

· 基础研究 ·

羧甲司坦对慢性气道炎症大鼠肺组织中 PI3K/AKT 和 γ -GCS 表达的影响

李国吾, 夏熙郑[△], 刘待见

(郑州大学第二附属医院呼吸内科, 郑州 450014)

摘要:目的 观察羧甲司坦对慢性气道炎症大鼠肺组织中磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)和 γ -谷氨酰半胱氨酸合酶(γ -GCS)表达的影响。方法 将 30 只健康雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和羧甲司坦治疗组。模型组及羧甲司坦治疗组大鼠用气管内注入脂多糖和熏香烟法制成慢性气道炎症大鼠模型,羧甲司坦治疗组大鼠在第 17~30 天吸烟前 30 min 给予羧甲司坦(500 mg/kg)灌胃。计数各组大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞,观察肺组织的病理变化;用免疫组织化学检测肺组织 γ -GCS 及磷酸化 AKT (p-AKT)的表达水平;用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 PI3K mRNA、 γ -GCS mRNA 的表达。结果 与模型组比较,羧甲司坦治疗组大鼠支气管、肺组织中炎症浸润及 BALF 中中性粒细胞数明显降低($P < 0.05$),p-AKT 蛋白、 γ -GCS 蛋白、PI3K mRNA 及 γ -GCS mRNA 的表达明显降低($P < 0.05$),谷胱甘肽(GSH)、活性氧(ROS)含量明显减少,总抗氧化能力明显上升($P < 0.05$)。结论 羧甲司坦可能通过 PI3K/AKT 通路促进 γ -GCS 蛋白的表达,减轻被动吸烟大鼠肺部的炎症和氧化应激。

关键词:磷脂酰肌醇-3-激酶;蛋白激酶类;谷胱甘肽;羧甲司坦;气道炎症

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.08.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)08-0772-03

Effects of carbocisteine on PI3K/AKT and γ -GCS expression in lung tissue of rats with chronic airway inflammation

Li Guowu, Xia Xizheng[△], Liu Daijian

(Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital to Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China)

Abstract: Objective To observe effects of carbocisteine on phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K)/protein kinase B(AKT) and γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) expression in lung tissue of rats with chronic airway inflammation. **Methods** 30 healthy male SD rats were randomly divided into control group, model group and carbocisteine treatment group. Intratracheal instillation of lipopolysaccharide and cigarette smoking were resorted to establish rat models of chronic airway inflammation in model group and carbocisteine treatment group. Rats in carbocisteine treatment group were subjected to gastric irrigation with carbocisteine (500 mg/kg) 30 minutes before smoking from day 17 to day 30. Cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats in each group were counted, pathological changes of lung tissue were observed, immunohistochemical detection was adopted to detect the expression levels of γ -GCS and phosphorylated AKT (p-AKT) and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to detect the expression of PI3K mRNA and γ -GCS mRNA. **Results** Compared with model group, inflammatory infiltration in bronchial and lung tissue and neutrophils in BALF of rats in carbocisteine treatment group were significantly lessened ($P < 0.05$), their p-AKT protein, γ -GCS protein, PI3K mRNA and γ -GCS mRNA expression were markedly decreased ($P < 0.05$), and the contents of glutathione(GSH), reactive oxygen species(ROS) were obviously reduced, while that of total antioxidative capability significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Carbocisteine probably reduces the inflammation and oxidative stress in lung of rats suffering from passive smoking through improving the expression of γ -GCS protein via PI3K/AKT pathway.

Key words: phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinases; glutathione; carbocisteine; airway inflammation

氧化-抗氧化失衡是慢性气道炎症的主要发病机制之一^[1]。谷胱甘肽(glutathione, GSH)是体内重要的抗氧化剂,在保护气道上皮细胞完整性、抵御肺部损伤与抗炎等方面发挥重要的作用^[2]。 γ -谷氨酰半胱氨酸合酶(γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS)是 GSH 合成的限速酶,对 GSH 生成的速度和量具有调控作用^[3]。最新发现磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)通路可能调控 γ -GCS 的表达^[4]。羧甲司坦是经典的黏痰溶解剂,最新的体外研究证实其具有抗氧化作用,但其具体的作用机制尚不清楚^[5]。本实验旨在探讨羧甲司坦对 PI3K/AKT 通路及 γ -GCS 表达的影响,研究其抗氧化的作用机制。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂 羧甲司坦片为广州白云山制药股份有限公司

产品,脂多糖试剂购自美国 Sigma 公司,还原型 GSH 测试盒购自南京建成生物工程研究所,兔抗磷酸化 AKT(phosphorylated AKT, p-AKT)、 γ -GCS 多克隆抗体为美国 Santa cruz 公司产品,通用型 SP 系列工作液试剂盒(SP-9000)购自北京中杉生物工程公司,逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)测试盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 实验动物分组及模型制备 清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 30 只(郑州大学实验动物中心),平均体质量(190.0 \pm 10.0)g,按随机数字表法分为 3 组,每组 10 只。本实验采用国内通用方法^[6]:(1)模型组:第 1、16 天,大鼠用 10% 水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉后,将脂多糖(1 mg/mL) 200 μ L 注入气管内;在第 2~15 天、第 17~30 天将大鼠置入自

[△] 通讯作者, Tel:13949011349; E-mail:xiaxizheng@126.com.

制密闭箱内被动吸红旗渠牌香烟(每支含尼古丁 1 mg,焦油 10 mg),烟雾浓度约 5%(v/v),每天 2 次,每次约 1 h;第 17~30 天上午吸烟前 30 min 予生理盐水 1.5 mL 灌胃。(2)羧甲司坦治疗组:脂多糖处理及烟熏同模型组;第 17~30 天上午吸烟前 30 min 给予羧甲司坦 500 mg/kg 灌胃。(3)对照组:正常饲养,第 1、16 天用 10%水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉,气管内注入生理盐水 200 μ L,第 17~30 天给予生理盐水 1.5 mL 灌胃。所有大鼠均在第 31 天用 10%水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉,颈动脉放血处死,行肺泡灌洗,留取实验标本。

1.3 实验方法

1.3.1 支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)的涂片计数 颈动脉放血处死大鼠,开胸分离出气管及肺组织,结扎右主支气管,在气管中上 1/3 环状软骨处离断,将静脉套管顺气管方向插至左侧肺门处并固定,用生理盐水 3 mL 注入左肺,停顿 30 s 后回抽,反复 3 次,BALF 回收率约 80%,将 BALF 行涂片细胞分类计数。

1.3.2 肺组织病理学观察及组织标本的保存 取左侧肺组织,用 4%甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木素-伊红染色后光学显微镜观察。切取右下肺,将其浸入 4%多聚甲醛固定后用于免疫组织化学检测;其余右肺迅速置于液氮,-80 $^{\circ}$ C 保存,用于 GSH、活性氧(reactive oxygen species,ROS)、总抗氧化能力(total antioxidative capability, T-AOC)和 RT-PCR 检测。

1.3.3 肺组织 p-AKT 及 γ -GCS 的免疫组织化学检测 采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)法检测 p-AKT 蛋白及 γ -GCS 蛋白的表达。取 4%多聚甲醛固定的右下肺组织,石蜡包埋切片,脱蜡至水,抗原修复,加山羊血清封闭,先后加入第一、二抗体,二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色,苏木素复染后脱水封片。细胞核出现棕黄或棕褐色为阳性。使用 Biosens Digital Imaging System(V1.6)图像分析系统检测图像中阳性区平均积分光密度。

1.3.4 肺组织 PI3K mRNA 及 γ -GCS mRNA 的 RT-PCR 检测 将待检肺组织取出后在液氮下研磨,加入 1 mL Trizol 试剂抽提 RNA, RNA 纯度、含量及完整性的检测和 RT-PCR 操作步骤均依照文献进行。PI3K mRNA 上游引物:5'-AGA TGA GGT GAG GAA CGA AGA A-3',下游引物:5'-AGG AGG AAG CGG TGG TCT A-3',扩增片段为 480 bp; γ -GCS

mRNA 上游引物:5'-AGA TGA TAG AAC ACG GGA GG-3',下游引物:5'-CAC AAA TAC CAC ATA GGC AGA-3',扩增片段为 424 bp; β -actin 上游引物为:5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3',下游引物为:5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC TA-3',扩增产物为 318 bp。扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后,置于暗箱式紫外透射仪中成像,软件分析计算灰度值。

1.3.5 肺组织 GSH、ROS 及 T-AOC 含量的检测 取右肺组织用比色法按试剂盒操作说明书测定 GSH、ROS 及 T-AOC 的含量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 BALF 中炎症细胞的表达 模型组大鼠 BALF 中细胞总数较对照组明显增多($P < 0.05$),其中以中性粒细胞增多为主。羧甲司坦治疗组细胞总数较模型组明显降低($P < 0.05$),但较对照组明显增多($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 肺组织病理学改变 对照组大鼠气道上皮细胞完整,肺组织结构正常;模型组上皮细胞脱落、坏死严重,可见大量炎症细胞浸润;羧甲司坦治疗组上皮细胞脱落、坏死及炎症细胞浸润较模型组减轻。

2.3 肺组织中 p-AKT 蛋白及 γ -GCS 蛋白的表达 模型组大鼠肺组织中 p-AKT 蛋白及 γ -GCS 蛋白的表达明显高于羧甲司坦治疗组和对照组($P < 0.05$),羧甲司坦治疗组大鼠肺组织中 p-AKT 蛋白及 γ -GCS 蛋白的表达明显高于对照组($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 PI3K mRNA 及 γ -GCS mRNA 表达 RT-PCR 显示,模型组 PI3K mRNA 及 γ -GCS mRNA 表达明显高于羧甲司坦治疗组和对照组($P < 0.05$),且羧甲司坦治疗组 PI3K mRNA 及 γ -GCS mRNA 表达明显高于对照组($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

2.5 肺组织中 GSH、ROS 及 T-AOC 的含量 与对照组比较,模型组及羧甲司坦治疗组大鼠肺组织 GSH 及 ROS 含量均增加,ROS 的增加尤为明显,而 T-AOC 含量显著降低($P < 0.05$)。提示模型组和羧甲司坦治疗组的 GSH 的增加不足以抵抗 ROS 的增加,存在氧化-抗氧化失衡。见表 3。

表 1 各组大鼠 BALF 细胞总数及分类 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞总数($\times 10^5$ /mL)	细胞分类(%)		
		单核-巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
对照组	1.65 \pm 0.38	81.13 \pm 2.58	13.21 \pm 1.76	5.66 \pm 0.91
模型组	7.32 \pm 0.77*	65.15 \pm 4.85*	30.43 \pm 4.54*	4.42 \pm 1.19*
羧甲司坦治疗组	4.20 \pm 0.61*#	78.15 \pm 5.41*#	16.14 \pm 3.94*#	5.71 \pm 2.37*#

*: $P < 0.05$,与对照组比较;#: $P < 0.05$,与模型组比较。

表 2 各组大鼠肺组织 p-AKT 蛋白、 γ -GCS 蛋白、PI3K mRNA 及 γ -GCS mRNA 的表达

组别	p-AKT 蛋白	γ -GCS 蛋白	γ -GCS mRNA	PI3K mRNA
对照组	106.64 \pm 5.91	113.87 \pm 3.49	0.15 \pm 0.02	0.45 \pm 0.07
模型组	151.33 \pm 11.09*	145.09 \pm 9.58*	0.45 \pm 0.05*	1.17 \pm 0.11*
羧甲司坦治疗组	130.48 \pm 4.86*#	126.51 \pm 4.76*#	0.21 \pm 0.04*#	0.87 \pm 0.09*#

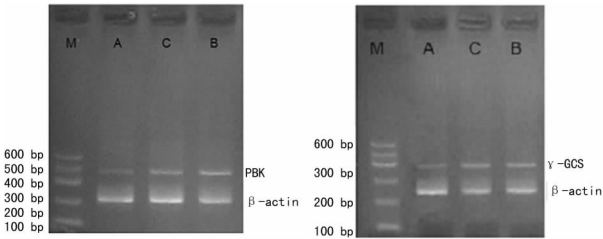
*: $P < 0.05$,与对照组比较;#: $P < 0.05$,与模型组比较。

2.6 p-AKT 与 γ -GCS 蛋白及 γ -GCS mRNA 的相关性 慢性气道炎症大鼠肺组织中 p-AKT 与 γ -GCS 蛋白及 γ -GCS mRNA 的表达均呈显著性正相关 ($r=0.812, r=0.741; P<0.01$)。

表 3 各组大鼠肺组织 GSH、ROS 及 T-AOC 的含量

组别	GSH (mg/mg prot)	ROS (U/mg prot)	T-AOC (U/mg prot)
对照组	13.36±3.81	7.15±1.78	1.45±0.39
模型组	29.48±5.37*	27.59±4.61*	0.63±0.27*
羧甲司坦治疗组	20.73±4.46*#	14.92±3.34*#	0.94±0.35*#

*: $P<0.05$, 与对照组比较; #: $P<0.05$, 与模型组比较。



M: Marker; A: 对照组; B: 模型组; C: 羧甲司坦治疗组。

图 1 大鼠肺组织 PI3K mRNA 及 γ -GCS mRNA 的表达

3 讨论

炎症和氧化-抗氧化失衡是慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) 的重要的发病机制^[7]。本实验显示,模型组 BALF 中细胞总数、中性粒细胞数明显增加,肺组织炎症细胞浸润明显,支气管黏膜排列紊乱;与对照组比较,模型组大鼠肺组织中 GSH、ROS 含量均增高,前者增高的程度低于后者;而 T-AOC 显著降低,表明模型组肺组织中存在炎症和氧化-抗氧化失衡。

本实验显示,模型组大鼠肺组织中 p-AKT 蛋白、 γ -GCS 蛋白、PI3K mRNA 及 γ -GCS mRNA 的表达水平均较对照组明显提高,提示慢性气道炎症大鼠肺组织中存在氧化应激反应,相关性分析显示 p-AKT 与 γ -GCS 蛋白及 γ -GCS mRNA 的表达呈正相关,说明 PI3K/AKT 的信号通路途径可能参与调节 γ -GCS 的表达。 γ -GCS 是 GSH 合成的限速酶, γ -GCS 的高表达促进 GSH 合成增加,从而参与局部抗氧化作用。Li 等^[8]在研究中发现 PI3K 的抑制剂 LY294002 能阻止 GSH 的上调。Arisawa 等^[9]研究证明 PI3K/AKT 通路经过熊去氧胆酸活化后可促进红系衍生的核因子 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 核转位,从而调控 γ -GCS 的表达。Martin 等^[10]也发现,PI3K 可能激活一些有助于增加 Nrf2 蛋白水平的稳定蛋白的转录。实验结果提示 PI3K/AKT 信号通路通过增加 Nrf2 上游调控激酶的表达促进 Nrf2 核转位,从而提高 γ -GCS 的表达水平,进而增加 GSH 的合成。

羧甲司坦是经典的黏痰溶解药物,它可以裂解二硫键,改善痰的黏滞性^[11]。最新研究表明,因其分子结构中含有较高的巯基(-SH),可能具有抗感染、抗氧化应激作用^[12-13]。本实验通过早期应用羧甲司坦干预被动吸烟大鼠慢性气道炎症来观察其作用。羧甲司坦治疗组大鼠 BALF 中细胞总数较模型组有所降低,中性粒细胞数也显著减少。肺组织病理学检测显示,羧甲司坦治疗组支气管黏膜上皮结构排列混乱、中性粒细胞浸润均较模型组有所减轻,说明羧甲司坦治疗组气道炎症有

所减轻。羧甲司坦治疗组的 PI3K mRNA、p-AKT 蛋白及 γ -GCS 蛋白的表达水平均较模型组降低,GSH、ROS 含量也较模型组有所降低,且 ROS 降低较为明显,T-AOC 也显著升高,说明羧甲司坦治疗组氧化-抗氧化失衡有所改善。综上所述,提示羧甲司坦具有抗感染、抗氧化作用。Yasuda 等^[14]临床研究也表明羧甲司坦在抗氧化、减轻系统性炎症等方面发挥重要作用。国内 22 个多中心的 PEACE 临床研究表明羧甲司坦可使 COPD 急性发作率降低 24.5%,其确切机制尚不清楚^[12]。最新的体外研究证实羧甲司坦可通过清除 ROS 发挥抗氧化作用^[15]。这与本实验结果一致,即羧甲司坦可减轻被动吸烟大鼠肺部的炎症和氧化应激。

总之,本研究表明 PI3K/AKT 信号通路可参与对抗氧化基因 γ -GCS 的调控,其可能机制为被动吸烟消耗抗氧化物 GSH,造成氧化-抗氧化失衡,同时又激活 PI3K/AKT 信号通路,增加 Nrf2 上游的调控蛋白的表达,引起 Nrf2 核转位,后者与 γ -GCS 基因启动子上相应位点结合,启动 γ -GCS mRNA 的转录,提高 γ -GCS 的含量,从而增加 GSH 的合成,对抗氧化应激,改善氧化-抗氧化失衡。本实验进一步证明了羧甲司坦具有减轻炎症细胞浸润,清除 ROS,发挥抗感染、抗氧化的作用,为羧甲司坦的临床应用提供了依据。

参考文献:

- [1] Cavalcante AG, de Bruin PF. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives [J]. *Bras Pneumol*, 2009, 35(12): 1227-1237.
- [2] 施焕中. 慢性阻塞性肺疾病 [M]. 北京: 人民出版社, 2006: 145-150.
- [3] 韩玲, 徐建英. γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶在慢性阻塞性肺疾病中的作用 [J]. *国外医学内科学分册*, 2006, 33(8): 343-345.
- [4] 江刚, 戴爱国, 胡瑞成. Nrf2 调控 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶表达与慢性阻塞性肺疾病 [J]. *国际呼吸杂志*, 2007, 27(4): 265-269.
- [5] Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, et al. Exhaled Interleukine-6 and 8-isoprostane in chronic obstructive pulmonary disease: effect of carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-Lys) [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 505(1/3): 169-175.
- [6] 庞宝森, 李远红, 张洪玉. 慢性阻塞性肺疾病动物模型的研究进展 [J]. *心肺血管病杂志*, 2005, 24(1): 45-46.
- [7] 姚婉贞, 徐永健, 冯玉麟, 等. 慢性阻塞性肺疾病 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2007.
- [8] Li SM, Xun L, Rozanski GJ. Regulation of glutathione in cardiac myocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(9): 1145-1152.
- [9] Arisawa S, Ishida K, Kameyama N, et al. Ursodeoxycholic acid induces glutathione synthesis through activation of PI3K/Akt pathway in HepG2 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(5): 858-866.
- [10] Martin D, Rojo AI, Marta S, et al. Regulation of Heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10): 8919-8929. (下转第 778 页)

- dant systems in epileptic patients[J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 96(4):465-473.
- [8] Armutcu F, Ozerol E, Gurel A, et al. Effect of long-term therapy with sodium valproate on nail and serum trace element status in epileptic children[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2004, 102(1/3):1-10.
- [9] Cohen-Kfir E, Lee W, Eskandari S, et al. Zinc inhibition of gamma-aminobutyric acid transporter 4 (GAT4) reveals a link between excitatory and inhibitory neurotransmission[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(17):6154-6159.
- [10] Ribeiro MG, Pedrenho AR, Hassón-Voloch A. Electrocyte (Na⁺), K⁺)ATPase inhibition induced by zinc is reverted by dithiothreitol[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34(5):516-524.
- [11] Koh JY, Suh SW, Gwag BJ, et al. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia[J]. *Science*, 1996, 272(5264):1013-1016.
- [12] Yokoyama M, Koh J, Choi DW. Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons[J]. *Neurosci Lett*, 1986, 71(3):351-355.
- [13] Bilevicius E, Yasuda CL, Silva MS, et al. Antiepileptic drug response in temporal lobe epilepsy: a clinical and MRI morphometry study[J]. *Neurology*, 2010, 75(19):1695-1701.
- [14] Wang L, Liu G, He M, et al. Increased insulin receptor expression in anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy[J]. *J Neurol Sci*, 2010, 296(1/2):64-68.
- [15] Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, et al. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death[J]. *Bio-metals*, 2001, 14(3/4):315-330.
- [16] Zhou Z, Wang L, Song Z, et al. Zinc supplementation prevents alcoholic liver injury in mice through attenuation of oxidative stress[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(6):1681-1690.
- [17] Hauer J, Püschner S, Ramakrishnan P, et al. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(8):2874-2879.
- [18] Mao AP, Li S, Zhong B, et al. Virus-triggered ubiquitination of TRAF3/6 by cIAP1/2 is essential for induction of interferon-beta (IFN-beta) and cellular antiviral response[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(13):9470-9476.
- [19] Purity MK, Wang WL, Wolf LV, et al. Rybp, a polycomb complex-associated protein, is required for mouse eye development[J]. *BMC Dev Biol*, 2007, 7:39.
- [20] Collart MA, Timmers HT. The eukaryotic Ccr4-not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways[J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2004, 77:289-322.
- [21] Albert TK, Hanzawa H, Legtenberg YI, et al. Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex[J]. *EMBO J*, 2002, 21(3):355-364.
- [22] Mulder KW, Brenkman AB, Inagaki A, et al. Regulation of histone H3K4 tri-methylation and PAF complex recruitment by the Ccr4-Not complex[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(7):2428-2439.
- [23] Zhao Y, Brummer D. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(8):1535-1541.
- [24] Neira JL, Román-Trufero M, Contreras LM, et al. The transcriptional repressor RYBP is a natively unfolded protein which folds upon binding to DNA[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(6):1348-1360.
- [25] Ianzano L, Zhang J, Chan EM, et al. Lafora progressive Myoclonus Epilepsy mutation database-EPM2A and NHLRC1 (EPM2B) genes[J]. *Hum Mutat*, 2005, 26(4):397.
- [26] Espinosa-Parrilla Y, Encha-Razavi F, Attié-Bitach T, et al. Molecular screening of the ZFX1B gene in prenatally diagnosed isolated agenesis of the corpus callosum[J]. *Prenat Diagn*, 2004, 24(4):298-301.
- [27] Lower KM, Turner G, Kerr BA, et al. Mutations in PHF6 are associated with Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome[J]. *Nat Genet*, 2002, 32(4):661-665.

(收稿日期:2011-09-12 修回日期:2011-10-18)

(上接第 774 页)

- [11] Steventon GB, Mitchell SC. The sulphoxidation of S-carboxymethyl-L-cysteine in COPD[J]. *Eur Respir J*, 2006, 27(4):865-866.
- [12] Zheng JP, Kang J, Huang SG, et al. Effect of carbocysteine on acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (PEACE Study): a randomised placebo-controlled study[J]. *Lancet*, 2008, 371(9629):2013-2018.
- [13] Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, et al. A phase II study with antioxidants, both in the diet and supplemented, pharmaconutritional support, progestagen, and anti-cyclooxygenase-2 showing efficacy and safety in patients with cancer-related anorexia/cachexia and oxidative stress[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(5):1030-1034.
- [14] Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, et al. Carbocysteine reduces frequency of common colds and exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2006, 54(2):378-380.
- [15] Nogawa H, Ishibashi Y, Ogawa A, et al. Carbocysteine can scavenge reactive Oxygen species in vitro[J]. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 2009, 14(1):53-59.

(收稿日期:2011-11-19 修回日期:2011-12-27)