

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.19.014

B7 同源体 3 上调肺炎链球菌脑膜炎小鼠 NSE 和 S100b mRNA 的表达*

王延平¹, 陈旭勤^{1△}, 王浙东¹, 张兵兵¹, 傅丰庆², 李岩^{1▲}

(1. 苏州大学附属儿童医院神经内科, 江苏苏州 215003; 2. 苏州大学医学生物技术研究所, 江苏苏州 215004)

摘要:目的 探讨 B7 同源体 3(B7H3)对肺炎链球菌(SP)脑膜炎引起的脑损伤作用。方法 以 BALB/C 小鼠为研究对象,通过侧脑室注射建立 SP 脑膜炎动物模型,48 只实验动物被分为 4 组:生理盐水组(CON 组),B7H3 蛋白组(B7H3 组),SP 组,SP+B7H3 组。术后 18、48、72 h,小鼠被行神经行为学评分,麻醉后颈椎脱臼处死,冰上断头取脑,制备脑组织匀浆,运用实时-PCR 法,检测神经元特异性烯醇化酶(NSE)、S100b mRNA 的表达。结果 B7H3 组的神经行为学评分与 CON 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);SP 组明显低于 CON 组($P<0.05$);SP+B7H3 组较 SP 组更进一步降低($P<0.05$)。B7H3 组和 CON 组的 NSE、S100b mRNA 相对表达量差异无统计学意义($P>0.05$);不同时间点 SP 组 NSE、S100b mRNA 相对表达量高于 CON 组($P<0.05$);SP+B7H3 组 NSE、S100b mRNA 相对表达量与 SP 组比较,各时间点更进一步升高($P<0.05$)。结论 B7H3 在 SP 诱导的小鼠脑膜炎中,上调 NSE、S100b 的基因表达,促进了脑膜炎病情的进展。

关键词:脑膜炎,肺炎球菌性;脑损伤;B7 同源体 3;神经元特异性烯醇化酶;S100b

中图分类号:R72

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)19-2437-03

B7H3 upregulates neuron-specific enolase and S100b mRNA expression in mice with *S. Pneumoniae meningitis**Wang Yanping¹, Chen Xuqin^{1△}, Wang Zhedong¹, Zhang Bingbing¹, Fu Fengqing², Li Yan^{1▲}

(1. Department of Neurology, Children's Hospital Affiliated to Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215003, China;

2. Institute of Medical Biotechnology, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215004, China.)

Abstract: Objective To investigate the effect of B7 Homology 3(B7H3) on brain damage of *S. Pneumococcal*(SP) meningitis. **Methods** SP meningitis was established by intracerebral ventricular injection of SP suspension on wild-type BALB/C mice. 48 mice were divided into 4 groups and received following injections: NS(CON group), recombinant murine B7H3 alone(B7H3 group), SP group, SP+B7H3 group. At 18, 48, 72 h post infection, mice were conducted neurobehavior score, then they were anesthetized and killed by cervical vertebra dislocation, brains were collected. The mRNA expressions of NSE and S100b were detected by real-time PCR. **Results** Compared with CON group, the scores of recombinant murine B7H3 group had no significant change at 18, 48, 72 h after infection of SP($P>0.05$); at different time points the scores of SP group were decreased significantly than the CON group ($P<0.05$); scores of SP+B7H3 group decreased furtherly than SP group($P<0.05$). The relative expressions of NSE, S100b mRNA in brain tissue homogenate; for the NSE, S100b mRNA relative expressions, there was no significant difference between B7H3 and CON group at 18, 48, 72 h post SP injection($P>0.05$). At 18h, 48h, 72h, post infection mRNA expressions of NSE, S100b in SP group increased compared with CON group($P<0.05$); the mRNA expressions of NSE, S100b increased furtherly in SP+B7H3 group compared with SP group($P<0.05$). **Conclusion** B7H3 upregulates the mRNA expressions of NSE and S100b, and promotes the progress of SP meningitis in mice.

Key words: meningitis, pneumococcal; brain injuries; B7H3; neuron-specific enolase; S100b

肺炎链球菌(*streptococcus pneumococcal*, SP)是引起化脓性脑膜炎最常见的革兰阳性细菌之一^[1]。在能引起神经系统后遗症的中枢神经系统疾病中,SP 脑膜炎是最复杂,最严重的^[2]。通过正规的抗菌药物、激素及支持治疗后,SP 脑膜炎仍有高达 25% 的致死率,约 50% 的存活者遗留神经系统后遗症^[2],多表现为智力低下、惊厥发作、听力损害、感觉障碍和运动发育落后等^[3]。因此,进一步研究细菌性脑膜炎的免疫病理机制,对治疗和改善细菌性脑膜炎预后意义重大。B7 同源体 3(B7H3)是 B7 协同刺激分子家族的新成员,它不仅在 T 细胞介导的免疫调控中扮演者多种角色而且与 SP 脑膜炎的固有免疫应答有关^[4]。神经元特异性烯醇化酶(NSE)是反映脑损伤的标志物^[5],S100b 蛋白约 96% 存在于脑内,绝大部分分布

于神经胶质细胞中,是反映脑组织损伤的标志蛋白^[6]。作者的前期研究发现,在确诊细菌性脑膜炎患者的脑脊液中,B7H3 的表达显著升高^[7],并且在小鼠 SP 脑膜炎中,证实了 B7H3 是通过 TLR-2 机制增强了脑内炎症反应,并且加剧了血脑屏障的破坏^[4]。本研究是在既往实验的基础上,通过观察 B7H3 对 SP 脑膜炎小鼠的临床症状以及检测脑损伤标志物 NSE 和 S100b 的基因表达的作用,进一步分析 B7H3 对 SP 脑膜炎中脑损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物: BALB/C 小鼠共 48 只,由上海实验动物中心(斯克莱公司)提供。试剂: SP3 型购自 American Tissue Cell Culture Collection(ATCC, Manassas, VA),菌号:

ATCC 6303;mB7H3 蛋白购自美国 R&D 公司;NSE、S100b 和 β -actin 三对引物均由上海博亚(英骏)有限公司设计;Trizol 试剂购自上海博亚(英骏)有限公司;Prime Script RT reagent kit Perfect Real Time 试剂盒、SYBR Premix Ex TaqII(Perfect Real Time) 试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;RNeasy Mini Kit 购自凯杰生物技术(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将 48 只 BALB/C 小鼠分为 4 组,每组 12 只。生理盐水组(CON 组)定位后向侧脑室注入 15 μ L 0.9% 氯化钠,B7H3 蛋白组(B7H3 组)定位后向侧脑室注入 10 μ L 浓度为 0.33 μ g/ μ L 的 B7H3 蛋白+5 μ L 0.9%氯化钠,SP 组定位后向侧脑室注入 10 μ L 0.9%氯化钠+5 μ L 浓度为 1.5×10^4 cfu/mL,SP+B7H3 组。以上各实验组小鼠按处死时间分为 18 h 组、48 h 组、72 h 组,术后置于室温 20~25 $^{\circ}$ C,光线明、暗各 12 h,自由饮食饲养。

1.2.2 细菌与化脓性脑膜炎的制备 将菌种 ATCC 6303 接种于血琼脂糖固体培养基上,置于 37 $^{\circ}$ C、5%的 CO_2 培养箱中过夜。挑取单个菌落,接种于含有 15 mL 脑心浸液的 50 mL 的离心管中,倾斜插入 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中,以 240 r/min 转速摇过夜;取 350 μ L 细菌悬液接种于脑心浸液中,240 r/min 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床培养 6~8 h,此时细菌生长至对数生长期,收菌,3 000 r/min 离心 20 min,离心后在管底可见乳白色沉淀,弃上清液,取 10 mL 无菌的 PBS 冲洗细菌沉淀;再同前离心 1 次,弃上清液后用无菌 PBS 10 mL 重悬沉淀,充分吹打混匀后,取 100 μ L,仍用无菌 PBS 进行倍比稀释余下细菌离心,将只含有细菌沉淀的离心管用封口膜封住放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用;倍比稀释后的细菌各取 100 μ L 进行涂板,置于 37 $^{\circ}$ C、5%的 CO_2 培养箱中培养;24 h 后计数血平板上的菌落,计算保存备用的细菌总数。在制作化脓性脑膜炎时,用 0.9%氯化钠稀释备用细菌沉淀,制成浓度为 1.5×10^4 cfu/mL 的 SP 悬液。

小鼠脑膜炎模型采用改进的 Diab 的侧脑室注射法^[8],先用麻醉剂戊巴比妥钠(浓度 1.0%) 60 mg/kg,腹腔注射诱导深度麻醉,然后俯卧位固定小鼠,在小鼠头正中沿矢状位做一个长 1.5 cm 左右的切口,暴露颅骨结构,可见各额、顶骨结构界限,准确定位:前凶后约 0.5 mm,中线右旁开 1.0 mm 为进针处,垂直深度为 2.5~3.0 mm,然后将 15 μ L 的细菌悬液(1.5×10^4 cfu/mL)在约 2 min 内缓慢、匀速地注入侧脑室,留置针头于颅内 1 min 后缓慢拔出(控制好注入速度和退针速度,以防由于速度过快引起的颅内压急剧升高和退针过快注入的液体外溢而影响注入侧脑室的液体量)。为证实定位准确,按以上定位方法向侧脑室内注射蓝黑墨水,3~5 min 后颈椎脱臼处死,解剖脑部结构,可见蓝黑色墨水已通过脑脊液迅速扩散至脊髓腔颅底窝小脑延髓池双侧侧脑室。

1.2.3 神经行为学评分 在 18、48、72 h 时分别对各组小鼠($n=4$)进行神经行为学评分,评分标准采用 Loeffler 的神经行为学 5 分制评分方法^[9]。5 分:抓住背部时能正常活动,在 5 s 内翻身成功;4 分:自主运动减少,5 s 内能翻身;3 分:翻身可以成功,但时间超过 5 s;2 分:不能翻身;1 分:不能运动;0 分:死亡。

1.2.4 实时-PCR 侧脑室注射后 18、48、72 h,将各组小鼠($n=4$)用 1%戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉,快速颈椎脱臼处死,在冰块上断头,将脑组织迅速放入液氮中快速冻。待行实时-PCR 检测。采用 TRIZOL 抽提法提取小鼠脑组织匀浆中的总 RNA,抽提的总 RNA,使用 RNeasy Mini Kit 进

行纯化,操作步骤严格按照说明书进行,取纯化后的 RNA 500 ng 进行逆转录,逆转录操作步骤按照 Prime Script RT reagent kit Perfect Real Time 执行,逆转录条件如下:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s。特异性引物如下:NSE 上游引物 5'-TCA TTC TCC TGG AGC CTC TT-3',下游引物 5'-AAG AGC AGA GAG AGC AAG G-G-3';S100b 上游引物 5'-TGC CCT CAT TGA TGT CTT CCA-3',下游引物 5'-GAG AGA GCT CGT TGT TGA TAA GCT-3'; β -actin 上游引物,5'-GGT CAT CAC TAT TGG CAA CG-3',下游引物 5'-ACG GAT GTC AAC GTC ACA CT-3'。实时-PCR 的操作按照 SYBR Premix Ex TaqII(Perfect Real Time) 的说明书进行,反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 30 s 1 个循环,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 15 min 1 个循环。

1.2.5 NSE、S100b mRNA 的相对表达量的计算 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 mRNA 的相对量,以 β -actin 基因为内参基因,对 NSE、S100b mRNA 进行均一化处理,利用荧光阈值(Ct 值)计算 NSE、S100b mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS18.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据作正态性 W 检验和方差齐性 Levene 检验;满足条件者多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验;不满足条件者采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

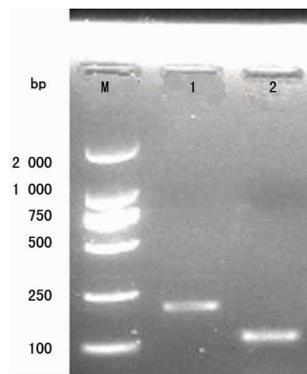
2.1 B7H3 对小鼠神经行为学评分的影响 各时点 B7H3 组神经行为学评分与 CON 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);不同时间点 SP 组较 CON 组降低($P < 0.05$);SP+B7H3 组与 SP 组比较,评分进一步降低($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组小鼠不同时间点神经行为评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	18 h	48 h	72 h
CON 组	4	5.000 \pm 0.000 ^a	5.000 \pm 0.000 ^a	5.000 \pm 0.000 ^a
B7H3 组	4	5.000 \pm 0.000 ^a	5.000 \pm 0.000 ^a	5.000 \pm 0.000 ^a
SP 组	4	4.500 \pm 0.577 ^b	3.500 \pm 0.577 ^b	2.750 \pm 0.500 ^b
SP+B7H3 组	4	4.000 \pm 0.000	3.000 \pm 0.000	1.750 \pm 0.500

^a: $P < 0.05$,与 SP 组比较;^b: $P < 0.05$,与 SP+B7H3 组比较。

2.2 实时-PCR 特异性产物 实时-PCR 产物具有高度特异性,电泳条带如图 2。



M:DNA 标记物;1:NSE 特异性产物;2:S100b 的特异性产物。

图 2 实时-PCR 特异性产物

2.3 B7H3 对脑膜炎时脑损伤标志物 NSE、S100b mRNA 相对表达量的影响 在细菌注射后 18、48、72 h,B7H3 组与 CON 组比较,NSE、S100b mRNA 相对表达量差异无统计学意义

($P > 0.05$); 不同时间点 SP 组 NSE、S100b mRNA 相对表达量较 CON 组明显升高 ($P < 0.05$); 各时间点 SP+B7H3 组 NSE、S100b mRNA 相对表达量较 SP 组进一步升高 ($P < 0.05$)。见表 2、3。

表 2 4 组小鼠各时间点脑组织 NSE mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	18 h	48 h	72 h
CON 组	4	0.028 ± 0.006 ^a	0.028 ± 0.003 ^a	0.028 ± 0.001 ^a
B7H3 组	4	0.052 ± 0.034	0.020 ± 0.001	0.036 ± 0.002
SP 组	4	0.095 ± 0.030 ^b	0.177 ± 0.021 ^b	0.369 ± 0.035 ^b
SP+B7H3 组	4	0.124 ± 0.049	0.330 ± 0.088	0.529 ± 0.020

^a: $P < 0.05$, 与 SP 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SP+B7H3 组比较。

表 3 4 组小鼠各时间点脑组织 S100b mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	18 h	48 h	72 h
CON 组	4	0.032 ± 0.006 ^a	0.029 ± 0.002 ^a	0.046 ± 0.002 ^a
B7H3 组	4	0.040 ± 0.018	0.029 ± 0.003	0.048 ± 0.001
SP 组	4	0.061 ± 0.057 ^b	0.185 ± 0.012 ^b	0.284 ± 0.008 ^b
SP+B7H3 组	4	0.148 ± 0.052	0.194 ± 0.018	1.620 ± 0.118

^a: $P < 0.05$, 与 SP 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SP+B7H3 组比较。

3 讨论

B7H3 是 B7 协同刺激分子家族的新成员, 作者的临床资料表明, 在确诊细菌性脑膜炎患者的脑脊液中, 相对于病毒性脑膜炎患儿可溶性 B7H3 的表达显著升高^[7], 推测 B7H3 蛋白在细菌性脑膜炎的病理、生理过程中发挥着重要作用。在本研究中, 通过侧脑室注射 SP 悬液建立 SP 脑膜炎小鼠模型, 并且选取术后 18、48、72 h 时间点动态观察脑膜炎的症状。本研究发现在侧脑室注射后 18 h, SP 组神经行为学评分较 CON 组降低, 说明实验组小鼠在细菌感染后 18 h 就已经出现了脑膜炎临床症状; 在细菌注射后 48、72 h 时, SP 组与 CON 组比较评分呈下降趋势, 表明随着时间的推移脑膜炎小鼠的病情逐步加重。SP 和 B7H3 蛋白的联合注射与 SP 单独注射相比, 神经行为学评分进一步下降, 表明在 SP 感染的前提下 B7H3 加剧了 SP 脑膜炎的病情进展。同时还发现 B7H3 蛋白单独注射小鼠的神经行为评分在各时间点均较 CON 组无变化, 表明 B7H3 蛋白本身对正常小鼠无影响, 这与作者最近的研究结果相符^[4]。

除临床症状外, 本研究中还运用了实时-PCR 技术检测脑组织匀浆中脑损伤标志物 NSE、S100b mRNA 的表达。NSE 是一种细胞质中的糖酵解酶, 是存在于神经元内的形式, 它是由 $\gamma\gamma$ 二聚体组成的, 相对分子质量为 78×10^3 , 半衰期为 24 h^[10], 它特异性存在于神经元尤其是中枢神经系统成熟的神经元内, 当神经元遭受各种应激状态时会将其释放^[11]。有研究表明, NSE 血清水平亦越高, 脑损伤的程度越重^[12]。S100b 蛋白是一种相对分子质量只有 21×10^3 的钙结合蛋白, 生物半衰期为 2 h, 它是由 $\beta\beta$ 组成的同源二聚体, 在中枢神经系统的星形胶质细胞中高表达并由它分泌^[13]。当 S100b 水平异常升高时, 它可以通过促炎症细胞因子的表达增加而产生有害影响促进细胞凋亡^[14]。亦有研究表明, S100b mRNA 在成年和老年小鼠的创伤性脑损伤中的表达是上调的^[15]。在本研究中, 实时-PCR 结果显示, 细菌接种后 18、48、72 h, SP 组小鼠 NSE、

S100b mRNA 相对表达量较 CON 组明显升高, 表明在基因水平, SP 感染诱导了小鼠脑组织中 NSE、S100b 的表达, SP+B7H3 组小鼠的 S100b mRNA 相对表达量较 SP 组更进一步升高, 而在 S100b、NSE mRNA 结果中均发现 B7H3 组和 CON 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结合 SP 脑膜炎小鼠的同步的神经行为学评分的动态观察, 本结果显示, 在脑膜炎的病情进展中, B7H3 在 SP 感染的基础上上调了 SP 脑膜炎小鼠脑损伤标志物 NSE、S100b 基因的表达。

综上所述, 本研究发现在 SP 脑膜炎小鼠中, B7H3 蛋白干预加剧了 SP 脑膜炎的临床症状, 并且对脑损伤标志物 NSE、S100b 的基因表达发挥了上调作用。因此, 可以认为协同刺激分子 B7H3 在细菌性脑膜炎引起的脑损伤可能发挥着积极作用。这一研究结论为 B7H3 作为细菌性脑膜炎干预治疗的潜在靶点提供了实验依据。深入探讨 B7H3 加剧 SP 脑膜炎脑损伤的信号机制, 正是作者后续研究中的主要内容。

参考文献:

- [1] Hoffmann O, Braun JS, Becker D, et al. TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage[J]. J Immunol, 2007, 178(10): 6476-6481.
- [2] Mook-kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, et al. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis[J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(3): 557-591.
- [3] Brouwer MC, Heckenberq SG, de Gans J, et al. Nationwide implementation of adjunctive dexamethasone therapy for pneumococcal meningitis [J]. Neurology, 2010, 75 (17): 1533-1539.
- [4] Chen X, Quinn EM, Ni H, et al. B7-H3 participates in the development of experimental pneumococcal meningitis by augmentation of the inflammatory response via a TLR2-Dependent mechanism[J]. Immunol, 2012, 189 (1): 347-355.
- [5] Soqut O, Guloglu C, Orak M, et al. Trauma scores and neuron-specific enolase, cytokine and C-reactive protein levels as predictors of mortality in patients with blunt head trauma[J]. Int Med Res, 2010, 38(5): 1708-1720.
- [6] 黄艳军, 郑幅, 晋光荣. TBOA 抑制谷氨酸转运体功能对戊四氮点燃癫痫模型的影响[J]. 实用医学杂志, 2009, 25 (19): 3199-3201.
- [7] Chen X, Zhang G, Li Y, et al. Circulating B7-H3(CD27 6) elevations in cerebrospinal fluid and plasma of children with bacterial meningitis[J]. Mol Neurosci, 2009, 37(1): 86-94.
- [8] Diab A, Zhu J, Lindquist L, et al. Haemophilus influenzae and streptococcus Pneumoniae induce different intracerebral mRNA cytokine patterns during the course of experimental bacterial meningitis[J]. Clin Exp Immunol, 1997, 109(2): 233-241.
- [9] Leib SL, Clements JM, Lindberg RL, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis[J]. Brain, 2001, 124(9): 1734-1742.
- [10] Pahlman S, Esscher T, Bergvall P, et al. Purification and characterization of human neuron-specific(下转第 2442 页)

现,氨基胍会引起蛋白非酶糖基化终产物(AGEs)增加,AGEs可以通过使 Bc-12/Bax 的比例降低以及 caspase3 的活化,从而引起毛细血管周细胞凋亡^[7-8]。同时,氨基胍作为一种 NOS 抑制剂,对 NOS 具有显著的抑制作用^[8-9],并有文献报道,氨基胍对 DR 的治疗作用与抑制 NOS 有关,但是其抑制作用是否具有 NOS 亚型选择作用目前并不清楚,需要进一步的研究证实^[9-10]。

DR 都会引起视网膜细胞的缺损,神经节细胞减少^[10-11],降低视网膜细胞的缺损,增加神经节细胞数量是治疗视网膜病变的主要目的。本研究发现,使用氨基胍的大鼠视网膜细胞缺损情况减轻,神经节细胞明显增多。说明氨基胍可以抑制糖尿病大鼠的视网膜病理性病变。

NOS 分为 iNOS、nNOS、eNOS 3 个亚型^[11-12],它们在体内起到不同的作用。研究发现,糖尿病大鼠视网膜中 iNOS mRNA 水平明显提高,iNOS 阳性细胞数也显著增多,且阳性细胞主要分布在 INL^[13]。有研究表明,在正常大鼠视网膜中,iNOS 免疫反应沉淀物主要出现在 INL 的 Müller 细胞中^[12-15],而此细胞是维系视网膜血管结构的重要的神经胶质细胞^[16]。由此可推测 iNOS 产生的过多的 NO 有可能对血管造成损伤。因此,抑制 iNOS 的表达可能对治疗 DR 具有一定的效果。本研究发现,氨基胍对 iNOS 的水平及表达具有显著的抑制作用,且具有选择性。

本研究证实了氨基胍可以改善 DR,且作用途径与选择性抑制 iNOS 有关。对于氨基胍参与多作用途径治疗糖尿病微血管病变提供了试验依据,同时,为研究和开发新型的治疗 DR 药物起到一定的指导作用。

参考文献:

- [1] Franklin SW, Rajan SE. An automated retinal imaging method for the early diagnosis of diabetic retinopathy[J]. *Technol Health Care*, 2013, 21(6): 557-569.
- [2] Oh E, Yoo TK, Park EC. Diabetic retinopathy risk prediction for fundus examination using sparse learning; a cross-sectional study[J]. *BMC Med Inform Decis Mak*, 2013, 13(1): 106-110.
- [3] 白双,于鑫,杜瑛培,等.枸杞多糖对 NMDA 致大鼠视网膜损伤保护作用的研究[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(5): 670-674.
- [4] 袁爱花,梅妍,周鸿鹰,等.一氧化氮合酶在糖尿病大鼠视网膜中表达模式的研究[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 27(4): 453-457.
- [5] 董娟,郎平,吴昌凡.一氧化氮和一氧化氮合酶基因多态

性与糖尿病视网膜病变[J]. *国际眼科杂志*, 2010, 10(11): 2144-2146.

- [6] Noonan JE, Jenkins AJ, Ma JX, et al. An update on the molecular actions of fenofibrate and its clinical effects on diabetic retinopathy and other microvascular end points in patients with diabetes[J]. *Diabetes*, 2013, 62(12): 3968-3975.
- [7] 杨宏伟,陈晓隆,卜立敏,等.细胞凋亡在 STZ 诱导糖尿病大鼠早期视网膜病变中的作用机制[J]. *眼科研究*, 2009, 27(6): 472-476.
- [8] Mishra A, Newman EA. Aminoguanidine reverses the loss of functional hyperemia in a rat model of diabetic retinopathy[J]. *Front Neuroenergetics*, 2012, 10(3): 10-15.
- [9] 张浩,咎金行,刘培勋.诱导型一氧化氮合酶抑制剂的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(6): 665-669.
- [10] 陈雪,周昌华,洪纓,等.保存期内红细胞内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达的变化[J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(2): 481-483.
- [11] Shazly AH, Mahmoud AM, Darwish NS. Potential prophylactic role of aminoguanidine in diabetic retinopathy and nephropathy in experimental animals[J]. *Acta Pharm*, 2009, 59(1): 67-73.
- [12] 周平,徐启革,姜洪翠,等.阿司匹林对高糖和高胰岛素诱导的血管平滑肌细胞内 iNOS 含量的影响[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2012, 32(2): 110-113.
- [13] Lopez-Costa JJ, Goldstein J, Saavedra JP. Neuronal and macrophagic nitric oxide synthase isoforms distribution in normal rat retina[J]. *Neurosci Lett*, 1997, 232(3): 155-158.
- [14] 崔海月.糖尿病视网膜病变发病机制研究[J]. *长春中医药大学学报*, 2013, 29(1): 95-97.
- [15] Agroiya P, Philip R, Saran S, et al. Association of serum lipids with diabetic retinopathy in type 2 diabetes[J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2013, 17 Suppl 1: S335-337.
- [16] Chen P, Ong RT, Tay WT, et al. A Study assessing the association of glycosylated hemoglobin A1C(HbA1C) associated variants with HbA1C, chronic kidney disease and diabetic retinopathy in populations of asian ancestry[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79767.

(收稿日期:2014-02-22 修回日期:2014-03-27)

(上接第 2439 页)

- enolase: radioimmunoassay development[J]. *Tumour Biol*, 1984, 5(2): 127-139.
- [11] Yardan T, Cevik Y, Donderici O, et al. Elevated serum S100B protein and neuron specific enolase levels in carbon monoxide poisoning[J]. *Am J Emerg Med*, 2009, 27(7): 838-842.
 - [12] 谷兴华,张供,张希全.血清蛋白 B 亚型和神经元特异性烯醇化酶对早期判断体外循环术后脑损伤的意义[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(14): 975-977.
 - [13] Donato R, Sorci G, Riuzzi F, et al. S100B's double life: in-

tracellular regulator and extracellular signal[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(6): 1008-1022.

- [14] Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, et al. S100B in brain damage and neuro-degeneration[J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 60(6): 614-632.
- [15] Sandhir R, Onyszchuk G, Berman NE. Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury[J]. *Exp Neurol*, 2008, 213(2): 372-380.

(收稿日期:2014-02-18 修回日期:2014-03-22)