

新癆片抗炎镇痛作用机制的蛋白组学研究

邸志权¹, 李昊丰², 冯 玥¹, 王春风³, 胡金芳^{1*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

3. 厦门中药厂有限公司, 福建 厦门 361100

摘要: **目的** 分析新癆片抗炎镇痛作用机制, 通过蛋白组学方法寻找其作用的蛋白靶点。**方法** 大鼠随机分成对照组、模型组、吲哚美辛 (2 mg/kg) 组以及新癆片 23.8、47.5、95.0 mg/kg 组。给药组均 ig 给药 10 mL/kg, 对照组及模型组 ig 给予同体积去离子水。1 次/d, 连续 3 d。于末次给药后 30 min, 除对照组外, 在大鼠右后足垫部 sc 1% 角叉菜胶 0.05 mL/只致炎。在致炎前和致炎后 1、2 h, 记录大鼠抬足潜伏期。剖杀大鼠取肝脏, 肝组织蛋白经提取、双向电泳、染色和图谱分析, 确定差异表达蛋白, 进行蛋白质质谱分析。**结果** 与模型组比较, 新癆片 23.8、47.5、95 mg/kg 组差异表达蛋白个数依次为 67、71、94, 其中上调个数为 10、11、33, 下调个数为 57、60、61; 新癆片 95 mg/kg 组与吲哚美辛 (2 mg/kg) 组比较, 差异表达蛋白 89 个, 其中上调 27 个, 下调 62 个。共鉴定出 11 个差异蛋白质。与模型组比较, 新癆片组均可以抑制 Shank3、ANXA5、TPI、PSMA2 表达, 增强 PAH、LZTS1 表达。**结论** 新癆片可调节的蛋白明显增多, 能够抑制多种相关炎症因子和肿瘤因子, 增强抗炎因子及抑癌因子的表达, 为新癆片“增效”作用机制提供重要理论依据。

关键词: 新癆片; 吲哚美辛; 蛋白组学; 抗炎; 镇痛; 机制

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)01-0005-06

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2016.01.002

Anti-inflammatory and analgesic mechanism of Xinhuang Tablets by proteomics

DI Zhi-quan¹, LI Hao-feng², FENG Yue¹, WANG Chun-feng³, HU Jin-fang¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

3. Xiamen Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Xiamen 361100, China

Abstract: Objective To analyse anti-inflammatory and analgesic mechanism of Xinhuang Tablets, and to explore drug targeting pathways in protein levels by proteomics technology. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, indomethacin 2 mg/kg group, and Xinhuang Tablets 23.8, 47.5, and 95.0 mg/kg groups. Rats in indomethacin group and Xinhuang Tablets groups were ig administered with the dose of 10 mL/kg, while rats in control group and model group were given the same volume of ionized water, once daily. All rats were treated for 3 d. Except the control group, 1% carrageenan was sc given into the right footpad of rats 0.05 mL to induce inflammation 30 min after the last administration. Before inflammation and 1 and 2 h after inflammation, foot lift latency was recorded. The animals were sacrificed to obtain livers for proteomics research. The proteins from liver tissue were extracted, two-dimensional electrophoresis, stained, and pattern analysis. Differentially expressed proteins were established, and the identified proteins were determined by the mass spectrometry. **Results** Compared with the control group, the numbers of differential express proteins in Xinhuang Tablets 23.8, 47.5, and 95.0 mg/kg groups were 67, 71, and 94, respectively. And 10, 11, and 33 proteins in Xinhuang Tablets groups were up-regulated, while 57, 60, and 61 proteins were down-regulated. Compared with the indomethacin group, there were 89 differentially expressed proteins in Xinhuang Tablets groups, including 27 up-regulated proteins and 62 down-regulated proteins. Eleven differentially expressed proteins were identified. Compared with the indomethacin group, Xinhuang Tablets could inhibit the expression of Shank3, ANXA5, TPI, and PSMA2, and enhanced the expression of PAH and LZTS1. **Conclusion** Xinhuang Tablets can regulate more proteins, and inhibit the expression of inflammatory/

收稿日期: 2015-11-18

作者简介: 邸志权 (1982—), 男, 助理研究员, 硕士, 从事药理毒理研究工作。Tel: (022)84845247 E-mail: dizq@tjpr.com

*通信作者 胡金芳 (1980—), 女, 副研究员, 从事药理毒理研究工作。E-mail: hujf@tjpr.com

tumor-associated factors, enhanced the expression of anti-inflammatory cytokines and tumor suppressor factor, which can provide theoretical basis for improving efficiency of Xinhuang Tablets mechanism.

Key words: Xinhuang Tablets; indomethacin; proteomics; anti-inflammatory; analgesic; mechanism

新癆片处方由吲哚美辛、肿节风、三七、人工牛黄、猪胆粉、肖梵天花、珍珠层粉、水牛角、红曲等组成,具有清热解毒、活血化瘀、消肿止痛的功效,用于热毒瘀血所致的咽喉肿痛、牙痛、痹痛、胁痛、黄疸、无名肿毒等。新癆片的抗炎镇痛作用已经得到证实^[1-3],并且发现新癆片可以降低环氧合酶-2 活性,抑制肿瘤抑制因子 NF- κ B 合成,降低 PGE₂ 含量,减少 IL-1 和组胺释放,从而抑制细胞因子及炎症介质生成,因此产生抗炎镇痛作用^[2]。蛋白组学这一概念最早是由 Marc Wilkins 在 1994 年提出,指的是大规模研究蛋白质的特征,由此获得蛋白质水平上的关于疾病发生、细胞代谢等过程的整体而全面的认识。前期研究表明,新癆片中中药成分对吲哚美辛胃肠毒性具有减毒效应^[4]。本研究旨在通过蛋白组学的方法找寻与吲哚美辛相比差异表达的相关蛋白,在蛋白水平上进一步确认新癆片的中药组分对吲哚美辛的增效作用,为该复方制剂的合理性提供依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量 180~200 g, 18 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号 SYXK(京)2012-0024。

1.2 主要药品

新癆片(浅棕灰色,含吲哚美辛 2.111%,批号 120704)、吲哚美辛(白色粉末,质量分数 98.8%,批号 101206)均由厦门中药厂提供。角叉菜胶(批号 20111013)由沈阳药科大学提供。

1.3 主要仪器及试剂

T-F₂ 光热测痛仪,中国医学科学院药物研究所;IPG 胶条,Bio-Rad; Multiphor II 多功能电泳仪,Amersham; PowerLook 2100 XL 扫描仪,UMAX; 4000 Series software 软件、GPS Explorer™ v3.5 软件、4700 Proteomics Analyzer 均为 ABI。

2 实验方法

2.1 分组与给药

将大鼠随机分成对照组、模型组、吲哚美辛(2 mg/kg)组以及新癆片 23.8、47.5、95 mg/kg 组,每组 3 只。给药组均 ig 给药 10 mL/kg,对照组及模型

组 ig 给予同体积去离子水。1 次/d,连续 3 d。于末次给药后 30 min,除对照组外,在大鼠右后足垫部 sc 1%角叉菜胶 0.05 mL/只致炎。在致炎前和致炎后 1、2 h,投影放大的方式测量大鼠右后肢踝关节下方 0.5 cm 处直径,用肿胀差值作为肿胀度;大鼠置于 T-F₂ 光热测痛仪上,右后足垫部处对准聚光点,记录鼠足自照射开始至出现抬足动作的时间,作为抬足潜伏期。随即剖杀大鼠取肝脏,液氮保存。

2.2 蛋白质 2D 电泳实验

2.2.1 样品制备 将液氮保存过的肝脏组织经过 PBS、蒸馏水洗涤后研磨至粉状,加裂解液,冰浴超声 30 s(间隔 0.5 s),间隔 30 s,反复 6 次;12 000 r/min,4 °C 离心 30 min,取上清采用 Bradford 法检测蛋白质浓度,-80 °C 保存备用。

2.2.2 双向电泳 将 IPG 胶条泡胀放入聚焦槽内,上样量为 0.8 mg,设置等电聚焦程序见表 1。聚焦结束的胶条立即进行平衡和第二向 SDS-PAGE 电泳,参数设置为 250 V 恒压、15 mA/胶恒流电泳 15 min,待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时停止电泳。

表 1 等电聚焦程序参数设置

Table 1 Isoelectric focusing program settings

步骤	电压/V	V·h
S1	0~500	500
S2	500	2 500
S3	500~3 500	10 000
S4	3 500	50 000
S5	3 500~500	8 000

2.2.3 染色及图像采集扫描分析 凝胶经染色、脱色、洗涤后用 300DPI 凝胶扫描仪透射扫描,得到数字化图像,用 PDQuest 8.0.1 软件进行分析。图像分析过程包括蛋白点的检测、凝胶匹配、相对分子质量和等电点的确定。

2.3 蛋白质质谱检测

需鉴定的差异蛋白点经切割、脱色、还原、烷基化、胰蛋白酶酶解、萃取及脱盐后,利用质谱仪测得各自肽质量指纹图谱,并以基质峰、酶自动降解片段峰进行校正。质谱分析的主要条件为一级激光强度 4 200,二级激光强度 4 600,检测相对分子

质量范围 700~4 000, 选用正离子反射模式进行质谱分析样品。所得肽质量指纹图谱用 GPS 软件进行数据库的检索, 蛋白质数据库选择 NCBI 和 SwissProt 库, 肽片段相对分子质量容许误差 (precursor tolerance) 为 ± 0.1 , 二级片段容许误差 (MS/MS tolerance) 为 ± 0.5 ; 每个肽允许 1 个不完全酶解片段, 固定修饰采用脲甲基半胱氨酸法, 可变修饰采用氧化法。

2.4 数据处理

蛋白组学检测数据利用 PDQuest 8.0.1 软件进行包括蛋白质点的检测、量化、背景扣除和点的匹配等图像分析。选择 35 个表达量较高的蛋白进行质谱鉴定。质谱鉴定结果判定标准为每个蛋白 Total Ion Score C.I. % (二级) 或 Protein Score C.I. % (一级) 数值达到 95 以上认为鉴定成功, 蛋白表达量与光强度呈正比, 因此以蛋白点光强度 (spots intensity) 均值标示蛋白量。

3 实验结果

3.1 抗炎镇痛作用

本课题组已报道了新癍片的抗炎镇痛作用^[1-2], 因此本研究中每组仅设 3 只动物, 为验证性试验。另外新癍片能明显抑制角叉菜胶引起的大鼠足肿, 具有显著的抗炎作用; 可显著延长光热刺激致大鼠抬足反应的潜伏期, 表明新癍片有镇痛作用^[3]。

3.2 电泳质控

蛋白质浓度符合实验要求, 2D marker 正常, 结果见图 1。

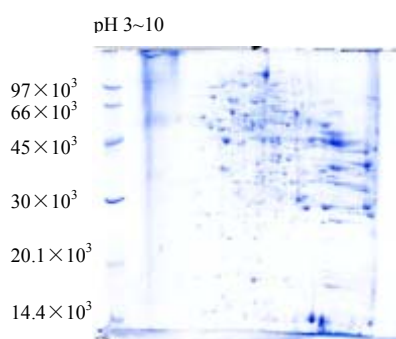


图 1 电泳质控图

Fig. 1 Electrophoresis of QC pattern

3.3 双向电泳分析

图像分析结果显示, 正常肝脏组织中检测到 959 个蛋白点, 模型肝组织检测到 925 个蛋白点, 差异表达蛋白 45 个, 其中上调 34 个, 下调 11 个;

与模型组比较, 新癍片 23.8、47.5、95 mg/kg 组差异表达蛋白个数依次为 67、71、94, 其中上调个数为 10、11、33, 下调个数为 57、60、61; 与模型组比较, 吡哌美辛组差异表达蛋白 40 个, 其中上调 14 个, 下调 26 个; 新癍片 95 mg/kg 组与吡哌美辛 (2 mg/kg) 组比较, 差异表达蛋白 89 个, 其中上调 27 个, 下调 62 个。

3.4 蛋白质质谱检测

结合质谱分析进行数据库检索, 共鉴定出 11 个差异蛋白质, 其中包括 Shank3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3)、TPI (Triosephosphate isomerase, 磷酸丙糖异构酶)、ANXA5 (Annexin A5, 膜联蛋白 A5)、PAH (phenylalanine-4-hydroxylase, 苯丙氨酸羟化酶)、PSMA2 (proteasome subunit alpha type-2)、LZTS1 (leucine zipper putative tumor suppressor 1), 见表 2。结果显示: 一方面模型组大鼠肝组织的 Shank3、ANXA5、TPI 的表达均较对照组升高; 与模型组比较, 吡哌美辛组、新癍片组均可以抑制 Shank3、ANXA5、TPI、PSMA2 表达, 且新癍片的抑制程度明显高于吡哌美辛; 另一方面模型组 LZTS1、PAH 的表达均较对照组明显降低; 与模型组比较, 吡哌美辛组、新癍片组均可以增强 PAH 表达, 且新癍片 95 mg/kg 组的反转程度高于吡哌美辛, 而吡哌美辛对 LZTS1 几无影响, 提示新癍片能够显著增强 LZTS1 的表达, 两者的差异极其显著。

4 讨论

Shank3 是 Shank 蛋白家族成员之一, 其结构特征为存在锚蛋白重复序列。对于 Shank 蛋白的研究集中于它在神经系统以及突触后密集区的作用, 与突触强化和突触记忆有关^[5]。T/B 细胞免疫性突触在免疫应答中发挥着重要的作用, 细胞支架蛋白 Shank 家族是该突触结构中必需的成分, 在免疫反应中必不可少^[6]。锚蛋白重复序列是 I κ B α 与蛋白酶体结合所必须的蛋白结构^[7], 可调控 I κ B α 的降解, 由此推断 Shank 蛋白在 NF- κ B 的激活过程中发挥着重要的作用。另外 Shank 蛋白通过与 Homer 蛋白相互作用, 调节钙库从而响应细胞表面谷氨酸受体活化^[8], Shank3 参与调节 Ret 酪氨酸激酶信号通路^[9]。本研究中 Shank3 的变化趋势与其功能相吻合, 模型中 Shank3 显著升高, 约为正常值的 4 倍, 提示角叉菜胶造模后 T/B 细胞的免疫功能激活, 免疫突触的形成增多, 而新癍片可明显抑制 Shank3 的表达, 其

表 2 质谱鉴定的蛋白

Table 2 Proteins identified by mass spectrometry

SSP	名称	各组平均蛋白点光强度						Swiss-Prot
		对照	模型	吲哚美辛	新癬片			
					23.8 mg·kg ⁻¹	47.5 mg·kg ⁻¹	95.0 mg·kg ⁻¹	
G2	Nuclear cap-binding protein subunit 1	0	0	0	63 333	49 833	63 637	sp A8XG63
G12	Shank3	4 250	15 322	11 352	5 008	6 715	7 668	sp Q9BYB0
H1	ANXA5	2 154	4 131	2 526	1 232	637	477	sp P14668
G10	LZTS1	15 754	0	0	11 000	18 715	22 544	sp Q9Y250
G16	PAH	16 857	0	16 349	9 278	13 132	25 327	sp P04176
G24	PSMA2	7 077	8 825	6 631	2 673	2 506	3 903	sp P49722
G19	TPI	13 445	21 856	13 386	9 608	12 987	9 054	sp P46225
H7	30S ribosomal protein S10	10 932	7 696	8 959	3 378	4 274	2 931	sp Q057A3
G21	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	22 217	23 172	15 794	12 574	10 575	12 558	sp P15651
G22	Sulfotransferase 1A1	46 642	54 462	43 741	30 122	27 580	31 463	sp P52840
G23	Adenylate kinase 2	20 972	21 472	15 721	10 559	12 085	12 827	sp Q9WTP6

值已接近正常水平,而吲哚美辛组 Shank3 的表达仅轻微下降,仍为正常值的近 3 倍,表明新癬片能够更加有效地抑制 Shank 蛋白,影响 T/B 细胞的功能,发挥抗炎镇痛作用。

研究结果显示,致炎后 ANXA5 的表达增高近 2 倍,而吲哚美辛、新癬片对高表达的 ANXA5 有显著的抑制作用,新癬片的作用更为明显,抑制 ANXA5 的表达使其低于正常值。随着近年对 ANXA5 的研究深入,发现 ANXA5 的功能除了抗凝,还参与炎症反应、凋亡等过程^[10]。对于 ANXA5 在炎症反应方面的作用,研究结果存在分歧: Martin 等^[11]、Rand 等^[12]认为 ANXA5 与脂多糖黏合,减少内毒素反应以减轻免疫炎症反应,ANXA5 缺失可引起炎症反应。相反观点则认为,巨噬细胞产生血脂球表皮生长因子 8,可像磷脂酰丝氨酸一样识别氨基磷脂以黏合凋亡细胞,ANXA5 可优先黏合凋亡细胞的 PS,减少巨噬细胞对凋亡细胞的摄取^[13],所以当凋亡细胞没有很快被清除时,它们将改变膜的成份,使其转变为次级坏死细胞,从而失去膜的完整性,引发炎症免疫反应。本研究结果支持后一种观点,认为膜联蛋白影响细胞因子环境,ANXA5 可与 TNF- α 等炎症因子呼应,影响巨噬细胞正常功能的发挥,使巨噬细胞分泌的抗炎细胞因子 IL-10 水平降低,导致炎症或抗炎免疫应答的平衡,是免

疫系统的一个重要的炎症调节剂。

研究^[14-16]已经证实,感染性疾病时,血清中苯丙氨酸与酪氨酸的比值显著升高,且主要是由于苯丙氨酸增多引起的,PAH 的抑制是产生上述情况的原因之一。角叉菜胶诱导的炎症表现出 PAH 的表达受到极其显著的抑制。分析可能原因为:炎症细胞因子可减少辅酶因子四氢生物蝶呤(BH4)的活性,BH4 是 PAH 将苯丙氨酸转化为酪氨酸的必需辅因子,BH4 对氧化还原作用高度敏感,炎症及相关细胞因子能够诱导产生大量活性氧和活性氮,降低 BH4 的水平^[17],又有研究^[18]报道 BH4 可反向调节 PAH 的合成,因此 BH4 的耗竭可能是 PAH 蛋白表达受到抑制的原因。PAH 的降低会造成多巴胺的合成不足,多巴胺不足在外周表现为血管收缩,醛固酮和去甲肾上腺素释放等应激性症状^[19],多巴胺又是一种中枢神经递质,主要负责情欲,传递兴奋及开心信息,多巴胺不足则表现为抑郁,也会导致帕金森病。研究结果表明,新癬片能够明显增加 PAH 的表达,缓解多巴胺不足所带来的后果,提示这可能是新癬片镇痛机制之一,且新癬片对 PAH 的调节作用明显优于吲哚美辛。

蛋白酶体是一种具有多催化位点的高度有序的桶状蛋白酶复合物^[20],外部的两个环各含有 7 个 α 亚基,可以发挥“门”的作用。这些 α 亚基可以识

别连接在蛋白质上的多泛素链标签,启动降解过程。本课题组前期研究证明^[2],新癍片能够显著抑制 NF- κ B 水平, NF- κ B 参与炎症反应、免疫反应等多种生物进程。细胞受到致炎因素刺激后,可诱导 I κ B 与泛素分子共价结合,使 I κ B 被 26S 蛋白酶体识别并降解^[6,21],从而激活 NF- κ B,发挥正反馈效应^[22-23]。26S 蛋白酶体是最普遍的蛋白酶体形式,研究^[23]发现, NF- κ B 亚基 p52 和 p50 的产生须经限制性蛋白酶解,该过程必须由蛋白酶体参与完成,且需要 I κ B α 通过锚蛋白重复序列与蛋白酶体的 α 2 (C3) 亚基(即 PSMA2)结合^[7]。本研究结果发现,作为 20S 核心颗粒 α 亚基之一的 PSMA2 在该炎症模型中显著上调,约为正常水平的 1.2 倍,提示机体内蛋白酶体水平可能已升高, NF- κ B 也已激活,形成试验模型效果,新癍片能够明显抑制 PSMA2 的表达,且抑制程度明显高于吲哚美辛,表明新癍片中的中药成分起到了至关重要的协同增效作用,使 NF- κ B 激活通路受阻,限制 NF- κ B 发挥生物学功能。

炎症因子亦可是肿瘤调控因子,肿瘤调控因子也可参与炎症反应,两者关系密切^[24]。LZTS1 是一个亮氨酸拉链蛋白,由 LZTS1 基因编码,LZTS1 上调后通过 cAMP 依赖激酶高磷酸化抑制了肿瘤的发生,使细胞周期在 G2/M 期出现阻滞^[25],它与 CDC25、CDC2 等细胞周期调控蛋白(cell division cyclin)作用后参与调控细胞有丝分裂等进程^[26-28]。本研究发现以角叉菜胶造模后,作为抑癌基因表达产物的 LZTS1 在模型大鼠肝组织中的水平极其显著的下降,以蛋白组学方法已检测不到,吲哚美辛对该蛋白没有影响,但新癍片各剂量均显著上调该蛋白,且呈一定的剂量关系,提示新癍片内的中药成分发挥了重要的补充调节作用,起到了增效作用。研究表明^[29-31],肿节风、三七具有抗肿瘤和增强免疫等作用。Naghavi 等^[28]研究发现,LZTS1 的过表达能够抵抗 MLV 和 HIV-1 的感染,能够阻止病毒 DNA 进入宿主细胞核,具有抑制病毒复制的功能,与本研究结果相一致,表明新癍片可多方面调节炎症、肿瘤相关的蛋白,进而更好发挥抗炎镇痛作用。

袁吉钊等^[32]发现 TPI 能特异性刺激类风湿性关节炎(RA)患者外周血 PBMC 的增殖,并增加 TNF- α 、INF- γ 及 IL-17a 等细胞因子的水平。他认为 TPI 可作为自身抗原,刺激抗原特异性 CD4⁺T 细胞向 Th1 及 Th17 细胞分化,并产生 INF- γ 及 IL-17a 等细胞因子参与 RA 疾病发生。TNF- α 、INF- γ 及

IL-17a 是参与 RA 疾病发生重要的细胞因子,TNF- α 作为促炎因子能通过 NF- κ B 通路刺激合成 PGE₂^[33],诱导产生一系列炎症反应。INF- γ 能活化巨噬细胞,增强 MHCI、II 类抗原的表达,增强 NK 细胞活性,抑制纤维母细胞产生胶原,刺激并增强炎症反应^[34]。Kolln 等^[35]也报道,胞质内的 TPI 可引起 B 细胞和浆细胞浸润受损的组织部位,引起局部的免疫反应造成炎症。新癍片能够明显抑制 TPI 的表达,且抑制程度明显高于吲哚美辛,表明新癍片中的中药成分具有明显的协同增效作用。

综上所述,吲哚美辛影响的蛋白相对较少,而加入中药成分的新癍片可调节的蛋白明显增多,调节程度亦有增大。新癍片能够抑制多种相关炎症因子和肿瘤因子,抑制 Shank3、ANXA5、TPI 和 PSMA2 表达,增强抗炎因子及抑癌因子的表达,提高 LZTS1、PAH 的表达,为新癍片的“增效”作用机制提供重要理论依据。

参考文献

- [1] 胡金芳,刘静,王春风,等.新癍片皮肤外涂给药镇痛实验的研究[J].药物评价研究,2010,30(4):66-71.
- [2] 吕晓静,刘静,陆洁,等.新癍片抗炎作用机制研究[J].天津中医药,2013,30(4):239-241.
- [3] 邸志权,胡金芳,冯玥,等.新癍片调节抗炎镇痛相关基因的初步研究[J].中南药学,2015,115(08):797-802.
- [4] 刘静,邸志权,王晶晶,等.新癍片中药成分对吲哚美辛胃肠毒性的减毒作用机制研究[J].中草药,2014,45(8):1115-1120.
- [5] Hung A Y, Futai K, Sala C, et al. Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1 [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(7): 1697-1708.
- [6] Huett A, Leong J M, Podolsky D K, et al. The cytoskeletal scaffold Shank3 is recruited to pathogen-induced actin rearrangements [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(12): 2001-2011.
- [7] Alvarez-Castelao B, Castano J G. Mechanism of direct degradation of I κ B α by 20S proteasome [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(21): 4797-4802.
- [8] Sala C, Roussignol G, Meldolesi J, et al. Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca²⁺ homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(18): 4587-4592.
- [9] Schuetz G, Rosário M, Grimm J, et al. The neuronal scaffold protein Shank3 mediates signaling and biological function of the receptor tyrosine kinase Ret in epithelial cells [J]. *J Cell Biol*, 2004, 167(5): 945-952.

- [10] 王小杰, 李欣, 武彦秋, 等. 膜联蛋白 A5 的结构与功能研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2010, 27(4): 413-415.
- [11] Martin M, Leffler J, Blom A M. Annexin A2 and A5 serve as new ligands for C1q on apoptotic cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(40): 33733-33744.
- [12] Rand J H, Wu X X, Lin E Y, *et al*. Annexin A5 binds to lipopolysaccharide and reduces its endotoxin activity [J]. *MBio*, 2012, 3(2): e00292-e00311.
- [13] Frey B, Munoz L E, Pausch F, *et al*. The immune reaction against allogeneic necrotic cells is reduced in Annexin A5 knock out mice whose macrophages display an anti-inflammatory phenotype [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(7): 1391-1399.
- [14] Wannemacher R W Jr, Klainer A S, Dinterman R E, *et al*. The significance and mechanism of an increased serum phenylalanine-tyrosine ratio during infection [J]. *Am J Clin Nutr*, 1976, 29(9): 997-1006.
- [15] Wannemacher R W Jr, Pekarek R W, Bartelloni P J, *et al*. Changes in individual plasma amino acids following experimentally induced and fly fever virus infection [J]. *Metabolism*, 1972, 21(1): 67-76.
- [16] Newberne P M. Overnutrition on resistance of dogs to distemper virus [J]. *Fed Proc*, 1966, 25(6): 1701-1710.
- [17] Kitagami T, Yamada K, Miura H, *et al*. Mechanism of systemically injected interferon-alpha impeding monoamine biosynthesis in rats: role of nitric oxide as a signal crossing the blood-brain barrier [J]. *Brain Res*, 2003, 978(1/2): 104-114.
- [18] Felger J C, Li L, Marvar P J, *et al*. Tyrosine metabolism during interferon-alpha administration: association with fatigue and CSF dopamine concentrations [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 31: 153-160.
- [19] 汤四文, 唐显玲. 外周多巴胺受体研究进展 [J]. 四川生理科学杂志, 2002, 24(3): 99-101.
- [20] Whitby F G, Masters E I, Kramer L, *et al*. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators [J]. *Nature*, 2000, 408(6808): 115-120.
- [21] Newton K, Dixit V M. Signaling in innate immunity and inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(3): 1-19.
- [22] Yamazaki S, Matsuo S, Muta T, *et al*. Gene-specific requirement of a nuclear protein, IkappaB-zeta, for promoter association of inflammatory transcription regulators [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(47): 32404-32411.
- [23] Li Q, Verma I M. NF-kappaB regulation in the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(10): 725-734.
- [24] 黄宁. 炎症因子与肿瘤 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(9): 87-89.
- [25] 宫琳琳, 熊海, 邵淑娟. FEZ1/LZTS1 基因的研究进展 [J]. 解剖科学进展, 2005, 11(2): 167-169.
- [26] Tschlis P N, Hatziaepostolou M, Hinds P W. Timing is everything: regulation of Cdk1 and aneuploidy [J]. *Dev Cell*, 2007, 12(4): 477-479.
- [27] 周薇. 亮氨酸拉链肿瘤抑制基因 LZTS1 在结直肠癌中的作用及其分子机制的初步研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [28] Naghavi M H, Hatzioannou T, Gao G, *et al*. Overexpression of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) induces a post-entry block to retroviruses in cultured cells [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(9): 1105-1115.
- [29] 蒋伟哲, 孔晓龙, 梁刚, 等. 肿节风片对恶性肿瘤和免疫功能的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2001, 18(1): 39-41.
- [30] 杨芬, 刘浩, 余美玲, 等. 三七粉对小鼠 S180 移植肿瘤的抑制作用及免疫功能的影响 [J]. 蚌埠医学院学报, 2009, 34(3): 195-197.
- [31] 刘佳琪. 体外培育牛黄改善晚期原发性肝癌患者生活质量临床观察 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2013, 23(4): 209-210.
- [32] 袁吉钊, 吴玉章. 类风湿关节炎新自身抗原: 磷酸丙糖异构酶的初步研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2012, 16(11): 8-12.
- [33] Henderson B, Pettipher E R. Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines *in vivo* [J]. *Clin Exp Immunol*, 1989, 75(2): 306-310.
- [34] Bucht A, Larsson P, Weisbrot L, *et al*. Expression of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA) [J]. *Clin Exp Immunol*, 1996, 103(3): 357-367.
- [35] Kolln J, Ren H M, Da R R, *et al*. Triosephosphate isomerase- and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-reactive autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis [J]. *J Immunol*, 2006, 177(8): 5652-5658.