

● 实验研究 ●

中药治疗大鼠去卵巢骨质疏松症的蛋白质组学分析*

王海彬¹ 刘建仁^{1△} 樊粤光¹ 熊莉华¹ 谢裕华¹ 何伟¹ 彭宣宪² 王三英²

1. 广州中医药大学第一附属医院骨三科 (广东 广州 510405) 2. 厦门大学生命科学学院 (福建 厦门 361005)

摘要: 目的: 用蛋白质组学的方法对绝经后骨质疏松症和中药作用机理进行研究, 有利于临床防治该疾病。方法: 建立去卵巢大鼠骨质疏松症模型, 设立中药治疗组及假手术对照组, 6周后骨质疏松症模型成功, 行骨形态学检查, 提取骨组织蛋白质样品, 双向电泳分离, 得到各组骨组织总蛋白质分子解剖图谱, 用图像分析软件, 分析各组间差异蛋白质点, MADITOF/MS 质谱分析, 结合蛋白质生物信息库 (Matrix science Ltd database), 对各蛋白质初步鉴定。结论: 鉴定了 3 个差异蛋白, 分别为 P1 硫氧还蛋白过氧化酶 1 (Thioredoxin peroxidase 1), P2 为阻凝蛋白轻链肽 2 (Myosin light polypeptide 2), P3 为泛素化酶 E2-17KD (ubiquitin-conjugating enzyme E2-17kD)。初步认为这三种蛋白质在绝经后骨质疏松症的发病及中药治疗过程中发挥着重要调控作用。

关键词: 蛋白质组学 骨质疏松症 双向电泳 中药

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3649 (2006) 08-0009-05

Bone Proteomic Analysis About Chinese Medicine Action On Rat Ovariectomy Model of Osteoporosis / Wang Haibin¹ Liu Jianren¹ Fan Yueguang¹ Xion Lihua¹ He Wei¹ Peng Xuanxian¹ Wang Sanying¹. // 1. Department of Orthopedic Surgery, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM (Guangzhou Guangdong 510405, China) 2. Center for proteomics, Department of Biology, School of Life Sciences, Xiamen University (Xiamen Fujian 361005, China)

Abstract Objective: To study the mechanism about osteoporosis of OVX (ovariectomy) and Chinese Medicine action on osteoporosis in proteomics, it is of benefit to prevent and cure this disease. Methods: Bilateral OVX in rats was performed as osteoporosis model. Rat was randomly divided into three groups: control group, osteoporosis model group and Chinese Medicine therapy group. The pathology of bone was examined after 6 weeks. In the present proteomic study, we characterized the potential effects of OVX and Chinese Medicine on protein expression in rat bones. Using two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, and Matrix science Ltd database, we elementarily identified three variational proteins. Conclusions: Three proteins were identified as proteins similar to thioredoxin peroxidase 1, Myosin light polypeptide 2 and ubiquitin-conjugating enzyme E2-17kD. These proteins have been demonstrated to be postmenopausal proteins. These results can provide valuable experimental evidences for the research for the molecular mechanism of osteoporosis which was response to OVX and Chinese Medicine in bone.

Key words: Proteomics Osteoporosis Two-dimensional electrophoresis Chinese Medicine

骨质疏松症是绝经后妇女常发生的一种慢性疾病, 表现为骨骼骨矿含量的显著降低、机械强度的明显减弱, 容易发生骨折^[1]。破骨细胞是骨质疏松症中骨骼重塑的主要作用细胞之一, 雌激素是破骨细胞活性的主要负面调控因子, 绝经后雌激素的分泌明显的减少^[2-5]。蛋白质组学 (Proteomics) 是一种高通量筛选技术, 已成为当前分离鉴定蛋白质的主要支柱之一, 本项目是基于此背景下对卵巢切除后骨质疏松症模型开展实施的研究。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 动物来源 清洁级雌性 SD 大鼠 (由广州中医药大学实验动物中心提供), 体重 0.18 ~ 0.22kg, 年龄 13 至 15 周, 在广州中医药大学实验动物中心标准清洁级动物房饲养。

1.1.2 试剂 丙烯酰胺, 双甲叉丙烯酰胺, Tris-base, SDS, 巯基乙醇, Triton X-100, Urea, TEMED, 过硫酸氨和考马斯亮

兰 R250 等购自上海生物工程技术服务有限公司; 两性载体电质和甘氨酸购自北京经科试剂公司; 三氟乙酸 (TFA) 为日本东京化成工业株式会社产品; 碘乙酰胺, 购自 Sigma 公司; 测序级胰蛋白酶购自 Promega 公司; 乙氰 (CAN) 为国产色谱纯; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 中药 中药生脉成骨胶囊 (广州中医药大学新药开发中心提供, 主要成分为木豆叶), 灌胃前制备成混悬液。

1.1.4 主要仪器设备 质谱仪 (德国 BRUKER 公司的 ReFlex™ IIMALDI-TOF), 圆盘电泳槽和高压稳压稳流电源 (北京六一仪器厂产品)、普通台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)、低温高速离心机 (Beckman 公司)。

1.2 动物处理 清洁级 SD 雌性大鼠购进后在标准清洁级动物房中饲养 3 ~ 5 天, 随机分为假手术组 (10 只), 模型组 (20 只), 中药治疗组 (20 只)。按照文献方法^[3], 术前常规用戊巴比妥钠麻醉动物, 模型组动物切除双侧卵巢, 假手术

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (基金号: 30400606), 广东省自然科学基金项目 (基金号: 04010036), 广东省科技厅项目 (基金号: 粤科社字 2004-139号), 广州中医药大学创新基金项目 (基金号: K004044) △刘建仁和王海彬对本具有同等贡献

组仅仅进行手术操作但保留卵巢, 术后动物常规用抗生素抗炎治疗1周; 中药治疗组在1周后开始每天按照体表面积折算(人与大鼠)方法给予等剂量生脉成骨胶囊混悬液灌胃治疗1次; 假手术组和模型组老鼠则每天用等量生理盐水灌胃治疗1次。

1.3 动物骨组织蛋白样品提取和处理 雌性SD大鼠经过6周激素处理, 并取样行骨骼形态学检查, 确定骨质疏松造模成功, 用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 放血处死, 冰上操作, 迅速取下其胫骨及股骨干, 剔除骨膜及两端软骨部分, 用蒸馏水反复冲洗, 将残留血液冲洗干净, 将骨放入1.5ml的Eppendorf管, 标记后置冻盒中, 先在 -20°C 冰箱中预冻30分钟后再转入 -70°C 冰柜中保存备用; 也可直接取用新鲜骨提取蛋白质样品。取1g新鲜骨, 放在盛有液氮的研钵里研磨粉碎, 并缓慢加入3ml样品提取液(1.44g尿素, 0.46g硫脲, 0.12g CHAPS, 0.047g DTT, 0.015g Tris-base, $30^{\circ}\text{I}100\text{mmol/L}$ PMSF), 放在 4°C 冰箱中裂解提取蛋白质过夜, 约14h后取出^[6,7]。然后 12000r/min 离心30min, 取上清液体放入 0.01M PBS中透析24h, 取样品, 加入10倍体积 -20°C 预冷的丙酮, -20°C 冰箱中静置2h, 10000r/min 离心10min, 保留沉淀, 4°C 中丙酮挥发, 加入5倍上清体积的裂解液(7mol/L 尿素, 4% CHAPS, 100mmol/L DTT, 40mmol/L Tris, 0.5%的两性电解质 pH 5~7, 2mol/L 硫脲), 2h后 10000r/min 离心10min上样。

1.4 双向电泳 双向电泳按文献^[8]的方法稍做改进进行。用pH 5~7的两性电解质配制IEF胶条。第一向预电泳 200V 15min, 300V 30min, 400V 2h, 上样后电压 400V 12h后调到 600V 6h。电泳结束后用考马斯亮蓝R250染色。GDS8000pc凝胶成像分析系统扫描, 进行图像分析。

1.5 质谱样品的制备 比较三组双向电泳图谱, 找到差异蛋白, 从胶上切下, 切成 1mm^3 大小置于0.5ml的Eppendorf管中, 按文献^[9]的方法处理样品。

1.6 质谱分析 质谱样品使用德国BRUKER公司的ReFlexTM II MALDI-TOF质谱仪进行分析, 采用反射模式, 离子源加速电压1为 20KV , 加速电压2为 23KV , N_2 激光波长 337nm , 脉冲 3ns 离子延迟 2000ns 真空度 $1.4 \times 10^{-7}\text{Torr}$, 质谱信号单次扫描累加20次, 用标准Marker峰作为外标校正质谱峰, 正离子谱测定, 获得肽质量指纹图谱。

1.7 数据库的查询 通过Matrix science Ltd网站提供的MASCOT软件(<http://www.matrix-science.com/cgi/search-from-select.html>)进行查询, 查询条件: 分子量、等电点未作限定, 肽片断分子量的误差范围 $\pm 0.2\text{Da}$, 未水解的酶切位点数为2 蛋白种属选择大鼠, 离子选择 $[M+H]^+$ 和Monoisotopic 修饰选Cabamidomethyl (C), 半胱氨酸为碘乙酰胺处理。

2 结果

2.1 卵巢切除术后骨质疏松模型造模成功的形态学检查 处死的大鼠取其近心段左胫骨行额状面去掉胫骨粗隆, 置70%酒精固定, 梯度脱水后, 置于 $58 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 蜡中浸蜡, 1小时后被包埋成蜡块。将包埋在蜡中的胫骨用电动切片进行切片, 切成 10°m 厚片置于透明载玻片上。于 40°C 温度下进行烤片30~40分钟, 再用二甲苯脱蜡, 95%酒精洗后, 予以“苏木精伊红法”染色。以苏木素染色3~5分钟, 水洗, 以1%盐

酸1份、80%酒精10份分化后, 用自来水冲洗, 再以伊红染色3~5分钟, 水洗后用二甲苯浸泡, 最后用棕树胶封片以进行骨形态计量学研究。我们可以观察到模型组骨小梁厚度明显变薄, 骨小梁数明显减少, 骨小梁间隔明显稀疏。

2.2 大鼠骨组织蛋白双向电泳图谱的比较 空白对照组、骨质疏松模型组及中药治疗组骨蛋白的双向电泳图谱如图1所示。从图1可见, 三张图谱非常相似, 蛋白点主要集在pI 5~7和Mw 10~100KD区域。从整个图谱来分析, 肉眼可以辨别约300多个蛋白点, 且蛋白点之间区分比较清晰, 可以对其进行蛋白质表达的差异分析。对A、B、C三个不同对照组大鼠骨组织蛋白双向电泳图谱比较, 从中发现了3个差异明显的蛋白, 分别命名为P1, P2, P3, 其分子量依次约为 21.9kD , 18.9kD , 16.7kD 。采用双向电泳图谱分析软件(Genomic Solutions Investigator HT Analyzer version 2.02)对差异蛋白的相对含量进行分析, 结果见图2的柱型图所示。

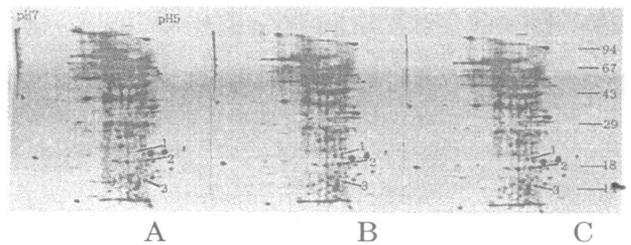
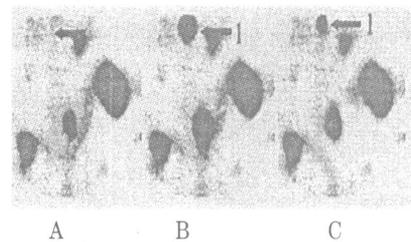
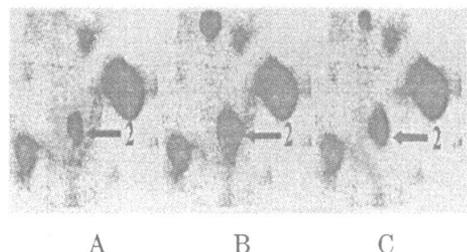


图1 大鼠骨组织蛋白双向电泳图谱的比较

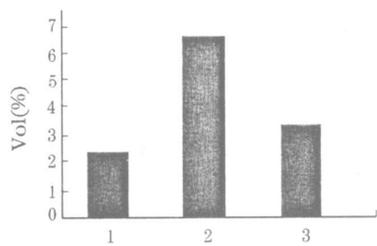
A: 对照组 B: 模型组 C: 治疗组



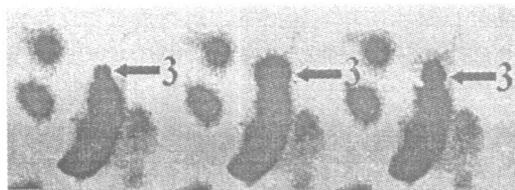
P1



A B C



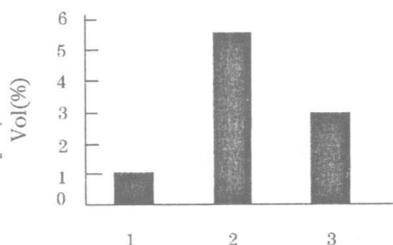
P2



A

B

C

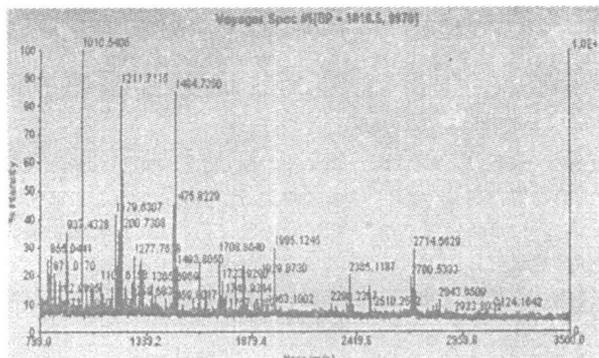


P3

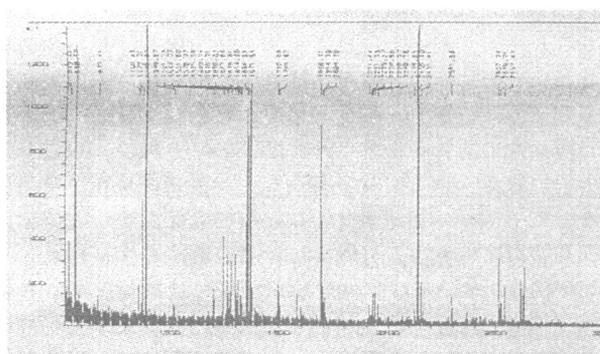
图2 大鼠骨组织蛋白双向电泳图谱差异点
(箭头表示)放大图谱

A: 对照组 B: 模型组 C: 治疗组

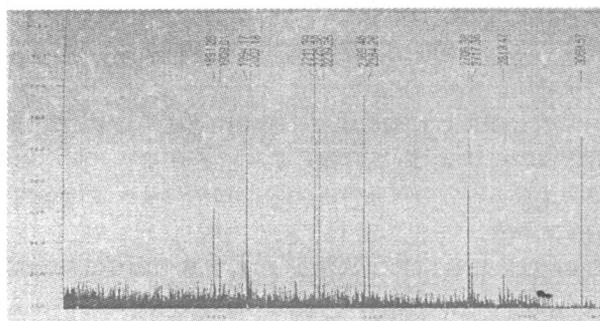
2.3 MALDI-TOF 肽质量指纹图谱分析 对3个差异蛋白进行MALDI-TOF分析,得到各自的肽质量指纹图谱,如图3所示。从图谱中可见,三个肽质量指纹图谱信号较强,基线平稳,适合进一步数据库检索鉴定。根据得到的肽质量指纹图谱数据,及分子量范围和其他有关参数,通过Matrix science网站提供的MASCOT软件查询与之相匹配的蛋白,搜索结果见表1。



A



B



C

图3 大鼠骨组织蛋白2-DE图谱中
差异蛋白点的肽质量指纹图谱

A P1 B P2 C P3

由搜索结果可看出, P1为硫氧还蛋白过氧化酶1(Thioredoxin peroxidase 1), P2为阻凝蛋白轻链肽2(Myosin light polypeptide 2), P3为泛素化酶E2-17KD(ubiquitin-conjugating enzyme E2-17kD)。

表1 P1 P2 P3在数据库搜索的结果

Proteins	Total score	Matched peptide	Accession	Description	PI/Mw
P1	68	6	gi 2499469	Peroxiredoxin 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin-dependent peroxidase reductase 1)	5.20/2193.6
P2	80	7	gi 6981238	Myosin light polypeptide 2	4.82/1895.7
P3	34	4	gi 4507777	ubiquitin-conjugating enzyme E2-17kD	7.67/16676

3 讨论

通过比较分析不同处理组间骨组织蛋白质组的分子解剖图谱,找到了与雌激素缺乏导致骨质疏松及中药治疗相关的差异蛋白质点,从质和量两方面进行了比较,发现了三个差异蛋白质点,分别命名为P1、P2、P3。

P1搜索到一种蛋白质与之相匹配,即硫氧还蛋白过氧化酶1。对硫氧还蛋白过氧化酶1的研究证实,硫氧还蛋白过氧化酶是一种抗氧化剂蛋白,主要通过限制氧化反应活性来起作用。硫氧还蛋白过氧化酶广泛存在于各种组织中,尤其在一些氧化代谢旺盛的细胞中高表达,如色调微红细胞、肾

管状细胞、心肌细胞和骨骼肌细胞以及某些神经细胞^[10]。以往研究显示: 硫氧还蛋白过氧化酶对红细胞及神经细胞的抗氧化反应有帮助作用, 主要是抑制其中的氧化分子的破坏力来实现。另外, 作为一种抗氧化剂, 雌激素能够通过减少氧化反应活性来削弱肿瘤坏死因子相关配基 (TRAIL/Apo2L) 诱导的侵蚀破坏行为^[11]。在我们的研究中发现, 从蛋白质图谱上看, P1 在假手术组不表达, 在卵巢切除雌激素缺乏模型组以及药物治疗组表达, 且卵巢切除雌激素缺乏模型组表达最明显, 治疗组表达减少。结合硫氧还蛋白过氧化酶与雌激素各自在抗氧化反应中的作用, 我们推断, 两者在细胞或组织中的抗氧化保护作用关系密切, 从我们的研究来分析, 卵巢切除术后雌激素缺乏可以激发硫氧还蛋白过氧化酶过量表达来发挥抗氧化作用, 而经过我们中药治疗后, 能够减少硫氧还蛋白过氧化酶过量表达, 说明我们的中药在治疗过程中, 与硫氧还蛋白过氧化酶有协同作用, 具有抗氧化作用, 从而发挥抗骨质疏松的作用。

P2 经过数据库查询, 找到一种相匹配的蛋白质, 名称为阻凝蛋白轻链 2。阻凝蛋白是一种广泛存在于真核细胞的细胞骨架蛋白, 它由两条重链和四条轻链构成。其中轻链又可以分成两类, 一种为碱性轻链, 一种是二硝基安息香酸 (DTNB) 可除轻链; 其中二硝基安息香酸可除轻链简称为 MLC₂, 当它不与 Ca²⁺ 结合时, 常作为一种调节轻链存在^[20]。阻凝蛋白与肌丝一起通过 ATP 水解产生运动活性^[13]。目前仍然没有阻凝蛋白与雌激素相关联的研究报道, 但是目前已经有甲状腺素与 MLC₂ 相关联的研究报道, 研究显示甲状腺素在比目鱼的幼虫变形过程中发挥重要调控作用, 主要是通过调控从幼虫到成虫的 MLC₂ 转变来实现^[14]。阻凝蛋白基因响应于甲状腺素作用的机制可能是在受体水平上来调控实现的^[15]。甲状腺素和雌激素受体均属于核受体超家族, 依靠粘合配基这一途径, 这两种受体在靶基因的转录上充分配基活化转录因子^[16]; 甲状腺素能够控制大鼠和小鼠卵巢切除术后因雌激素缺乏导致的脊柱前弯症状, 提示甲状腺素受体能够干预因雌激素导致的一些病理变化, 这种共同调控作用也减少了因雌激素诱导的视丘下部腹正中存在的 PPE 基因的感应现象^[17-19]。此外, 大鼠 OT (脑下垂体后叶荷尔蒙之一) mRNA, 能够在屏状核中被雌激素调高水平, 相反, 能够被甲状腺素降低水平^[20]。作为基因产物, PPE 和 OT 多肽能够促进脊柱前弯症改变; 相反, 甲状腺素能够介导减少这些雌激素感应的基因, 以上事实可能说明一种机制, 即甲状腺素能够减低雌激素的功能^[21]。在我们的研究中, 有趣地发现 MLC₂ 在卵巢切除术后雌激素缺乏组中过量表达, 在中药治疗组中表达又相对减少, 这一方面提示 MLC₂ 在绝经后骨质疏松症的发病中是一种重要的功能蛋白质, 在一定环节上发挥重要作用; 另一方面, 也提示中药在防治绝经后骨质疏松症中, 可能与改变 MLC₂ 的表达有关从而发挥作用。同时, 将甲状腺素与雌激素联合考察, 研究它们在绝经后骨质疏松症的发病机制中的作用机制, 这将有利于我们阐明绝经后骨质疏松症的发病机制。

P3 经过数据库查询, 找到一种相匹配的蛋白质, 名称为泛素化酶 E2-17KD。从我们的研究中发现, 在模型组中 P3 高表达, 在假手术组和治疗组中表达降低。我们知道蛋白质的泛素化是由许多酶调节实现的, 目前已知有泛素激活酶 E1、

泛素化酶 E2 以及泛素连接酶。在这些酶中, 不同的泛素化酶 E2 成员及泛素连接酶成员作用机理基本一致, 都具有相同的酶作用底物及组织特异性。研究证实, 泛素化酶 E2 具有广泛的组织分布性, 能够促进泛素小分子与靶蛋白结合, 并选择性地介导降解异常蛋白及短寿命的蛋白。泛素化酶 E2 成员还在介导泛素化蛋白质水解过程中起重要作用^[22, 23]。在雌二醇影响大鼠不同组织泛素水平的研究中发现, 这种影响是有组织特异性的, 主要是影响子宫和肝脏的泛素水平变化。在大鼠子宫组织中泛素水平与雌激素受体的泛素化水平呈反比。在大鼠卵巢切除术后 10 天, 雌激素泛素减少, 这可能是由于大鼠子宫中泛素水平增加的结果。研究显示: 在移植术后, 当增强雌激素受体泛素化, 大鼠子宫内泛素水平明显降低, 这提示泛素分子可能结合了雌激素受体。雌二醇似乎不能影响泛素合成。卵巢切除术和移植术后泛素水平的改变也许是雌激素受体泛素化减少的原因导致^[24]。在我们的研究中发现, 在卵巢切除组中, 泛素化酶 E2-17KD 过量表达, 在中药治疗组中则表达相对减少, 这提示雌激素缺乏能够通过增加泛素连接酶而促进蛋白质的泛素化; 同时也提示经过中药治疗后, 能减少蛋白质的泛素化, 从而起到防治骨质疏松的作用。

总之, 我们通过蛋白质组学研究的方法, 研究卵巢切除术后骨质疏松症模型组、中药治疗组以及假手术组的骨组织蛋白质的表达变化情况, 并利用质谱分析结合蛋白质数据库查询, 鉴定了其中的 3 个差异蛋白质点, 分别为硫氧还蛋白过氧化酶 1、阻凝蛋白轻链 2 和泛素化酶 E2-17KD。经过分析, 这些蛋白质都确实与雌激素缺乏相关, 其中前两种蛋白质是首次报道与骨质疏松发病相关, 这为揭示绝经后骨质疏松症的发病机理和中药的治疗机理提供了全新的实验证据, 能够大大推进我们从分子水平认识绝经后骨质疏松症的发病机理, 并为中药的作用机理找到确实的依据, 为推广其临床应用, 提供了宝贵数据。

参考文献

- [1] Melton LJ 3rd. How many women have osteoporosis now? [J]. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 175~177
- [2] Compston, J. E. Hormone replacement therapy [J]. *Clin Rheumatol*, 1997, 11: 583~596
- [3] Meiner S. E. An expanding landscape. Osteoporosis: Treatment options today [J]. *Adv Nurse Pract*, 1999, 7: 26~31, 80
- [4] Aubin, J. E., Bonnelly E. Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption [J]. *Women's Health*, 2000, 5: 5
- [5] Bellino, F. L. Non-primate animal models of menopause: workshop report [J]. *Menopause*, 2000, 7: 14~24
- [6] 梁前进, 彭奕欣, 余秋梅, 等. 野生鲫鱼和五个金鱼代表品种的肌肉蛋白电泳分析 [J]. *动物学研究*, 1994, 15 (2): 68~75
- [7] 任惠民, 周志刚, 陈向军, 等. 正常及重症肌无力肌肉蛋白成分的比较 [J]. *中国临床神经科学*, 2000, 8 (4): 260~262
- [8] 夏其昌. 蛋白质化学研究技术和进展 [M]. 北京: 科学出版社, 1997
- [9] 陈子耀, 王三英, 彭宣宪. 温度对人肺癌细胞 A549 蛋白质表达的影响 [J]. *实验生物学报*, 2003, 35 (3): 179~183
- [10] Ichimiya, S. Davis, J. G., O'Rourke, D. M., et al. Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury [J]. *DNA Cell Biol*

去垂体对壮医药线点灸 调节脾虚大鼠生长抑素的影响^{*}

吕琳¹ 陈永红¹ 庞声航² 吕泽平² 肖国有³ 陈红¹

1 广西民族医药研究所 (广西 南宁 530001) 2 广西江滨医院 (广西 南宁 530021) 3 广西肿瘤防治研究所 (广西 南宁 530021)

摘要: 目的: 观察去垂体后壮医药线点灸对实验性脾虚大鼠下丘脑、胃、肠生长抑素 (Somatostatin, SS) 的影响, 探讨壮医药线点灸治疗脾虚的机理。方法: 用耗气破气加饥饱失常法建立 100 只实验性脾虚大鼠模型, 经耳摘除脑垂体。放射免疫分析法检测壮医药线点灸治疗前后下丘脑、血、胃、肠组织中 SS 的含量, 并设立空线点灸对照、中药四君子汤治疗对照、模型假手术对照、模型自然恢复对照及正常健康对照, 对比分析各组的变化。结果: 脾虚大鼠去脑垂体后, 下丘脑、胃、肠组织中的 SS 含量明显高于同期正常健康对照和垂体保留模型对照 ($P < 0.01$); 血中的 SS 含量低于同期正常健康对照和垂体保留模型对照 ($P < 0.01$)。壮医药线点灸治疗后, 除下丘脑的 SS 含量略有下降外, 胃、肠、血中的 SS 含量没有明显变化, 治疗后与去垂体模型组比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 中药组与去垂体模型比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。结论: 脾虚大鼠去垂体后, 壮医药线点灸对下丘脑、胃、肠、血 SS 调整作用不明显, 推论壮医药线点灸调节 SS 的效应机制与垂体有关。

关键词: 脾虚证 垂体 壮医药线点灸 SS

中图分类号: R245.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2006) 08-0013-03

Effect of Medicated Thread Moxibustion of Zhuang Traditional Medicine on SS of Pituitaryectomied Rat in Experimental Spleen Deficiency/ Lu Lin¹ Chen Yonghong¹ Pang Shenghang² Lv Zeping² Xiao Guoyou³ Cheng Hong¹ // 1. Guangxi Institute of Folk Medicine (Nanning Guangxi 530001, China)

Abstract Objective: To explore the mechanism and effect of Medicated Thread Moxibustion of Zhuang Traditional Medicine (MTMZ) on SS of pituitaryectomied rats in experimental spleen deficiency. Methods: 100 model rats of spleen deficiency were established by exhaustion, dissipating stagnant qi and irregular diet, then pituitaryectomied, as compared with the control group. Contents

* 基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (编号: 30260126)

1997, 3: 311~321

[11] Lee, M.W., Park, S.C., Yang, Y.G., *et al.* The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis [J]. FEBS Lett., 2002, 512: 313~318

[12] Weeds, A.G., Lowey, S., Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin [J]. J. Mol. Biol., 1971, 61: 701~725

[13] Memml, V., Post, P.L., Moosker, M.S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction [J]. Science, 1998, 279: 527~533

[14] Yamano, K., Miwa, S., Differential gene expression of thyroid hormone receptor α and β in fish development [J]. Gen. Comp. Endocrinol., 1998, 109: 75~85

[15] Moutou, K.A., Canario, A.V.M., Mamuris, Z., *et al.* Molecular cloning and sequence of Sparus aurata skeletal myosin light chains expressed in white muscle: developmental [J]. J. Exp. Biol., 2001, 204: 3009~3018

[16] Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., *et al.* Overview: the nuclear receptor superfamily: the second decade [J]. Cell, 1995, 83: 835~840

[17] Dellovade, T.L., Zhu, Y.S., Krey, L., Pfaff, D.W. Thyroid hormone and estrogen interact to regulate behavior [J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, 93: 12581~12586

[18] Morgan, M.A., Dellovade, T.L., Pfaff, D.W. Effect of thyroid hormone administration on estrogen-induced sex behavior in female Endocrinology [J]. Horm. Behav., 2000, 37: 15~22

[19] Dellovade, T.L., Kia, H.K., Zhu, Y.S., *et al.* Thyroid hormone coadministration inhibits the estrogen-stimulated elevation of preproenkephalin mRNA in female rat hypothalamic neurons [J]. Neuroendocrinol., 1999, 70: 168~174

[20] Dellovade, T.L., Zhu, Y.S., Pfaff, D.W. Thyroid hormones and estrogen affect oxytocin gene expression in hypothalamic neurons [J]. J. Neuroendocrinol., 1999, 11: 1~10

[21] Pfaff, D.W., Kow, L.M., Zhu, Y.S., *et al.* Hypothalamic cellular and molecular mechanisms helping to satisfy axiomatic requirements for reproduction [J]. J. Neuroendocrinol., 1996, 8: 325~336

[22] Jensen, J.P., Bates, P.W., Yang, M., *et al.* Identification of a family of closely related human ubiquitin conjugating enzymes [J]. J. Biol. Chem., 1995, 270: 30408~30414

[23] Wing, S.S., Jain, P., Molecular cloning, expression and characterization of a ubiquitin conjugation enzyme (E2 (17) kD) highly expressed in rat testis [J]. Biochem. J., 1995, 305 (Pt 1): 125~132

[24] Nimmla, P.B., Thampan, R.V., Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, 213: 24~31

(收稿日期 2006-04-21)