

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01264

后纵韧带骨化症患者后纵韧带组织的蛋白质组学

Proteomic analysis of biomarkers for ossification of posterior longitudinal ligament

张颖, 李阳, 王新伟, 孙其志, 张竞, 陈华江, 袁文*

第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003

[摘要] **目的** 采用蛋白质组学方法分析、寻找后纵韧带骨化症(OPLL)的特异性蛋白标志。**方法** 采用荧光差异双向电泳法研究 OPLL 患者及正常人韧带组织的双向电泳图像。采用飞行时间质谱进行鉴定并分析差异表达的蛋白质点。**结果** 两组样本均得到约 1 100 个蛋白质点, 50 个点表达有改变。切胶获得 45 个蛋白质点的肽段样本, 质谱鉴定为 21 个蛋白质或肽段。其中 15 个血液蛋白, 其余 6 个蛋白中 4 个表达下调; 2 个表达上调。RT-PCR 检测表明烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的激素脱氢酶, 伴肌动蛋白相关锚定蛋白及Ⅵ型胶原蛋白 mRNA 变化与电泳结果一致。**结论** 这些差异表达蛋白可能是 OPLL 的特异表达蛋白。

[关键词] 后纵韧带骨化症; 蛋白质组; 诊断; 标志物

[中图分类号] R 686.5 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1264-04

后纵韧带骨化症(ossification of posterior longitudinal ligament, OPLL)是发生在脊柱韧带的异位骨化性疾病。后纵韧带沿脊柱椎体后方分布, 上至枕骨大孔, 下止于骶骨, 构成椎管的前壁。OPLL 患者的后纵韧带中形成一高密度团块, 团块逐渐生长硬化成骨, 形成一个韧带与骨结构混合的致压物, 压迫脊髓造成肢体麻木、运动障碍、大小便障碍甚至瘫痪。OPLL 的发病率随年龄增长增加, 国人发病率为 1.6%~1.8%。目前研究认为, OPLL 为多因素致病, 激素、代谢因子、遗传因素都与发病有关。其发病机制仍不明确。CT 和 MRI 的普遍应用, 使得无临床症状的 OPLL 患者可以早期发现并寻求手术治疗。但是, 由于缺乏简便有效的筛查方法, OPLL 的早期诊断仍是一个难题^[1]。

蛋白质组学方法的发展完善使得在病理组织和体液中大规模寻找蛋白标志物成为可能。其中, 荧光差异双向凝胶电泳(difference gel electrophoresis, DIGE)由于排除了操作差异, 引入荧光标志物, 具有较好的准确性和操作性, 是应用较多的方法^[2]。为寻找参与 OPLL 发病的特异蛋白标志物, 本研究对 OPLL 患者及的后纵韧带标本采用 DIGE 法进行了蛋白质组比较研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 Cocktail 酶抑制剂(Roche); 蛋白质定量标准蛋白、胰蛋白酶、CHCA(Sigma); 非线性 IPG 胶条、DIGE 染料、Typhoon 扫描仪和 DeCyder 6.5 图谱分析软件(GE healthcare); SE-600 全套电泳设备(Amersham); 蛋白质分析反应剂、光密度扫描仪(GS-710, Bio-Rad 公司); MALDI-TOF MS(Applied Biosystems); AutoFlex TOF-TOF LIFT Mass Spectrometer(Bruker-Daltonics); 荧光定量 PCR 仪(Rotor-Gene

RG-3000 Real-Time Thermal Cycler, Corbett Reseach); 色谱柱: C₁₈ 柱(15 cm×150 μm, Column Technology Inc. CA), Trap 柱(Zorbax 300 SB-C₁₈ peptide traps, Agilent Technologies, Wilmington, DE)。RNA 抽提试剂(TRIZOL, Invitrogen 公司); RT 试剂(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesesi Kit, Fermentans); Real-time PCR 反应试剂(SYBR® Green Real-time PCR Master Mix, TOYOBO); DNA-Mark(DL2000, TaKaRa)。

1.2 双向电泳

1.2.1 标本采集 共收集 4 名 OPLL 患者及 4 名正常人的后纵韧带标本。OPLL 标本来自因 OPLL 行颈椎前路减压术患者。正常标本来自因外伤行颈椎前路减压植骨内固定术的患者。术中获得标本后迅速剔除骨组织, -80℃ 保存。

1.2.2 蛋白抽提 液氮研磨 3 次, 加裂解液及酶抑制剂(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 尿素, 4% CHAPS)及酶抑制剂混合液(裂解液与酶抑制剂 50:1 比例)放置 5 min。4℃ 匀浆。冰浴下超声破碎。15 000×g 离心, 45 min 后去上清。Bradford 法定量。

1.2.3 荧光差异双向凝胶电泳 内标样本为所有样本等量混合, 标准方法标记^[3]。第一向等电聚焦(电泳条件: 30 V 12 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 8 000 V 8 h, 500 V 4 h), 第二向 SDS-PAGE(15 mA/胶 30 min; 30 mA/胶至溴酚蓝离胶下沿 0.5 cm, 约 8 h)。同期跑制备胶, 考马斯亮蓝染色。

1.2.4 图像采集分析 Typhoon 扫描仪。PMT 值 550; 分辨率设为 1 000。选择 A/V 值大于 1.5 的点。

1.3 蛋白质鉴定 手工切胶。肽段提取液(60% CAN+0.1% TFA), 超声 15 min。反复抽提 3 次, ZipTip 脱盐。飞行时间质谱方式: 正离子, 反射检测(飞行管长 2.7 m, 加速电压 20 kV, 反射电压 23 kV); 数据库: NCBI nr。

[收稿日期] 2010-04-23 **[接受日期]** 2010-07-29

[作者简介] 张颖, 博士, 助理研究员。E-mail: shenss137@126.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81885650, E-mail: yuanwenspine@163.com

1.4 实时定量 PCR

1.4.1 标本采集 同前, 收集 OPLL 患者及正常人各 5 名的后纵韧带标本。

1.4.2 RNA 提取 组织冰浴下匀浆。氯仿混匀后离心 3 次。弃上清加 DEPC-Water 至完全溶解。走 RNA 变性电泳观察 18S、28S 条带, 分光光度计检测光密度 (D) 比值 D_{260}/D_{280} , 计算 RNA 浓度。

1.4.3 反转录 总 RNA 加入 Oligo dT 1 μ l 混匀后 70 $^{\circ}$ C 放置 5 min, 立即冰浴。依次加入 5 \times reaction buffer 4 μ l、RNA 酶抑制剂 1 μ l、10 mmol/L dNTP mix 2 μ l, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 反应 5 min。加入 RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μ l, 终体积 20 μ l。混匀后 42 $^{\circ}$ C, 60 min; 然后 70 $^{\circ}$ C, 10 min。

1.4.4 Real-time PCR 反应 取反转录产物 1 μ l。依次加入 (μ l): SYBR Premix Ex Taq 10. 0、Primer 10. 4、Primer 20. 4、ddH₂O 8. 2。PCR 产物选择 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 浓度的稀释产物作为标准品模板, 生成工作曲线, 计算 Ct 值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 分析数据。连续性变量的组间差异采用 *t* 检验, 频数资料、组间例数不同的连续性变量采用 χ^2 检验, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 样本采集 本研究共采集 18 个韧带标本, 由于手术获得人体后纵韧带标本体积小、组织坚韧, 最终提取的总蛋白量十分有限, 故双向电泳部分和 RT-PCR 部分分别采集标本完成。18 个病例的基本情况如表 1 所示, 患者年龄、性别、家族史情况在电泳组和 RT-PCR 组间无统计学差异 (*P* 值分别为 0.700、0.814、0.250), 进一步分亚组为 OPLL 和对照组统计, 也没有统计学差异 (OPLL 患者电泳组和 RT-PCR 组年龄、性别、家族史统计 *P* 值分别为 0.712、0.635、0.236; 对照组年龄、性别统计 *P* 值分别为 0.806、0.858, 均无 OPLL 家族史)。

表 1 患者一般资料

序号 ^a	年龄 (岁)	性别	诊断	OPLL 家族史
1	73	男	OPLL(C ₃₋₇), 混合型	无
2	58	女	OPLL(C ₃₋₆), 混合型	无
3	53	男	OPLL(C ₄₋₆), 连续型	无
4	48	男	OPLL(C ₃₋₇), 节段型	有
5	72	男	C ₅ 骨折	无
6	56	女	C ₄₋₅ 脱位	无
7	54	男	C ₄ , C ₅ 骨折	无
8	44	男	C _{4/5} 、 _{5/6} 创伤性椎间盘突出	无
9	58	男	OPLL(C ₃₋₇), 连续型	无
10	42	男	OPLL(C ₃₋₅), 节段型	无
11	46	男	OPLL(C ₂₋₃ , C ₃₋₇), 混合型	无
12	63	女	OPLL(C ₆), 节段型	无
13	62	女	OPLL(C ₃₋₅), 混合型	无
14	59	女	C ₅ 、C ₆ 骨折	无
15	67	男	C ₅ 骨折	无
16	60	男	C ₆ 骨折	无
17	53	男	C ₅₋₆ 脱位	无
18	45	男	C ₃₋₄ 脱位	无

^a: 序号 1~8 采用荧光差异双向凝胶电泳检测, 序号 9~18 采用实时荧光定量 PCR 检测

2.2 DIGE 及质谱分析结果 本研究完成 8 个样本的 DIGE 实验, 获得 8 张清晰度高、蛋白质点满意的 2-D 模拟胶图。经软件检测, 每张胶图蛋白质点均在 1 100 个左右 (图 1)。表达丰度在两组之间 AV 值大于 1.5 的点共 50 个, 手工切胶获得 45 个点 (图 2)。质谱鉴定出其中 32 个蛋白质点为 21 个蛋白质及肽段, 其中 4 个蛋白质上调、17 个蛋白质下调 (表 2)。根据其功能可大致分为 7 类: 转运结合蛋白 19 个, 占总蛋白质点数量的 59.38%; 代谢酶结构蛋白 3 个, 占 9.38%; 血纤维蛋白、结构蛋白、免疫球蛋白、信号蛋白及未知蛋白各 2 个, 各占 6.25%。

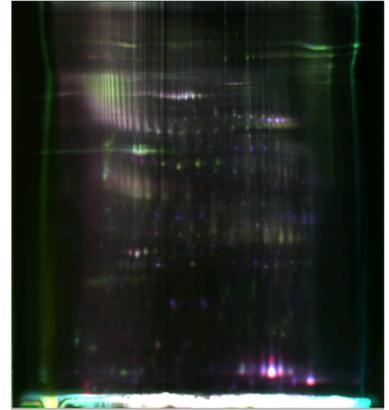


图 1 荧光双向差异电泳扫描综合图

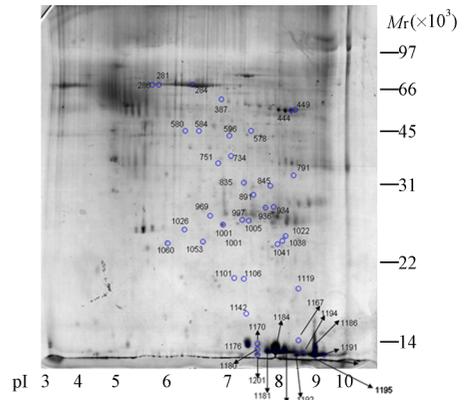


图 2 制备胶切点图

2.3 荧光免疫 PCR 结果 10 个韧带样本中 9 个提取出总 RNA, 反转录后进行荧光定量。经计算相对表达量, 发现伴肌动蛋白相关锚定蛋白 (nebulin-related anchoring protein, N-RAP) 的 mRNA 在 OPLL 韧带组织中表达上调, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原酶 [NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like, NSDHL], VI 型胶原 α 链 (alpha-1 collagen VI, VI α 1) 在 OPLL 组织中表达下调, 与 2D-DIGE 结果一致。骨生成诱导因子 (osteoglycin OG, OGN), 碳酸酐酶 (carbonic anhydrase 1, CA1), 胆绿素还原酶 B (biliverdin reductase B, BVRB) 的 mRNA 在 OPLL 韧带标本和正常对照组之间表达无统计学差异 (表 3)。

表 2 OPLL 患者韧带组织中的差异表达蛋白

序号 ^a	蛋白中文名称	蛋白英文名称
1	血红蛋白	HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha
2	伴肌动蛋白相关锚定蛋白	Nebulin-related anchoring protein isoform S [Homo sapiens]
3	免疫球蛋白 κNIG26 前体	Ig kappa chain NIG26 precursor-human
4	骨生成诱导因子	Osteoglycin OG [Homo sapiens]
5	纤维蛋白原 β 链前体	FGB Fibrinogen beta chain precursor
6	结合珠蛋白	HP protein [Homo sapiens]
7	血清白蛋白-抗凋亡配体复合体	Chain A, soltion structure of domain 3 from human serum albumin complexed to an anti-apoptotic ligand directed against bcl- X _L and bcl-2
8	胆绿素还原酶 B	Biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH)) [Homo sapiens]
9	纤维蛋白 β 链	Fibrin beta
10	白蛋白	ALB protein [Homo sapiens]
11	血红蛋白部分结构	Chain A, T-To-T(high) quaternary transitions in human hemoglobin: desarg141alpha deoxy low-salt
12	未命名蛋白	Unnamed protein product [Homo sapiens]
13	碳酸酐酶复合物 A 链	Chain A, X ray structure of the complex between carbonic anhydrase I and the phosphonate antiviral drug foscarnet
14	血清白蛋白晶体结构复合体	Chain A, crystal structure of the ga module complexed with human serum albumin
15	NAD(P)依赖的激素脱氢酶	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like, isoform CRA_a [Homo sapiens]
16	血红蛋白部分结构	Chain B, oxygen affinity modulation by the N-termini of the beta chains in human And Bovine Hemoglobin
17	血红蛋白部分结构	Chain A, structure of haemoglobin in the deoxy quaternary state with ligand bound At The Alpha Haems
18	血红蛋白部分结构	Chain B, t-to-t(High) quaternary transitions in human hemoglobin: deshis146beta Deoxy Low-Salt
19	变异 β 球蛋白	Mutant beta globin [Homo sapiens]
20	Ⅵ胶原 α 链	Alpha-1 collagen VI (AA 574-1009) [Homo sapiens]
21	假想蛋白	Hypothetical protein [Homo sapiens]

^a:序号 1~4 蛋白质表达上调,其余表达均下调

表 3 RT-PCR 各蛋白相对定量及 P 值

蛋白质	OPLL 样本的 相对定量	对照样本的 相对定量	P 值
NSDHL	0.030 1	0.015 7	0.049
Ⅵ型胶原 α 链	0.272	0.094 7	0.024
伴肌动蛋白相关锚定蛋白	0.006 2	0.07	0.041
骨生成诱导因子	0.184 2	0.091 5	0.375
碳酸酐酶	0.197 6	0.080 4	0.569
胆绿素还原酶 B	1.507 2	2.719 1	0.107

NSDHL: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的激素脱氢酶. 相对定量 = 内标定量/样品定量

3 讨论

3.1 韧带组织的双向电泳分析 8 个样本的模拟 2-D 胶图每张蛋白质点均在 1 100 个左右。胶图稳定,具有较好的敏感性和重复性,可认为初步建立了韧带组织的 2D 胶图,同时也证明本研究所采用的蛋白抽提和凝胶分离的方法是可行的。但这一蛋白抽提和凝胶分离条件远远不是理想的。在预实验中,通过更改实验条件,降低了胶图背景噪声;但调整实验条件未能去除垂直条纹,考虑是硫脲造成的^[4]。

3.2 质谱结果的整体分析 在质谱鉴定出的 21 个蛋白质或肽段中,血液高丰度蛋白,如血红蛋白、白蛋白占了较大比例。后纵韧带分为深浅两层,而椎体后的动静脉(椎动脉分支、椎管内静脉丛)走行在两层之间,这一解剖特点造成了标本处理过程中无法避免的血液污染。血浆蛋白浓度在 60~80 mg/ml,脑脊液蛋白浓度较血浆低 100 个数量级,而组织中的蛋白浓度更少^[5-7]。这种悬殊的蛋白浓度造成了

DIGE 和质谱实验的浪费。由于技术的敏感性,低峰度蛋白的微小变化被识别,而高丰度蛋白正常范围内的变化由于数量级的原因,被同样视为差异表达。这种高丰度蛋白的干扰可以采用顺序提取、亲和纯化等方法去除,但这些方法均会造成样本蛋白的损失。在本研究中,韧带标本本身仅为 0.5 cm³ 左右,获得蛋白提取液浓度约 3~4 mg/ml。对于这样微量的样本,在血浆、脑脊液研究中常用的这类纯化方法,造成的蛋白损失可能直接导致一些微量蛋白在胶图上消失。DIGE 本身的敏感性可以在一定程度上克服高丰度蛋白的干扰。

基于上述考虑,本实验未对白蛋白、血红蛋白、免疫球蛋白等结果进行进一步研究。

3.3 差异表达蛋白 NSDHL 也称 3β-羟化类固醇脱氢酶 (3beta-hydroxysteroid dehydrogenase),编码基因 NSDHL 位于 Xq28 染色体上,与胆固醇合成相关。NSDHL 位于内质网和细胞内脂滴上,细胞脂滴上的 NSDHL 联合一种选择性转运蛋白在内涵体和高尔基体间转运甘露糖受体。

Ⅵ胶原纤维是一种细胞外基质蛋白,具有细胞因子样作用。可以刺激细胞增殖迁移,促进磷酸化,与成骨密切相关。多个研究发现,人Ⅵ型胶原 α1 链编码基因(COL6A1)的单核苷酸多态性与 OPLL 强相关^[8]。基础实验推测 α1 链可能具有促进微纤维形成的作用,其缺失将导致Ⅵ胶原无法形成四聚体,进而无法形成Ⅵ胶原网络。本研究结果显示Ⅵ型胶原 α1 链表达下调,与既往研究中 OPLL 患者Ⅵα1 基因变异的发现相吻合,这一结果验证前期工作的准确性,也首次确认了Ⅵα1 在蛋白水平存在异常。

N-RAP 是一种细胞骨架蛋白,属于 LIM 蛋白家族,能够结合肌动蛋白(actin)。既往研究仅在心肌、骨骼肌、脊髓及前列腺

中发现 N-RAP, 认为 N-RAP 可能是扩张型心肌病 (dilated cardiomyopathy, DCM) 的早期标志。RNA 干扰法敲除 N-RAP 基因后, 发现 N-RAP 通过某种转录后干扰的方式, 控制两种不同形态的肌球蛋白保持平衡, 提示 N-RAP 有干扰基因翻译或参与蛋白修饰的功能^[9]。本研究首次发现了韧带组织中 N-RAP 的存在, 并发现在 OPLL 患者的后纵韧带组织中表达上调。N-RAP 既往已被证实, 具有在细胞和基质之间传导应力的作用, 而应力刺激是 OPLL 发展的重要局部因素, OPLL 细胞的基因背景造成其对应力高度敏感^[10]。据此, 我们推测 N-RAP 有可能在应力刺激诱导细胞成骨转化中发挥了一定作用。

OGN 是一种分泌蛋白, 具有亮氨酸富集重复结构 (leucine-rich repeats, LRRs), 其生长刺激活性来源于骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)。在垂体中表达极高, 可能是一种新的垂体激素。OGN 与 BMP 家族关系密切。在软骨细胞分化晚期 OGN 的 mRNA 与骨形成蛋白相结合^[11]。BMP-1 通过作用于 OGN 调节 I 型胶原纤维生成。

CA1 分布于人体多种细胞中。研究表明 CA1 可做为糖尿病的早期诊断标志, 并与 2 型糖尿病严重程度相关^[12]。细胞外 CA1 有提高血管渗透性作用。CA1 可提高局部 pH 值导致激肽释放酶 (kallikrein) 活性增强, 促进 XIIa 因子生成^[13]。

胆绿素还原酶具有氧化还原作用, 参与核苷酸糖代谢, 能够诱导转录因子 2 和血红素加氧酶 1 (hemo-oxygenase 1, HO-1)。BVR 尚参与细胞凋亡调控、细胞保护^[14-15]。

3.4 RT-PCR 结果分析 OGN、CA1、BVRB 的 mRNA 表达在两组之间无统计学差异。可能由以下情况造成: (1) 样本量小, 未能如实反映组织中 OGN、BVRB 的 mRNA 实际拷贝水平。(2) 实验误差。DIGE 实验技术是在双向凝胶电泳基础上发展起来的定量比较蛋白质组学技术, 其本身存在制备胶与实验胶不能完全重复、荧光染料对实验结果的影响以及双向电泳本身重复性不理想等因素的干扰, 因此实验结果仍然存在一定的误差。(3) RT-PCR 本身是常见的基因半定量检测技术, 还不能完全定量反映样本中 mRNA 的真实水平, 引物设计、总 RNA 的抽提、标本的采集等均可以影响实验结果的准确性。(4) 标本污染问题。所取组织标本含有血管组织等, 有可能影响 RT-PCR 的准确性。(5) 蛋白质和转录物表达之间的差异可能会导致细胞的蛋白质组与转录组不一致。转录后, 特殊序列或者是次级折叠结构可能会影响翻译率, 后者可能影响 mRNA 衰退, 与核糖体的装载和加工一样, 这些转录后机制都将证明蛋白质合成中的变化, 从而导致了蛋白质和转录物之间的相关性很弱。因而, 本试验结果尚需大样本量试验研究的进一步验证。

本研究用差异蛋白质组学的方法讨论了 OPLL 患者后纵韧带的病理改变。实验结果表明有 6 种组织蛋白质的含量在 OPLL 患者的韧带标本中有明显改变, 其中 3 种蛋白质的 mRNA 表达与蛋白质组学研究结果一致。这些蛋白质的改变与韧带骨化的发生、发展有关, 通过对它们的作用进行分析, 我们认为 OPLL 患者的基因背景决定其对老化、应力等损伤过程的敏感性。在损伤因素的刺激下, OPLL 细胞启动成骨过程。由于成骨过程的启动, 一些信号和转运蛋白的

代谢也受到影响, 伴随和推动了骨化过程。对这些蛋白质的研究将有助于进一步了解 OPLL 病理性骨化的病理生理过程, 同时, 有助于发现与骨化发展明显相关或地位重要的蛋白质, 为临床诊断和药物开发提供理论基础。

[参考文献]

- [1] Wang H, Liu D, Yang Z, Tian B, Li J, Meng X, et al. Association of bone morphogenetic protein-2 gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity in Chinese patients[J]. *Eur Spine J*, 2008, 17: 956-964.
- [2] Tumani H, Lehmsiek V, Lehnert S, Otto M, Brettschneider J. 2D DIGE of the cerebrospinal fluid proteome in neurological diseases[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2010, 7: 29-38.
- [3] Westermeier R, Scheibe B. Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 424: 73-85.
- [4] 丁士健, 俞利荣. 双向凝胶电泳[M]//夏其昌, 曾 嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学. 北京: 科学出版社, 2004: 286.
- [5] Somasundaram K, Nijaguna M B, Kumar D M. Serum proteomics of glioma: methods and applications[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2009, 9: 695-707.
- [6] Maurer M H. Proteomics of brain extracellular fluid (ECF) and cerebrospinal fluid (CSF)[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2010, 29: 17-28.
- [7] Thompson E J. Proteins of the cerebrospinal fluid: analysis & interpretation in the diagnosis and treatment of neurological disease[M]. New York: Academic Press, 2005: 9.
- [8] Kong Q, Ma X, Li F, Guo Z, Qi Q, Li W, et al. COL6A1 polymorphisms associated with ossification of the ligamentum flavum and ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. *Spine*, 2007, 32: 2834-2838.
- [9] Dhume A, Lu S, Horowitz R. Targeted disruption of N-RAP gene function by RNA interference: a role for N-RAP in myofibril organization[J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006, 63: 493-511.
- [10] Furukawa K. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: molecular basis of ectopic bone formation induced by mechanical stress[J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100: 201-204.
- [11] Osawa A, Kato M, Matsumoto E, Iwase K, Sugimoto T, Matsui T, et al. Activation of genes for growth factor and cytokine pathways late in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells [J]. *Genomics*, 2006, 88: 52-64.
- [12] Gambhir K K, Ornasir J, Headings V, Bonar A. Decreased total carbonic anhydrase esterase activity and decreased levels of carbonic anhydrase 1 isozyme in erythrocytes of type II diabetic patients[J]. *Biochem Genet*, 2007, 45: 431-439.
- [13] Gao B B, Clermont A, Rook S, Fonda S J, Srinivasan V J, Wojtkowski M, et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation[J]. *Nat Med*, 2007, 13: 181-188.
- [14] Florczyk U M, Jozkowicz A, Dulak J. Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance[J]. *Pharmacol Rep*, 2008, 60: 38-48.
- [15] Kim H P, Wang X, Nakao A, Kim S I, Murase N, Choi M E, et al. Caveolin-1 expression by means of p38beta mitogen-activated protein kinase mediates the antiproliferative effect of carbon monoxide[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11319-11324.

[本文编辑] 尹 茶