

人参皂苷 Rg1 调节 N2a/APP695 细胞 β 分泌酶活性的可能机制

陈丽敏 林楠 张静 朱元贵 陈晓春

【摘要】 目的 观察人参皂苷 Rg1 能否通过核蛋白因子 κ B (NF- κ B) 影响 N2a/APP695 细胞 β 淀粉样肽 ($A\beta$) 的生成和代谢, 从源头上缓解和 (或) 减轻阿尔茨海默病 (AD) 病人的神经病理改变。**方法** 利用稳定表达突变型 APP695 的 N2a 细胞 (N2a/APP695), 通过 RT-PCR、蛋白免疫印迹、激光共聚焦显微镜等方法检测人参皂苷 Rg1 对 β 分泌酶活性及上游转录因子 NF- κ B 活性的影响。**结果** 2.5 μ mol/L 人参皂苷 Rg1 作用 6~12 h 后, N2a/APP695 细胞外液 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 水平较 Rg1 作用前均有不同程度的下降 [最低值分别为 (13.3 \pm 4.3) ng/ml 及 (12.0 \pm 5.4) ng/ml]; BACE1 的蛋白表达水平下降 (BACE1/ β -肌动蛋白比值为 0.26 \pm 0.05); NF- κ B p65 蛋白表达水平明显增加 (磷酸化 p65/总 p65 比值为 0.93 \pm 0.02) 并诱导促进 NF- κ B 的核转位; NF- κ B 的抑制剂 quinazoline 预处理后可见人参皂苷 Rg1 对 BACE1 mRNA 和蛋白表达的抑制作用明显减弱。**结论** 人参皂苷 Rg1 能激活 NF- κ B, 促进 NF- κ B 的核转位, 增加与 BACE1 启动子相应位点的结合, 导致 β 分泌酶的活性减少。

【关键词】 人参皂苷 Rg1; 核蛋白因子 κ B; β 分泌酶; N2a 细胞

Mechanism of ginsenoside Rg1 regulating the activity of β secretase in N2a/APP695 cells CHEN Li-min, LIN Nan, ZHANG Jing, ZHU Yuan-gui, CHEN Xiao-chun. Fujian Institute of Geriatrics, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001 China
Corresponding author: CHEN Xiao-chun, Email: chenxiaochun998@gmail.com

【Abstract】 Objective To explore whether or not ginsenoside Rg1 can modify the metabolism of amyloid precursor protein (APP) and the generation of amyloid beta ($A\beta$) by nuclear factor-kappa B (NF- κ B). **Methods** N2a/APP695 cells, a mutated APP-overexpressing neuronal cell line, was used to mimic the APP metabolism and $A\beta$ generation *in vitro*. The BACE1 mRNA and protein levels were detected by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) and Western blot respectively. Then the expression levels and subcellular localization of NF- κ B were detected by Western blot and confocal laser scanning microscope respectively. **Results** The treatment of ginsenoside Rg1 at a dose of 2.5 μ mol/L decreased the levels of $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ (13.3 \pm 4.3) ng/ml vs (12.0 \pm 5.4) ng/ml in N2a/APP695 cells, decreased the protein level of BACE1 (BACE1/ β -actin 0.26 \pm 0.05), increased the protein level of NF- κ B p65 (p-p65/p65 0.93 \pm 0.02) and resulted in the translocation of NF- κ B from cytoplasm to nucleus. Quinazoline inhibited the activation of NF- κ B with a reduction of p-p65 and p-p65/p65 in N2a/APP695 cells and increased the BACE1 protein level. And the treatment of ginsenoside Rg1 showed similar changes in N2a/APP695 cells when compared with the treatment of quinazoline alone. **Conclusion** Ginsenoside Rg1 may modify the metabolism of APP by enhancing the nuclear binding of NF- κ B to BACE1 promoter and inhibiting the transcription and translation of BACE1.

【Key words】 Ginsenoside Rg1; NF- κ B; β secretase; N2a cells

β 淀粉样肽 ($A\beta$) 是由 β 分泌酶 (BACE1) 和 γ 分泌酶剪切 APP 而形成的。在阿尔茨海默病 (AD)

患者脑中, BACE1 的蛋白含量和酶活性都明显升高^[1-2], 而且存在转录调节。BACE1 基因启动子包含的转录因子结合位点 PPAR γ , 核蛋白因子 κ B (NF- κ B) 等在大鼠、小鼠和人类中是高度保守的^[3-4], 于是, 我们选取稳定表达人类 APP695 基因的小鼠神经母细胞瘤 N2a 细胞作为 AD 的细胞模型, 探讨 BACE1 表达调节在 AD 治疗中的可能作用。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2012.05.012

基金项目: 国家自然科学基金 (30772555); 教育部博士点专项基金 (20070392004)

作者单位: 350001 福州, 福建医科大学附属协和医院内科, 福建省老年医学研究所

通信作者: 陈晓春, Email: chenxiaochun998@gmail.com

人参能增强体质,提高认知能力。本课题的前期研究发现人参皂苷 Rg1 可以通过抑制 A β 诱导的 tau 蛋白过度磷酸化及抑制 CDK4-pRB-E2F1 通路等多种途径减轻 A β 诱导的大鼠皮层、海马神经元凋亡^[5-6]。本研究将重点观察人参皂苷 Rg1 能否影响 APP 的代谢和 A β 的生成及其可能机制。

材料与方法

一、药物与试剂

DMEM、OPTI-MEM、5% 胎牛血清、G418 和 RNA 提取液均购自美国 GIBCO BRL 公司,羊抗兔二抗购自美国 KPL 公司, β -肌动蛋白单克隆抗体购自 NeoMarkers 公司。Western 印迹化学发光检测试剂盒购自美国 KPL 公司。RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。DNA 标准参照物购自 Fermentas 公司。BACE1 兔源一抗受赠于许华曦教授(美国 Burnham 研究所),NF- κ B p65 一抗购自美国 Cell Signaling 公司,quinazoline 购自美国 Calbiochem 公司,Alex488 标记的二抗和 Topro-3 购自美国 Invitrogen 公司。人参皂苷 Rg1(分子量 800,分子式 C₄₂H₇₂O₁₄)由白求恩医科大学有机化学教研室提供,纯度 > 98%,以 DMEM 培养基配置成储备液, -20 °C 保存备用。

二、细胞及细胞培养

小鼠神经纤维瘤野生型 N2a 细胞(N2a/wt),稳定表达突变型 APP695 的 N2a 细胞(N2a/APP695)受赠于许华曦教授。细胞培养基内含 47.5% DMEM, 47.5% OPTI-MEM 和 5% 胎牛血清及 200 μ g/ml G418。所有细胞复苏后以 1.2×10^6 /孔接种于 6 孔培养板上,1.4 ml 培养基/孔,放置于温度 37 °C,体积分数为 5% CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养,每 2 天传代 1 次,传代 3 次后将细胞用于各项实验。

三、药物干预及实验分组

将培养细胞分为 5 组:(1)对照组:N2a/wt 细胞;(2)实验对照组:N2a/APP695 细胞;(3)Rg1 组:2.5 μ mol/L 的人参皂苷 Rg1 培养 N2a/APP695 细胞 3、6、12、24 h;(4)单纯用药组:NF- κ B 抑制剂 quinazoline 500 nmol/L 预处理 N2a/APP695 细胞 18 h;(5)联合用药组:NF- κ B 抑制剂 quinazoline 500 nmol/L 预处理 N2a/APP695 细胞 18 h 后,再以 2.5 μ mol/L 的人参皂苷 Rg1 继续培养 3、6、12、24 h,然后提取细胞裂解液用于各项实验。各实验组设 3 个平行对照。拟行免疫荧光染色的细胞,先将玻片置

于 24 孔培养板中,然后以 10 000/孔的密度接种细胞,以 2.5 μ mol/L 的人参皂苷 Rg1 培养 3、6、12、24 h 后将玻片取出进行实验,实验重复 3 次。

四、酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 A β ₁₋₄₀ 及 A β ₁₋₄₂ 水平

参照 ELISA 试剂盒的产品说明书进行操作,分别测定培养上清液的 A β ₁₋₄₀ 及 A β ₁₋₄₂ 水平,ELISA 测定时同时设空白孔、标准孔、待测样品孔,严格参照产品说明书操作后用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(A 值),根据标准曲线计算出上清液 A β ₁₋₄₀ 及 A β ₁₋₄₂ 水平,结果以 ng/ml 表示。

五、细胞核蛋白和细胞质蛋白的提取

拟行 NF- κ B P65 检测的标本进行细胞核蛋白和细胞质蛋白的提取。细胞用裂解缓冲液 A (10 mmol/L HEPES, pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF) 400 μ l 冰上裂解细胞 15 min,然后加入 10% NP-40(终浓度 0.2%)振荡 20 s, 6000 $\times g$ 4 °C 离心 5 min,上清液即为胞质蛋白。将沉淀重悬于 50 μ l 裂解缓冲液 B (10 mmol/L HEPES, pH 7.9, 25% 甘油, 420 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF),冰上振荡 20 min, 14 000 $\times g$ 4 °C 离心 5 min,上清液即为可溶性的核蛋白,储存于 -80 °C 以备检测 p65 核蛋白。

六、蛋白免疫印迹

细胞用细胞裂解液(10 mmol/L Tris, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L NaF, 20 mmol/L Na₄P₂O₇, 2 mmol/L Na₃VO₄, 0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸钠, 1% Trion-X 100, 1 mmol/L PMSF, 60 μ g/ml 抑肽酶, 10 μ g/ml 亮肽素, 1 μ g/ml 胃酶抑素)冰上裂解 30 min,低温下 12 000 $\times g$ 离心 30 min 后汲取上清液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,分离的蛋白转移到 PVDF 上,室温下用封闭液(含 5% 脱脂奶粉和 0.2% 吐温-20)封闭 1 h 后分别加入用封闭液稀释的一抗(1:500 稀释),4 °C 孵育过夜,用 1:4000 稀释的辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 孵育 2 h,再用增强型化学发光法显色,X 射线底片曝光。同时选择 β -肌动蛋白为内参照。每次曝光后底片扫描后对条带的点密度用 Scion 公司的软件进行定量,然后与 β -肌动蛋白作比较,计算出相对百分值。

七、免疫荧光染色及激光共聚焦显微镜观察

处理的细胞经 0.01 mol/L PBS 冲洗后用 4% 多

聚甲醛固定液固定 30 min, PBS 冲洗后加入 0.3% Triton X-100 溶液作用 10 min, PBS 冲洗后加入含 5% BSA 的 TBS, 室温封闭 60 min 后加入用封闭液稀释的 NF- κ B 一抗(1:100 稀释), 放入湿盒, 4 °C 过夜。PBS 冲洗后加入用封闭液按 1:500 稀释的 Alex488 标记的免疫荧光二抗, 室温湿盒内孵育 1 h 后 PBS 冲洗。用 Topro-3 (PBS 1:100 000 稀释) 染核 10 min。PBS 冲洗后抗荧光淬灭液反面固定后指甲油封片, 荧光共聚焦显微镜底下观察, 拍照。

八、RT-PCR 法测定 BACE1 mRNA 表达水平

利用 Trizol 常规提取细胞总 RNA, RNA 定量后应用一步法 RT-PCR (Access Quick™ Master Mix) 检测 BACE1 mRNA 的表达水平, 并以 GAPDH 为参照, 所有的标本重复测定。在扩增终点取 8 μ l 的产物, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并拍照。凝胶图像分析系统进行条带吸光度扫描, 以 GAPDH 校正做 BACE1 相对表达量分析, 数值以 BACE1/GAPDH 表示。引物序列 BACE1 (299 bp): 上游 5' GATGGTG ATGCGGAAGGACTGATT3', 下游 5' CCGGCGGGAG TGGTATTATGAAGT3', GAPDH (500 bp): 上游 5' GGCATGGGTCAGAAGGATTC 3', 下游 5' ATGTC ACGCACGATTTCCCGC3'。

九、统计学处理

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 12.0 统计软件, 选择 ANOVA (Tukey) 进行多组间差异性统计, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、人皂苷 Rg1 对 N2a/APP695 细胞分泌 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 的影响

结果显示, 2.5 μ mol/L 的 Rg1 作用 3、6、12 h 后细胞外液 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 水平较 Rg1 作用前均有不同程度的下降, 以 6 ~ 12 h 下降明显(表 1)。提示 2.5 μ mol/L 人皂苷 Rg1 在一定时间范围内对 N2a/APP695 细胞 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 的生成或分泌有抑制作用。

二、人皂苷 Rg1 对 N2a 细胞 BACE1 蛋白水平的影响

我们以 2.5 μ mol/L 人皂苷 Rg1 分别作用于 N2a/wt 细胞及 N2a/APP695 细胞 3、6、12、24 h 后提取细胞蛋白, 通过 Western 印迹法检测 BACE1 蛋白表达水平, 结果可见, N2a/wt 细胞 BACE1 蛋白水平较低(0.24 ± 0.05), N2a/APP695 细胞 BACE1 蛋白水平高于 N2a/wt 细胞(0.81 ± 0.04), 2.5 μ mol/L 人皂苷 Rg1 作用 3 ~ 24 h 后, BACE1 蛋白水平较 N2a/APP695 细胞实验对照组明显减少, 并呈逐步下降趋势, 12 h 下降最为明显(0.26 ± 0.05), 见图 1。提示人皂苷 Rg1 能减少 N2a/APP695 细胞 BACE1 蛋白表达水平。

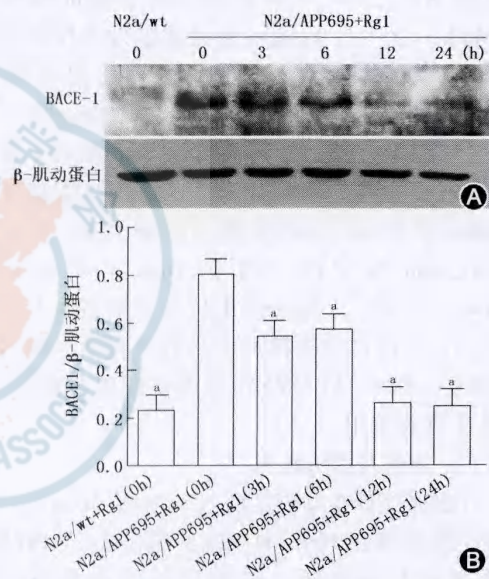


图1 人皂苷 Rg1 对 N2a/APP695 细胞 BACE1 蛋白水平的影响。A: Western 印迹法检测 BACE1 蛋白表达水平; B: 柱状图显示 BACE1/ β -肌动蛋白的比值。与实验对照组比较^a $P < 0.01$

三、人皂苷 Rg1 对 N2a 细胞 NF- κ B p65 表达和核转位的影响

结果可见 N2a/wt 和 N2a/APP695 细胞内磷酸化 p65 与总 p65 蛋白表达水平及磷酸化 p65/总 p65 比值均处于较低水平。2.5 μ mol/L Rg1 作用后 N2a/APP695 细胞磷酸化 p65 与总 p65 蛋白水平随 Rg1 作用时间延长呈逐步上升趋势, 磷酸化 p65/总

表1 Rg1 对 N2a/APP695 细胞外液 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 水平的影响($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	样本数	$A\beta_{1-40}$				$A\beta_{1-42}$			
		3 h	6 h	12 h	24 h	3 h	6 h	12 h	24 h
N2a/APP695	3	28.5 \pm 2.0	15.1 \pm 2.2	18.2 \pm 3.3	16.7 \pm 3.2	20.3 \pm 3.7	26.5 \pm 4.7	33.9 \pm 5.8	31.1 \pm 4.3
N2a/APP695 + Rg1	3	22.9 \pm 3.0 ^a	10.9 \pm 2.0 ^a	13.3 \pm 4.3 ^b	17.8 \pm 4.2	9.5 \pm 2.4 ^a	18.5 \pm 3.2 ^a	12.0 \pm 5.4 ^a	27.8 \pm 3.2

注: 与相应时间未加 Rg1 组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$

p65 比值亦升高,并于 12 h 达到最高峰,见图 2。以上提示人参皂苷 Rg1 可诱导激活 NF- κ B。激光共聚焦显微镜观察可见,N2a/wt 和 N2a/APP695 细胞的 NF- κ B 的 p65 表达较低,而且多位于胞质,2.5 μ mol/L 人参皂苷 Rg1 作用后 N2a/APP695 细胞胞质 NF- κ B p65 表达逐渐升高,在 6 ~ 12 h 达到高峰,并可见 NF- κ B 的 p65 核移位现象,镜下表现为胞质中绿色的 NF- κ B 的 p65 阳性颗粒明显增多,并可见部分绿色颗粒转移入染色为蓝色的胞核内。以上提示人参皂苷 Rg1 能增加 N2a/APP 695 细胞 NF- κ B 的 p65 蛋白表达水平并促进其核转位,见图 3。

四、人参皂苷 Rg1 通过 NF- κ B 对 N2a 细胞 BACE1 mRNA 转录的影响

我们应用 NF- κ B 抑制剂 quinazoline 对 N2a/APP695 细胞进行预处理,然后再加入人参皂苷 Rg1 作用不同时间后检测各组细胞 BACE1 mRNA 表达水平。结果显示,N2a/wt 细胞 BACE1 mRNA 表达水平较低(0.21 ± 0.03),N2a/APP695 细胞 BACE1 mRNA 表达水平明显高于 N2a/wt 细胞(0.36 ± 0.06);quinazoline 预处理后可见人参皂苷 Rg1 对 BACE1 mRNA 表达的抑制作用明显降低,见图 4。提示人参皂苷 Rg1 可能通过激活 NF- κ B 减少 BACE1 mRNA 的表达水平。

五、人参皂苷 Rg1 通过 NF- κ B 对 N2a 细胞 BACE1 蛋白表达水平的影响

同样我们利用 NF- κ B 抑制剂 quinazoline 抑制 NF- κ B 的激活,quinazoline 预处理后 N2a/APP695 细胞磷酸化 p65 蛋白水平和磷酸化 p65/总 p65 比值明显降低(0.24 ± 0.07),即使再加入人参皂苷 Rg1 也不能明显增加磷酸化 p65 蛋白水平和磷酸化 p65/总 p65 比值,见图 5。同时,N2a/APP695 细胞内 BACE1 蛋白水平未见降低,提示人参皂苷 Rg1 减少 BACE1 蛋白表达的作用被抑制,见图 6。以上结果进一步提示人参皂苷 Rg1 通过 NF- κ B 调节 BACE1 的表达。

讨 论

BACE1 是 A β 生成的限速酶,大多数散发性 AD 患者的 BACE1 含量升高或活性增强^[7]。而且,BACE1 蛋白水平、活性和分泌酶产

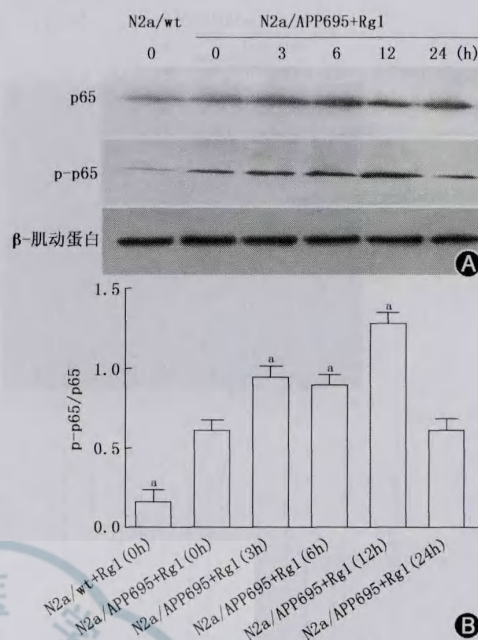


图2 人参皂苷 Rg1 对 N2a/APP695 细胞 p65 和 p-p65 蛋白水平的影响。A: Western 印迹法检测磷酸化 p65 与总 p65 蛋白表达水平;B: 柱状图显示磷酸化 p65/总 p65 的比值。结果显示 Rg1 能通过增加磷酸化 p65/总 p65 比值使 NF- κ B 活化。与实验对照组比较^a $P < 0.01$

物 β -CTF 在散发性 AD 病人脑内和神经炎性斑块中,以及 AD 和轻度认知功能障碍病人的脑脊液中都明显升高。BACE1 表达和活性变化提示脑中存在 BACE1 转录和翻译水平增高的调节^[8]。我们的

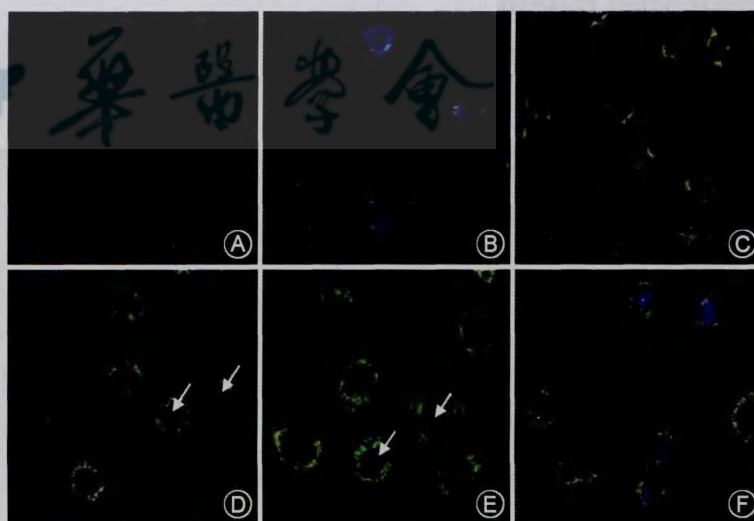


图3 人参皂苷 Rg1 对 N2a/APP695 细胞 p65 核转位的影响。蓝色部分代表细胞核,绿色部分代表 p65 染色阳性颗粒。箭头所示为 p65 染色阳性颗粒核内转位。A: N2a/wt; B: N2a/APP695; C: N2a/APP695 + Rg1 (3 h); D: N2a/APP695 + Rg1 (6 h); E: N2a/APP695 + Rg1 (12 h); F: N2a/APP695 + Rg1 (24 h)

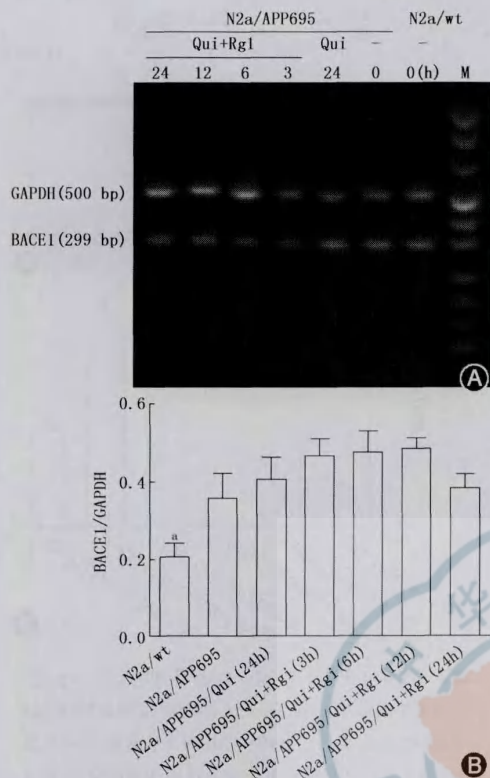


图4 人参皂苷 Rg1 对 N2a/APP695 细胞 BACE1 mRNA 水平的影响。A: BACE1 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳的结果; B: BACE1/GAPDH 吸光度比值结果。与实验对照组比较^a $P < 0.01$

研究已经证实 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 能减少 A β 生成和 BACE1 蛋白表达水平。接下来的工作是要寻找人参皂苷 Rg1 影响 BACE1 转录和翻译的作用位点,进一步探讨人参皂苷 Rg1 降低 BACE1 表达的可能机制。

NF- κ B 是一种具有多向性调节作用的蛋白质因子,由多肽链 p50 与 p65 两亚基形成二聚体,参与基因尤其是与机体免疫反应有关的基因表达调控。除免疫细胞外,全身许多组织细胞均存在 NF- κ B 的转录调控。许多中药如雷公藤、大黄、黄芪和当归等具有调节免疫、细胞增殖和凋亡的作用。研究中药对于 NF- κ B 活性的调节作用亦将有利于从分子水平阐明中药的药理机制,开发新的药物。

对 BACE1 启动子的研究提示, NF- κ B 可以与 BACE1 启动子区域的 DNA 同源序列结合对大脑神经细胞 BACE1 的表达起抑制作用^[3]。Bourne 等^[9]通过凝胶迁移率实验方法研究表明 BACE1 启动子上的 NF- κ B 位点能与 NF- κ B 亚单位 p65/p50 结合,证实 NF- κ B 位点是一个功能性位点。大鼠的

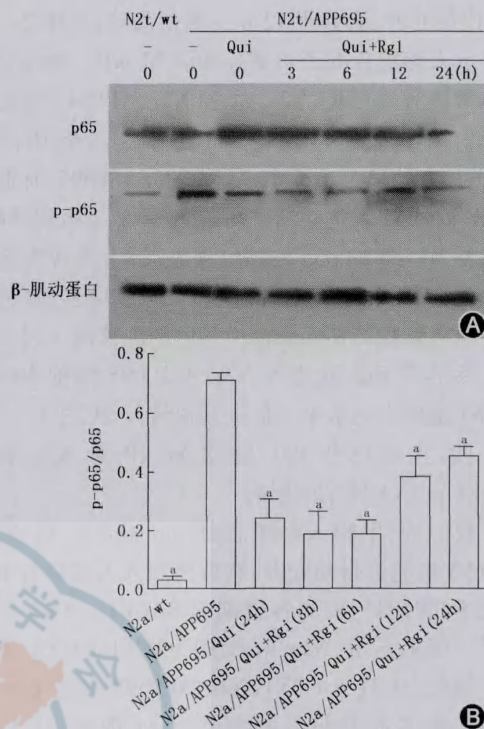


图5 人参皂苷 Rg1 和 NF- κ B 抑制剂 quinazoline 对 N2a/APP695 细胞 p65 和 p-p65 蛋白水平的影响。A: Western 印迹法检测磷酸化 p65 与总 p65 蛋白表达水平; B: 柱状图显示磷酸化 p65/总 p65 的比值。与实验对照组比较^a $P < 0.01$

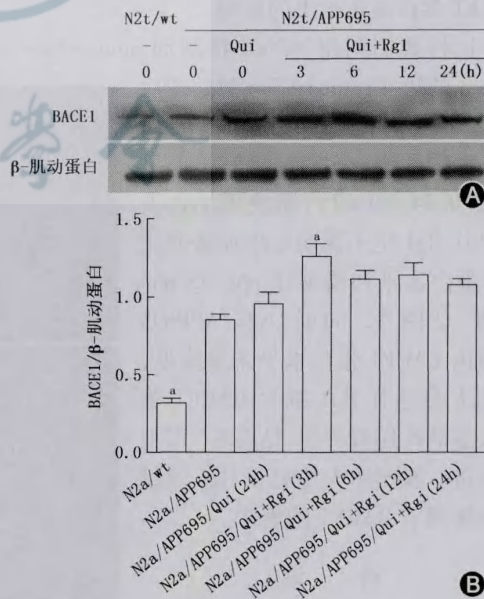


图6 人参皂苷 Rg1 和 NF- κ B 抑制剂 quinazoline 对 N2a/APP695 细胞 BACE1 蛋白水平的影响。A: Western 印迹法检测 BACE1 蛋白表达水平; B: 柱状图显示 BACE1/ β -肌动蛋白的比值。与实验对照组比较^a $P < 0.01$

BACE1 启动子包含有一个单独的 NF- κ B 结合位点, 它也出现在人类 BACE1 启动子中 (- 1521 ~ - 1512, 同源性 > 85%)^[3, 10]。NF- κ B 结合位点的作用依细胞的类型和培养的环境而不同。在神经细胞和未活化的胶质细胞, NF- κ B 对 BACE1 起抑制作用, 而在活化的星型胶质细胞中则起激动作用。因此, NF- κ B 对 N2a/APP695 细胞的 BACE1 起抑制作用。

基于 NF- κ B 在 AD 发病和神经保护方面的广泛作用, 我们想了解人参皂苷 Rg1 是否能通过 NF- κ B 对 BACE1 的转录调节来发挥其作用。结果发现, 人参皂苷 Rg1 作用于 N2a/APP695 细胞 3 ~ 6 h 后出现 NF- κ B 的活化及核移位增加, NF- κ B 蛋白水平增加, 伴随着 BACE1 mRNA 表达水平以及 BACE1 蛋白水平都明显下降; NF- κ B 抑制剂能阻断人参皂苷 Rg1 的上述作用。以上研究结果提示人参皂苷 Rg1 可能通过激活 NF- κ B, 增加 NF- κ B 的核转位, 使其与 BACE1 启动子相应位点的结合增加, 从而抑制 BACE1 的转录和翻译, 使 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 生成减少。

参 考 文 献

- [1] Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, et al. Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J*

Pathol, 2004, 164: 719-725.

- [2] Tyler SJ, Dawbarn D, Wilcock GK, et al. alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299: 373-376.
- [3] Lange-Dohna C, Zeitschel U, Gaunitz F, et al. Cloning and expression of the rat BACE1 promoter. *J Neurosci Res*, 2003, 73: 73-80.
- [4] Christensen MA, Zhou W, Oing H, et al. Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 865-874.
- [5] 彭小松, 陈晓春, 朱元贵, 等. 人参皂苷 Rg1 对 A β 25-35 诱导大鼠海马神经元 tau 蛋白异常磷酸化的影响. *中国药理学通报*, 2005, 21: 299-305.
- [6] Chen XC, Chen LM, Zhu YG, et al. Involvement of CDK4, pRB, and E2F1 in ginsenoside Rg1 protecting rat cortical neurons from beta-amyloid-induced apoptosis. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24: 1259-1264.
- [7] Yang LB, Lindholm K, Yan R, et al. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med*, 2003, 9: 3-4.
- [8] Rossner S, Sastre M, Bourne K, et al. Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression--implications for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 2006, 79: 95-111.
- [9] Bourne KZ, Ferrari DC, Lange-Dohna C, et al. Differential regulation of BACE1 promoter activity by nuclear factor-kappaB in neurons and glia upon exposure to beta-amyloid peptides. *J Neurosci Res*, 2007, 85: 1194-1204.
- [10] Sambamurti K, Kinsey R, Maloney B, et al. Gene structure and organization of the human beta-secretase (BACE) promoter. *Faseb J*, 2004, 18: 1034-1036.

(收稿日期: 2011-11-06)

(本文编辑: 朱瑶)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊“疑难病例析评”栏目征稿

中华医学杂志开辟“疑难病例析评”栏目。结构分“病历摘要”和“分析与讨论”两部分。与本刊“临床病理讨论”栏目文稿的不同之处为: (1) 作者在文题下署名, 而非仅在文末注明由何人整理, 作者拥有本文的著作权。 (2) “分析与讨论”部分不采用依次发言的形式, 而由作者系统归纳, 形成思路清晰、条理清楚、分析得当、科学性强的原创性临床论文。论文性质等同于本刊“论著”。 (3) 所分析的病例不一定都具备病理检查结果, 但必须经科学手段确诊。

1. 病例选择: (1) 疑难病例, 特别是涉及多学科、多领域的疑难病例。 (2) 误诊且有经验教训的病例。 (3) 诊断已经明确, 但病情危重或有诸多并发症, 治疗上甚为棘手的病例。 (4) 罕见病例。 (5) 其他对临床实践有指导或提示意义的病例。以上病例须最终获得明确诊断或成功治疗, 临床资料应齐全, 能提供实验室、影像学 (或) 病理确诊证据。

2. 写作格式: 文题可用主要症状、体征或诊断命题, 各

短语之间用一字线连接。正文分“病历摘要”和“分析与讨论”两部分。“病历摘要”部分: 交代清楚患者主诉、病史 (包括既往史)、作者接诊后的诊治经过等。应提供必要的实证图片。字数以不超过 1000 字为宜 (不包括图片)。“分析与讨论”部分: 要求逻辑性强, 条理清楚, 能较好地体现正确的临床思维, 对读者的临床工作有实际借鉴意义。重点部分可采用序号标示法, 以突出层次。写作上应满足以下要求: (1) 开门见山, 首先说明本例需要从哪几个方面讨论; (2) 写清诊断和治疗思路, 如何发现并优先处理疾病的关键问题; (3) 请将疑点、鉴别诊断要点另列出, 通过什么手段排除相关疾病; (4) 给出本例的最后诊断和诊断依据; (5) 若为误诊, 则总结经验教训; (6) 若为罕见病, 则介绍目前国内外的最新进展; (7) 列出相关的国内外主要参考文献。字数以控制在 2000 ~ 2500 字为宜。