论著

文章编号:1000-5404(2012)08-0744-05

载脂蛋白E亚型通过细胞外信号调节激酶途径影响轴突生长锥的生长

殷 成,蒋 理,周 帅,孙晓川 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

[摘要] **目的** 观察载脂蛋白E(apolipoprotein E,ApoE)各个亚型对神经元轴突生长锥的影响并探索其机制。**方法** 体外培养小鼠皮质神经块,加入重组人类ApoE到神经块培养基中,免疫荧光和Western blot检测重组人类ApoE能否进入轴突及其生长锥;鬼丙环肽染色生长锥观察重组人类ApoE2、3、4对生长锥的影响;加入细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路抑制剂,观察ERK信号通路是否参与ApoE亚型对生长锥的影响。**结果** 免疫荧光和Western blot显示加入重组人类ApoE后的神经块轴突及其生长锥中ApoE为阳性;加入重组人类ApoE2、3、4组的荧光强度分别为(50.7±19.4)、(58.5±15.4)、(23.4±13.5),其中加入重组人类ApoE4的轴突生长锥荧光强度低于加入重组人类ApoE2、3的生长锥荧光强度($P<0.05$);同时加入重组人类ApoE4和ERK信号通路抑制剂的实验组生长锥荧光强度为(32.8±13.2),而仅加入重组人类ApoE4的实验组生长锥荧光强度为(21.9±6.9),实验组生长锥荧光强度高于对照组($P<0.05$)。**结论** 重组人类ApoE能进入轴突及其生长锥,ApoE4能负性影响生长锥生长,阻断ERK信号途径能抑制ApoE4对生长锥的负面影响。

[关键词] 神经块;轴突;生长锥;载脂蛋白E;细胞外信号调节激酶
[中图法分类号] R329.26;R338.1;R363.25 [文献标志码] A

ApoE4 influences growth cone of neuronal axon through ERK signal pathway

Yin Cheng, Jiang Li, Zhou Shuai, Sun Xiaochuan (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of different ApoE subtypes on the growth cones of neuronal axons. **Methods** Cortical explants were isolated from 1-day-old ApoE knockout mice, and then cultured *in vitro* with the treatment of the recombinant human ApoE2, 3 and 4 (20 μg/ml) respectively for 24 h. Immunofluorescence staining and Western blot analysis were used to detect recombinant human ApoE whether entering axons and growth cones. Phalloidin staining was used to dye the growth cones after ApoE2, 3, and 4 treatment. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor was added into culture medium to discover ERK pathway whether participating in the process of ApoE subtypes influencing the growth cones. **Results** Immunofluorescence staining and Western blotting showed the recombinant human ApoE was positive in the axons and growth cones, and the fluorescence intensity of axonal growth cones was 50.7±19.4, 58.5±15.4 and 23.4±13.5, respectively for ApoE2, 3 and 4 treatment. The fluorescence intensity of axonal growth cones with ApoE4 treatment was significantly weaker than that of growth cones after ApoE2 or ApoE3 treatment ($P<0.05$). The fluorescence intensity of growth cones in cortical explants with ApoE4 and ERK inhibitor treatment was 32.8±13.2, but that of growth cones after ApoE4 treatment was 21.9±6.9. The fluorescence intensity in experimental group was stronger than that in control group without above inhibitor ($P<0.05$). **Conclusion** Recombinant human ApoE can enter the axons and growth cones of explants. ApoE4 can negatively influence the growth of growth cones, which is inhibited by ERK inhibitor.

[**Key words**] explants; axon; growth cone; apolipoprotein E; extracellular signal-regulated kinase

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30973087). Corresponding author: Sun Xiaochuan, Tel: 86-23-89011151, E-mail: sunxch1445@gmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973087)

[通信作者] 孙晓川,电话:(023)89011151,E-mail: sunxch1445@gmail.com

在哺乳动物中枢神经系统中,生长锥是神经元轴突末端的膨大部分。在轴突发育和再生过程中,生长锥能不断伸缩感受周围基质环境,确定轴突延伸的路径,最终生长锥与靶点接触,进而分化形成突触前部分,为神经科学领域研究的热点[1]。作为中枢神经系统中主要的载脂蛋白,载脂蛋白 E(apolipoprotein E, ApoE)参与了神经元脂质的代谢,钙的转运,信号的转导等[2-3]。此外,人类 ApoE 存在 2、3、4 亚型,在疾病发生和预后等方面,不同亚型的携带者表现出不同的效应,比如 ApoE4 携带者更易患阿尔茨海默病,而 ApoE2 却能降低携带者患该病的风险,以及 ApoE4 携带者颅脑创伤预后较 ApoE2、3 携带者更差等[4]。但是,上述现象的机制目前尚未得到完全的阐明,我们考虑人类不同 ApoE 亚型对神经元轴突生长锥的影响可能是其机制之一。本研究基于该假设,采用体外培养 ApoE 敲出小鼠皮质神经块作为研究模型,分别加入人类重组 ApoE 的 3 种蛋白亚型,使用免疫荧光和 Western blot 等技术观察 ApoE 各个亚型对轴突生长锥的影响,并进一步明确 ApoE 亚型影响轴突生长锥可能的信号通路,为 ApoE 各亚型对疾病的不同影响寻找新的机制和可能的干预策略。

1 材料与方法

1.1 培养皮质神经块

参考并改进文献[5]中的培养方案:出生后 1 d 的 C57 野生小鼠/ApoE 敲出鼠(重庆医科大学实验动物中心)断头取脑,浸泡在冰预冷培养基 DMEM/F12(DF12, Gibco 公司,美国)中,使用眼科镊仔细剥离脑组织表面脑膜,分离出皮质部分,使用眼科剪剪碎至 0.3 mm 左右大小,移入预先含有 DMEM/F12 培养基的离心管中自然沉降,随后小心移除神经块以外的上清液,再加入 Neurobasal/10% 胎牛血清培养基(Gibco 公司,美国),使用巴氏管轻柔地重悬组织块。另取出放置有 8 mm × 8 mm 玻璃片的 35 mm 培养皿,种板前 2 h,将 0.1% 多聚赖氨酸(Sigma 公司,美国)滴加到玻璃片上,放置于常温超净台,临种板前吸出多聚赖氨酸,PBS 润洗 3 遍。使用巴氏管吸起重悬后的组织块,接种在铺有玻片的培养皿中,置于恒温孵箱(37 ℃,5% CO_2)。4 h 后,组织块基本全部贴壁,全量更换培养液为 Neurobasal/2% B27 培养基(Gibco 公司,美国)。其后每 2 天半量更换培养基,4 ~ 5 d 神经块即培养成熟。

1.2 检测轴突及生长锥中重组人类 ApoE

取载有 ApoE 敲出鼠神经块玻片的培养皿,全量更换为新鲜 Neurobasal/2% B27 培养基,分为 3 组,分别加入重组人类 ApoE2、3、4(PeproTech 公司,美国),每种亚型蛋白在培养基中的终浓度为 20 μg/ml[6],上述 3 组均为实验组,此处设不加入重组人类 ApoE 的 ApoE 敲出鼠神经块为对照组,随后置于恒温孵箱。孵育 24 h 后,使用免疫荧光和 Western blot 检测上述实验组和对照组中 ApoE 是否为阳性,证明重组人类 ApoE 是否进入轴突及生长锥。

1.3 免疫荧光检测

取出载有生长成熟神经块的玻片,使用 PBS 清洗 3 遍。室温下使用 4% 多聚甲醛固定标本 20 min,PBS 清洗 3 遍后,加入 0.1% Triton X-100 破膜 1 h[7]。山羊封闭血清用于稀释一抗:小鼠单克隆抗微管蛋白Ⅲ抗体(anti-tubulinⅢ,1∶500 稀释, Sigma 公司,美国), 兔多抗 anti-ApoE (1∶200 稀释,Santa Cruz Biotechnology 公司,美国),滴加一抗至玻片表面,4 ℃过夜孵育。PBS 稀释二抗:TRITC 标记山羊抗小鼠(1∶50 稀释,中杉金桥公司,中国)和 Alexa 555 标记山羊抗兔(1∶50 稀释,碧云天公司,中国)作为荧光二抗,37 ℃水浴锅中避光孵育 30 min,PBS 冲洗去除多余二抗,50% 甘油封片。使用荧光显微镜及其成像系统(NIKON TE2000-U,日本)成像,使用 Image J 软件进行图片处理。

1.4 Western blot 检测

使用 PBS 冲洗神经块 3 遍后,加入含有 1% PMSF 的 Western-IP 细胞裂解液(碧云天公司,中国),冰上裂解 30 min,使用细胞刮取下培养皿上裂解后神经块,4 ℃下 15 000 r/min 离心 20 min,离心后上清液即为蛋白样品,使用 BCA 蛋白检测试剂盒(碧云天公司,中国)检测蛋白浓度。按照 4∶1的体积比加入蛋白样品和上样缓冲液(碧云天公司,中国),混匀后沸水煮 5 min, -80 ℃ 分装保存。使用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品,80 V 恒压电泳约 60 min,待染料前沿进入分离胶后将电压提高至 100 V,恒压电泳约 2 h。切胶后在 250 mA 50 min 的转膜条件下将蛋白转至孔径 0.22 μm 的 PVDF 上。使用 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭膜 1 h,封闭液用于稀释一抗,兔多抗 anti-ApoE (1∶300 稀释, Santa Cruz Biotechnology,美国) 4 ℃过夜孵育。洗膜后,对应的山羊抗兔二抗(1∶2 000 稀释, 中杉金桥公司,中国)37 ℃孵育 1 h,ECL 化学发光法用于条带显影,Quantity One 软件用于条带处理。

1.5 荧光染色检测生长锥

取出载有生长成熟神经块的玻片,使用 PBS 清洗 3 遍。室温下使用 4% 多聚甲醛固定标本 10 min,再加入 PBS 稀释的 0.1% Triton X-100 破膜 1 h。PBS 清洗 3 遍去掉 Triton X-100 后,加入 PBS 稀释的鬼丙环肽(Phalloidin, 50 μg/ml, Sigma,美国),室温孵育 1 h,使用 PBS 冲洗 5 遍去掉多余鬼丙环肽,随后 50% 甘油封片。在设置相同成像参数的条件下,使用荧光显微镜及其成像系统随机选择视野成像。使用 Image J 软件对生长锥荧光强度进行测量,即打开图像,转成 8 位灰阶,设定域值,用 Analyze particle 命令分析。每个实验组检测生长锥各 30 个,并计算其平均值。使用 Sigma Plot 软件生成柱状图。

1.6 观察 ApoE 各亚型对生长锥的影响

同样取载有 ApoE 敲出鼠神经块的玻片,全量换液后分为 3 组,分别将重组人类 ApoE2、3、4 加入培养基中(20 μg/ml),上述 3 组均为实验组,此处设野生鼠神经块为对照组,随后置于恒温孵箱。孵育 24 h 后,使用鬼丙环肽染色各组中生长锥,

并检测其荧光强度。比较各组间荧光强度的差异，检测 ApoE 各亚型对生长锥的影响。

1.7 检测细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase，ERK)通路是否参与 ApoE 亚型对生长锥的影响

实验组中 ERK 信号通路抑制剂 U0126 和 ApoE4 同时加入 ApoE 敲出鼠神经块培养基中，U0126 在培养基中的终浓度为 10 μmol/L。对照组中，仅加入 ApoE4 至 ApoE 敲出鼠神经块培养基中。置于恒温孵箱，孵育 24 h 后，使用鬼丙环肽染色各组中生长锥，检测其荧光强度。比较 2 组间荧光强度的差异，检测 ERK 抑制剂的效应。

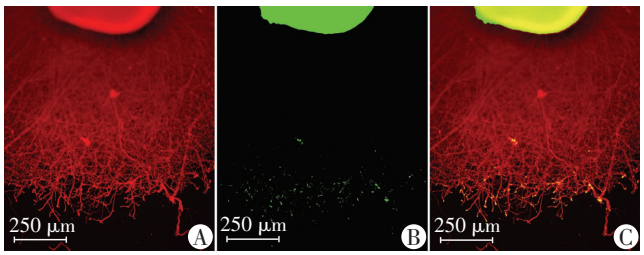
1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SSPS 10.0 统计软件，两组间比较行 t 检验。

2 结果

2.1 皮质神经块的培养

小鼠皮质神经块种板后 4 h 内即贴壁，24 h 后可见细丝状的轴突从神经块边缘伸出并向外周扩展。在培养成熟的神经块中，免疫荧光染色轴突中 tubulin Ⅲ，可见染为红色的细长致密轴突以神经块为中心呈放射状分布(图 1A)。对生长锥的荧光染色可见染为绿色的生长锥呈点状分布在神经块的外围(图 1B)，通过叠加染色后轴突和生长锥的图片，可见生长锥对应的分布在单个轴突的末端(图 1C)。



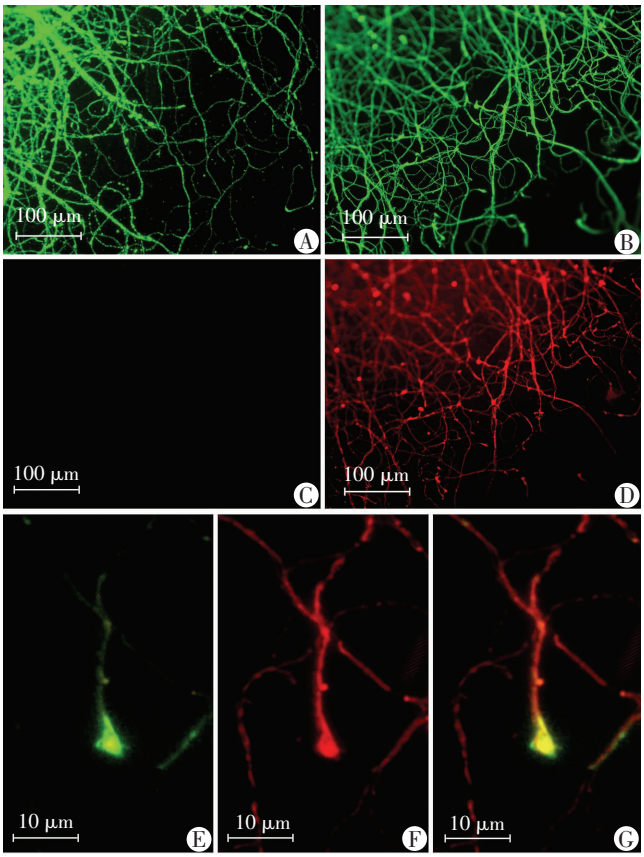
A：轴突染色；B：生长锥染色；C：叠加

图 1 荧光染色神经块轴突和轴突末端的生长锥

2.2 重组人类 ApoE 能进入轴突和生长锥

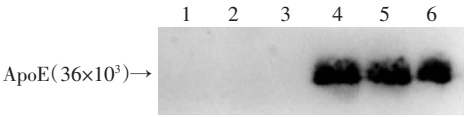
在未加入重组人类 ApoE 的对照组中，免疫荧光染色轴突中 tubulin Ⅲ显示为绿色(图 2A)，而 ApoE 染色为阴性，说明 ApoE 敲出鼠轴突中不存在 ApoE。在加入重组人类 ApoE 的实验组中，免疫荧光染色轴突中 tubulin Ⅲ显示为绿色，同时 ApoE 染色为红色阳性(图 2B、D)，说明重组人类 ApoE 能进入 ApoE 敲出鼠神经元轴突。随后，使用 Western blot 检测加入重组人类 ApoE2、3、4 的 ApoE 敲出鼠神经块，结果显示 ApoE 为阳性，而未加入组中神经块 ApoE 为阴性(图 3)。对加入重组人类 ApoE 的 ApoE 敲出鼠神经块，使用鬼丙环肽染色生长锥为绿色(图 2E)，免疫荧光染色 ApoE 为红色(图 2F)，叠加后显示 ApoE 在生长锥区域有分布，但分布范围较绿色的生长锥略小(图 2G)。

证明重组人类 ApoE 能进入神经块的轴突及其生长锥。



A：轴突 tubulin Ⅲ染色；B：加入 ApoE 后轴突 tubulin Ⅲ染色；C：轴突 ApoE 免疫荧光；D：加入 ApoE 后轴突 ApoE 免疫荧光；E：鬼丙环肽染色生长锥；F：生长锥 ApoE 免疫荧光；G：EF 图片叠加

图 2 免疫荧光检测重组人类 ApoE 在轴突和生长锥的分布

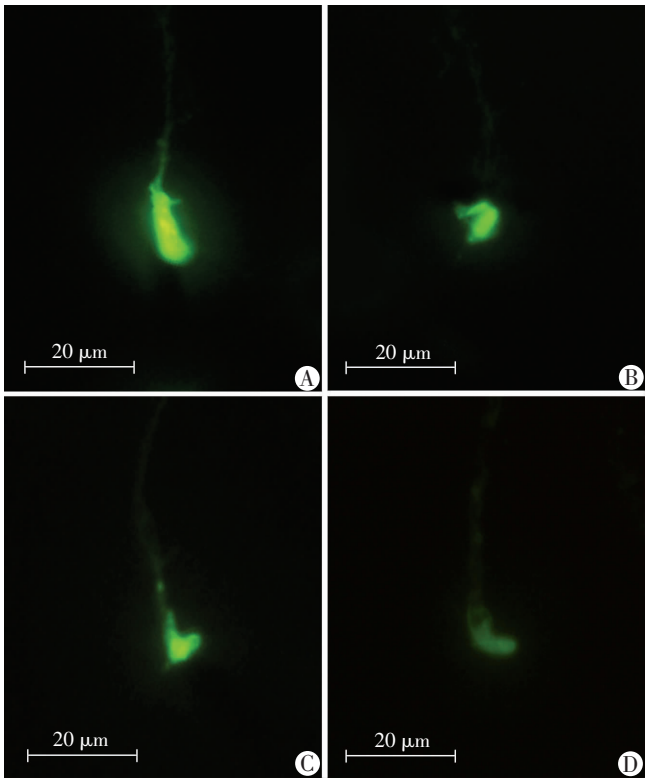


1～3：未加入 ApoE 的 ApoE 敲出鼠神经块；4～6：加入 ApoE2、3、4 的 ApoE 敲出鼠神经块

图 3 Western blot 检测重组人类 ApoE 进入神经元内

2.3 ApoE4 负性影响生长锥的生长

对照组中野生小鼠神经块中生长锥被染为明亮的绿色(图 4A)。实验组 ApoE 敲出鼠神经块中加入重组人类 ApoE，加入 ApoE2、3 的生长锥被染为较明亮的绿色(图 4B、C)，加入 ApoE4 的生长锥绿色荧光亮度低(图 4D)。进一步定量检测各组中生长锥荧光强度，对照组为(75.2 ± 14.8)，加入 ApoE2 实验组为(50.7 ± 19.4)，加入 ApoE3 实验组为(58.5 ± 15.4)，加入 ApoE4 实验组为(23.4 ± 13.5)。对照组野生小鼠生长锥荧光强度大于各个实验组生长锥荧光强度($P < 0.05$)。实验组中加入 ApoE4 的生长锥荧光强度明显低于加入 ApoE2、3 的生长锥荧光强度($P < 0.05$)。

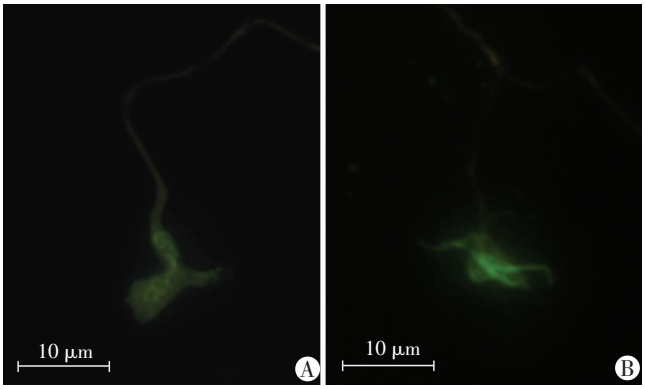


A:野生鼠;B:ApoE 敲出鼠 + ApoE2;C:ApoE 敲出鼠 + ApoE3;D:ApoE敲出鼠 + ApoE4

图 4 ApoE2、3、4 对生长锥荧光强度的影响

2.4 阻断 ERK 信号通路能降低 ApoE4 对生长锥的负性影响

对照组只加入重组人类 ApoE4 到 ApoE 敲出鼠神经块中,实验组同时加入重组人类 ApoE4 和 ERK 信号通路抑制剂 U0126 到 ApoE 敲出鼠神经块中,实验组中生长锥荧光亮度较对照组高(图 5)。定量检测对照组和实验组生长锥的荧光强度分别为(21.9 ± 6.9)、(32.8 ± 13.2),U0126 干预的实验组生长锥荧光强度大于对照组生长锥荧光强度($P < 0.05$)。



A:ApoE 敲出鼠 + ApoE4;B:ApoE 敲出鼠 + ApoE4 + U0126

图 5 ERK 通路抑制剂降低 ApoE4 对生长锥荧光强度的负性影响

3 讨论

本研究通过体外培养小鼠皮质神经块,关注不同 ApoE 亚型对轴突生长锥的影响,发现 ApoE4 对生长锥存在明显的负效应,并通过实验进一步证实了 ERK 信号通路参与了 ApoE4 对生长锥的影响。生长锥是位于神经元轴突末端膨大的部分,是引导轴突延长的生长起始点,主要出现在神经元轴突发育早期以及轴突再生期。生长锥能极其敏感的感受周围生长环境,为轴突的生长或再生寻找路径,通过突出、填充和成熟 3 个步骤引导轴突延伸,在正确辨识所连接的靶点后,生长锥与靶点形成连接,分化形成突触前部分,具有极其重要的病理生理意义[8]。在结构上,通过电子显微镜观察,生长锥主要由细胞骨架成分(微管及微丝)组成。基于细胞骨架形态学的研究,可以将生长锥分为 2 个部分:外周区,主要包含由微丝组成的丝足和板足;中央区,主要包括细胞器和微管。生长锥骨架中的微丝由螺旋的丝状肌动蛋白丝(F-actin)组成,F-actin 在生长锥的外周区有 2 个群,分别形成生长锥的丝足以及板足,而丝足中 F-actin 的聚合则是生长锥引导轴突延伸开始的第 1 步。此外,生长锥不仅是轴突延伸的引导部位,还是轴突与细胞外信号分子相互作用的部位,生长锥通过整合轴突内、外信号分子来指导轴突生长[9]。有研究表明胞外信号分子在神经元细胞内主要的效应靶点是 F-actin,众多蛋白(ERM Proteins, UNC-115、Fascin、Ableson、Cofilin 等)通过和 F-actin 绑定或者分离从而与轴突、生长锥发生作用[1]。因此,本实验选择 F-actin 作为生长锥的检测指标,并使用特异性荧光染色剂鬼丙环肽对其染色,从而定量分析生长锥中 F-actin 的变化。ApoE 是一种含有 299 个氨基酸并结合磷脂的糖蛋白,人类 ApoE 有 3 种主要的亚型(E2、3、4),他们之间的差别仅在于 112 位和 158 位上的单个氨基酸不同,这种单个氨基酸不同造成的异构体是由 ApoE 多态性所决定的[10]。ApoE 多态性与多种中枢神经系统疾病的发生和预后相关,如阿尔茨海默病、大脑淀粉样血管病、创伤性脑损伤、痴呆、卒中等[4]。尽管存在争议,目前的研究主要支持 ApoE4 在多种中枢神经系统疾病中扮演负面的角色,例如:在创伤性脑损伤后,ApoE4 基因携带者比 ApoE2、3 基因携带者的预后更差[11];在阿尔茨海默病中,ApoE4 基因携带者可能比无 ApoE4 基因携带者早 10 ~ 20 年发病[12];相类似,ApoE4 基因携带者更易患痴呆,以及卒中预后更差等[4]。但是,对于 ApoE4 和上述疾病发

生、预后关系的机制尚未完全阐明。

本实验从神经元轴突生长锥这个方向来研究ApoE各个亚型对轴突生长锥的影响，希望能从该角度来解释ApoE4对中枢神经系统疾病不良影响的原因。鉴于在野生小鼠体内是存在其自身的ApoE，而人类存在ApoE的3种亚型，本研究为了更好地模拟人体情况并避免来自野生鼠本自身ApoE的影响，选择了将重组人类ApoE亚型加入到ApoE敲出鼠神经块培养基中。经免疫荧光和Western blot检测证实该重组蛋白能进入轴突及其生长锥后，再观察ApoE亚型对轴突生长锥的作用效应。目前的研究显示，在中枢神经系统，胶质细胞是合成ApoE的主要来源，而神经元内ApoE仅在病理情况下增多，因此神经元主要通过膜表面的脂蛋白受体从细胞外摄取ApoE入胞[13]。Nathan等[14]研究发现，在Neuro-2a细胞中，ApoE3能促进轴突的生长，而ApoE4则抑制轴突的生长，其原因与ApoE4影响了轴突中细胞骨架蛋白的聚合相关，而这一点也在原代培养的小鼠皮质神经元中得到证实[15]。Strittmatter等[16]研究也发现ApoE3比ApoE4具有更好地和微管相关蛋白tau绑定的能力。作为轴突的一部分，生长锥中也具有和轴突相类似的骨架结构，但因为生长锥功能的特殊性，其内部骨架结构则更加复杂，除了含有和轴突相同的微管蛋白tubulin，还包含了F-actin和capzb2等蛋白[17]。因此，在证明重组人类ApoE能进入轴突生长锥区域后，我们则考虑ApoE的不同亚型是否影响了生长锥特有的骨架蛋白F-actin，并进而影响整个生长锥的生长，后继实验也证实了上述可能。同时，ERK信号通路[18]抑制剂U0126的使用则进一步证实了ApoE4作用生长锥的信号路径。但是，本研究为体外实验，存在自身的局限性，需要在体实验进行验证和阐明。随着目前对ApoE及其亚型研究的不断深入，ApoE与各种中枢神经系疾病的相关性将得到更加科学的解释，以期能在神经系统疾病的诊治及预防中起到更大的作用。

参考文献：

[1] Dent E W, Gupton S L, Gertler F B. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(3): 800 - 845.

[2] Struble R G, Cady C, Nathan B P, *et al*. Apolipoprotein E may be a critical factor in hormone therapy neuroprotection[J]. Front Biosci, 2008, 13: 5387 - 5405.

[3] Herz J. Apolipoprotein E receptors in the nervous system[J]. Curr Opin Lipidol, 2009, 20(3): 190 - 196.

[4] Verghese P B, Castellano J M, Holtzman D M. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders[J]. Lancet Neurol, 2011, 10(3): 241 - 252.

[5] Yamagishi S, Fujitani M, Hata K, *et al*. Wallerian degeneration involves Rho/Rho-kinase signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280(21): 20384 - 20388.

[6] Qiu Z, Crutcher K A, Hyman B T, *et al*. ApoE isoforms affect neuronal N-methyl-D-aspartate calcium responses and toxicity *via* receptor-mediated processes[J]. Neuroscience, 2003, 122(2): 291 - 303.

[7] 师晓燕，赵圆宇，卢伟，等. 运用新的体视学方法定量研究大鼠海马结构神经元和突触数目[J]. 第三军医大学学报，2011，33(13)：1328 - 1332.

[8] Kodama A, Lechler T, Fuchs E. Coordinating cytoskeletal tracks to polarize cellular movements[J]. J Cell Biol, 2004, 167(2): 203 - 207.

[9] Giger R J, Hollis E R 2nd, Tuszynski M H. Guidance Molecules in Axon Regeneration[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(7): a001867.

[10] Seripa D, D'Onofrio G, Panza F, *et al*. The genetics of the human ApoE polymorphism[J]. Rejuvenation Res, 2011, 14(5): 491 - 500.

[11] Ponsford J, McLaren A, Schonberger M, *et al*. The association between apolipoprotein E and traumatic brain injury severity and functional outcome in a rehabilitation sample[J]. J Neurotrauma, 2011, 28(9): 1683 - 1692.

[12] Corder E H, Saunders A M, Strittmatter W J, *et al*. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families[J]. Science, 1993, 261(5123): 921 - 923.

[13] Vance J E, Hayashi H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(8): 806 - 818.

[14] Nathan B P, Chang K C, Bellosta S, *et al*. The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization[J]. J Biol Chem, 1995, 270(34): 19791 - 19799.

[15] Nathan B P, Jiang Y, Wong G K, *et al*. Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein[J]. Brain Res, 2002, 928(1/2): 96 - 105.

[16] Strittmatter W J, Saunders A M, Goedert M, *et al*. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(23): 11183 - 11186.

[17] Davis D A, Wilson M H, Giraud J, *et al*. Capzb2 interacts with beta-tubulin to regulate growth cone morphology and neurite outgrowth[J]. PLoS Biol, 2009, 7(10): e1000208.

[18] 党姗姗，朱叶芳，王少雯，等. ERK1/2对胆红素诱导的海马神经元损伤及NF-κB表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2011，33(14)：1480 - 1483.

（**收稿**：2012-01-18；**修回**：2012-02-28）

（编辑　王小寒）