

高原鼠兔脑红蛋白基因的克隆与组织表达

白振忠 韩淑芬 杨应忠 曹越 马兰 刘寿 格日力*

(青海大学医学院高原医学研究中心, 西宁 810001)

摘要: 克隆高原鼠兔脑红蛋白 (Neuroglobin, NGB) 基因编码区并检测其在成年高原鼠兔脑组织和其他组织中的表达, 同时探讨高原鼠兔低氧适应的分子生物学机制。从高原鼠兔脑组织中提取总 RNA, 通过 RT-PCR 获得高原鼠兔 NGB cDNA, 将其与 pGEM-T Easy 载体连接, 构建重组质粒, 蓝白斑筛选阳性克隆并进行鉴定和测序; 制备地高辛标记的 RNA 探针并采用原位杂交法 (In situ hybridization, ISH) 分析脑红蛋白基因在高原鼠兔脑组织中的分布; 采用 RT-PCR 和蛋白印记 (Western blot) 检测高原鼠兔不同组织中脑红蛋白的表达含量。将含有目的片段的阳性克隆测序和 Blast 分析, 显示其部分编码序列与 GenBank 中绵羊、大鼠等同源性很高 (大于 84%), 表明本实验所克隆的序列为脑红蛋白基因; 原位杂交结果显示 NGB 在青藏高原土著动物高原鼠兔脑部分布较为广泛; 高原鼠兔不同组织中都有 NGB mRNA 表达, NGB 基因并不是中枢神经系统所特有的, 睾丸和肾上腺也有较高的表达。NGB 基因在高原鼠兔脑组织和其他组织中分布较为广泛, 推测 NGB mRNA 可能在高原鼠兔机体较为广泛的区域中发挥着作用, 同时为高原低氧适应相关基因的研究提供了实验依据。

关键词: 脑红蛋白; 高原鼠兔; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2010) 01-0074-05

Genetic cloning and expression of neuroglobin in high altitude hypoxic adaptation species—Plateau pika (*Ochotona curzoniae*)

BAI Zhenzhong, HAN Shufen, YANG Yingzhong, CAO Yue, MA Lan, LIU Shou, GE Rili*

(Research Center for High Altitude Medicine, Qinghai University Medical School, Xining 810001, China)

Abstract: For identification of the neuroglobin genes coding sequences molecular cloning and examination of the tissues expression spectrums and showing the hypoxic adaptations mechanisms in Plateau pika (*Ochotona curzoniae*). Extracting the total RNA, cloning neuroglobin coding sequences cDNA with reverse-transcription RT-PCR, capturing and confirming the certain sequences with DNA sequencing. Examination the tissues mRNA expressions spectrums of neuroglobin with in situ hybridization ISH technology. In addition, semi-quantitative RT-PCR and western-blot technologies were being used to analysis of the relative neuroglobin mRNA and protein expression amounts in various tissues with Plateau pika. Cloning and sequencing results confirmed it was the neuroglobin gene coding sequence of Plateau pika with Blast analysis; and the ISH results exhibited the neuroglobin gene expressions spectrums indicate widely distributed with higher amount in brain tissues of Plateau pika. Additionally, neuroglobin mRNA also expressed in the other tissues such as testis and adrenal glands besides brain tissues. We can speculate that NGB might play an important role in the adaptations of the Plateau pika under the high altitude environment. Furthermore, native Tibetan species neuroglobin genes will also present fundamental evidence to investigate high altitude adaptable related genetics study in the future.

Key words: Gene cloning; Gene expression; Neuroglobin; Plateau pika (*Ochotona curzoniae*)

脑红蛋白是新近发现类似于血红蛋白和肌红蛋白的一种携氧球蛋白 (Burmester *et al.*, 2000), 为六配位血红素蛋白, 主要表达于脊椎动物神经组织和视网膜 (Schmidt *et al.*, 2003) 中。脑红蛋白

在进化和功能上有其独特性 (Burmester and Hankeln, 2004), 例如: 作为一种神经元的肌红蛋白, 促进了氧向神经元中的线粒体扩散, 或直接介导了氧向线粒体的传递。此外, 脑红蛋白可能作为

基金项目: 国家 973 项目 (2006CB504100); 国家自然科学基金资助项目 (30393130)

作者简介: 白振忠, 男 (1979-), 硕士, 讲师, 主要从事分子生物学研究. E-mail: baizz@126.com

收稿日期: 2008-12-29; 修回日期: 2009-11-25

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: geriligao@hotmail.com

一种终端氧化酶 (Dewilde *et al.*, 2001), 有还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶的作用、清除氧自由基和 NO 的功能 (Van Doorslaer *et al.*, 2003), 还减少 NO 对神经系统的损伤。再者, 作为氧感受器和鸟嘌呤核苷酸解离抑制剂, 与 G 蛋白 (Wakasugi *et al.*, 2003)、flotillin - 1 (Wakasugi *et al.*, 2004) 等存在相互作用, 在缺氧与氧应激时保护神经元 PC12 细胞; 作为一种氧感受器, 在缺血缺氧性脑损伤中保护神经元的存活, 满足机体能量的需求, 改善缺氧组织氧气的供应。由此可见, 脑红蛋白的发现, 开辟了缺血缺氧性脑损伤研究的新方向。然而, 关于脑红蛋白的生理学作用和高原缺氧状态下土著动物的抗缺氧和脑保护功能学研究未见报道, 而且研究特殊环境下该基因的表达对脑红蛋白生物学作用和体内的功能非常有意义。本文旨在对青藏高原土著动物高原鼠兔脑红蛋白的生物学保护机制做一初步研究。

高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 为兔形目, 鼠兔科, 鼠兔属的小型哺乳动物, 在新型实验动物研究中已受到广泛关注。由于鼠兔具有体型小, 性情温和, 繁殖力强等优势, 加之它生活在海拔 3 200 ~ 3 700 m 的高寒草原, 具有极强的低温、低氧耐受能力, 主要通过高的静止代谢率和增加非颤抖性产热以及高的氧利用率来适应高寒、缺氧环境 (王德华和王祖望, 1990; Ge *et al.*, 1998; 王玉山等, 2001; Li *et al.*, 2001), 因此被认为是研究高原低氧适应的代表性动物之一。本文通过对高原鼠兔脑红蛋白基因的克隆与表达, 以期为进一步研究高原低氧环境的适应性奠定基础。

1 研究方法

1.1 实验材料

于 2006 年 6 月在青海省可可西里自然保护区 (海拔 4 600 m) 捕捉高原鼠兔 6 只 (雄性, 130 ~ 150 g), 就地解剖取高原鼠兔各组织迅速投入液氮容器中, 低温保存并运回西宁。TRIzol 试剂盒、p EM - TE sy 载体、限制性切酶 Xho I 和 BamH I 酶为 Prom ga 公司产品, M - ML 逆转录试剂盒为 Fermentas 公司产品, 即用型 PCR 试剂盒、柱式质粒 DNA_{out} 试剂盒及 Hyb 高效杂交液均购自天泽基因生物有限公司, QIAquick Gel 回收试剂盒购自 Clontech 公司, 限制性内切酶 *EcoR* I 和蛋白酶 K 为 TaKaRa 公司产品, 地高辛 RNA 标记试剂盒 (SP6/T7) 和地高辛荧光检测试剂盒为

Roche 公司产品, BCA 蛋白分析试剂盒和 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate 均购自 Pierce 公司, 兔抗 NGB 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 和 GAPDH 购自 Cell Signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及鉴定

按照 Trizol 试剂盒说明提取高原鼠兔各组织总 RNA, 溶于 20 μ L DEPC 水中, 并用 DU800 核酸蛋白含量检测仪 (BECKMAN 公司) 测定 A_{260}/A_{280} 值及浓度, 并进行 1% 甲醛变性凝胶电泳检测其质量, 置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.2 目的基因扩增及序列测定

引物设计: 利用 GenBank 中人 (*Homo sapiens*, NM_021257)、小鼠 (*Mus musculus*, NM_022414)、大鼠 (*Rattus norvegicus*, NM_033359)、猪 (*Sus scrofa*, NM_001001647) 和兔 (*Oryctolagus cuniculus*, NM_001082133) 的脑红蛋白 (Neuroglobin, NGB) cDNA 序列和 Dnaman 软件设计高原鼠兔脑红蛋白基因的引物, 其上游引物序列 (NGB-F): 5' -ATGGAGCTC-CCGGA/(T)GCCCCGAGC/(G)TGA - 3', 下游引物序列为 (NGB-R): 5' - TTACTCGCCACCCCAGC-CCCGACTC - 3'。引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 扩增长度为 456 bp 左右, 使用浓度为 20 μ mol/L。

目的基因的扩增: 取总 RNA 2.0 μ g, 按照 AMV 逆转录酶试剂盒逆转录合成 cDNA 第一链。PCR 反应体系: 模板 cDNA 1 μ L, PCR Mix 15 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L, 引物 NGB - F 及 NGB - R 各 0.25 μ L, 加水补足至 25 μ L; 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物 10 μ L 进行 1.2% 的 EB 琼脂糖凝胶电泳, 采用紫外凝胶成像分析系统记录电泳结果。

PCR 产物的回收、纯化及序列测定: 用 QIAquick Gel 回收试剂盒回收纯化 456 bp PCR 扩增片段并连接到 pGEM - T Easy 载体上。通过蓝白斑筛选实验挑取白斑单克隆, 接种后 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜, 然后提取质粒, 用 *EcoR* I 酶切, 选出含有目的片段的阳性克隆送北京奥科生物技术有限公司进行序列测定。将获得的序列在 GenBank 上进行 Blast 初步比较分析和在 DNAMAN 上进行物种同源性比较。

1.2.3 高原鼠兔脑组织原位杂交

冰冻切片的制备: 高原鼠兔于 25% 乌拉坦腹

腔注射麻醉下,经左心室插管灌注固定,先以生理盐水快速冲洗,然后灌以4%多聚甲醛缓冲液(PFA)20 min,立即取脑于4% PFA,4℃过夜固定,15%和30%蔗糖梯度脱水,然后切片,片厚40 μm。

RNA 探针的制备:将含有 NGB 基因的质粒转化感受态 *E. coli* DH5α 细菌并扩增,采用柱式质粒 DNA_{out} 试剂盒提取质粒,经限制性内切酶 Xho I 和 BamH I 酶切将质粒线性化,回收线性化 NGB 质粒,采用体外转录法制备地高辛标记的 RNA 探针。

标本处理:将冰冻切片分别梯度乙醇脱水和复水,0.2 N HCl 室温酸化处理20 min,10 μg/mL 蛋白酶 K 37℃ 孵育 15 min,0.16% PFA 室温固定 20 min 后梯度乙醇脱水干燥。

预杂交:每个杂交孔中加入 2 mL Hyb 高效杂交液并置湿盒中,于杂交炉内 50℃ 预杂交 2 h。

杂交:在预杂交的杂交孔中分别加入 NGB 基因探针 2 μL,50℃ 杂交过夜。杂交后洗涤:用 2 × SSC (50% 甲酰胺)漂洗 30 min,两次;0.1 × SSC 漂洗 20 min,两次;0.1 M PBS 漂洗 15 min,两次。

显色:Buffer I 室温 5 min,Buffer II 室温封闭 30 min,滴加 Buffer II 稀释的 anti-DIG-AP 抗体,4℃ 避光过夜保存,Buffer I 室温 10 min,3 次,Buffer III 室温 5 min,加显色液显色并在荧光显微镜下观察。

1.2.4 半定量 RT-PCR 检测

半定量 RT-PCR 分别检测高原鼠兔大脑皮质、中脑、下丘脑、小脑组织、睾丸和肾上腺组织中 mRNA 表达的变化,用 TRIzol (Invitrogen, 美国)分组抽提 200 mg 组织总 RNA,紫外分光光度计 Eppendorf, 美国)对总 RNA 定量,按 RT-PCR 试剂盒(大连宝生物有限公司,DRR014A)说明书进行 RT-PCR 操作,各批次内取等量的 RNA (1 μg) 反转录为 cDNA,再以 cDNA 为模板,对 NGB 的基因特异性引物进行扩增 (Bio-Rad 公司,PTC-200 型 PCR 仪,美国),以磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参照。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 1 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 40 个循环;延伸温度 72℃,10 min;最后反应温度 10℃,10 min。反应结束后,PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用 DNA 凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国)对电泳条带扫描成像,用 1-D 凝胶分析软件 Quantity One 4.5 (Bio-

Rad, 美国)分析电泳条带光密度,得出待测基因脑红蛋白原始灰度值,并将其与内参照 GAPDH 扫描灰度值相比较,得出相对灰度比较值。

1.2.5 Western-blotting 检测

用 0.3 M 盐酸胍的 95% 乙醇提取高原鼠兔各组织总蛋白,溶解在 1% SDS 溶液中,蛋白定量后等量取各组样本蛋白 20 μg,进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳后,电转至 PVDF 膜,在含有无脂奶粉的封闭液中封闭 1 h,加兔抗 NGB 多克隆抗体及 GAPDH 一抗稀释液中,4℃ 孵育过夜,TBST 冲洗后,与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 室温下孵育 2 h,加化学发光剂曝光显影。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增及测序

利用 DNAMAN 软件设计兼并引物,扩增高原鼠兔脑组织 NGB 编码区部分序列,引物序列可靠,扩增片段长约 420 bp (图 1)。将目的片段的测序结果经 NCBI 数据库 Blast 搜索,显示高原鼠兔 NGB 的编码区部分序列与 GenBank 中的大鼠、小鼠、兔、猪、人等的 NGB 基因的同源性都在 84% 以上。表明本实验克隆得到的序列为高原鼠兔 NGB 基因部分 cDNA 序列。

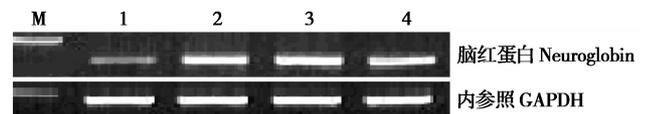


图 1 梯度 PCR 产物 1.5% 琼脂糖 PCR 产物凝胶电泳. M: 分子量标准; 1, 2, 3, 4 泳道: 脑红蛋白 cDNA 的 PCR 产物

Fig. 1 Gradient PCR products running on the 1.5% agarose gel.

M: Marker; 1, 2, 3, 4 Lane: Neuroglobin cDNA PCR products

2.2 原位杂交结果

在克隆脑红蛋白基因的基础上,制备探针,采用组织原位杂交技术显示该基因在高原鼠兔脑组织中的定位和信号强弱。结果显示脑红蛋白在高原鼠兔脑部的分布十分广泛,且多分布于神经元突出之间和毛细血管周围。在脑内部的环形血管周围脑红蛋白基因的阳性杂交信号很强。脑组织中脑红蛋白的显微分布如图 2 所示。

2.3 不同组织中 NGB mRNA 表达

高原鼠兔不同组织中都有 NGB mRNA 表达,但其表达水平不同,大脑皮质、中脑区以及下丘脑表达水平较高,在睾丸和肾上腺等内分泌组织中也有表达 (图 3, 图 4)。

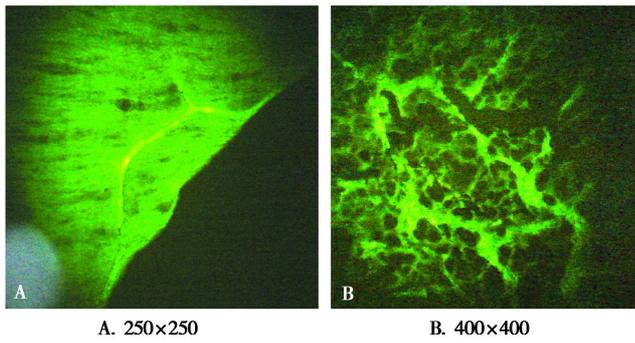


图2 原位杂交切片：荧光显微镜观察高原鼠兔脑组织基底部血脑屏障

Fig. 2 ISH section; fluorescent microscope observing blood-brain barrier in the brain basal regions

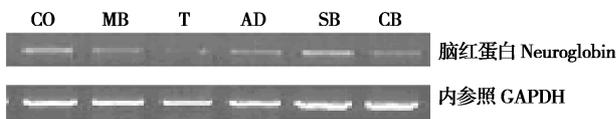


图3 不同组织半定量 RT-PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图. T: 睾丸; AD: 肾上腺; CB: 小脑; SB: 下丘脑; MB: 中脑部; CO: 大脑皮质

Fig. 3 RT-PCR products running on 1.5% agarose gel. T: Testis; AD: Adrenal gland; CB: Cerebrum; SB: Hypothalamus; MB: Middle brain areas; CO: Cerebral cortex

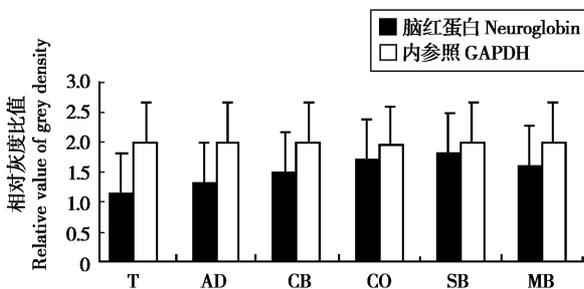


图4 半定量 RT-PCR 产物与内参照 GAPDH 的相对灰度比值. T: 睾丸; AD: 肾上腺; CB: 小脑; SB: 下丘脑; MB: 中脑部; CO: 大脑皮质

Fig. 4 Relative value of grey density of the neuroglobin with house-keeping GAPDH genes. T: Testis; AD: Adrenal gland; CB: Cerebrum; SB: Hypothalamus; MB: Middle brain areas; CO: Cerebral cortex

2.4 不同组织中 NGB 基因转录后蛋白表达

对高原鼠兔脑红蛋白基因转录后蛋白质水平也进行了各组织表达量比较。发现其与 mRNA 水平出现较为一致的变化。在中脑和下丘脑处表达的量最高，依次为大脑皮质和小脑，睾丸组织与肾上腺等内分泌组织也有表达（图 5，图 6）。

3 讨论

脑红蛋白是继血红蛋白和肌红蛋白后的第三类

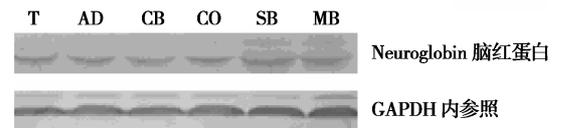


图5 高原鼠兔不同组织半定量 Western-Blot 结果. T: 睾丸; AD: 肾上腺; CB: 小脑; SB: 下丘脑; MB: 中脑部; CO: 大脑皮质

Fig. 5 Western-Blot results in tissues. T: Testis; AD: Adrenal gland; CB: Cerebrum; SB: Hypothalamus; MB: Middle brain areas; CO: Cerebral cortex

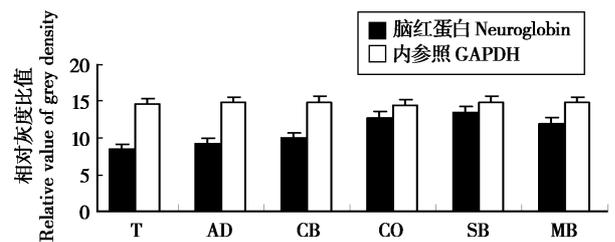


图6 脑红蛋白 NGB 蛋白表达半定量与内参照 GAPDH 的相对灰度比值. T: 睾丸; AD: 肾上腺; CB: 小脑; SB: 下丘脑; MB: 中脑部; CO: 大脑皮质

Fig. 6 Relative value of grey density of NGB and GAPDH. T: Testis; AD: Adrenal gland; CB: Cerebrum; SB: Hypothalamus; MB: Middle brain areas; CO: Cerebral cortex

携氧球蛋白 (Burmester *et al.*, 2000), 是一种内源性神经蛋白 (Greenberg *et al.*, 2008), 参与了神经元的运氧和储氧, 可提高神经元的氧分压, 与神经元的存活密切相关。NGB 仅占全脑总蛋白含量的 0.01%, 但与氧有很高的亲和力, 有利于转运氧通过血脑脊液屏障, 提高脑组织氧的利用率 (Greenberg *et al.*, 2008)。

近年来, 关于 NGB 的研究已经成为神经科学的一大热点, NGB 作为一种神经内源性的保护因子, 给缺氧缺血性脑损伤研究提供了新的方向。目前研究已证实, NGB 储存氧的释放可以缓冲氧分压的变化, 同时可以延缓神经细胞的死亡, 并维持神经功能的正常发挥 (Greenberg *et al.*, 2008)。长期低氧造成活性氧簇的产生和清除失衡, 脑血管内皮细胞和脑胶质细胞释放 NO 和氧自由基的产物增多, 而 NGB 可以清除机体内的活性氧簇 (ROS), 如 H_2O_2 和 NO_2 等 (Brunori *et al.*, 2007)。

本研究克隆了高原鼠兔 NGB 基因, 基因序列分析显示高原鼠兔 NGB 的序列与 GenBank 中的大鼠、小鼠、兔子、猪、人等的 NGB 基因的同源性都在 89% 以上, 脑红蛋白在生物进化上较为保守。地高辛标记的 NGB RNA 探针原位杂交显示, NGB

mRNA 阳性物质定位于高原鼠兔的神经元,而且多分布于神经元突出之间和毛细血管周围,提示 NGB 基因在神经生物信号的快速传导和高原缺氧的神经适应等方面,可能发挥了重要的作用。半定量 RT-PCR 和蛋白印记检测显示,NGB 基因表达于高原鼠兔各种组织中,除大脑皮层表达相对较高外,外周神经系统睾丸和肾上腺亦有较高的表达,提示 NGB 并不是中枢神经系统特有的,在外周神经系统中也有较高的表达,且在神经系统以外的其他组织也有 NGB 的表达。为此作者认为,NGB 可能在许多组织和脏器中均发挥着重要作用。因此,本文的结果,可为高原低氧适应相关基因的深入研究,提供基础资料。同时本研究中心也研究发现急慢性高原缺氧 SD 大鼠 NGB 在 mRNA 水平和蛋白水平的变化趋势大致相同,均呈现时相性变化,低压低氧暴露后 NGB mRNA 和蛋白的表达明显升高,提示 NGB 有可能在急慢性低压低氧的适应过程中起保护作用(韩淑芬和格日力,2008)。

已有大量研究显示,缺氧所诱导的 NGB 表达升高具有显著的神经保护作用。最新研究,可溶性融合蛋白 TAT PTD-NGB 的原核表达、鉴定、纯化及其跨膜转导入皮质神经元,为进一步应用蛋白转导技术进行 NGB 的神经保护机制研究奠定了基础,为 NGB 应用于脑血管疾病及高原中枢神经系统疾病治疗创造了可能(Peroni *et al.*, 2007)。近年来,关于 NGB 的研究已经成为神经学科的一大热点,NGB 作为一种神经内源性保护因子,给缺氧缺血性脑损伤研究指出了新的方向(贺建勋等,2008);由此提示脑红蛋白今后对高原低氧性脑损伤的防治提供了新的思路。因此,可以预见研究 NGB 基因在高原鼠兔组织中的表达,可以揭示土著动物对高原特殊环境适应的分子机制并对高原疾病的防治有一定指导意义。

参考文献:

- Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. 2000. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, **407** (6803): 520-523.
- Burmester T, Hankeln T. 2004. Neuroglobin, a respiratory protein of the nervous system. *News Physiol Sci*, **19**: 110-114.
- Brunori M, Vallone B, Brunori M, Vallone B. 2007. Neuroglobin, seven years after. *Cell Mol Life Sci*, **64**: 1259-1268.
- Dewilde S, Kiger L, Burmester T, Hankeln T, Baudin-Creuzat V, Aerts T, Marden M, Caubergs R, Moens L. 2001. Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin - a novel member of the globin family. *J Biol Chem*, **276**: 36377-36382.
- Greenberg D A, Jin K N, Khan A A. 2008. Neuroglobin: an endogenous neuroprotectant. *Neurosciences*, **8**: 20-24.
- Ge R L, Kubo K, Kobayashi T, Sekiguchi M, Honda T. 1998. Blunted hypoxia pulmonary vasoconstrictive response in the rodent *Ochotona curzoniae* (pika) at high altitude. *AJP - Heart*, **274**: 1792-1799.
- Han S F, Ge R L. 2008. Neuroglobin and neuroprotection mechanisms under hypoxia. *Progress in Physiological Science*, **39** (2): 145-147. (in Chinese)
- He J X, Lei P. 2008. Neurology: internal neurological protection factor. *Chinese Journal of Minimally Invasive Neurosurgery*, **13** (6): 287-288. (in Chinese)
- Li Q F, Sun R Y, Huang C X, Wang Z K, Liu X T, Hou J N, Liu J S, Cai L Q, Li N, Zhang S H, Wang Y. 2001. Cold adaptive thermogenesis in small mammals from different geographical zones of China. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **129**: 949-961.
- Peroni D, Negro A, Bahr M. 2007. Intracellular delivery of neuroglobin using HIV-1 TAT protein transduction domain fails to protect against oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett*, **421** (2): 110-114.
- Schmidt M, Giessel A, Laufs T. 2003. How does the eye take breath? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem*, **278**: 1932-1935.
- Van Doorslaer S, Dewilde S, Kiger L, Nistor S V, Goovaerts E, Marden M C, Moens L. 2003. Nitric oxide binding properties of neuroglobin: a characterization by EPR and flash photolysis. *J Biol Chem*, **278**: 4915-4925.
- Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. 2003. Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric G-protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem*, **278**: 36505-36512.
- Wakasugi K, Nakano T, Kitatsuji C. 2004. Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **318**: 453-460.
- Wang D H, Wang Z W. 1990. Strategies for survival of small mammals in a cold alpine environment: II Seasonal changes in the capacity of nonshivering thermogenesis in *Ochotona curzoniae* and *Microtus oeconomus*. *Acta Theriologica Sinica*, **10** (1): 40-53. (in Chinese)
- Wang Y S, Wang Z W, Wang D H. 2001. Maximum metabolic rate in plateau pikas (*Ochotona curzoniae*) and root voles (*Microtus oeconomus*). *Zool Res*, **21** (3): 200-204. (in Chinese)
- 王玉山,王祖望,王德华. 2001. 温度和光周期对高原鼠兔和根田鼠最大代谢率的影响. *动物学研究*, **21** (3): 200-204.
- 王德华,王祖望. 1990. 小哺乳动物在高寒环境中的生存对策: II 高原鼠兔和根田鼠非颤抖性产热(NST)的季节性变化. *兽类学报*, **10** (1): 40-53.
- 贺建勋,雷鹏. 2008. 脑红蛋白:内源性神经保护因子. *中国微侵袭神经外科杂志*, **13** (6): 287-288.
- 韩淑芬,格日力. 2008. 脑红蛋白与高原低氧性脑保护. *生理科学进展*, **39** (2): 145-147.