

复方中药制剂在寒冷诱导机体损伤中作用及其机制

吕 辉 张文斌 孟姗姗 李 丹 张建彬 骆文静 刘明朝 陈景元[△] 陈耀明[△]

(第四军医大学军事预防医学系军队劳动与环境卫生学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 研究寒冷所诱导的机体损伤作用,明确寒冷引发机体损伤的部分机制以及预防性药物对机体处于寒冷环境中的保护作用。方法 通过低温试验、ATP 检测、电镜观察等确定寒冷对机体造成的损伤 通过总抗氧化能力、CAT 含量、谷胱甘肽过氧化物酶含量、SOD 水平、MDA 水平等的检测确定氧化应激在寒冷暴露对机体损伤中的作用及机制;并确证复方中药制剂在寒冷损伤氧化应激状态下对机体的保护作用。结果 1. 急性 $-15\pm 1^{\circ}\text{C}$ 寒冷环境暴露可引起机体内肝脏组织能量代谢障碍,ATP 生成减少,肝细胞线粒体损伤,溶酶体增多等机体损伤的现象 2. 寒冷应激可导致机体的总抗氧化能力、CAT 显著减少,而氧化应激终产物之一的丙二醛(malondialdehyde, MDA)显著增多(说明肝脏组织出现明显的氧化应激过程),并且出现抗氧化能力下降。3. 预先给予药物干预后,机体抗氧化能力显著增加。结论 1. 寒冷可以诱导机体肝脏明显损伤。2. 氧化应激是寒冷诱导机体损伤的关键机制之一。3. 复方中药制剂可以增加机体在寒冷应激条件下的抗氧化能力,从而产生保护作用。

关键词 寒冷应激 SD 大鼠 线粒体损伤 氧化应激

中图分类号 Q95-3, R122 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 05-856-05

The Effect and Mechanism of Traditional Chinese Medicine Compounds on Cold Induced Organism Injury

LV Hui, ZHANG Wen-bin, MENG Shan-shan, LI Dan, ZHANG Jian-bin, LUO Wen-jing, LIU Ming-chao,

CHEN Jing-yuan[△], CHEN Yao-ming[△]

(Department of Occupational & Environmental Health, Faculty of Preventive Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of cold induced body injury, identify the mechanism of cold induced body injury and clear protection effect of traditional Chinese medicine compounds on body in cold environment, provide experimental basis on cold injury and pre-prevention. **Methods:** The damage caused by the cold on the body was detected by low-temperature test, ATP test, electron microscopy; The effect and mechanism of oxidative stress on body under cold stress was detected by total antioxidant capacity, CAT content, content of glutathione peroxidase, SOD levels and MDA levels; The protective effect of traditional Chinese medicine compounds in cold injury and oxidative stress were also confirmed. **Results:** 1. Acute exposure to -15 ± 1 degrees cold environment can cause liver energy metabolism, ATP formation decrease, mitochondrial damage in liver cells, and the lysosomal level increase; 2. Cold stress can lead a decreasing of body total antioxidant capacity and CAT level and a increasing of MDA level. 3. Pre-administration of traditional Chinese medicine compounds can enhance the body total antioxidant capacity. **Conclusion:** 1. Cold can induce significant liver damage 2. Oxidative stress is a key mechanism in cold injury 3. Traditional Chinese medicine compounds can enhance the body total antioxidant capacity and lead a protect effect in cold stress.

Key words: Cold stress; SD rats; Mitochondria; Oxidative stress

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R122 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 05-856-05

前言

寒冷作为一种特殊的自然环境,对作业者的工作、生活以及身体健康均可造成不良影响^[1,2]。我国寒区面积广,因此常需作业人员常驻或急进高寒地区执行作业活动。而寒冷环境对进驻尤其是急进寒区作业人员的休息、作业及身体健康均可能造

成不良影响,甚至可能威胁到作业人员的安全。因此应该加快寒冷损伤的机制及其预防措施的研究。众所周知,长期寒冷暴露,不仅可以引起躯体冻伤,还可能造成心血管系统^[3,4]、中枢神经系统^[5,6]、肝脏^[7,8]等多器官、系统的损伤,甚至威胁生命安全。研究发现,寒冷诱导机体的损伤与机体的失代偿有关,如能量代谢失代偿^[9,10]、增强的机体氧化应激水平^[11,12]、细胞线粒体的损伤^[13,14,15]、最终引起细胞死亡等。但是冷暴露与机体损伤时空关系及其确切机制还不清楚。为进一步研究冷暴露的损伤作用及机制,本研究以 SD 大鼠为研究对象,采用急性冷暴露,并施加我们研制的复方中药制剂进行干预,来研究寒冷引起机体损伤的可能机制,进一步为寒冷损伤的机制及其预防提供实验依据。

作者简介: 吕辉 (1979),女,硕士,讲师,主要研究方向 环境神经毒理。E-mail: 20440193@qq.com

△通讯作者 陈耀明, E-mail: doeh28@fmmu.edu.cn

陈景元, E-mail: jy_chen@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-08-05 接受日期 2011-08-30)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD 大鼠, BALB/c 小鼠 (购于第四军医大学实验动物中心)。

1.1.2 主要试剂 复方中药制剂 (人参、淫羊藿等。本教研室研制); ATP 检测试剂盒购于碧云天生物技术研究; 总抗氧化能力测定试剂盒、CAT 测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶测定试剂盒、SOD 测定试剂盒、MDA 测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.1.3 主要仪器 激光共聚焦显微镜 (Olympus 公司)。荧光发光计 TD20/20 (Luminometer Tuner Design 公司)。紫外可见分光光度计 (日本岛津公司)。-85℃超低温冰箱 (美国 NuAire 公司)。SIM-F140 制冰机 (日本三洋公司)。超声波细胞粉碎机 (美国 Sonics 公司)。Allegra 64R 低温高速离心机 (美国 Beckman Coulter 公司)。5415D 小型高速离心机 (Ependoff 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠冻亡实验 选取 16-18g BALB/c 小鼠, 随机分为两组, 常规饮食, 适应 3 天后, 急性暴露于 $-15\pm 1^{\circ}\text{C}$, 观察小鼠的行为, 确定小鼠冻亡时间。药物干预后, 不同组小鼠给予 $-15\pm 1^{\circ}\text{C}$ 急性暴露, 观察小鼠冻亡时间。

1.2.2 大鼠寒冷应激肛温变化 选取 160-180g SD 大鼠, 按体重随机分为四组, 分为室温对照组、寒冷对照组、2.0g/kg 药物组、4.0g/kg 药物组, 每组动物 20 只。给药组预先通过灌胃给药 3 周, 室温对照组给予生理盐水。药物干预后, 寒冷对照组, 2.0g/kg 药物组, 4.0g/kg 药物组三组大鼠给予 $-15\pm 1^{\circ}\text{C}$ 急性暴露 4h 后, 观察冷暴露前后的肛温变化。

1.2.3 测定肝脏组织细胞内 ATP 生成水平 药物干预后, 大鼠经 $-15\pm 1^{\circ}\text{C}$ 急性寒冷应激 4h 后, 立即麻醉处死大鼠, 取肝脏组织备用, 依据 ATP 检测试剂盒说明书, 取 50mg 组织后加入 500 μL 裂解液于预冷的匀浆器中, 冰上匀浆 30 次后, 低温高速

离心机选取 4°C , 12000g 离心 10 分钟, 取上清 100 μL , 放入有 100 μL ATP 检测试剂 1.5ml 新离心管中。间隔 2 秒后, 立即用 luminometer 读数。同时用 BCA 法测定上清中蛋白浓度, 根据样本的蛋白浓度标准化样本的 ATP 浓度。

1.2.4 电子显微镜观察线粒体超微结构 大鼠经灌注后, 肝脏组织放入 4°C 预冷的 2% 的戊二醛, 在 4°C 固定 2 h, 然后用探针剥离组织团块, 移入青霉素小瓶中, 在 4°C 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min。再用 1% 四氧化锇在 4°C 固定 15-30 min, 接着用 PBS 漂洗 3 次。细胞团块再经梯度丙酮脱水, 环氧树脂浸透后包埋, 超薄切片机切片, 电子染色, 透射电镜观察结果。

1.2.5 复方中药制剂对肝组织总抗氧化能力的影响 通过灌胃给药 3 周后, 大鼠急性寒冷应激后, 取出大鼠肝脏, 组织匀浆后, 总抗氧化能力测定试剂盒测定组织中的总的抗氧化能力。

1.2.6 复方中药制剂对大鼠肝脏中 CAT 含量、谷胱甘肽过氧化物酶含量、SOD 水平及 MDA 水平的影响 通过药物灌胃给药 3 周后, 大鼠急性寒冷应激后, 取出大鼠肝脏, 组织匀浆后, 分别采用试剂盒测定肝脏组织中的 CAT、谷胱甘肽过氧化物酶、SOD 以及 MDA 的水平。

1.3 数据处理

实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。应用 ANOVA 检验进行样本均数间的差异性比较, 数据由 SPSS16.0 软件统计处理, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 寒冷对小鼠冻亡时间影响

采用雄性 BALB/c 小鼠 (16~18g), 常规饮食, 适应 3 天后, 随机分 2 组, 急性暴露于 $-15\pm 1^{\circ}\text{C}$, 观察小鼠的行为, 确定小鼠冻亡时间。结果显示 (表 1), 小鼠在 $-15\pm 1^{\circ}\text{C}$ 环境中急性暴露后小鼠的冻亡时间为 56 ± 10.6 min。说明急性冷暴露可在短时间内导致小鼠冻亡发生。

表 1 小鼠 $-15\pm 1^{\circ}\text{C}$ 环境冷暴露中冻亡时间
Table 1 The survive time of mice under $-15\pm 1^{\circ}\text{C}$

Animal	Body weight (g)	Survive time (min)
BALB/c mice	20 ± 2.3	56 ± 10.6

2.2 寒冷对大鼠肛温下降的影响

采用雄性 SD 大鼠 (180~200g), 常规饮食, 适应 3 天后, 随机分 4 组, 急性暴露于 $-15\pm 1^{\circ}\text{C}$, 暴露不同时间 (0h、2h、4h、6h), 通过肛温测定仪测定大鼠寒冷暴露后的肛温变化。结果显示大鼠急性寒冷暴露后, 大鼠肛温显著下降, 并且随暴露时间的延长大鼠肛温的下降渐趋明显, 其肛温下降值分别是 2.98 ± 1.41 、 3.52 ± 1.32 、 8.67 ± 2.44 。与对照组相比, 差异有显著性 ($P<0.05$)。以上结果提示寒冷急性暴露作用可以导致大鼠肛温显著下降, 机体损伤, 并且这种作用存在浓度、时间依赖效应 (图 1)。

2.3 寒冷暴露对大鼠肝脏 ATP 生成的影响

大鼠急性寒冷暴露后, 立即麻醉处死大鼠, 取肝脏 -80 度保存, 取同一部位肝脏, 按照 ATP 检测试剂盒说明书步骤, 匀

浆器匀浆后, 采用荧光素酶发光法检测肝脏组织中的 ATP 水平, 结果发现随着寒冷暴露时间的延长, 寒冷暴露组肝脏组织明显减少; 与对照组相比, 寒冷暴露组肝脏 ATP 生成水平显著降低 ($P<0.05$), 提示寒冷应激后可显著诱导机体肝脏组织出现损伤作用 (图 2)。

2.4 寒冷对大鼠肝脏细胞超微结构变化

透射电镜结果显示, 对照组组织电子密度均匀, 边缘清晰, 线粒体完整, 线粒体膜清楚, 可见大量糖原颗粒, 细胞染色质均匀, 细胞器结构清晰。寒冷环境暴露后, 一些线粒体出现肿胀和空泡化现象, 线粒体断裂, 出现大量电子密度高的溶酶体 (图 3)。提示机体寒冷环境暴露后, 肝脏细胞出现一定损伤, 表现为线粒体出现损伤, 溶酶体增多, 细胞活力降低。

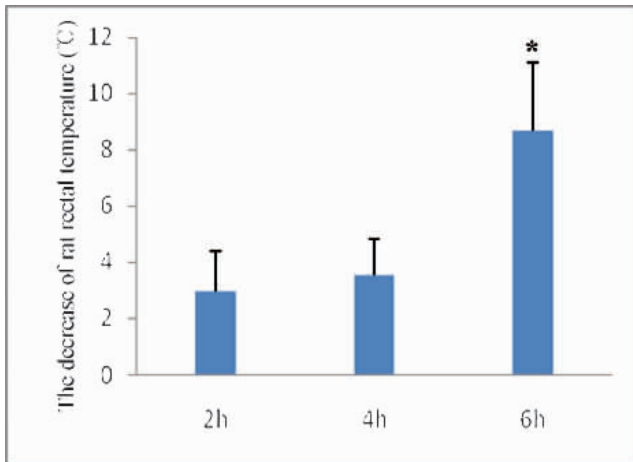


图1 -15±1°C急性寒冷暴露不同时间对大鼠的肛温下降的影响 * vs

2h P<0.05

Fig.1 The effect of acute cold stress under -15±1°C on rat rectal temperature. * vs 2h P<0.05

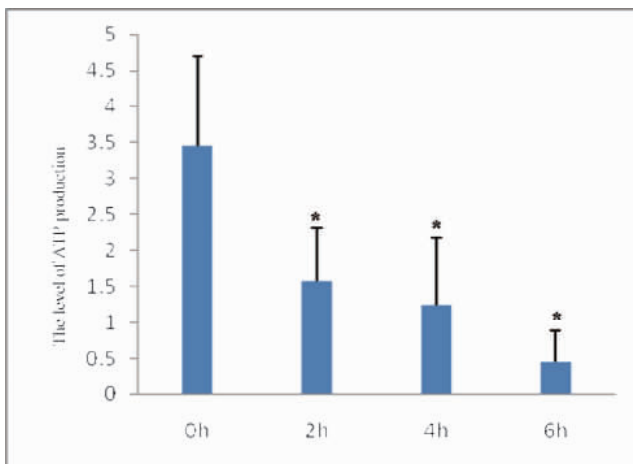


图2 -15±1°C急性寒冷暴露不同时间对大鼠的肝脏 ATP 生成的影响

* vs 0h P<0.05

Fig.2 The effect of acute cold stress under -15±1°C on ATP production.

* vs 0h P<0.05

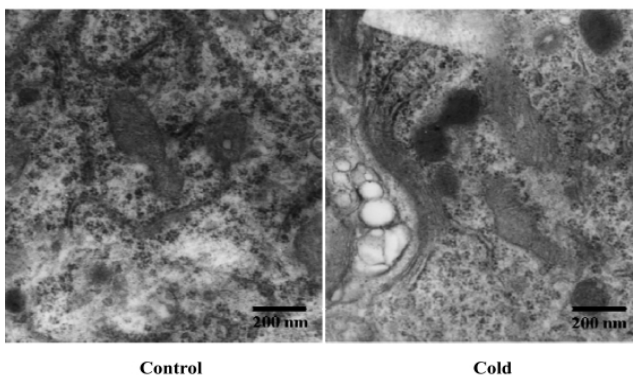


图3 寒冷应激对大鼠肝细胞超微结构的影响(×40000)

Fig.3 The effect of acute cold stress under -15±1°C on ultrastructure of liver cell

2.5 复方中药制剂对不同组织总抗氧化能力的影响

通过药物灌胃给药3周后,大鼠急性寒冷暴露后,取大鼠肝脏,组织匀浆后,通过总抗氧化能力测定试剂盒测定肝组织

中的总抗氧化能力,发现正常对照组的肝脏组织总抗氧化能力是 271.01 ± 22.32 , 寒冷应激后机体内肝脏组织出现显著的抗氧化能力下降(219.7 ± 21.4)($P < 0.05$),提示寒冷应激后可显著诱导机体肝脏组织出现氧化应激,机体出现抗氧化能力的下降,而给予不同浓度的药物,发现低浓度药物组肝组织中总抗氧化能力为 222.00 ± 23.0 ,与寒冷对照组相比无显著差别。而给予中浓度药物后,肝组织总抗氧化能力显著增高(267.39 ± 20.42),说明给予药物对维持或增加机体的总抗氧化能起到重要的作用(图4)。

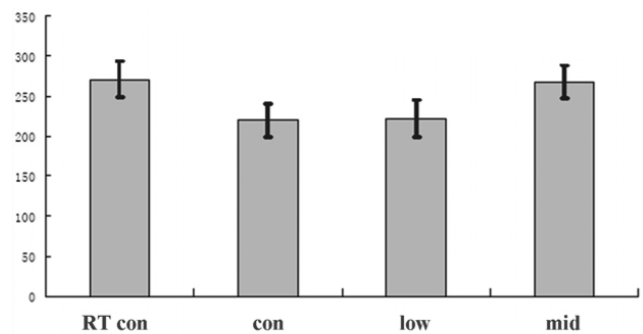


图4 药物对大鼠寒冷应激后肝组织总抗氧化能力的影响

Fig.4 The effect of acute cold stress under -15±1°C on total antioxidant capacity of hepatic tissue. RT con means room temperature control

2.6 复方中药制剂对大鼠肝脏中CAT含量的影响

通过采用CAT测定试剂盒测定肝脏组织中的抗氧化酶CAT的水平,如图所示:相对于室温对照组(55.84 ± 14.44),CAT在机体寒冷应激后显著下降(45.51 ± 5.55),与机体总抗氧化能力相似。与寒冷对照组相比,当机体预先给予药物时,低浓度组显著增高(53.61 ± 11.51),给予中浓度药物时CAT水平显著升高(55.59 ± 15.32),升高到室温对照水平。结果显示随着抗寒药物用量的增加,CAT活性显著提高,进一步证实药物能够增加机体的抗氧化能力,提高机体寒冷应激能力(图5)。

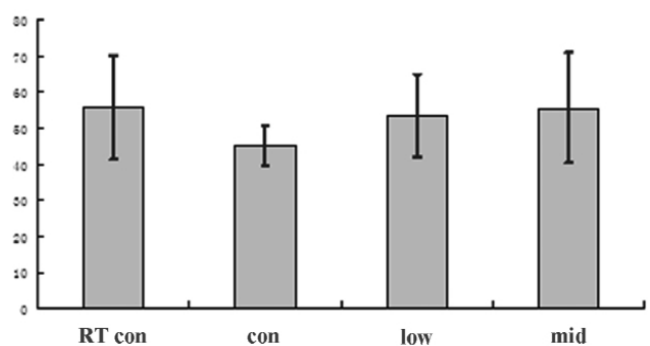


图5 药物对大鼠寒冷应激后肝组织CAT水平的影响

Fig.5 The effect of acute cold stress under -15±1°C on the level of CAT of hepatic tissue. RT con means room temperature control

2.7 复方中药制剂对大鼠肝脏中谷胱甘肽过氧化物酶含量的影响

肝脏中的谷胱甘肽过氧化物酶含量测定结果显示,相对于室温对照组(3992.72 ± 489.02),谷胱甘肽过氧化物酶在机体寒冷应激后并无显著变化(4116.5 ± 462.74),给予药物组其变化水

平无显著性差异,低浓度组(4161.87 ± 116.39),中浓度药物组(4109.37 ± 206.87)。结果显示冷暴露、抗寒药物对机体肝脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶没有显著影响(图 6),说明谷胱甘肽过氧化物酶在寒冷应激中并不起关键作用。

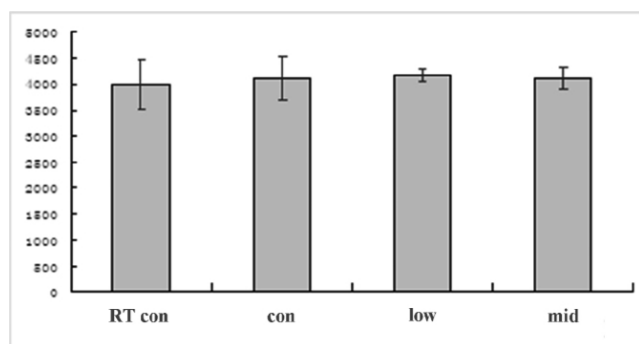


图 6 药物对大鼠寒冷应激后肝组织谷胱甘肽过氧化物酶水平的影响

Fig.6 The effect of acute cold stress under $-15 \pm 1^\circ\text{C}$ on the level of glutathione peroxidase of hepatic tissue. RT con means room temperature control

2.8 复方中药制剂对大鼠肝脏中 SOD 水平的影响

肝脏中的 SOD 含量的测定结果显示,相对于室温对照组(1162.4 ± 66.66),SOD 水平在机体冷暴露后显著增高(1564.02 ± 149.51)。相对于正常对照组,给药组水平也显著增高,低浓度组(1605.57 ± 88.36),中浓度药物组(1553.8 ± 53.3);结果显示冷暴露导致机体肝脏组织中 SOD 显著增高,提示我们在冷暴露后机体产生氧化应激。而给予药物后,在寒冷条件下,机体肝脏中 SOD 水平也升高,与寒冷对照组无差异(图 7),说明药物可能不是通过 SOD 增加机体抗氧化能力的,同时结果也提示机体在冷暴露后,机体产生氧化应激。

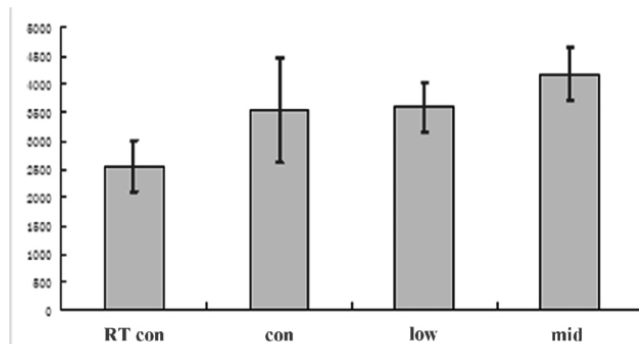


图 7 药物对大鼠寒冷应激后肝组织 SOD 水平的影响

Fig.7 The effect of acute cold stress under $-15 \pm 1^\circ\text{C}$ on the level of SOD of hepatic tissue. RT con means room temperature control

2.9 复方中药制剂对大鼠肝脏中 MDA 水平的影响

肝脏中 MDA 含量的测定结果显示,相对于室温对照组(2556.25 ± 458.65),MDA 水平在冷暴露后显著增高(3536.11 ± 923.17)。相对于正常对照组,给予药物组其变化水平也显著增高,低浓度组(3601.39 ± 436.72),中浓度药物组(4182.50 ± 482.44);结果显示冷暴露机体肝脏组织中 MDA 显著增高,提示我们在冷暴露后机体产生氧化应激。而给予药物后,在寒冷条件下,机体肝脏中 MDA 水平进一步升高,说明药物可能进

一步增加了 MDA 水平,增加机体抗氧化能力(图 8)。

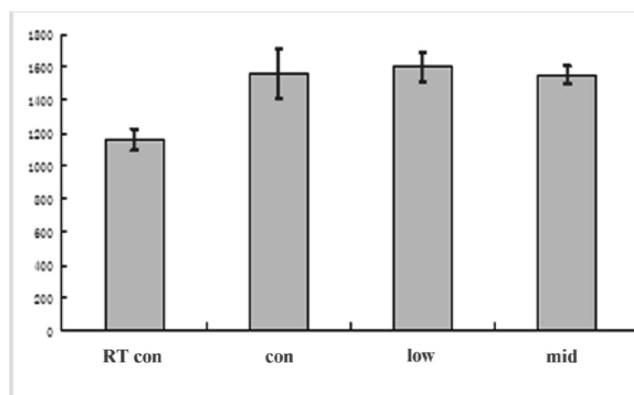


图 8 药物对大鼠寒冷应激后肝组织 MDA 水平的影响

Fig.8 The effect of acute cold stress under $-15 \pm 1^\circ\text{C}$ on the level of MDA of hepatic tissue. RT con means room temperature control

3 讨论

冷暴露可诱发应激反应,而过度冷暴露则会诱导机体损伤^[16,17]。人体长期暴露于冷环境不仅可引起冻伤,还可对心血管系统、中枢神经系统以及肝脏产生损害,甚至威胁生命^[18]。机体对冷应激反应有着复杂的调控过程,其中能量代谢是关键机制,但是在急性寒冷应激条件下,机体的能量代谢调控过程失调或机体对寒冷应激的反应能力不能对抗外界应激水平时,机体则出现损伤^[19,20,21]。在寒冷地区作业,冷环境可能诱发冻伤。此外在战争时期,也常因机体疲劳、持续战斗、夜间长途行军或御寒设备不足等情况而造成冻伤减员急剧增多,严重影响部队战斗力。因此研究冻伤的机制及预防措施具有重要的意义。

能量代谢在抵抗寒冷损伤中起重要作用。肝脏是能量代谢的关键器官,肝细胞富含线粒体,而线粒体往往是损伤的关键区域。研究显示,寒冷引起的全身损伤与线粒体损伤有一定的关系^[13,14,15]。我们前期研究结果也显示 HEK293 细胞在寒冷应激条件下,线粒体出现明显损伤。本研究首先通过动物急性冷暴露观察冷应激对肝能量代谢的影响。小鼠急性冷暴露试验结果显示,在 $-15 \pm 1^\circ\text{C}$,小鼠出现冻亡。通过观察 SD 大鼠冷应激不同时间发现,大鼠冷暴露后肛温下降明显。以上结果表明 $-15 \pm 1^\circ\text{C}$ 寒冷应激可以显著诱导机体的损伤发生,大鼠冷暴露模型建立成功。

肝脏对维持机体能量代谢起重要作用^[22,23]。因此本研究通过检测肝组织中 ATP 生成水平观察机体能量代谢水平,发现随着冷应激时间的延长,肝内 ATP 生成水平显著下降,出现明显的能量代谢障碍,同时观察肝细胞内线粒体超微结构的变化发现,寒冷暴露后出现一些线粒体肿胀和空泡化现象,线粒体脊断裂,出现大量电子密度高的溶酶体,同时糖原减少。以上结果显示,寒冷可引起线粒体损伤,从而导致能量代谢障碍、机体损伤。

线粒体功能和细胞损伤关系密切^[22],而寒冷导致线粒体损伤的原因尚不清楚。线粒体代谢过程中可产生活性氧,而氧化应激可能是机体寒冷应激导致线粒体损伤的关键环节,且前期研究发现,氧化应激水平在寒冷应激后增强,这可能是能量代

谢的副产物,也是导致线粒体损伤的关键因素。肝组织中的过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)是肝脏组织内重要的抗氧化酶系统,对于清除体内的过氧化物具有重要的作用,丙二醛(malondialdehyde, MDA)是脂质氧化的终产物之一,MDA含量可间接体现体内过氧化反应水平。本研究结果发现,在寒冷应激后,体内MDA含量在寒冷应激组中显著升高,而抗氧化酶系统则出现不一致表现,主要表现为SOD的显著升高,CAT显著下降,GSH-Px无明显变化。检测肝组织总抗氧化能力,发现单纯寒冷应激,对照组出现显著的下降,说明在寒冷应激中,机体出现显著的氧化应激过程,而机体的氧化应激过程激活了抗氧化系统,其中,SOD作为抗氧化系统主要酶类出现持续激活状态,而CAT则在氧化应激中出现下降,说明机体体内的抗氧化系统不能平衡体内的氧化应激系统,出现了氧化应激损伤。因此,机内抗氧化系统随着寒冷应激的持续时间延长,出现抗氧化系统功能的减弱或缺失,从而诱发严重的氧化应激过程,诱导机体组织中的敏感部位如线粒体的损伤,进而导致细胞损伤,这可能是机体出现寒冷损伤的关键机制。

我单位研发的复方中药制剂主要有人参、淫羊藿等组成,其配伍依据古代经典名方及验方演化而来,前期实验证实其能够显著提高机体抗寒能力,但其作用机制并不清楚,而我们上述研究发现氧化应激是机体寒冷损伤的关键环节,因此,我们设想中药可能是通过改善机体内部的抗氧化能力来提高机体的抗寒能力的。通过我们的研究结果证实,动物预先给药干预后,出现明显的抗氧化效果,体内总抗氧化能力明显增强,而CAT、SOD水平都显著升高,说明药物可以通过改善机体抗氧化系统而保护肝细胞内的线粒体,并维持线粒体功能及能量代谢过程。

综上所述,本实验初步阐明了寒冷应激对机体的损伤作用,氧化应激在寒冷应激诱导的机体损伤过程中的重要作用,以及复方中药制剂改善氧化应激并对机体的保护作用,为进一步阐明寒冷损伤的作用机制以及探寻药物的防护措施提供实验依据。

参考文献 (References)

- [1] Makinen TM, Hassi J. Health problems in cold work [J]. Ind Health, 2009, 47(3): 207-220
- [2] Nonnecke BJ, Foote MR, Miller BL, et al. Effects of chronic environmental cold on growth, health, and select metabolic and immunologic responses of preruminant calves[J]. J Dairy Sci, 2009, 92(12): 6134-6143
- [3] Dubiel JP, Zmudka K, Goldberg SH. Cold and the cardiovascular system[J]. Kardiol Pol, 1980, 23(12): 1059-1069
- [4] Iarosh AM, Kurch TK. The reactions of the cardiovascular system in children suffering from inflammatory lung diseases to cold exposures [J]. Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult, 1995, (3): 28-30
- [5] Kim KW, Choi SS, Woo RS, et al. Development of antinociceptive tolerance and changes of opioid receptor ligand binding in central nervous system of the mouse forced to single and repeated swimming in the cold water [J]. Brain Res Bull, 2003, 61(1): 93-97
- [6] Tereshin S. The role of the central nervous system in realizing the action of UHF electromagnetic oscillations in the centimeter range on the function of the excited tissues in cold-blooded animals [J]. Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult, 1994, (2): 9-12
- [7] Corps CL, Shires M, Crellin D, et al. Influence on energy kinetics and histology of different preservation solutions seen during cold ischemia in the liver [J]. Transplant Proc, 2009, 41(10): 4088-4093
- [8] Solov'eva AG, Zimin YV, Razmakhov AM. Kinetic parameters of liver aldehyde dehydrogenase in rats with cold injury [J]. Bull Exp Biol Med, 2009, 148(2): 191-192
- [9] Lishmanov Iu B, Lasukova TV, Afanas'ev SA, et al. Effect of cold stress on the contractile activity, carbohydrate and energy metabolism in the isolated rat heart [J]. Patol Fiziol Eksp Ter, 1997, (1): 28-31
- [10] Sano H, Sawada H, Takenami A, et al. Effects of dietary energy intake and cold exposure on kinetics of plasma glucose metabolism in sheep [J]. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2007, 91(1-2): 1-5
- [11] Jia HY, Li JM, Yu Q, et al. The effect of cold stress on DNA oxidative damage of lung in chicken [J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2009, 25(3): 373-376
- [12] Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Vitamin E reduces cold-induced oxidative stress in rat skeletal muscle decreasing mitochondrial H₂O₂ release and tissue susceptibility to oxidants [J]. Redox Rep, 2009, 14(4): 167-175
- [13] Duval M, Plin C, Elimadi A, et al. Implication of mitochondrial dysfunction and cell death in cold preservation-warm reperfusion-induced hepatocyte injury [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2006, 84(5): 547-554
- [14] Ligeret H, Brault A, Vallerand D, et al. Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation-warm reperfusion liver injury [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 115(3): 507-514
- [15] Saba H, Munusamy S, Macmillan CLA. Cold preservation mediated renal injury: involvement of mitochondrial oxidative stress [J]. Ren Fail, 2008, 30(2): 125-133
- [16] Khaliulin IG, Lishmanov Iu B, Maslov LN, et al. The limitation of the intensity of the stress reaction under open-field test conditions through the adaptation of rats to cold and physical loading [J]. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova, 1993, 43(6): 1218-1224
- [17] Namikawa K, Hirai K, Tanaka I, et al. Effect of the lipid peroxide reaction caused by repeated cold stress on cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. Biol Trace Elem Res, 1998, 63(3): 213-220
- [18] Popovich IL, Butusova IA, Ivasivka SV, et al. Features of gastrin reaction in rats with different susceptibilities to gastric mucosa lesions in immobilization-cold stress [J]. Biull Eksp Biol Med, 1992, 113(2): 126-127
- [19] Duncko R, Johnson L, Merikangas K, et al. Working memory performance after acute exposure to the cold pressor stress in healthy volunteers [J]. Neurobiol Learn Mem, 2009, 91(4): 377-381
- [20] Lieberman HR, Castellani JW, Young AJ. Cognitive function and mood during acute cold stress after extended military training and recovery [J]. Aviat Space Environ Med, 2009, 80(7): 629-636
- [21] Mahoney CR, Castellani J, Kramer FM, et al. Tyrosine supplementation mitigates working memory decrements during cold exposure [J]. Physiol Behav, 2007, 92(4): 575-582

(下转第 855 页)

0.108ml/10g 剂量下小鼠血糖过低,引起低血糖反应,且不能检测血糖,不利于实验数据的收集,也对小鼠造成较严重的影响,而按 0.054ml/10g 和 0.027ml/10g 剂量给药则比较合适。

参考文献 (References)

- [1] 田文真,马凤珍,李红梅. 甘精胰岛素在门诊 2 型糖尿病中的应用[J]. 宁夏医学杂志,2011, 33 (1) :52-54
Tian Wen-zhen, Ma Feng-zhen, Li Hong-mei, et al. The study of insulin in the outpatient the application type 2 diabetes[J]. Ningxia Medical Journal,2011, 33 (1) :52-54
- [2] 赵菊珍. 甘精胰岛素联合口服降糖药治疗 2 型糖尿病[J]. 中国实用医刊,2010,37 (14) :56-58
Zhao Ju-ying. The treatment of type 2 diabetes by orally drug and insulin[J]. Chinese Journal of Practical Medicine,2010,37 (14) :56-58
- [3] 崔燎主编. 药理学实验教程[M]. 北京: 科学出版社,2011 :136-138
Cui Liao Editor. Experiment tutorial of the Pharmacology[M]. Beijing: Sciences press,2011:136-138
- [4] 张超,胡亚楠,唐丽娜,等. 胰岛素不同给药途径对糖尿病小鼠葡萄糖代谢的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2007,12(8):927-930
Zhang Chao, Hu Ya-nan, Tang Li-na, et al. Insulin administration on glucose metabolism in alloxan diabetic mice[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther,2007,12(8): 927-930
- [5] 陈时宏. 多种教学方法在降血糖药教学中的应用实践 [J]. 医学信息,2009, 22 (12) :3640-3643
Chen Shi-hong. Applications of Multi-teaching Methods in Antidiabetes for Nursing Pharmacology, Teaching[J]. Medical Information, 2009, 22 (12) :3640-3643
- [6] 张程亮,蔡晓寒,李秋,等. 自身抗原胰岛素皮下注射诱导 1 型糖尿病模型小鼠的免疫耐受作用[J]. 医药导报,2006,25 (4) :495-498
Zhang Cheng-liang, Cai Xiao-han, Li Qiu, et al. A Study of Immune Tolerance Induced by Subcutaneous Administration of Autoantigen Insulin in Mice with IDDM[J]. Herald of Medicine, 2006, 25 (4) :495-498
- [7] 吴铁. 主编. 药理学[M]. 北京: 科学出版社,2101,413-416
Wu Tie. Editor. Pharmacology [M]. Beijing: Sciences press, 2010: 413-416
- [8] 李华,王草,刘维全,等. 人胰岛素基因在幼仓鼠肾细胞中的表达及其降血糖效应[J]. 中国临床康复,2006,10 (40) :178-180
Li Hua, Wang Cao, Liu Wei-quan, et al. Expression of human insulin genes in body hamster kidney cells and its effect on decreasing blood glucose[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10 (40):178-180
- [9] 刘蓉,张阳德. 糖尿病大鼠口服胰岛素油溶液降血糖效果的研究[J]. 中国现代医学杂志,2008,18 (7) :843-846
Liu Rong, Zhang Yang-de. Study on hypoglycemic activity of oral insulin oily solution in rats with diabetes [J]. China Journal of Modern Medicine, 2008, 18 (7) :843-846
- [10] 徐晖. 胰岛素纳米制剂研究进展[J]. 中国药业,2008,17(22):19-21
Xu Hui. Advance in Study of Insulin Nanoparticles[J]. China Pharmaceutical, 2008, 17(22):19-21
- [11] 闫敏,次央. 重视低血糖症的危害与防治[J]. 西藏医药杂志,2009, 30(4):28-30
Yan Min, Ci Yang. The prevention and the harm of low blood sugar [J]. Medical journal of Tibetan, 2009, 30(4): 28-30
- [12] 康燕婕,李恒周,彭勃,等. 预防输注胰岛素溶液发生低血糖反应的临床对策[J]. 中国医学创新,2011,8 (5) :154-155
Kang Yan-jie, Li Heng-zhou, Peng Bo, et al. The clinical countermeasures of low blood sugar reaction by inject insulin solution[J]. Medical Innovation of China, 2011, 8 (5) :154-155
- [22] Becker GL. Fatty acid lessens halothane's inhibition of energy metabolism in isolated hepatocytes [J]. Anesth Analg, 1990, 70(1): 22-28
- [23] Kitade H, Kanemaki T, Sakitani K, et al. Regulation of energy metabolism by interleukin-1beta, but not by interleukin-6, is mediated by nitric oxide in primary cultured rat hepatocytes [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1311(1): 20-26

(上接第 860 页)