

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.038

糖原检测方法研究进展*

杨 柳¹ 郭海云² 邵长健¹ 朱凯龙¹ 张伟东¹ 才延辉² 李 燕^{1,2Δ}

(1 第四军医大学基础部神经生物学教研室 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学西京医院麻醉科 陕西 西安 710032)

摘要:糖原是由葡萄糖分子通过糖苷键聚合而成的高分子物质,作为重要的能源物质储存于肝脏、肌肉和脑等重要器官。糖原的储存或代谢异常可引起多种疾病。一方面,作为一种动态能量底物,准确检测糖原的质与量有一定难度,另一方面,目前随着对糖原研究的深入,出现了越来越多的糖原检测方法和手段。因此,选择恰当的糖原检测方法以促进对糖原的研究显得尤为重要。本文对几种常用的糖原定性与定量检测方法的实验原理,操作步骤及影响因素和改进进行总结,比较其优缺点,为研究者选择最适合的方法对糖原代谢及相关疾病进行研究提供参考。

关键词:糖原检测方法;PAS 染色;糖原代谢

中图分类号:Q591.4;R446 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)01-175-05

Research Progress of Glycogen Detection Methods*

YANG Liu¹, GUO Hai-yun², SHAO Chang-jian¹, ZHU Kai-long¹, ZHANG Wei-dong¹, CAI Yan-hui², LI Yan^{1,2Δ}

(1 Department of Neurobiology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Anesthesiology, Xijing hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT: Glycogen, a common macromolecular substance polymerized by glucose via glucosidic bond, is a significant energy source that is stored in liver, muscle, brain and other important organs. The abnormality of glycogen storage or metabolism can result in many diseases. On the one hand, as a kind of dynamic energy substrates, it is difficult to detect the quality and quantity of glycogen accurately. On the other hand, at present, with the thorough research of glycogen, there are more and more glycogen detection methods. So it is imperative to select appropriate glycogen detection methods to promote glycogen research. In this review, the experiment principle, operation procedures, influential factors and improvements of some common glycogen qualitative or quantitative detection methods are summarized. The advantages and disadvantages of each method are also compared, which could serve as a reference for researchers to select optimal method to study glycogen metabolism and relevant diseases.

Key words: Glycogen detection methods; Periodic acid schiff stain; Glycogen metabolism

Chinese Library Classification(CLC): Q591.4; R446 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)01-175-05

前言

糖原是哺乳动物体内重要的储能物质,主要储存在肝脏和肌肉、肾脏和脑组织也能检测到少量的糖原。肝糖原是血糖的重要来源,肌糖原主要为肌肉收缩提供急需的能量^[1]。肝、肌糖原代谢异常会导致肝、肌糖原累积病等。在脑内,绝大多数的糖原储存在星形胶质细胞^[2]。星形胶质细胞内的糖原代谢通过对神经系统功能主要承担者神经元尤其是兴奋状态的神经元的能量支持^[3,4],发挥对中枢神经系统功能重要的调节作用以及参与多种疾病如阿尔茨海默症、亨廷顿舞蹈症^[5,6]的发生发展。

随着医学和分子生物学实验技术的发展,糖原检测应用的范围越来越广泛。例如细胞中糖原丢失的诊断^[7];用于心血管疾病诊断、糖原累积病诊断和研究、糖尿病诊断和研究;观察肾小球基底膜^[8]以及对肾小球肾炎进行诊断分类^[9],用于阿米巴滋养体和霉菌的着色。也用于某些肿瘤的鉴别诊断^[9],诊断声带上皮

重度异型增生的早期癌变与声带鳞癌早期浸润基底膜的病变,显示肉瘤的瘤细胞的胞内结晶物,浆细胞内 Russel 小体和 Dutcher 小体^[9],骨尤文瘤糖原染色阳性可作为确诊依据;推断肿瘤细胞起源和肿瘤细胞是否发生血管浸润。还可用于研究脑缺血及再灌注后时星形胶质细胞糖原蓄积与神经元代谢功能变化及机制从而为脑缺血/再灌注损伤的治疗提供新的思路^[9]。因此,笔者总结并比较了现有的各种糖原检测方法的原理、操作步骤及影响因素和改进,以期更好地对糖原代谢和相关疾病进行研究。

1 糖原检测前处理

脑糖原定量检测时需对组织需进行特殊的处理。

实验原理:微波产生的高热或液氮的低温可灭活糖原代谢的相关酶类从而使代谢停止,使糖原含量保持在处理时间点状态,从而使脑糖原测定更加准确和相对较易。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81471110);陕西省青年科技新星项目(2015KJXX-49);中国博士后科学基金项目(2015T81094)

作者简介:杨柳,本科,主要研究方向:神经细胞代谢异常与疾病,E-mail:3022973496@qq.com,电话:18220682667

Δ 通讯作者:李燕,硕士研究生导师,副教授,主要研究方向:神经细胞代谢异常与疾病,E-mail:liyann@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-02-27 接受日期:2017-03-21)

1.1 微波法

操作步骤: 可用 MMW-05 微波固定系统对小鼠进行聚焦微波辐射。无麻醉小鼠被限制在一个特制的动物放置管内, 将鼠放入管内, 等小鼠运动到放置管的未封口端, 用活塞封口以固定小鼠。将放置管被放入 MMW-05。用 5 kW 高能微波聚焦照射小鼠头部 0.94~1.05 s 或用 10 kW 高能微波聚焦照射小鼠头部 1.2 s^[10]。聚焦照射处死小鼠后, 小鼠会被立即开颅以确保脑组织温度在 82 ± 3 °C^[10]。将脑组织移入固定液(用 0.1 mol 磷酸缓冲液配置的 4% 多聚甲醛), 在 4 °C 孵育过夜。在有些实验中, 可对处死小鼠进行标准的常规灌注(先用 25 mL 生理盐水灌注 5 min, 再用上述固定液灌注 10 min)过夜放置作为固定对照。

改进: 为解决管的直径相对较小不利于动物自愿钻入的问题, 可将无麻醉改为短麻醉。先用 3% 异氟烷快速麻醉小鼠, 之后立即放入放置管。在照射前, 可等待 2~3 min 让小鼠从麻醉中逐渐苏醒, 这样有利于小鼠固定体位以进行照射。其余处理同上。无麻醉与短麻醉糖原免疫组化染色结果无质的差异^[11]。

1.2 液氮法

操作步骤: 迅速剥离经液氮处死的小鼠大脑, 在液氮中将海马组织研磨成粉, 加入 6% 高氯酸匀浆灭活各代谢酶活性^[12]。

改进: 液氮和高氯酸处理后, 定量检测糖原含量前将脑组织始终置于 -80 °C 保存^[10]。

2 定性分析方法

2.1 PAS 染色方法

PAS (Periodic acid-Schiff Stain) 即过碘酸 - 雪夫氏染色或称高碘酸 - 无色品红染色法, 是应用最广的糖原染色方法。但该方法对糖原染色的特异性不高, 还可显示糖脂类物质, 糖蛋白, 粘蛋白, 粘液, 胶质, 基膜, 基质等, 染色结果受多种因素影响, 因此需对实验方法总结与完善以提高实用价值, 而且最好有其他的糖原检测方法作为辅证。

实验原理: 首先过碘酸将多糖分子的乙二醇基氧化为乙二醛基; 同时在碱性品红中加入 HCl 和亚硫酸盐, 二者生成的 SO₂ 通过破坏碱性品红中醌式结构的双键, 将碱性品红变为无色品红, 即为 Schiff 试剂。组织中的醛基继续和 Schiff 试剂反应, 生成紫红色产物。多糖分子的含量可由多糖中被氧化的乙二醇分子的含量即该产物的颜色深浅反映^[9]。

操作步骤: 组织编号取材, 固定(固定前不能用水浸洗)。脱水, 透明, 浸蜡, 包埋。常规切片 5 μm 厚, 脱蜡, 水洗; 入高碘酸 (pH 值以 3.0~5.0 为宜) 氧化 5~10 min。流水冲洗后, 继续用蒸馏水浸洗 2 次; Schiff 试剂(从冰箱取出升至室温)染色 10~20 min; 0.5% 偏重亚硫酸钠(钾)浸洗两次^[9]或三次^[9]; 流水冲洗后, 蒸馏水浸洗; 苏木精染 2~5 min, 流水冲洗^[9]; 1% 盐酸酒精分化 5~10 s^[7,8], 流水彻底冲洗; 1% 氨水返蓝 5 s^[7,8]; 流水冲洗, 脱水, 透明, 封固^[8]。

影响因素及改进: ① 取材组织的新鲜度: 取小块新鲜组织及时固定^[9]; ② 固定液的选用: 采用乙醇性固定液, 避免用水溶性固定液(糖原及糖原分解成的葡萄糖都易溶于水); 尤宜采用乙醇为溶剂配制的含甲醛、冰醋酸及苦味酸等的混合固定液^[9]; 亦可用 10% 甲醛固定组织块。③ 固定温度: 组织 4 °C 左右温度固定、保存^[8]。④ 切片厚度: 肾活检标本切片厚度以 1 μm 为宜。

⑤ 高碘酸的浓度: 一般采用 0.5%~1% 的浓度。单一组织化学染色可采用 0.5% 浓度, 进行免疫组化和组织化学重复染色时, 采用 1% 高碘酸的浓度, 高碘酸的配制液可放在 4 °C 冰箱内^[9]长期保存。⑥ Schiff 试剂的配制质量: 选用高质量的碱性品红, 配制时实验操作避免污染, 偏重亚硫酸钠(钾)质量要纯^[9], 现配现用^[9], Schiff 试剂配好后建议分装于砂塞瓶内并用塑料薄膜包住于 4 °C 保存^[9]。也可在气体发生瓶内进行 Na₂SO₃ (无水) + H₂SO₄ → NaSO₄ + H₂O + SO₂↑, 漂白碱性品红^[7]。因为偏重亚硫酸钠(Na₂S₂O₃)溶于水后形成的 H₂SO₃ 易挥发失效, 故可用重新添加 Na₂S₂O₃ 生成 H₂SO₃ 的方法解决 Schiff 液失效问题。⑦ 避光染色与避免污染: Schiff 试剂染色时需避光染色^[13]。染色过程中避免接触伊红, 以防造成颜色误差^[8]。⑧ 染色温度与染色时间: 糖原染色有效温度广泛, 4 °C、10 °C、20 °C、30 °C、37 °C 染色呈增强反应, 37 °C 染色可提高糖原染色反应强度^[14]但非特异染色增强, 因此温度高时氧化时间可适当缩短; 为提高染色特异性与节省时间以提高实验效率, 选用 20 °C 作为糖原染色温度。根据 Schiff 氏液配制的时间与染色温度调节作用时间^[10], SO₂ 浓度或染色温度高, 染色时间应适当缩短^[8]。⑨ 消化对照: 糖原染色需作消化对照。⑩ 切片方法: 冰冻切片优于石蜡切片^[15]。

2.2 电镜法

各种组织和细胞均可以使用电镜法观察糖原颗粒。对糖原累积症患者(肌糖原累积症和肝糖原累积症), 除用 PAS 染色诊断与鉴别亚型^[16], 电镜检查对糖原累积症的诊断与鉴别诊断具有重要临床价值^[17-19]。而在肾活检病理中, 可用免疫电镜技术显示糖原, 且不同切片包埋方法效果不同^[20]。

操作步骤: 活检标本修剪为 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织块, 戊二醛固定^[20], 磷酸缓冲液冲洗, 1% 锇酸固定 1 h, 磷酸缓冲液冲洗, 脱水^[17], 树脂包埋、聚合、超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双重电子染色, 透射电子显微镜下观察、分析^[17]。

影响因素及改进: ① 固定剂的选择, 浓度和固定时间: 常规 3.75% 戊二醛^[20] 或用 2.5% 戊二醛在 4 °C 固定 2 h, LR White Resin 树脂低温包埋法对细胞内糖原保存较好, 将肾组织块放入含 2% 甲醛和 0.02% 戊二醛 0.1 mol/L PBS 混合固定液中室温固定 2 h。② 组织块大小: 以 1 mm³ 为宜。③ 包埋聚合方法: LR White Resin 包埋, 45 °C 聚合 48 h^[20] 或用环氧树脂 618 包埋。

3 定量分析方法

然而糖原定性分析方法特异性有待提高, 有时需要依靠研究者的经验做出判断, 有一定的主观性; 而且有些实验如研究糖原代谢中糖原含量的变化以发现相关疾病发病机制及药物作用靶标需要对糖原做定量分析, 因此我们总结了几种常见的糖原定量分析方法, 作为糖原研究方法的选择参考。

3.1 蒽酮法

1956 年就有报道用蒽酮法对肝糖原和肌糖原进行定量检测^[21]。

实验原理: 浓硫酸使糖原脱水生成糖醛衍生物, 糖醛类与蒽酮作用, 生成在 620 nm 波长有最大吸收峰的蓝色化合物, 再与用相同方法处理的葡萄糖标准溶液比色定量^[22,23]。

操作步骤与改进: 可对 Carroll 等的操作步骤^[21]进行改进, 精确称取待检组织 100 mg, 加入 8 mL 5% 三氯醋酸(TCA), 匀

浆 1 min,以 3000 r/min 离心匀浆液 15 min,取 1 mL 上清液,加入 4 mL 95 %乙醇并混匀,正置室温过夜。沉淀完全后,3000 r/min 离心 15 min,小心弃去上清液,离心管倒立放置 10 min。加入 2 mL 蒸馏水溶解糖原,并混匀。配制空白管与标准管溶液,各加入 10 mL 蒽酮试剂,并混匀,浸于沸水浴 15 min 后移至冷水浴,620 nm 波长比色,根据公式测定计算糖原含量^[22]。

3.2 试剂盒法

试剂盒法是常用的糖原定量分析方法。笔者发现部分文献^[23-25]将试剂盒法误认为是蒽酮法。按照卫生部《保健食品检验与评价技术规范(2003 版)》^[22],应将试剂盒法与蒽酮法区别开来,规范且便于检索。

实验原理:因糖原在浓碱溶液中稳定,显色前将组织放入浓碱中加热,其他成分被破坏而糖原保留^[20]。其余原理同蒽酮法^[22,23]。

操作步骤:取葡萄糖按 50、25、12.5、6.25、3.12 及 1.6 mg/L 配制葡萄糖标准液,制作标准曲线,1.6 mg/L 的葡萄糖量相当于 1.44 mg/L 的糖原^[26]。组织称重,放入 EP 管内(先在管盖上用针头扎一小孔),按样品与 30 %KOH1:3 配置水解液,沸水浴 20 min;冷却后加入双蒸水配成 5 %肌糖原检测液,肝糖原水解液需配成 1 %检测液^[22]。取 50 μ L 待测液加入 50 μ L 双蒸水,200 μ L 蒽酮试剂(2 mg/mL 浓硫酸),震荡混匀,沸水浴 5 min;冷却后以空白管调零,测定 200 μ L 各样品和葡萄糖标准溶液于 620 nm 处的吸光度,根据标准曲线计算糖原含量^[23,25]。

3.3 荧光测定法

3.3.1 荧光间接测定法 脑糖原含量测定采用 Kong^[10]等报道的方法。

实验原理:淀粉葡萄糖苷酶可使脑内多糖--糖原的 α -1,4 糖苷键, α -1,6 糖苷键水解而成葡萄糖。分别测出加淀粉葡萄糖苷酶和不加淀粉葡萄糖苷酶的总葡萄糖量与内源性葡萄糖量,二者差值即为糖原分解得到的葡萄糖。利用这个差值通过糖原含量测定标准曲线计算组织中糖原含量^[12]。

操作步骤:用液氮处理方法进行糖原检测前处理。取适量匀浆液用 1 mL 0.2 mol/L 醋酸钠,20 μ L 0.1 mol/LK₂HCO₃ 和 20 U/mL 淀粉葡萄糖苷酶消化 16 h。加入 0.5 mL 6 %高氯酸,25000 r/min 离心 10 min 后保留上清,并加入 3 mol/L KOH 溶液,调节溶液 pH=7。向 96 孔板中加入 200 μ L 反应体系,加入 50 μ L 0.3 U 己糖激酶,30 min 后,将 96 孔板放入荧光酶标仪,以 355 nm 激发、480 nm 发射、420 nm 的截止波长测定总葡萄糖的含量(实际上是生成的 NADPH 含量,间接反映葡萄糖的量)。按上述相同操作在不加淀粉葡萄糖苷酶的情况下测出组织内源性葡萄糖量。总葡萄糖量和内源性葡萄糖量的差值,就是糖原量,通过糖原含量测定标准曲线计算组织中糖原含量^[12]。

3.3.2 2-NBDG 荧光直接测定法 对培养细胞可采用 2-NBDG(荧光标记的葡萄糖类似物)荧光直接测定法测定细胞内糖原,具体又分为两种方法:荧光酶标仪法和荧光显微镜法。

实验原理:培养细胞可利用荧光标记的葡萄糖类似物 2-NBDG 作为底物合成糖原,因此测定荧光强度可计算出合成的糖原含量。

操作步骤(荧光酶标仪法):使用培养 3~4 d 的长至融合状态的待测细胞,缓冲裂解液冲洗三遍,将细胞从培养板转移至

一塑料管,冰上超声脉冲 30 s,加入 2-NBDG(一种荧光葡萄糖衍生物,具有 480 nm 激发波长和 535 nm 发射波长)在 37 $^{\circ}$ C 连续摇晃培养,取 250 μ L 已裂解的样品过滤(选择 GF/C 玻璃微纤维滤纸保留 98 %的 1.2 μ m 粒子)得到糖原颗粒,40 mL70 %乙醇冲洗,滤过物放入 12 孔板,室温黑暗中干燥过夜。之后用荧光酶标仪在 480/25 nm 激发波长 535/20 nm 发射波长下测定留存荧光进行定量,从而确定糖原颗粒被荧光标记的特异性且摸索出最适的 2-NBDG 培养浓度。

操作步骤(荧光显微镜法):待测细胞的种于 6 孔无菌板,用共聚焦分析缓冲液洗三次细胞,37 $^{\circ}$ C 培养于带有 500 μ M 2-NBDG 的缓冲液中。2~12 h 后,用共聚焦显微镜观察拍摄细胞内荧光糖原,并以荧光强度定量分析糖原含量^[27]。

3.4 免疫组化法

可采用特异性更高的免疫组化法测定糖原含量。

实验原理:制备特异的糖原单抗作为一抗,利用抗原抗体特异性结合的原理测出荧光二抗的荧光强度从而计算出糖原含量。

操作步骤:用微波处理方法处理脑糖原。获得两种 IgM 型糖原单抗(ESG1A9 和 IV58B6)。制备一抗混合物,其中 ESG1A9 和 IV58B6 的相应终浓度为 15 μ g/mL 和 30 μ g/mL^[11]。制得 60 μ m 厚度的脑切片,用 PBS 洗后在 PBS 培养液(含 0.1 %Triton X-100 和一抗混合物)中 4 $^{\circ}$ C 轻微摇晃培养 24 h。Tris 缓冲盐洗 3~5 遍,用荧光二抗培养,制片。部分切片用糖原特异性淀粉葡萄糖苷酶处理,处理后同样进行上述糖原免疫组化处理作为对照。用装有 ImageJ 软件 NeuN IR 对 FV1000 激光扫描共聚焦显微镜得到的高分辨率图像进行荧光分析从而测定糖原含量进行定量分析^[11]。

4 糖原检测方法的比较

糖原定性方法可较好地观测糖原颗粒形状及分布位置但客观性较差。PAS 应用最为广泛,但对糖原染色特异性不高,且染色结果受多种因素影响,不同组织染色步骤有差异,需研究者不断摸索改进适合自己研究的染色步骤与实验细节,但通常效果较好。电镜作为糖原检测的金标准,对糖原累积症等相关疾病的诊断与鉴别诊断具有重要意义,但操作时间长,操作步骤多,对实验者技术水平要求较高,要想取得较好结果需注意实验细节,不同组织切片包埋方法有差异,仍需实验者自己摸索改进。

糖原定量方法可分析糖原含量变化从而分析相关疾病的病变及机制但缺少直观性。蒽酮法与试剂盒法相比较:由于肝糖原含量相对较高,而肌糖原含量相对较低,试剂盒法中的碱液处理可去除其他成分而有效保留糖原,故其对肌糖原的测定灵敏度高于蒽酮法,对肝糖原的测定结果与蒽酮法无明显差异^[22]。肝糖原与肌糖原相对脑糖原含量较高,较易检测。脑细胞糖原含量极低,仅占肌细胞的 1/10,肝细胞的 1/100,因此脑内糖原含量测定必须进行实验前的特定处理使处理时间点前的糖原代谢酶类灭活而使脑糖原含量保持在处理时间点状态,从而使脑糖原测定更加准确和相对较易。荧光间接测定法虽可对脑糖原进行定量检测,但由于通过测定葡萄糖的量间接测定糖原含量,影响了该方法的精确程度。改进的 2-NBDG 荧光测定法

不需细胞免疫组化技术和细胞固定,组织破坏和糖原水解^[27]而且测定灵敏快速,同时可通过直接测定荧光葡萄糖在体内转化成荧光糖原含量以判断不同生理或病理状态下糖原合成这一重要的能量储存途径的功能状态,也可快速检测药物对糖原合成的影响。免疫组化法尽管糖原抗体特异,测定结果准确,但由于抗体并未商品化,只有个别实验室拥有制备糖原抗体的能力,大大限制了其应用。

总之,在进行糖原检测时,需多种方法综合运用,取长补短,使糖原检测更加准确简便。

5 小结与展望

糖原是体内可快速动员的储能物质,研究糖原代谢规律及机制可为相关疾病的治疗提供新的思路与靶点。糖原检测对某些疾病的诊断具有重要的临床意义,如PAS染色方法在糖原贮积症的诊断中具有重要的临床价值甚至必不可少^[16],电镜法在糖原贮积症的辅助诊断中具有重要的临床价值^[56],PAS染色方法可作为急性淋巴细胞白血病的诊断甚至亚型诊断的辅助手段^[28],糖原检测与其他方法联合可用于异性淋巴细胞的诊断与鉴别诊断^[29]。糖原的定量分析适合研究某种物质对能量代谢的影响^[30],如试剂盒法可用于研究某种物质对心肌能量代谢的影响从而判断该物质的作用^[31]。糖原的定性检测可用于研究肾脏病变,判断癌症转移^[32],骨髓涂片中病原体鉴别等多个方面。糖原定性定量检测联合应用可用于判断失神经骨骼肌再生状态^[33]。由于脑糖原含量低,其功能很长时间并未受到重视,近年来研究发现星形胶质细胞内糖原代谢异常与多种疾病如脑出血密切相关^[34],星形胶质细胞的糖原代谢与神经元的能量偶联^[34,35]值得关注,很可能为重要的中枢神经系统疾病如阿尔茨海默症,亨廷顿舞蹈症^[56]的治疗提供新的思路。总之,根据不同的组织与疾病类型,针对各种糖原检测方法的优缺点选择合理的方法检测糖原含量与糖原代谢水平,对于糖原的基础研究和相关疾病研究是非常关键的。

而目前国内外尚未见文章对糖原检测方法尤其是较新的糖原检测方法进行系统的综述,本文较为系统地总结了多种现有的较为成熟且常用的糖原检测方法,并比较其优缺点以期对相关糖原的研究提供选择参考。我们也期待科研人员未来能开发出有更多更好的糖原检测方法。

参考文献(References)

[1] 查锡良,药立波.生物化学与分子生物学[M].北京:人民卫生出版社,2013
Zha Xi-Liang, Yao Li-bo. Biochemistry and Molecular Biology[M]. Beijing: People's medical publishing house, 2013

[2] Chambers TW, Daly TP, Hockley A, et al. Contribution of glycogen in supporting axon conduction in the peripheral and central nervous systems: the role of lactate[J]. Frontiers in neuroscience, 2014, 8: 378

[3] Diemel GA, Cruz NF. Contributions of glycogen to astrocytic energetics during brain activation [J]. Metabolic brain disease, 2015, 30(1): 281-298

[4] 才延辉,唐文红,李燕,等.脑缺血后星形胶质细胞能量代谢的改变:研究进展及临床意义[J].国际麻醉学与复苏杂志,2016[Epub ahead of print]

Cai Yan-hui, Tang Wen-hong, Li Yan, et al. Advance and clinical value of energy metabolism in astrocytes after cerebral ischemia[J]. International Journal of Anesthesiology and Resuscitation, 2016, 12[Epub ahead of print]

[5] Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gomez-Isla T, et al. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease[J]. Journal of Neuropathology and Experimental neurology, 2013, 72(6): 462-471

[6] Boussicault L, Herard AS, Calingasan N, et al. Impaired brain energy metabolism in the BACHD mouse model of Huntington's disease: critical role of astrocyte-neuron interactions [J]. J Cereb Blood FlowMetab, 2014, 34(9): 1500-1510

[7] 钟妮娜,耿毅,彭西. PAS 染色技术的改进[J]. 解剖学杂志, 2005, 28(6): 723-724
Zhong Ni-na, Geng Yi, Peng Xi. Improvement of PAS stain [J]. Chinese Journal of Anatomy, 2005, 28(6): 723-724

[8] 付银锋. PAS 染色方法及应用[J].河南科技大学学报(医学版), 2008, 26(2): 100-101
Fu Yin-feng. PAS dyeing method and use [J]. J Henan Univ of SciTech(MedSci), 2008, 26(2): 100-101

[9] 郭惠彬. PAS 染色在病理应用中的体会[J].现代医药卫生, 2010, 26(20): 3131
Guo Hui-bin. Experience of PAS stain in pathological application[J]. Modern Medicine & Health, 2010, 26(20): 3131

[10] Kong J, Shepel PN, Holden CP, et al. Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep[J]. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2002, 22(13): 5581-5587

[11] Oe, Y, Baba O, Ashida H, et al. Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns [J]. Glia, 2016, 64(9): 1532-1545

[12] 张绘宇,赵玉男,王中立.慢性皮质酮注射对小鼠抑郁样行为及脑糖原水平的影响[J].中国病理生理杂志, 2015, 31(5): 828-835
Zhang Hui-yu, Zhao Yu-nan, Wang Zhong-li. Influence of chronic corticosterone injection on depression-like behavior and brain glycogen levels in mice [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2015, 31(5): 828-835

[13] 方庆全,叶美华,黄红浪.提高病理高碘酸雪夫氏法染色效果的体会[J].临床和实验医学杂志, 2009, 8(12): 125-126
Fang Qing-quan, Ye Mei-hua, Huang Hong-Lang. Experience of improving the Periodic acid schiff stain effect in pathology[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2009, 8(12): 125-126

[14] 周建中. 温度对糖原染色积分的影响 [J]. 重庆医学, 2012, 41(21): 2200-2201
Zhou Jian-zhong. Effect of temperature on the glycogen stain [J]. Chongqing Medicine, 2012, 41(21): 2200-2201

[15] 张继大,祝雪,张盛周.两种切片方法检测肝糖原染色效果的比较[J].中国组织化学与细胞化学杂志, 2014, 23(6): 548-550
Zhang Ji-tai, Zhu Xue, Zhang Sheng-zhou. Comparison of two section methods for detecting Liver glycogen [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2014, 23(6): 548-550

[16] 董愉,吴惠群,梁英杰,等. PAS 染色在骨骼肌糖原贮积症诊断中的应用[J].中国组织化学与细胞化学杂志, 2014, 23(4): 385-386

- Dong Yu, Wu Hui-qun, Liang Ying-jie, et al. Application of PAS staining to diagnose variants of glycogenosis in skeleton muscles[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2014, 23(4): 385-386
- [17] 贺宏梅, 靳陶然, 李娜, 等. 活检骨骼肌对肌糖原累积病的诊断价值[J]. 神经损伤与能重建, 2014, 9(15): 395-398
- He Hong-mei, Jin Tao-ran, Li Na, et al. Diagnosis Value of Skeletal Muscle Biopsy for Muscle Glycogen Storage Disease[J]. Neural Injury and Functional Reconstruction, 2014, 9(15): 395-398
- [18] Hicks J, Wartchow E, Mierau G. Glycogen storage diseases: a brief review and update on clinical features, genetic abnormalities, pathologic features, and treatment [J]. Ultrastructural pathology, 2011, 35(5): 183-196
- [19] Lewandowska E, Wierzb-Bobrowicz T, Rola R, et al. Pathology of skeletal muscle cells in adult-onset glycogenosis type II (Pompe disease): ultrastructural study [J]. Folia neuropathologica, 2008, 46(2): 123-133
- [20] 朱小东, 曾彩虹, 刘志红. 冷冻超薄切片免疫电镜技术在肾活检病理中的应用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2013, 22(3): 293-298
- Zhu Xiao-dong, Zeng Cai-hong, Liu Zhi-hong. Ultrathin cryo-sections immunoelectron microscopy technique in the application of renal pathology[J]. J Nephrol Dialy Transplant, 2013, 22(3): 293-298
- [21] Carroll NV, Longley RW, Roe JH. The determination of glycogen in Liver and muscle by use of anthrone reagent[J]. The Journal of biological chemistry, 1956, 220(2): 583-593
- [22] 高珊, 童英, 熊晓燕, 等. 蒽酮法与试剂盒法测定糖原含量的比较研究[J]. 首都公共卫生, 2011, 5(1): 38-40
- Gao Shan, Tong Ying, Xiong Xiao-yan, et al. Comparative study of glycogen determination by Anthrone method and Kit method[J]. Capital Journal of Public Health, 2011, 5(1): 38-40
- [23] 李志民, 曲兴民, 徐寿平, 等. 电离辐射对大鼠咬肌细胞超微结构及糖原含量的影响[J]. 现代口腔医学杂志, 2009, 23(5): 532-535
- Li Zhi-min, Qu Xing-min, Xu Shou-ping, et al. The effect radiation on the ultrastructure and glycogen content in rat masseter muscle[J]. J Modern Somatol, 2009, 23(5): 532-535
- [24] 刘铭瑶, 王文飞, 于艺雪, 等. 成纤维细胞生长因子(FGF)-21改善胰岛素抵抗肝细胞对葡萄糖的吸收和肝糖原的合成[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(10): 1327-1333
- Liu Ming-yao, Wang Wen-fei, Yu Yi-xue, et al. FGF-21 Improves Glucose Uptake and Glycogen Synthesis of Insulin-resistant Liver Cell [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2009, 36(10): 1327-1333
- [25] 甄洁, 朱荣. 有氧运动对慢性心力衰竭大鼠骨骼肌糖原和运动耐力的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(4): 426-431
- Zhen Jie, Zhu Rong. Effects of Aerobic Exercise on Skeletal Muscle Glycogen and Exercise Endurance in Rats with Chronic Heart Failure [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2015, 21(4): 426-431
- [26] Chun Y, ZD Yin. Glycogen assay for diagnosis of female genital Chlamydia trachomatis infection [J]. J ClinMicrobiol, 1998, 36(4): 1081-1082
- [27] Louzao, MC, Espina B, Vieytes MR, et al. "Fluorescent glycogen" formation with sensibility for in vivo and in vitro detection[J]. Glycoconj J, 2008, 25(6): 503-510
- [28] 吕占武, 胡朝辉, 陈南风, 等. 糖原染色在急性淋巴细胞白血病亚型诊断中的应用[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2): 180-181
- Lv Zhan-wu, Hu Zhao-hui, Chen Nan-feng. Application of PAS staining in diagnosis of acute Lymphoblastic Leukemia subtype [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2011, 8(2): 180-181
- [29] 李科成, 谢建红, 周玉球. 过氧化物酶染色、糖原染色与嗜异性抗体、EB-VCA-IgM 抗体联合检测用于异型淋巴细胞诊断和鉴别诊断的探索[J]. 中外医学研究, 2010, 8(13): 4-7
- Li Ke-cheng, Xie Jian-hong, Zhou Yu-qiu. Combined detection of POX and glucogenm stain and heterophil antibody and EB-VCA-IgM antibody to explore the diagnosis and differential diagnosis of atypical Lymphocyte [J]. Chinese and Foreign Medical Research, 2010, 8(13): 4-7
- [30] Kong, HL, Wang JP, Li ZQ, et al. Anti-hypoxic effect of ginsenoside Rb1 on neonatal rat cardiomyocytes is mediated through the specific activation of glucose transporter-4 ex vivo [J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(4): 396-403
- [31] 张雪, 赵炳翔, 宋玉琴, 等. 乌头碱配伍人参皂苷 Rb 对原代培养心肌细胞能量代谢的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化和中药研究, 2015, 17(9): 1785-1789
- Zhang Xue, Zhao Bing-xiang, Song Yu-qin, et al. Compatibility Effect of Aconitine and Ginsenosides Rb1 on Energy Metabolism of Primary Cultured Myocardial Cells [J]. World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2015, 17(9): 1785-1789
- [32] 毛海波. 肝癌转移中血管生成拟态的 PAS 染色研究应用[J]. 现代实用医学, 2010, 8(13): 4-7
- Mao Hai-bo. Research and application of PAS stain in Liver cancer metastasis vasculogenic mimicry [J]. Modern Practical Medicine, 2010, 8(13): 4-7
- [33] Larkin LM, Kuzon WM Jr, Halter JB. Synergist muscle ablation and recovery from nerve-repair grafting: contractile and metabolic function[J]. Journal of applied physiology, 2000, 89(4): 1469-1476
- [34] Brown AM. Brain glycogen re-awakened [J]. Journal of neurochemistry, 2004, 89(3): 537-552
- [35] Sickmann HM, Waagepetersen HS, Schousboe A, et al. Brain glycogen and its role in supporting glutamate and GABA homeostasis in a type 2 diabetes rat model [J]. Neurochemistry international, 2012, 60(3): 267-275