

# 金属硫蛋白对奶牛体外脾淋巴细胞凋亡/坏死及线粒体膜电位的影响

吴力专<sup>1,2</sup>, 罗佳捷<sup>1</sup>, 张彬<sup>1\*</sup>, 占今舜<sup>1</sup>, 李丽立<sup>3\*</sup>

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128; 2. 长江大学动物科学学院, 荆州 434025; 3. 中国科学院亚热带农业生态研究所动物生态营养与健康养殖联合实验室, 农业生态工程重点实验室, 长沙 410125)

**摘要:** 观察金属硫蛋白(MT)对热应激奶牛脾淋巴细胞凋亡的影响, 研究 MT 对热氧化应激引起的细胞凋亡/坏死及线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ )的调节。采用荧光显微镜观察细胞凋亡现象; Annexin V-PI 双染法测定细胞凋亡率和坏死率; 以 JC-1 为装载探针测定  $\Delta\Psi_m$  值。结果显示 MT 只对高热应激诱导的细胞凋亡有抑制作用, MT 为 5.25~8.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 对正常细胞凋亡有轻微促进作用; 低浓度 MT (2.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 轻微促进细胞坏死; MT 可提高细胞线粒体膜电位, 其中高热诱导细胞所需 MT 浓度高, 而正常细胞需 MT 浓度宜适中 (3.75~6.75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 其它浓度则不能充分保护细胞。结论: 1 h, 43 °C 处理牛脾淋巴细胞, 可提高细胞线粒体膜电位, 但同时也导致细胞坏死率增加, 而添加 MT 不仅提高细胞线粒体膜电压, 对热应激导致的细胞坏死具有较好的抑制作用, 因此 MT 保护细胞比热处理更具有现实的意义, 同时也说明线粒体通路是 MT 调节细胞凋亡/坏死的信号转导通路之一。

**关键词:** 金属硫蛋白; 奶牛脾淋巴细胞; 细胞凋亡; 细胞坏死; 线粒体膜电位

中图分类号: S852.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)09-1475-06

## Effect of Metallothionein on *in vitro* Cow Splenic Lymphocytes Apoptosis/Necrosis and Mitochondrial Membrane Potential

WU Li-zhuan<sup>1,2</sup>, LUO Jia-jie<sup>1</sup>, ZHANG Bin<sup>1\*</sup>, ZHAN Jin-shun<sup>1</sup>, LI Li-li<sup>3\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 3. Laboratory of Animal Nutrition and Human Health and Key Laboratory of Agro-ecology, Institute of Subtropical Agriculture, The Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China)

**Abstract:** Our research was conducted to observe the effect of metallothionein (MT) on cow heat stress splenic lymphocytes apoptosis, and study MT on the regulation of the thermo-oxidative stress-induced apoptosis/necrosis and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). The splenic lymphocytes apoptosis phenomena were observed by using fluorescence microscope. The apoptosis and necrosis rates were assayed for adopting Annexin V-FITC with flow cytometer. The  $\Delta\Psi_m$  of cells was assayed with flow cytometer through loading JC-1. Results were as follows: MT only has inhibitory effect on the apoptosis induced by heat stress, and when MT was 5.25-8.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the apoptosis can be promoted lowly. The necrocytosis can also be promoted lowly by the lower MT when the concentration was 2.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . And the  $\Delta\Psi_m$  value can be increased more by MT, but the high stress of cell require higher concentration of MT, and the normal cell require

收稿日期: 2013-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31072053; 30671516); 湖南省自然科学基金重点项目(11JJ2014); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(博导类)项目(20104320110001); 湖南省博士生科技创新基金项目(CX2010B284)

作者简介: 吴力专(1973-), 女, 湖南醴陵人, 讲师, 博士生, 主要从事反刍动物营养生理研究, E-mail: lizhuanw1111@sina.com

\* 通信作者: 张彬, E-mail: zhb8236@126.com; 李丽立, E-mail: lili@isa.ac.cn

moderate concentration ( $3.75-6.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), cell can not be protected enough by the other concentration. These findings indicate that the 1 hour culture in  $43^\circ\text{C}$  of cow spleen lymphocytes can improve mitochondrial membrane potential, as well as the necrosis rate. Nevertheless, mitochondrial membrane voltage can be improved, and necrosis caused by heat stress could be restrained because of adding MT in cell culture medium. Therefore, It has more practical meaning for adopting adding MT to improve the integrity of cellular mitochondria than high fever, at the same time, it also shows that the mitochondrial pathway is one of signal transduction pathway which MT regulating apoptosis/necrosis.

**Key words:** metallothionein; cow spleen lymphocytes; apoptosis; necrosis; mitochondrial membrane voltage

应激(尤其是热应激)一直是困扰中国南方各省奶牛养殖的一大难题,从遗传角度来讲,当前中国主要的乳用品种牛源自北欧不耐热品种荷斯坦牛,从生理角度来讲,其在瘤胃发酵和产奶过程中产生大量的热,加之奶牛汗腺不发达、单位体重散热面积小等,导致了奶牛具有“耐寒不耐热”的生物特性<sup>[1]</sup>。中国南方夏季气候高温高湿,致使奶牛表现出普遍且较严重的热应激综合征,实际生产中表现产奶量明显下降,抗病力降低,乳房炎、腐蹄病、生殖道感染等炎症性疾病增加,致使奶牛体温增加即发展成高热病,热应激已成为限制南方乳业发展的瓶颈。一般认为,机体氧化及应激的始作俑者是羟基自由基,羟基自由基通过攻击生物膜多不饱和脂肪酸、DNA、蛋白质和其他生物大分子,引发细胞和组织氧化损伤,导致细胞组织裂解、酶和氧化强化剂释放,使机体产生应激,生产力下降,出现炎症、病变、甚至死亡。因此,了解热应激对动物细胞的影响,有利于提供预防奶牛热应激理论基础。

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一种重要的生理活性物质,当奶牛处于热应激状态时,它能缩短与产能有关的激素水平达到动态平衡的调节时间<sup>[2]</sup>,可显著提高奶牛血液中谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)和红细胞中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,提高抗氧化酶 SOD 的基因表达水平<sup>[3-5]</sup>,抑制淋巴细胞凋亡基因的表达<sup>[6]</sup>,因而在促进动物健康养殖、提高畜产品质量安全等方面具有广阔应用前景。在天然条件下,MT 中的巯基均以还原状态存在,其中的金属具有动力学不稳定性,而巯基具有亲核性,从而使 MT 易与亲电性物质特别是某些自由基相互作用,可作为高效抗氧化剂来清除自由基,降低自由基对细胞的毒害,增强机体应激反应能力<sup>[7-8]</sup>。低水

平的活性氧(reactive oxygen species, ROS)促进细胞增生,高水平的 ROS 则促进线粒体介导的细胞凋亡,这是因为位于线粒体内外膜交接处的线粒体通透性转换孔(MPTP)开放,线粒体跨膜电位消失,耗氧量减少,ATP 合成降低,释放  $\text{Ca}^{2+}$ 、细胞色素 C、凋亡诱导因子(AIF)富含半胱氨酸的蛋白酶(caspase)以及膜间隙中的其他凋亡因子,启动凋亡。除 MPTP 开放使得线粒体膜通透性增加外,某些促凋亡因子(如 Bax、AIF、caspase)以及膜间隙中的其他凋亡因子也启动凋亡,可使线粒体膜形成  $20\sim 300 \text{ ps}$  的单孔道,有时甚至可以达到  $1 \text{ ns}$ ,于是线粒体中一些促凋亡物质可以外漏到细胞质发挥致调效应<sup>[9]</sup>。因此提示  $\Delta\Psi\text{m}$  下降为凋亡的早期阶段,并为凋亡的特异性变化。 $\Delta\Psi\text{m}$  是线粒体功能正常与否的标志。线粒体有“细胞能量工厂”之称,其膜电位变化和线粒体活性氧产生直接影响到细胞的生存。MT 对动物体外淋巴细胞的凋亡、坏死以及线粒体膜电位的作用鲜见报道。作者通过 MT 对奶牛脾淋巴细胞凋亡/坏死及线粒体膜电位影响的研究,拟初步了解 MT 对热氧化应激引起细胞凋亡的影响,同时研究 MT 对线粒体膜电位值  $\Delta\Psi\text{m}$  调节,旨在揭示 MT 对中国南方泌乳母牛抗热氧化应激的机理及夏季高热病防治的理论研究,为其在乳业安全生产中的应用提供初步理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 金属硫蛋白(Zn-MT)

系参照李丽立等<sup>[10]</sup>建立的硫酸锌诱导法,从中国荷斯坦奶牛公犊肝脏诱导、提取、纯化 Zn-MT。

### 1.2 奶牛脾脏原代细胞的获取和培养

无菌取初生奶牛犊脾脏组织,0.25%胰蛋白酶消化,过  $70 \mu\text{m}$  不锈钢滤网,牛淋巴细胞分离液分

离淋巴细胞,红细胞裂解液去除残余红细胞,Hanks液洗涤2次后用含有20%本体血清、 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PHA(植物血细胞凝集素)的RPMI1640稀释细胞到 $2\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ ,制成细胞悬液,后置入 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO培养箱中适应性培养24 h。换成含15%本体血清、 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PHA的RPMI1640,每培养24 h换1次液,直至细胞数达到 $2\times 10^7\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行试验。

### 1.3 试验设计与测定指标

取细胞悬液用 $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PBS洗涤2次后,均分为12份,后依次在各细胞培养基中添加MT至终浓度为0、2.25、3.75、5.25、6.75、8.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,每个浓度为2份,将含MT不同浓度细胞分别置入 $43\ ^\circ\text{C}$ (热应激处理)和 $37\ ^\circ\text{C}$ (奶牛正常体温为 $37\sim 42\ ^\circ\text{C}$ )中1 h,后转入12孔细胞培养板中置入 $37\ ^\circ\text{C}$  CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养6 h后,取出振荡使细胞充分悬浮,取 $50\ \mu\text{L}$ 细胞悬液,AO/EB法染色,荧光显微镜观察细胞的凋亡情况(其中显绿色为活细胞,显橙色为凋亡细胞,显红色为坏死细胞),继续培养至24 h后取出,采用Annexin V/PI染色和JC-1法,分别进行细胞凋亡/坏死和线粒体膜电位的测定。

1.3.1 细胞凋亡率和坏死率 采用Annexin V-PI Apoptosis Kit(北京索莱宝公司生产),上流式细胞仪前先设置模式:将1管细胞均分成a、b、c、d、e 5管,每管约 $1\times 10^5$ 个细胞;a管不加任何试剂,作为阴性对照管;b管加1%多聚甲醛固定30 min,用Annexin V和PI双染,作为阳性对照;c管只加 $10\ \mu\text{L}$  PI液,避光孵育15 min;d管只加 $5\ \mu\text{L}$  Annexin V液,避光孵育15 min;e管加 $10\ \mu\text{L}$  PI液和 $5\ \mu\text{L}$  Annexin V液,温室避光孵育15 min;后每管各加 $400\ \mu\text{L}$ 的Binding Buffer( $1\times$ )重悬,上机:检测阴性对照管(a),建立Annexin V vs PI双参数点图,建立十字门,确定阴性范围。调节电压将阴性细胞置于该区域;上d管,通过调节补偿将FITC漏入FL3的荧光去掉;上c管,通过补偿将PI漏入FL1的荧光去掉;上阳性对照(b)将十字门位置上调,大致包含双阳性细胞的90%;上检测管(e),并读数,将该模式保存,然后各待测样品按e管进行检测。所建十字门分成4相:C1、C2、C3和C4,其中C1代表细胞坏死率;C2代表细胞晚期凋亡率;C3代表正常生长细胞百分率;C4代表细胞早期凋亡率。

1.3.2 淋巴细胞膜电位( $\Delta\Psi\text{m}$ ) 以JC-1(江苏省碧云天生物技术研究生产)为荧光探针。对于

大多数细胞,通常 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CCCP处理20 min后,线粒体的膜电位会完全丧失,取刚出生牛犊血淋巴细胞作阴性对照,按CCCP终浓度为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 加到细胞培养液中培养20 min后,用PBS洗涤2次后,将待测细胞样品与阴性对照同时悬浮于0.5 mL含有10%本体血清的RPMI1640中,然后再加0.5 mL的JC-1染色工作液,颠倒数次混匀,置于细胞培养箱中 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育20 min,用JC-1稀释液洗涤细胞2次后重悬,上流式细胞仪按检测PI的参数设置,阴性对照设置成上相为0.1%,表示此细胞的线粒体膜电压为0,后上待测细胞,上下相细胞百分率之比值即表示线粒体膜电压值。

### 1.4 数据处理

数据采用WinMDI version 2.8和Microsoft Excel 2003分析。

## 2 结果

### 2.1 奶牛脾淋巴细胞凋亡现象

$37\ ^\circ\text{C}$ 培养时,添加MT 5.25和 $6.75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时(图1中J和K),细胞未见凋亡,而其他浓度处理均可见细胞凋亡现象(图1中箭头所指示的细胞),其活细胞密度各组的细胞数量均无大的变化; $43\ ^\circ\text{C}$ 处理时,MT为 $5.25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组(图1中D)未发现有细胞凋亡现象,其他均可观察到单个正处于凋亡状态的细胞,MT为 $6.75$ 和 $8.25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (图1中E和F)时,活细胞的密度明显比其他各浓度的高,活细胞密度有增加的趋势(图1)。

### 2.2 MT对奶牛脾淋巴细胞热诱导凋亡、坏死的影响

从图2可知,未添加MT时, $1\ \text{h}$ 、 $43\ ^\circ\text{C}$ 处理细胞凋亡率为4%, $37\ ^\circ\text{C}$ 正常培养细胞的凋亡率为1.3%,其中细胞早期凋亡率 $43\ ^\circ\text{C}$ 时为0.3%, $37\ ^\circ\text{C}$ 为0.4%,几乎相近,但晚期凋亡率 $43\ ^\circ\text{C}$ 时为3.7%,而 $37\ ^\circ\text{C}$ 为0.9%; $43\ ^\circ\text{C}$ 时的细胞坏死率为10.8%,而 $37\ ^\circ\text{C}$ 时坏死率只有0.6%,两者坏死率相差甚大。细胞培养时添加MT后, $43\ ^\circ\text{C}$ 处理细胞群均向右下相漂移,随着MT的使用浓度增大而向右下相移动(图2中B、C和D),当MT达到一定浓度时,细胞群保持稳定(图2中E、F),可见MT抑制高热应激所致的细胞凋亡和坏死; $37\ ^\circ\text{C}$ 时,添加MT的细胞群向左上相漂移(图2中H所示),随着MT使用浓度增加,细胞群逐步向右上相漂移(图2中I、J、K和L)。从图3来看, $37\ ^\circ\text{C}$ ,MT为 $0\sim 8.25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

时,细胞凋亡率依次如下:1.3%、0.8%、0.9%、4.9%、3.3%和5.1%,相对应的细胞坏死率为0.6%、3.4%、0.8%、0.3%、0.5%和0.5%,可见细胞凋亡率上升,然后趋于基本恒定,坏死率除 MT 为 2.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  稍高外(图 3 中 B),其他保持基本稳定。

43  $^{\circ}\text{C}$  时,MT 为 2.25~8.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,细胞凋亡率依次如下:3.2%、4.1%、1.7%、3.5%和3.8%,相对应的细胞坏死率为 0.8%、0.5%、0.7%、0.8%和 0.5%,细胞的坏死率和凋亡率都保持基本的稳定。

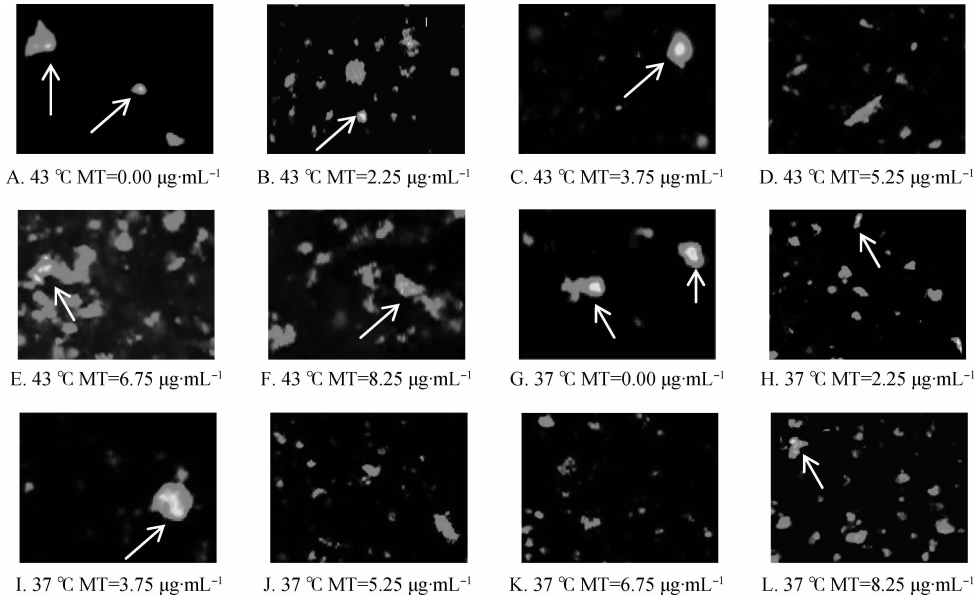


图 1 AO/EB 染色后荧光显微镜观察细胞凋亡

Fig. 1 The observation about apoptosis with fluorescence microscope through using AO/EB method

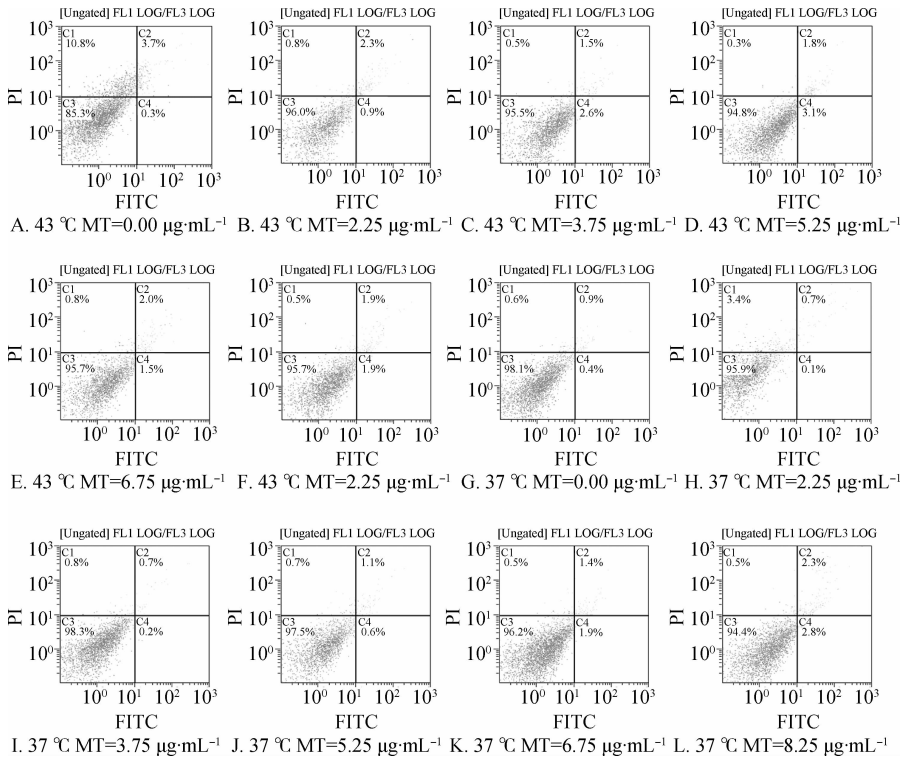


图 2 MT 对细胞凋亡/坏死的调节

Fig. 2 Regulation of MT on cell apoptosis and necrosis

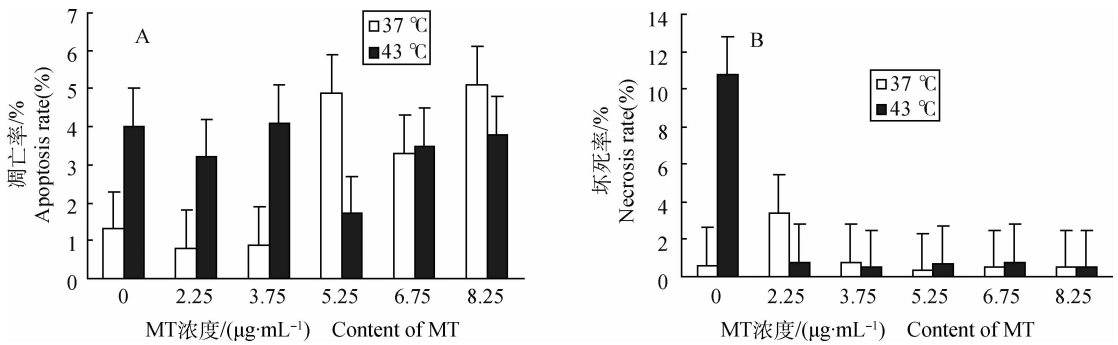


图3 MT对正常和高温培养的脾淋巴细胞凋亡/坏死率的影响

Fig. 3 Effect of MT on the rate of cow splenic lymphocyte apoptosis/necrosis in normal or high temperature living

### 2.3 MT对热处理奶牛脾脏淋巴细胞膜电位的影响

MT对线粒体膜电位具有调节作用,如图4所示,37 °C培养的细胞, $\Delta\Psi_m$ 从高到低依次为4.952 2、4.128 2、2.773 6、0.686 3、0.356 9和0.089 3,分别对应的MT使用浓度为5.25、3.75、6.75、2.25、8.25和0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,处于中等浓度(即3.75~6.75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )时, $\Delta\Psi_m$ 对应值高,而高和低浓度(8.25或2.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )时则 $\Delta\Psi_m$ 的值低;43 °C处理后,细胞的 $\Delta\Psi_m$ 从低到高对应的MT使用浓度依次为3.75、0、6.75、2.25、5.25和8.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,分别对应的 $\Delta\Psi_m$ 为0.715 3、1.577 3、1.762 4、2.039 5、2.640 0和2.831 4,其中除MT为3.75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 所对应的 $\Delta\Psi_m$ 较低外,其它的均相差不多。

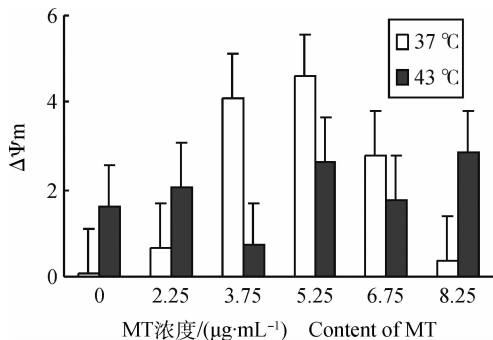


图4 MT对正常和高温培养的脾淋巴细胞线粒体膜电位的调节

Fig. 4 The regulation of MT on mitochondrial membrane voltage of cow splenic lymphocyte cultured in normal or high temperature

## 3 讨论

高热应激能导致细胞坏死增加,从图1的观察

结果来看,未观察到有坏死的细胞,但是热诱导处理后细胞的密度明显下降,坏死细胞和部分凋亡细胞在6 h的培养过程中可能由于细胞膜丧失了悬浮培养液中的能力而紧贴于培养皿底部,采用振荡法不能使其悬浮,若采用胰酶消化法和细胞刮刀又恐损伤细胞,可能会出现细胞凋亡数和坏死数增加,不能真实反映细胞的情况,因而本试验采用荧光染色观察活细胞密度来间接确定细胞坏死和凋亡的情况。从荧光显色观察结果来看,未添加MT的热处理活细胞的密度下降,可推测出细胞的凋亡和坏死率增加,初步确定MT有保护细胞的作用。

细胞凋亡是一把“双刃剑”,一方面是机体发育的正常过程,另一方面如果细胞凋亡过速,则会导致慢性退行性病变<sup>[9]</sup>。细胞坏死是细胞受到强烈理化或生物因素作用引起细胞无序变化的死亡过程,和细胞凋亡不同,它是由于离子平衡调节失调,被动进行的病理死亡方式,其后果会引起炎症反应。若动物体内淋巴细胞的坏死率较大时,说明动物机体状态处于病理状态,反之,动物则比较健康。因此淋巴细胞的凋亡保持在一个较低且恒定的水平时,既不影响免疫性能的发,又能及时增殖更新细胞。如图3所示,37 °C培养细胞MT为5.25~8.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞凋亡率保持在3.3%~5.1%,较MT为0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时高2.0%~3.8%,说明MT确实有利于淋巴细胞的增殖更新;MT为0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时高热培养细胞坏死率是正常培养细胞的18倍,而添加MT(MT为3.75~8.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )后,两者细胞坏死率均在0.3%~0.8%,说明MT对高热所致细胞坏死有很好的抑制作用,同时也证明MT对热应激所致的炎症有很好的预防作用。

在脊椎动物细胞凋亡过程中,线粒体被认为是

处于凋亡调控的中心位置,  $\Delta\Psi_m$  是线粒体内膜两侧电子的不对称分布所造成, 线粒体内膜的低通透性和电化学质子梯度是维持膜电位的基础。研究证实细胞凋亡的早期阶段, 在细胞核病理改变出现前  $\Delta\Psi_m$  已经下降,  $\Delta\Psi_m$  下降为凋亡的早期阶段。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导心肌细胞凋亡时,  $\Delta\Psi_m$  下降, 并且胞浆内的 Bad 转移到线粒体, 随后 Bad 与 Bcl-2 均降解<sup>[11]</sup>。从本研究结果来看, 高热处理有利于保持细胞线粒体膜的完整, 与李勇等的报道<sup>[12]</sup>一致, 如 MT 为 0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 热处理细胞比正常培养细胞的  $\Delta\Psi_m$  值高 1.488; 但比添加 5.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  MT 且正常培养细胞的  $\Delta\Psi_m$  低 3.01, 比该 MT 使用浓度且 1 h、43 °C 处理后细胞  $\Delta\Psi_m$  高 1.95, 而后者又比 MT 为 0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  且 43 °C 培养的细胞  $\Delta\Psi_m$  值高 1.06, 与此同时, 43 °C 的细胞坏死率明显增加(图 2 和 3)。可见, MT 不仅能提高细胞线粒体膜电位, 还能进一步加固热处理后细胞的线粒体膜, 且效果高于单用热处理的方式, 同时规避了热导致细胞坏死这一副作用。所以采用添加 MT 的方法来改善细胞线粒体的完整性具有更现实的意义, 其中正常培养的细胞以 MT 使用浓度为 3.75~8.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 可较好地改善细胞线粒体完整性, 抗氧化热应激需 MT 的使用浓度稍高, 5.25~8.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  较佳。

综上所述, MT 使用浓度为 5.25~8.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 可使细胞凋亡保持在恒定的低水平, 促进细胞增殖更新, 较好抑制热应激所致的细胞坏死, 保护细胞线粒体膜。同时可推测 MT 对动物术后伤口愈合有较好的作用, 同时降低炎症发生率。也说明线粒体通路是 MT 调节热应激导致的细胞凋亡和坏死的信号转导通路之一。

#### 参考文献:

[1] 王福兆, 孙少华. 乳牛学 [M]. 4 版. 北京: 科学技术文献出版社, 2010: 261.

- [2] 吴力专, 陈海燕, 张 彬, 等. 外源性金属硫蛋白对奶牛产能性能和内分泌的影响[J]. 草业学报, 2011, 20(1): 183-188.
- [3] 张 彬, 薛立群, 李丽立, 等. 外源金属硫蛋白对奶牛抗热应激调控及 SOD 基因表达的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 193-198.
- [4] ZHANG B, TAN Q, LI L L, et al. Effects of exogenous metallothionein on GSH-Px & CAT gene expressions in Chinese Holstein dairy cattle[C]//The 2nd International Symposium on Agricultural Research. Athens, Greece, 2009: 28-31.
- [5] 张 彬, 谭 琼, 李丽立, 等. 金属硫蛋白对奶牛抗氧化酶 CAT 和 GSH-Px 基因表达的影响[J]. 草业学报, 2010, 19(3): 132-138.
- [6] 罗佳捷, 吴宗明, 张 彬, 等. 金属硫蛋白对热应激奶牛血淋巴细胞凋亡基因和 HSP70 基因表达的影响[J]. 草业学报, 2012, 16(8): 183-188.
- [7] ROMERO-ISART N, VASÁK M. Advances in the structure and chemistry of metallothionein[J]. *J Inorg Biochem*, 2002, 88(3-4): 388-396.
- [8] PALMITER R D. The elusive function of metallothioneins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(15): 8428-8430.
- [9] 王迪浚, 金惠铭. 人体病理生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 92.
- [10] 李丽立. 一种猪肝金属硫蛋白的提取方法[P]. 中国专利: ZL200410013212. X, 2006-04-17.
- [11] COOK S A, SUGDEN P H, CLERK A. Regulation of Bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes; association with changes in mitochondrial membrane potential[J]. *Circ Res*, 1999, 85(10): 940-949.
- [12] 李 勇, 谢 斌. 热休克预处理对大鼠肝脏缺血再灌注时线粒体的保护作用[J]. 创伤外科杂志, 2002, 4(5): 263-265.

(编辑 白永平)