

2.2 德国小蠊肠道细菌抑制真菌 在分离自德国小蠊肠道的 29株细菌中, 1号、14号、17号 3株细菌可在体外抑制球孢白僵菌抑制菌圈直径分别为 21、15、14 mm; 黄绿绿僵菌抑制菌圈直径分别为 22、15、18 mm; 黄曲霉的抑菌圈直径分别为 21、17、15 mm, 他们的活性占所分离菌株总数的 10.3%。其中, 1、17号菌属芽孢杆菌科, 1号菌株还显示出较强的抑菌效果, 抑菌圈直径达到 > 20 mm, 另外, 假单胞菌科的 14号也显示出一定的抑菌活性。

3 讨论

德国小蠊及其他昆虫肠道中均存在着大量的正常微生物, 其是宿主昆虫正常生长发育所不可缺少的, 它们不仅在维生素的合成, 脂肪和碳水化合物的吸收与利用中起着重要作用, 而且在抵御外来菌的侵入与定植, 及在促进免疫系统的功能中也起着重要作用^[4-6], 德国小蠊能生活在充满大量病原微生物的环境中与其肠道内存在大量正常菌群有很大关系^[7]。

本实验利用传统的微生物分离方法, 从德国小蠊肠道中共分离出 29株需氧或兼性厌氧菌, 其中肠杆菌科细菌有 9种, 种类最多; 其次为假单胞菌, 种类达到 6种; 链球菌也比较丰富, 有 5种被检出, 这 3类菌占分离总菌数的 69%, 分离频率较高, 应是德国小蠊肠道的常住菌群, 其余分离频率较低的菌群, 可能为德国小蠊肠道的过路菌。本实验发现, 自德国小蠊肠道内分离到 3株细菌对昆虫的病原真菌具有明显的抑制活性, 其中 1株还显示出较强的抑制效果, 与汤历等^[8]的研究结果类似, 推测此类细菌可能对德国小蠊抵御外来病原真菌

的侵入与定植起到一定作用, 可以在一定程度解释自然状态下德国小蠊不容易被真菌感染的原因。如果能对细菌发酵产生的抑制真菌的活性物质进一步通过高效液相色谱分析 (high performance liquid chromatography, HPLC) 或者其他分离手段进行, 并进而探明其机理, 将会对抗真菌药物的研发具有重要的意义。

参考文献

- [1] Oлива GR, D az C, Fuentes O. *Blatella germanica* as a possible cockroach vector of micro-organisms in a hospital[J]. J Hosp Infect 2010 1(74): 93-95.
- [2] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8版. 中国科学院微生物研究所译. 北京: 科学出版社, 1984
- [3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [4] 刘晖, 万启惠, 贺莉芬, 等. 家蝇幼虫抗菌蛋白的诱导及抗菌特性[J]. 中国公共卫生, 2006 22(5): 568
- [5] Abe T, Bignell DE, H gashi ME. Ecology of prokaryotic microbes in the guts of wood- and litter-feeding termites[J]. In Termites Evolution, Sociality, Symbioses Ecology, 2003 32: 209-232
- [6] Sabree ZL, Kanbham pati S Moran NA. Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont[J]. Proc Natl Acad Sci 2009 46(106): 19521-19526
- [7] 郭丽, 沈孝兵. 德国小蠊 DDVP 抗性与其相关酶活性的关系[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(8): 838
- [8] 汤历, 廉婕, 陆小军, 等. 德国小蠊肠道细菌抗真菌的初步研究[J]. 昆虫天敌, 2005 27(3): 140-144

收稿日期: 2010-06-28

(蔡天德编辑 郭长胜校对)

【实验研究】

不同剂量铜摄入对大鼠血脂影响*

段链, 张宏伟, 程义斌, 金银龙

摘要: 目的 探讨铜摄入量对大鼠血脂的影响, 为定量评价铜引发动脉粥样硬化 (atherosclerosis AS) 的危险性提供数据基础。方法 选择 Wistar 大鼠饲以缺铜饲料并给予不同剂量葡萄糖酸铜 30 d 分析铜摄入量与大鼠体内总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、载脂蛋白 A1 (ApoA1)、载脂蛋白 B (ApoB) 等血脂指标关系。结果 铜摄入量 ≤ 0.047 mg/kg 时, 大鼠血中 ApoB 为 0.31~0.35 g/L, LDL-C 为 0.37~0.43 mmol/L, 2者均高于正常对照水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 铜摄入量 ≤ 0.175 mg/kg 时, 大鼠血中 TG 为 1.28~1.53 mmol/L, 高于正常对照水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 铜摄入量为 4.015 mg/kg 时, ApoA1 为 (0.12 ± 0.02) g/L, 高于正常对照, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 铜摄入量异常可不同程度对大鼠各项血脂指标产生影响, 进而对 AS 的发生与发展产生促进或抑制作用。

关键词: 铜; 总胆固醇; 甘油三酯; 高密度脂蛋白胆固醇; 低密度脂蛋白胆固醇; 载脂蛋白 A1; 载脂蛋白 B

中图分类号: R 541.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2011)01-0079-03

Effect of copper intake on blood lipids in rat DUAN Lian, ZHANG Hong-wei, CHENG Yi-bin, et al Institute for Environmental Health and Related Product Safety, China Centers for Disease Control and Prevention (Beijing 100021, China)

Abstract Objective To research the effect of copper intake on the blood lipid in rats and to provide data for quantitative risk assessment of copper-induced atherosclerosis (AS). **Methods** Wistar rats were fed with special feeds without copper and stock diet was given with copper gluconate in different dose using stomach tube every day for 30 days The relationships between copper intake and the indexes of blood lipid such as total cholesterol (TG), triglyceride, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), apolipoprotein A1 (ApoA1) and apolipoprotein B (ApoB) in the rats were analyzed. **Results** When the copper intake was lower than 0.047 mg/kg bw, the ApoB in the rat serum was 0.31-0.35 g/L, and the LDL-C was 0.37-0.43 mmol/L; both of them were higher than those of normal

* 基金项目: 国际铜业协会 (ICA) 资助项目 (H-AS-07-02)

作者单位: 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所, 北京 100021

作者简介: 段链 (1978-), 女, 吉林白山人, 助理研究员, 博士, 研究方向: 环境毒理学。

level with statistical significance ($P < 0.05$). When the copper intake was lower than $0.175 \text{ mg/kg} \cdot \text{bw}$, the TG was in the range of $1.28 - 1.53 \text{ mmol/L}$, higher than that of normal level with statistical significance ($P < 0.05$). When the copper intake was $4.015 \text{ mg/kg} \cdot \text{bw}$, both the HDL-C and the ApoA1 ($0.12 \pm 0.02 \text{ g/L}$) in the rat serum were higher than normal level compared with those of the normal control with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** The abnormal copper intake could produce different effects on lipids of serum and accelerate or prevent the occurrence and development of AS.

Key words copper; total cholesterol; triglyceride; high-density lipoprotein cholesterol; low-density lipoprotein cholesterol; apo lipoprotein A1; apolipoprotein B

铜是人体内重要的微量元素,铜摄入量水平与心血管疾病密切相关^[1],铜摄入量异常可直接或间接引发动脉粥样硬化(AS)。研究表明,铜摄入量极高或极低时均可不同程度激活AS起始环节各炎症因子,有引起AS的潜在风险^[2];而血脂异常与AS的发生发展密切相关,目前临床上常把血液中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)等作为诊断AS的重要指标。HDL主要由高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和载脂蛋白A1(ApoA1)构成;而低密度脂蛋白(LDL)主要由低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和载脂蛋白B(ApoB)构成。本研究拟对摄入不同剂量铜大鼠血中与AS相关的各血脂指标进行测定,分析不同铜摄入量对大鼠血脂指标的影响,为定量评价铜引发AS的危险度提供数据基础。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 清洁级Wistar大鼠(中国医学科学院实验动物研究所)56只,体重(110 ± 10)g许可证号:SCXK(京)2005-0013 动物房使用许可证号:SYXK(京)2006-0010 参照大鼠饲养标准NH-76进行饲料配方,依照文献^[3]配制缺铜饲料。大鼠每日从饲料中摄入的铜元素量,正常饲料组约为 0.845 mg/kg 缺铜饲料组约为 0.015 mg/kg

1.2 主要试剂与仪器 葡萄糖酸铜(Cu-G),纯度98.0%(北京信诺科美科技有限公司);7180型全自动生化分析仪(日本日立公司);TC、TG检测试剂盒、HDL-C、LDL-C检测试剂盒,载脂蛋白A1/B(ApoA1/B)检测试剂盒(四川迈克公司)。

表1 不同铜摄入量大鼠AS相关血脂指标变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	(mg/kg)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	ApoA1(g/L)	ApoB(g/L)
正常对照	0.945	1.55 ± 0.22	0.72 ± 0.11	1.26 ± 0.12	0.15 ± 0.12	0.08 ± 0.02	0.22 ± 0.05
铜摄入量	0.015	1.71 ± 0.16	1.53 ± 0.14^a	1.03 ± 0.07^a	0.37 ± 0.11^a	0.02 ± 0.02^a	0.35 ± 0.06^a
	0.047	1.77 ± 0.11	1.28 ± 0.14^a	1.08 ± 0.11^a	0.43 ± 0.20^a	0.04 ± 0.02^a	0.31 ± 0.08^a
	0.175	1.57 ± 0.20	1.31 ± 0.21^a	1.15 ± 0.09	0.16 ± 0.11	0.07 ± 0.01	0.16 ± 0.07
	0.815	1.54 ± 0.15	0.72 ± 0.19	1.27 ± 0.10	0.13 ± 0.08	0.08 ± 0.01	0.23 ± 0.07
	4.015	1.95 ± 0.71	0.84 ± 0.16	1.33 ± 0.10	0.45 ± 0.02^a	0.12 ± 0.02^a	0.14 ± 0.06
	20.015	1.72 ± 0.50	0.71 ± 0.11	1.23 ± 0.47	0.34 ± 0.15^a	0.07 ± 0.01	0.20 ± 0.05

注:与正常对照组比较, $aP < 0.05$

2.2 铜摄入量与AS发生关系 铜摄入量较低时,大鼠血清中ApoA1水平与HDL-C的变化趋势相似,均随着铜摄入量的增加呈现升高趋势。不同铜摄入量大鼠血清中高密度脂蛋白水平会受到HDL-C及ApoA1协同作用影响,当铜摄入量极低时($< 0.047 \text{ mg/kg}$),大鼠血清中HDL低于正常水平,不利于其发挥抗AS作用;随着铜摄入量增加,HDL逐渐接近正常水平,对AS的发生与发展可能起到一定的抑制作用。

3 讨论

血清中的TC是所有胆固醇的总和,LDL-C及HDL-C占据很大比例。本研究中,大鼠铜摄入量对TC含量无明显影响,可能正是由于HDL-C及LDL-C同时变化的结果。血清中的HDL主要由HDL-C及ApoA1组成,二者对HDL抑制AS作用均有影响。其中ApoA1在HDL促细胞胆固醇外流作用

1.3 动物分组与染毒 大鼠按体重随机分为7组,每组8只,雌雄各半。6组作为染铜组,饲以缺铜饲料并按照大鼠体重 $1 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 灌胃给予Cu-G,剂量分别 $0.0228, 0.14, 0.5, 7, 28, 5, 142.5 \text{ mg/kg}$ 另1组为正常对照组,饲以普通饲料,灌胃等容积蒸馏水。各组大鼠总铜摄入水平为灌胃给予Cu-G中铜含量与缺铜饲料中摄入铜元素含量(0.015 mg/kg)之和,因此各染铜组大鼠铜摄入水平分别为 $0.015, 0.047, 0.175, 0.815, 4.015, 20.015 \text{ mg/kg}$ 正常对照组大鼠从普通饲料中摄入铜元素,摄入量为 0.845 mg/kg 所有大鼠均自由摄食饮水,室温 25°C ,日夜光照比为1:1,连续30d。

1.4 样品采集与测定 实验动物末次灌胃后禁食、给水过夜,第2天上午腹主动脉取 $3 \sim 5 \text{ mL}$ 全血于非抗凝管中,待血液凝固后离心得血清,取 0.5 mL 血清样本用全自动生化分析仪进行血液生化指标测定。

1.5 统计分析 采用SPSS 16.0软件进行总体差异显著性方差分析,采用最小显著差异法(LSD)比较组间差异。检验水准 $\alpha = 0.05$ 双侧检验。

2 结果

2.1 铜摄入量与血脂指标变化(表1) 各组大鼠血清中TC值与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),铜摄入量低于日常摄入量时,大鼠血清中TG、LDL-C及ApoB含量均高于正常对照组,HDL-C及ApoA1含量均低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

方面协同作用明显^[4-5]。LDL-C及ApoB是LDL的主要构成部分,通过对二者进行定量分析,可以反映LDL水平^[6]。本研究中,随着铜摄入量的增加大鼠血清中HDL-C及ApoA1变化趋势一致,可能导致HDL出现同样变化趋势。铜摄入量极低时,大鼠血中LDL-C及ApoB均明显高于正常水平,此时LDL含量明显升高,对AS的发生与发展有很强的促进作用。

HDL与LDL之间存在复杂的脂质交换,TG水平越高,这种交换越活跃,LDL的胆固醇酯越多,越容易促使AS的形成^[7]。本研究中铜摄入量高于日常摄入量时,大鼠血中TG含量也处于正常水平范围,结合LDL-C及ApoB的结果,推断在此范围内大鼠血中LDL含量可能还不至于升高到引发AS的程度,但由于LDL-C含量已明显高于正常水平,可能会存

在发生 AS 的潜在风险,值得进一步探讨。

参考文献

[1] 汤慧,方立志.铜与动脉粥样硬化[J].生命的化学,2005,25(2):145-147
 [2] 段链,张明,金银龙.铜摄入量对大鼠动脉粥样硬化炎症因子影响[J].中国公共卫生,2010,26(8):1021-1022
 [3] 刘选珍,李鸣,黄承钰,等.大鼠缺铜模型的建立及缺铜对大鼠重要脏器的损伤[J].中华预防医学杂志,2007,41(增刊):127-130
 [4] 张春妮,陈大宁,庄一义.HDL抗动脉粥样硬化的多功能性以及

氧化修饰对其功能的影响[J].医学研究生学报,2001,14(增刊):56-59.
 [5] 张新波,王绿娅,陈保生.载脂蛋白 A I的抗动脉粥样硬化功能研究进展[J].中国动脉粥样硬化杂志,2007,15(3):233-235
 [6] 吴祥林,沈佐群.低密度脂蛋白研究进展[J].临床输血与检验,2002,4(3):72-74.
 [7] 曹志友,张文希.高甘油三酯血症致冠心病的研究进展[J].人民军医,2002,45(3):164-166

收稿日期:2010-08-13

(解学魁编辑 郭长胜校对)

【实验研究】

辐射诱发胸腺淋巴瘤 *c-myc* 基因启动子甲基化检测*

于雷¹,刘永哲²,孙世龙²,方芳²,巩宏伟²,陈强²,鞠桂芝²

摘要:目的 研究辐射诱发小鼠胸腺淋巴瘤 *c-myc* 基因启动子 CpG 岛甲基化状态和 mRNA 表达的变化。方法 X 射线照射 BALB/c 小鼠建立胸腺淋巴瘤模型,采用硫化测序 PCR (bisulfite sequencing PCR, BCP)法和逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)分别检测 *c-myc* 基因启动子 CpG 岛甲基化状态和 mRNA 的表达。结果 辐射诱发胸腺淋巴瘤 *c-myc* 基因启动子 CpG 岛与正常胸腺组织比较呈去甲基化状态,RT-PCR 检测结果显示,胸腺淋巴瘤 *c-myc* 基因 mRNA 相对表达量 (1.12±0.99)明显高于正常胸腺组织 (0.89±0.08),2组比较差异有统计学意义 (P<0.01)。结论 *c-myc* 基因启动子去甲基化可能与辐射诱发胸腺淋巴瘤密切相关。

关键词:胸腺淋巴瘤;甲基化;硫化测序 PCR; CpG 岛

中图分类号:R 763.3 Q 786

文献标志码:A

文章编号:1001-0580(2011)01-0080-02

Detection on promoter methylation of *c-myc* gene in thymic lymphomas induced by ionizing radiation YU Lei, LIU Yong-zhe, SUN Shi-long, et al Department of Radiotherapy, Second Hospital, Jilin University (Changchun 130021, China)

Abstract Objective To study methylation of CpG islands in promoter region of *c-myc* gene and the change of mRNA expression in thymic lymphomas of mice induced by ionizing radiation. **Methods** The thymic lymphoma model was made with X-ray exposure in BALB/c mice. The methylation of CpG islands in promoter region and the mRNA expression of *c-myc* gene were detected with bisulfite sequencing PCR and RT-PCR. **Results** CpG islands in promoter region of *c-myc* gene were at demethylation state in thymic lymphomas induced by ionizing radiation against normal thymus. The mRNA expression of *c-myc* gene in thymic lymphomas (1.12±0.99) was higher than that of in normal thymus tissue (0.89±0.08) with a statistical significance (P<0.01). **Conclusion** There is a correlation between promoter demethylation of *c-myc* gene and thymic lymphomas induced by ionizing radiation.

Key words thymic lymphoma; methylation; bisulfite sequencing PCR; CpG island

电离辐射照射细胞后,细胞本身发生的可遗传改变有 2 类,其一是 DNA 序列及机构异常包括基因点突变、缺失、扩增、重排等及由此引起的染色体畸变;其二是表观遗传修饰的改变^[1]。本研究探讨 *c-myc* 基因启动子甲基化状态与辐射诱导胸腺淋巴瘤的相关性,为从表观遗传学角度阐明辐射致癌机制提供理论依据。

1 材料与方法

- 1.1 动物 近交系 BALB/c 小鼠,雌性,体重 (18±2) g 30 只。
- 1.2 建立小鼠胸腺淋巴瘤模型 按参考文献 [2] 方法。
- 1.3 硫化测序 PCR (bisulfite sequencing PCR, BSP)
- 1.3.1 基因组 DNA 提取 取辐射诱发小鼠胸腺淋巴瘤和正常胸腺组织,采用基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科

技有限公司)提取 DNA,用紫外分光光度计测量 DNA 的浓度和纯度,-20℃保存备用。

1.3.2 基因组 DNA 的亚硫酸氢盐修饰 按 EpiEct⁵ Bisulfite Kit 说明书 (德国 QIAGEN 公司)进行基因组 DNA 亚硫酸氢盐转化。

1.3.3 BSP 引物 *c-myc* 基因上游引物:5'-TATATATT-GAGTGGGGTTTCTAG-3',下游引物:5'-TAAC-CAAAAAATCTCTCTTTCTCG-3',扩增产物长度为 473 bp PCR 扩增条件:94℃、30 s、59℃、30 s、72℃、1 min、35 个循环,72℃、5 min。

1.3.4 转化 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测后,用 DNA 回收试剂盒对 PCR 产物进行回收,按照 PMD19-T vector (大连 TaKaRa 公司)试剂盒说明书进行 T-A 克隆,挑取阳性克隆接种于 5 mL 含氨苄青霉素的培养液中,37℃振荡培养过夜。将菌液送大连 TaKaRa 公司测序。

1.4 逆转录 PCR

1.4.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 取辐射诱发小鼠胸腺淋巴瘤和正常胸腺各 6 个样品,按 Trizol 试剂说明书的操作步

* 基金项目:国家自然科学基金 (30670630);吉林大学生创新基金资助项目 (20091032)

作者单位:1. 吉林大学第二医院放疗科,长春 130021; 2. 吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室

作者简介:于雷 (1977-),男,吉林长春人,讲师,博士在读,主要从事辐射肿瘤学研究。

通讯作者:鞠桂芝, E-mail: gzi@ yahoo.com.cn