

## 红花 cDNA-AFLP限制性内切酶的选择及银染体系的建立

杨娟,郭美丽(第二军医大学药学院生药学教研室,上海 200433)

**摘要** 目的:建立适于红花 cDNA-AFLP分析酶切组合及银染技术体系,为进一步进行红花重要性状相关基因研究奠定基础。方法:对 PstI/MseI和 MseI/EcoRI两种限制性内切酶组合酶切效率进行比较,并探讨测序板处理中亲和硅烷和剥离硅烷的用量、测序胶中 TEMED的用量、预电泳、温度因素、显色液的配置等银染过程中较关键的几个因素。结果:选用 PstI/MseI限制性内切酶组合酶切效率较高,测序板应彻底清洁,TEMED量应适中,应进行 30 min预电泳,整个铺板电泳过程保持温度恒定,选用 4℃冷藏的碳酸钠做显色液效果好,综合以上几方面能显著提高胶图的质量。结论:本研究建立了适于红花的 cDNA-AFLP银染体系,PstI/MseI较 MseI/EcoRI酶切组合具有更高的多态性率,能更全面地揭示红花研究材料间更为丰富的遗传变异性;银染过程中成功克服了以往试验中常见的撕胶、背景太深、条纹不清晰等问题。

**关键词** 红花;cDNA-AFLP;银染体系;限制性内切酶

中图分类号:R931.6 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)06-0421-05

### Choice of restriction endonuclease and establishment of silver-staining method in cDNA-AFLP System for *Carthamus tinctorius*

YANG Juan, GUO MeiLi(Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT Objective:** To establishing an appropriate combination of restriction endonuclease and silver-staining system for cDNA-AFLP analysis in *Carthamus tinctorius* L.,. **Methods:** The efficiency of combination of PstI/MseI and MseI/EcoRI is compared. Several key factors in silver-staining including the affiliation and dissection dosage in sequencing plate processing, TEMED dosage in gel, pre-electrophoresis, temperature factor, staining liquid configuration etc are researched and discussed. **Results:** Enzyme efficiency of PstI/MseI is higher than MseI/EcoRI. Sequencing plate should be cleaned thoroughly. TEMED volume should be moderate. 30mins pre-electrophoresis should be carried out. Temperature should be constant through the whole electrophoresis process. **Conclusion:** This research has found a high effective restriction endonuclease combination can further discover the genetic background of safflower and has established an appropriate silver-staining system which has overcome several problems in staining process.

**KEY WORDS** *Carthamus tinctorius* L.; cDNA-AFLP; silver-staining system; restriction endonuclease

红花 (*Carthamus tinctorius* L.)是常用的药用植物,其花具有活血通经、散瘀止痛之功效<sup>[1]</sup>,是传统的活血化瘀中药。黄酮类查尔酮成分 羟基红花黄色素 A (HSYA)是红花的主要活性成分,其含量的高低,直接影响红花品质的优劣。因此,采用 cDNA-AFLP分子生物学方法研究与红花黄酮含量高低相关的分子标记,对于红花的分子标记辅助育种以及对其品质进行定向调控具有重要意义。

cDNA-AFLP技术,作为分析基因表达水平及差异表达基因筛选的重要方法之一,可不需要预先知

道序列信息的情况下对生物体转录组进行大规模全面、系统的分析。被广泛地应用于植物遗传多样性研究<sup>[2]</sup>、遗传图谱的构建<sup>[3]</sup>、基因定位等方面<sup>[4,5]</sup>。其中根据实验对象的基因组特征选择合适的限制性内切酶组合,对其进行充分合理的酶切,以期获得足够丰富并且能够提供较高的遗传变异性的该基因组信息的酶切组合是该项技术的关键。

此外,以往的 cDNA-AFLP方法多采用由中心试剂盒和引物试剂盒组成的商品化的试剂盒,对引物或 ATP进行放射性标记,并采用放射性自显影技术<sup>[6-9]</sup>,因此价格昂贵、检测时间较长,并需特殊防护。银染显色是近些年新发展起来的显带方法,具有成本低、无健康危害、检测时间短、染色后的胶可长期保存等优点,有利于研究和分析,是一种安全、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772734)。

作者简介:杨娟(1980-),女,硕士研究生。E-mail: yangjuanyoung@hotmail.com.

通讯作者:郭美丽。Tel: (021)81871302, E-mail: mlguo@smmu.edu.cn.

快速而有效的方法<sup>[10]</sup>,并被证明与<sup>33</sup>P检测同样可靠<sup>[11]</sup>。但其在操作技术要求上要高于其它方法,因此建立并优化反应的每一步显得非常重要。

本研究旨在建立适合红花分析的 cDNA-AFLP 酶切组合及银染技术体系,为进一步进行红花重要性状相关基因研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 植物材料** 红花 *Carthamus tinctorius* L. 种植于第二军医大学药用植物园,取红花花蕾在液氮中速冻, -70 保存备用。

**1.1.2 试剂和仪器** 尿素、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、过硫酸胺、TEMED;硝酸银、剥离硅烷、亲和硅烷购自北京鼎国生物工程公司;限制性内切酶、Taq Plus DNA 聚合酶、dNTP Mixture、10 × PCR buffer 及 DNA 分子量标准 DL-2000 均购自天根生化科技有限公司;RNA 提取所用 Trizol、DEPC 购自 Gibco 公司 (USA);反转录酶、cDNA 双链合成试剂盒购自 TaKaRa 公司 (Japan);引物由上海生工生物公司合成。电泳仪、电泳槽 (WEALTEC ELITE300 PLUS 美

国);凝胶成像系统 (WEALTEC Dolphin-DOC 美国);PCR 扩增仪 (Biometra TGRADIENT 德国);DY-CZ220A 型电泳槽、DYY212 型电泳仪电源 (北京六一仪器厂);P270 型摇床 (中国科学院武汉科学仪器厂)。

### 1.2 方法

**1.2.1 cDNA-AFLP 反应** 总 RNA 提取:采用 Trizol 法提取红花总 RNA。双链 cDNA 合成:参照 TaKaRa M-MLV RTase cDNA synthesis Kit 方法说明。酶切:选用限制性内切酶 PstI 和 MseI 组合与限制性内切酶 MseI 和 EcoRI 组合进行比较,对其效果加以比较,确定适宜的限制酶组合,用于遗传作图。连接:用 T4 DNA 连接酶将接头与酶切片段连接, 16 12 h。预扩增:对连接产物稀释 20 倍,扩增程序为 72 3 min, 94 30 s, 56 30 s, 72 1 min, 30 个循环; 72 5 min; 4 保温。选择性扩增:将预扩增产物稀释 150 倍作模板,采用选择性扩增引物组合,扩增程序为 94 1 min, 94 30 s, 65 30 s, 每循环降低 0.7, 72 1 min 12 个循环, 94 30 s, 56 30 s, 72 1 min 25 个循环, 72 10 min; 4 保温 (表 1)。

表 1 cDNA-AFLP 反应体系

酶切体系	用量 / (μL)	连接体系	用量 / (μL)	预扩增体系	用量 / (μL)	选择性扩增体系	用量 / (μL)
cDNA (333 ng/μL)	1.0	酶切产物	40.0	连接产物稀释 20 倍	4.0	预扩产物稀释 400 倍	5.0
MseI (10 U/μL)	0.5	MA (50 μM)	1.5	M <sub>00</sub> (50 ng/μL)	1.5	MseI+2 (50 ng/μL)	0.8
EcoRI (10 U/μL)	0.5	EA (10 μM)	1.5	E <sub>00</sub> (50 ng/μL)	1.5	EcoRI+2 (10 ng/μL)	0.8
MseI (10 U/μL)	0.5	MA (50 μM)	1.5	M <sub>00</sub> (50 ng/μL)	1.5	MseI+2 (50 ng/μL)	0.8
PstI (10 U/μL)	0.5	PA (5 μM)	1.5	P <sub>00</sub> (50 ng/μL)	1.5	PstI+2 (50 ng/μL)	0.8
Buffer	4.0	T <sub>4</sub> Ligase (4 U/μL)	0.25	10 ×PCR Buffer	4.0	10 ×PCR Buffer	2.5
BSA	0.2	Buffer	2.0	Taq 酶 (2.5 U/μL)	0.6	Taq 酶 (2.5 U/μL)	0.5
ddH <sub>2</sub> O	33.8	BSA	0.5	dNTP (10 mM)	1.0	dNTPs (10 mM)	0.5
		ddH <sub>2</sub> O	4.25	ddH <sub>2</sub> O	27.4	ddH <sub>2</sub> O	14.9

### 1.2.2 银染

**1.2.2.1 测序板的制备** 用亲和硅烷处理长玻璃板,使凝胶与之粘贴,用玻璃硅烷处理小玻璃板,使凝胶易于玻璃。将玻璃板用洗洁精洗涤,用双蒸水漂洗干净,玻璃板晾干后,用无水乙醇蘸在拭镜纸上擦洗,晾干。重复一次。处理短板:加 3 mL 剥离硅烷于玻板上,用拭镜纸将其均匀涂抹在整个表面。室温干燥 30 min,重复一次,晾干。处理长板:将亲和硅烷加于玻板上,对所加亲和硅烷设置不同量 (1、2、3 mL) 进行对比研究,用拭镜纸抹满整个平面,室温 30 min,用双蒸水冲洗一遍,晾干。准备 1 cm 间隔条,加样梳和金属夹,将处理好的玻板置于制胶模具上,准备灌胶。

**1.2.2.2 灌胶** 取 70 mL 6% 胶储备液,迅速加入

TEMED,分别设不同量 (15、45、75 μL) 进行比较,加入 10% 新鲜配制的 AP1000 μL,用 50 mL 注射器吸取凝胶,慢慢灌入准备好的模具中,边灌边用手轻拍玻板,以防气泡的出现。模具注满后,用梳子平端推入灌胶口约 1 cm 深,用夹子夹紧,待胶凝聚完全,即可电泳。

**1.2.2.3 电泳** 将凝聚完全的胶撤去梳子,安装到电泳槽内,上下电泳槽内各加入适量 1 ×TBE 电泳缓冲液,接通电源 1 800 V,100 W 恒功率预电泳 30 min。同时设定空白对照,即不进行预电泳。用移液枪小心冲洗凝胶上界面,冲去析出的尿素和碎胶。将选扩产物与 10 ×loading buffer 按 3:1 体积比混合,置于水浴锅 95 变性 8 min,立即置于冰上,3 min 后开始点样。每个点样孔上样 10 μL。上样后,

1 800 V, 100 W 恒功率电泳至溴酚兰条带接近胶底, 停止电泳。

**1.2.2.4 银染** 银染试剂的配制: 固定液, 100 mL 冰醋酸加入 900 mL ddH<sub>2</sub>O 中; 染色液, 1 g AgNO<sub>3</sub> 和 1.5 mL 甲醛溶于 1 L ddH<sub>2</sub>O 中; 显色液, 60 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶于 2 L ddH<sub>2</sub>O 中, 冰浴至 4℃, 使用之前加 3 mL 37% 甲醛和 400 μL 10 mg/mL Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>。同时如上配制 NaOH 显色液作为对照。银染操作步骤: 固定, 在固定专用托盘中加入固定液, 至浸没凝胶, 充分振荡 20 min。洗胶, 用超纯水振荡洗胶, 轻摇 10 min, 倒去纯净水, 重复 2 次。凝胶染色, 把凝胶浸入染色溶液中充分摇动 30 min。洗胶, 从染色溶液中迅速取出凝胶放入装有超纯水的托盘中浸洗 4 s。显影, 在 4℃ 预冷好的显影液一半倒入托盘中, 充分振荡, 直至模板带开始显现, 再把剩下的一半显影液倒入, 振摇, 直至条带全部显现, 另取常温放置显色液显色作为对照; 固定凝胶, 将固定液倒

入, 终止显色。然后用双蒸水漂洗 10 min。

## 2 结果与分析

**2.1 两种内切酶组合酶切效率的比较** 132 对 EcoI/MseI AFLP 引物总共获得了 6 751 条不同迁移率的条带, 其中只有 33 条为多态性条带, 占 0.49%, 平均每对引物获得 51 条带, 其中 0.25 条为多态性带。与此形成对照的是, 256 对 PstI/MseI AFLP 引物总共获得了 5 635 条不同迁移率的条带, 其中 768 条为多态性带, 占 13.63%, 平均每对引物获得 22.01 条带, 其中 3 条为多态性带。可见, 在红花整体基因组序列未知的情况下, MseI/PstI 酶切组合是更为合适的选择, 其酶切点更多地位于差异基因附近, 其酶切结果可更好地显示基因组表达序列的多态性差异, 更利于对红花转录组进行全面、系统的分析, 较为适用于表达基因遗传连锁作图和基因克隆研究中 (表 2)。

表 2 PstI/MseI 与 MseI/EcoR 酶切组合酶切效率比较

酶切组合	选择性扩增引物组合数 (对)	不同迁移率条带 (条)	多态性条带数 (条)	平均每对引物获得多态性条带数 (条)	多态性条带所占比例 (%)
PstI/MseI	256	5 635	768	3	13.63
MseI/EcoRI	132	6 751	33	0.25	0.49

**2.2 测序板制备效果的比较** 实验中发现, 涂抹 3 mL 亲和硅烷与 1 mL 亲和硅烷比较, 其发生撕胶现象比例大大增加。且长玻璃经亲和硅烷处理后应用去离子水再次冲洗, 以去除多余的亲和硅烷, 否则极易发生撕胶现象。由此可见, 在测序板的制备过程中, 亲和硅烷的用量较为关键, 在涂抹均匀的前提下, 用量应尽量减少, 否则易发生撕胶。与之相比, 剥离硅烷的用量可略微宽松, 在涂抹均匀的前提下可适当多涂些。此外, 测序板的彻底清洗也是避免撕胶的重要因素之一。

**2.3 测序胶制备效果的比较** 在配置测序胶时, 应控制 TEMED 的量, TEMED 作为催化剂, 引发丙烯酸酰胺发生链式反应, 交联成交联体。若 TEMED 量少 (15 μL), 胶板易粘胶而导致胶破裂; 若 TEMED 量过多 (90 μL), 一方面不容易进行后续操作, 如测序胶凝结较快, 易堵塞针筒, 影响灌胶过程的顺利进行, 并且灌胶后插入梳子时极易产生气泡, 易导致灌胶过程失败。另一方面过多的 TEMED 影响电泳, dDNA 带容易发虚、扭曲。经实验反复调试, 发现以加入 TEMED 45 μL 为宜。

**2.4 预电泳的作用** 预电泳时间一定要大于 30 min, 保证胶板温度达到 50 ~ 55℃, 低于此温度, 条

带发虚, 模糊不清, 温度过高会出现 Smear 带, 还有可能使胶板炸裂, 且经 30 min 预电泳后, 测序胶中 TEMED 充分溶出, 染色后 dDNA 条带平稳整齐且清晰。若未经预电泳, 测序胶中 TEMED 未能充分溶出, 且测序板存在温差, 染色后 dDNA 条带易发虚扭曲, 影响后期观察比较 (图 1)。

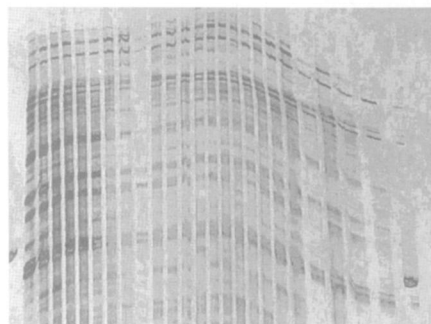


图 1 银染条带扭曲

**2.5 染色时显色液的影响** 实验中发现, 用 4℃ 预冷的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液进行显影时较之常温 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 背景显影较浅, 且显影速度较慢, 易于控制整个显影过程。当用 NaOH 代替 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 配制显色液时, 其显色速度迅速加快, 并且背景颜色明显加深, 较难

识别特异条带,影响后期分析(图2)。因此综上所述,显色液应以4℃低温 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液为宜。

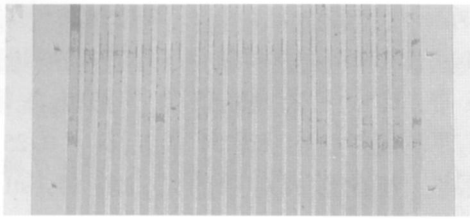


图2 银染背景加深

### 3 讨论

AFLP具有在一次实验中同时观测大量限制性片段的优点,被认为是迄今为止最有效的分子标记技术。不管研究的基因组cDNA有多么复杂,理论上讲,用AFLP方法都可以检测出cDNA之间的多态性。而AFLP片段的多态性及丰富性是由酶切的多态性和丰富性来决定的,因此,酶切质量是决定AFLP成功与否的关键。对cDNA进行充分酶切是后续所有试验步骤的基础,为保证酶切充分,应慎重选择限制性内切酶组合,用量适当,酶切时间可适当延长,在本实验中,我们发现PstI/MseI较MseI/EcoR酶切组合具有更高的多态性率,能更全面地揭示出红花评析材料间更为丰富的遗传变异性。并且,在实验条件允许的情况下,最好选用可靠大公司生产的酶和试剂(ATP、dNTP等),因不同公司的酶活性不一样,甚至同一公司不同批次的酶活性也不一样,因此应尽量保证所用的药物来源于同一公司同一批次。

传统的cDNA-AFLP方法是采用同位素进行引物标记,因为同位素对人体有害,这就需要相应的防护措施以及配套的仪器设备,因此,大大提高了cDNA-AFLP技术的成本。并且同位素曝光一般需要几天的时间,实验周期比较长,这就限制了cDNA-AFLP的推广应用。目前,利用银染等非放射性方法代替放射性同位素检测cDNA-AFLP的报道还不多见。本试验利用银染的方法,获得了清晰的cDNA特征图谱。利用银染的方法不需要特殊的实验设备和防护措施,从电泳到得到最后的银染仅需要半天时间,大大缩短实验周期。另外,经过硝酸银染色后的凝胶自然干燥后可以长期保存,而且对于特异性的谱带可以直接从胶上准确地切下,然后进一步扩增和克隆,能降低实验成本,提高实验效率,便于该技术在植物育种、分子标记筛选和高密度遗传图谱地构建中广泛应用。但cDNA-AFLP银染技术对操作人员技术要求较高,任何一步的疏忽都会影响试验结果。在整个试验过程中,我们发现若能注

意文中所提若干关键点,则可获得理想的胶图。

测序板应充分清洗至不挂水,用乙醇去除残留的洗涤剂,否则灌胶时,在污染处易产生气泡,且此类气泡不易去除。并且,若测序板未清洗干净,在后期的试验中,还极易发生撕胶,产生褐色背景等不良现象。灌胶过程中,TEMED的量也较为关键,若测序胶中TEMED未能充分溶出,染色后cDNA条带易发虚扭曲。因此也是为了减少TEMED对电泳的影响,一般需先进行30min的预电泳。

温度对银染效果的影响也较大。在实验中发现,不仅制胶时的温度对试验有影响,在电泳过程中,温度始终是一个重要影响因子。尤其在冬季温度低的情况下,用冷的自来水和去离子水清洗玻璃板后,会造成玻璃板不同部位热胀冷缩的程度不一。因此,在电泳前,应先进行30min的预电泳,使测序板、测序胶、缓冲液受温均匀。并且在电泳时,始终保持室温恒定,否则,电泳几分钟后,便可观察到指示剂不在同一条直线上,呈拱桥状或此起彼伏状,最终因条带清晰度不均一而无法准确地进行统计分析。

碳酸钠在显影液中有提供碱性环境、促进显影剂显影能力的作用。试验中,将无水碳酸钠溶液进行4℃预冷,可以延缓显影时间,便于控制显影过程及中止反应时间,同时减少背景着色。在试验中发现,碳酸钠溶液在冷冻到冰针状之前整个温度范围内,其温度越低,背景着色越浅,效果也越好。如果用氢氧化钠代替无水碳酸钠或提高碳酸钠的浓度,其显影液碱性增强,显影时间缩短,但背景颜色明显加深。

总之,高效的酶切组合、合适的银染条件是AFLP技术成功的关键。AFLP技术能很好地分离鉴别相差几个碱基的核酸小片段,结果可永久保存,并且可从该胶中回收的cDNA纯度极高,适用于分子生物学中较高要求的实验。但其实验操作要求较高,一定程度上限制了它的广泛运用。本研究通过反复对比尝试,成功克服了红花银染体系中,酶切效率低、撕胶、胶板背景太深、条纹不清晰等关键性问题。为进一步构建cDNA文库、mRNA差异显示分析、cDNA克隆等深入研究奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 中国药典 2005年版,一部[S]. 2005: 103.
- [2] Zhang L, Huang BB, Yin KG, et al Analysis of intraspecific variation of Chinese *Carthamus tinctorius* L. Using AFLP markers [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2006, 41: 91.
- [3] Reijans M, Lascaris R, Groeneger AO, et al Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and GeneChip expression data in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Genomics, 2003, 82: 606.

- [4] Milioni D, Sado PE, Stacey NJ, *et al* Early gene expression associated with the commitment and differentiation of a plant tracheary element is revealed by cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis[J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 2813.
- [5] Luisa MC, Luis C, Cristina O, *et al* Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2000, 47: 257.
- [6] Goulao L, Caobrita L, Oliveira CM, *et al* Comparing RAPD and AFLP(TM) analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars-RAPD and AFLP analysis of apples[J]. *Euphytica*, 2001, 119 (3): 259.
- [7] Goto-Yamamoto N. Phenetic clustering of grapes (*Vitis* spp.) by AFLP analysis[J]. *Breeding Science*, 2000, 50: 53.
- [8] Jun G, Rays HYJ, Lars G, *et al* A cDNA-AFLP based strategy to identify transcripts associated with avirulence in *Phytophthora infestans*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2006, 43: 111.
- [9] Perera L, Russell JR, Provan J, *et al* Evaluating genetic relationships between indigenous coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions from Sri Lanka by means of AFLP profiling[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 545.
- [10] 石锐,郭长虹. 聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的银染方法 [J]. *生物技术*, 1998, 5: 41.
- [11] Chalhoub BA, Thibault S, Laucou V, *et al* Silver staining and recovery of AFLP (TM) amplification products on large denaturing polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, 1997, 22: 216.

收稿日期: 2009-06-18

## (上接第 403页)

- [10] Solys J, Quinn MT. Modulation of endotoxin and enterotoxin-induced cytokine release by *in vivo* treatment with beta-(1, 6)-branched beta-(1,3)-glucan[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(1): 244.
- [11] Tzianabos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13(4): 523.
- [12] Wassr SP. Medical mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(3): 258.
- [13] Muralikrishna G, Rao MV. Cereal non-cellulosic polysaccharides: structure and function relationship- an overview [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2007, 47(6): 599.
- [14] Sletmoen M, Stokke BT. Higher order structure of (1,3)-beta-D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities[J]. *Biopolymers*, 2008, 89(4): 310.
- [15] Valeur HS, Valen G. Innate immunity and myocardial adaptation to ischemia[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(1): 22.
- [16] Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 782.
- [17] Cha J, Wang Z, Ao L, *et al* Cytokines link Toll-like receptor 4 signaling to cardiac dysfunction after global myocardial ischemia [J]. *Ann Thorac Surg*, 2008, 85(5): 1678.
- [18] Fischer UM, Radhakrishnan RS, Uray KS. Myocardial function after gut ischemia/reperfusion: does NF kappa B play a role? [J]. *J Surg Res*, 2009, 152(2): 264.
- [19] Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, *et al* Akt promotes survival of cardiomyocytes *in vitro* and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart[J]. *Circulation*, 2000, 101(6): 660.
- [20] Matsui T, Tao J, delMonte F, *et al* Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia *in vivo*[J]. *Circulation*, 2001, 104(3): 330.
- [21] Williams DL, Ha T, Li C, *et al* Inhibition of LPS-induced NFkappaB activation by a glucan ligand involves down-regulation of IKKbeta kinase activity and altered phosphorylation and degradation of IkappaBalpha[J]. *Shock*, 2000, 13(6): 446.
- [22] Li C, Ha T, Kelley J, *et al* Modulating Toll-like receptor mediated signaling by (1->3)-beta-D-glucan rapidly induces cardioprotection[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 60(3): 538.
- [23] Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ, *et al* Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats[J]. *Am J Pathol*, 1985, 121(3): 522.
- [24] Katare RG, Kakinuma Y, Arikawa M, *et al* Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PBK signaling pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(3): 405.
- [25] Matsui T, Tao J, delMonte F, *et al* Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia *in vivo*[J]. *Circulation*, 2001, 104(3): 330.
- [26] Borel JP, Maquart FX. Molecular mechanisms of wound scarring [J]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 1998, 56(1): 11.
- [27] Stappenbeck TS, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair [J]. *Science*, 2009, 324(5935): 1666.
- [28] Huang MH, Yang MC. Evaluation of glucan/poly(vinyl alcohol) blend wound dressing using rat models[J]. *Int J Pharm*, 2008, 346(1-2): 38.
- [29] Kougijs P, Wei D, Rice PJ, *et al* Normal human fibroblasts express pattern recognition receptors for fungal (1->3)-beta-D-glucans[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(6): 3933.
- [30] Wei D, Williams D, Browder W. Activation of AP-1 and SP1 correlates with wound growth factor gene expression in glucan-treated human fibroblasts [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(8): 1163.
- [31] Wang ZM, Li L, Li B, *et al* Anticoagulant property of a semi-synthesized sodium beta-1,4-glucan sulfate [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2006, 41(4): 323.
- [32] Chaidedgumjom A, Toyoda H, Woo ER. Effect of (1->3)- and (1->4)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity[J]. *Carbohydr Res*, 2002, 337(10): 925.
- [33] Alban S, Franz G, Alban S, *et al* Partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: a review [J]. *Biomacromolecules*, 2001, 2(2): 354.
- [34] Smeclerovic A, Knezevic-Jugovic Z, Petronijevic Z. Microbial polysaccharides and their derivatives as current and prospective pharmaceuticals[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(29): 3168.

收稿日期: 2009-07-29