

DOI 10.16720/j.cnki.tcyj.2023.001

灵芝子实体醇提物抗缺血性脑卒中研究

胡浪, 施巍巍, 周亚杰, 王颖, 冯鹏, 郭原

(南京中科药业有限公司, 江苏 南京 210008)

摘要 :研究灵芝子实体醇提物对大鼠中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)损伤模型大鼠的影响。建立SD大鼠MCAO/R大鼠模型,按行为学评分随机分为6组,每组6只,分别为灵芝子实体醇提物高剂量组(20 mg/kg)、灵芝子实体醇提物中剂量组(10 mg/kg)、灵芝子实体醇提物低剂量组(5 mg/kg)、阳性对照氯吡格雷组7.5 mg/kg和假手术组及缺血模型对照组(均给以等容积的生理盐水)。每组复灌之后2 h开始给药,之后每日灌胃给药1次,连续给药7 d。MCAO/R后第2天、第4天及末次给药后30 min,对大鼠进行神经行为学评分,测定大鼠神经功能,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定大鼠脑梗死率和脑含水量。用断尾法和玻片法分别检测小鼠出血时间和凝血时间。灵芝子实体醇提物在MCAO/R后2 h给药,3个剂量组MCAO/R大鼠的神经功能评分均降低脑梗死率和脑含水量,能显著延长小鼠的出血时间和凝血时间。灵芝子实体醇提物及时治疗给药可以降低大鼠脑缺血再灌注损伤脑梗死率和脑含水量,改善大鼠神经运动功能,并表现出较好的抗凝血作用。

关键词 灵芝子实体醇提物 缺血性脑卒中 神经行为学 出血时间 凝血时间

中图分类号 R285

文献标识码 A

文章编号 1001-4721(2023)01-0001-06

Study on the Anti-Ischemic Stroke Effect of Alcohol Extract from *Ganoderma lucidum* Fruit Body

HU Lang, SHI Weiwei, ZHOU Yajie, WANG Ying, FENG Peng, GUO Yuan

(Nanjing Zhongke Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210008, China)

Abstract: To study the effect of alcohol extract of *Ganoderma lucidum* fruit body on middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) injury model rats. MCAO/R model of SD rats was established and randomly divided into 6 groups according to behavioral scores, with 6 rats in each group, high dose group (20 mg/kg), medium dose group (10 mg/kg) and low dose group (5 mg/kg), respectively; The positive control group was given clopidogrel 7.5 mg/kg; Sham operation group and ischemia model control group were given the same volume of normal saline. The administration of each group was started 2 h after the reperfusion, and then administered by intragastric administration once a day for 7 consecutive days. On the second day and the fourth day after MCAO/R administration and 30 min after the last administration, neurobehavioral scores were performed to determine the neural function of the rats. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining method was used to determine the rate of cerebral infarction and brain water content in rats. The bleeding time and coagulation time of mice were detected by tail docking method and glass slide method, respectively. The alcohol extract of *Ganoderma lucidum* fruit body was administered 2 hours after MCAO/R, and the neurological function score, cerebral infarction rate and cerebral water content of MCAO/R rats were all decreased in the three dosage groups, and the bleeding time and coagulation time of mice were significantly prolonged. The timely treatment and administration of alcohol extract of *G. lucidum* fruit body can reduce cerebral infarction rate and cerebral water content, improve neuromotor function and show good anticoagulant effect in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury.

Key words: alcohol extract of *Ganoderma lucidum* fruit body; ischemic stroke; neurological function score; bleeding time; coagulation time

缺血性脑卒中(ischemic stroke)指多种原因引起的短暂或永久脑血流供应障碍,脑组织缺血缺氧坏死,

导致神经功能缺损,产生包括偏瘫、失语、认知和学习能力受损等一系列临床综合征。缺血性脑卒中具有发

收稿日期 2022-06-01

作者简介 胡浪(1990-),男,安徽省滁州人,硕士,中级医药工程工程师,从事灵芝类药品、保健食品的研究与开发工作。

病率高、致残率高、死亡率高以及并发症多等特点^[1]。缺血性脑卒中属于脑卒中多种亚型中的主要类型,已成为世界第二大死亡原因和第三大致残因素^[2,3]。目前对于缺血性脑卒中的治疗手段包括手术介入治疗和药物治疗。其中,药物治疗是临床上最常用的手段,如抗凝药、抗血小板药和溶栓药^[4,5]。然而这些现存的药物存在药物选择性不高、作用途径单一及胃肠道反应明显等缺点,因此,寻找新的候选药物对于防治缺血性脑卒中具有着重要的意义^[6]。

大脑中动脉(Middle cerebral artery, MCA)是人类脑卒中的多发部位,大脑中动脉闭塞(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型被普遍认为是局灶性脑缺血的标准动物模型。

灵芝作为一种名贵的中药材,以子实体入药,含有多种氨基酸、脂肪酸、三萜和多糖类等物质。灵芝子实体醇提物是从灵芝子实体中经乙醇提取后得到的提取物,其主要成分有灵芝多糖、灵芝总三萜和氨基酸等^[7]。多篇文献报导灵芝醇提物具有提高免疫力、辅助抑制肿瘤及改善睡眠的作用^[8-10]。

本研究建立 MCAO/R 模型,探索大鼠脑缺血再灌注损伤的抗凝血作用及治疗作用,为灵芝子实体醇提物的进一步开发提供实验依据。

1 试验材料

1.1 药物与试剂

灵芝子实体醇提物(南京中科药业有限公司),临用前用玉米油配成所需浓度的均匀混悬液 氯吡格雷,临用前 0.5%CMC-Na 配成所需浓度的均匀混悬液。0.9%氯化钠注射液(安徽双鹤药业有限责任公司产品) 水合氯醛(上海凌峰化学试剂有限公司产品),临用前用 0.9%氯化钠注射液溶解配制成浓度为 3%的澄清溶液。2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC, BioLINK 公司),临用前用 PBS 缓冲液配制成浓度为 1%的溶液;羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 国药集团化学试剂有限公司),0.5% CMC-Na 的配制 将 2.5 g CMC-Na 均匀撒在 500 mL 的超纯水表面,室温下放置过夜,摇匀后使用,药用级玉米油(Aladdin)。

1.2 动物

SD 大鼠,72 只,SPF 级,雄性,由上浙江省杭州医学院提供,生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002,合格证编号:20201010Aazz0100000536;ICR 小鼠,50 只,SPF 级,雌雄各半,由浙江省杭州医学院提供,生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002,合格证编号:202009

22Abzz0100000176, 20200922Abzz0100000485;饲料:颗粒饲料,由中国药科大学动物室供给;饲养条件:空调房间,温度 18~24℃,相对湿度 70%。所有动物试验均符合动物伦理委员会标准。

1.3 仪器

数显干燥箱(上海博讯实业有限公司 GZX-9140 MBE);电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司 BS224s型) 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司产品 HH-4);-20℃冰箱(德国SIEMENS公司BCD-254CKK 25V61TI)。

2 方法

2.1 灵芝子实体醇提物的制备方法

取灵芝子实体粗粉碎,用 30 倍量 95%乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,收集滤液,真空干燥 4 h,粉碎过筛,即得灵芝子实体醇提物。

2.2 灵芝子实体醇提物于MCAO再灌后 2 h 给药对大鼠脑缺血损伤的保护作用

2.2.1 大鼠 MCAO/R 损伤模型建立 取雄性 SD 大鼠 36 只(实际需要 72 只,因为成模率为 50%左右),体重 250~300 g,按体重随机分为 6 组,每组 6 只,分为醇提物高剂量组(20 mg/kg)、中剂量组(10 mg/kg)和低剂量组(5 mg/kg) 3 个剂量组,阳性对照氯吡格雷组 7.5 mg/kg,假手术组及缺血模型对照组(均给以等容积的生理盐水)。MCAO 再灌后 2 h 开始给药,每日灌胃给药 1 次,连续给药 7 d,给药容积为 0.2 mL/100 g 体重。

渔线的制备 将一长 40 mm,直径 0.26 mm 的渔线的一端用记号笔标记,在距离此标记端 18 mm处用记号笔再做一标记,置于生理盐水中备用。

大鼠 MCAO/R 模型:造模手术前 24 h 禁食不禁水。参考 Longa 等的方法^[11],采用颈内动脉线栓法制备大鼠 MCAO 模型 大鼠用 3%水合三氯乙醛(300 mg/kg)腹腔注射(i.p)麻醉,仰卧手术台上,颈部正中切口,暴露右侧颈总动脉,向外牵引二腹肌及胸锁乳突肌,由颈总动脉分叉处向头端依次游离,结扎并剪断颈外动脉的分支枕骨下动脉和甲状腺上动脉,在颈外动脉远端结扎,切断颈外动脉使其主干游离备用,然后分离颈内动脉,用丝线在颈外动脉根部打一松扣,夹闭颈总动脉和颈内动脉,将渔线(长 40 mm,直径 0.26 mm)经颈外动脉主干切口缓慢向颈内动脉入颅方向推进,当渔线进入颈内动脉后松开颈内动脉上的动脉夹,以颈总动脉分叉处为标记,推进 18 mm 左右时感到阻力,即达到

了较细的大脑前动脉内,阻断了MCA的所有血供来源,扎紧颈外动脉根部松扣。缺血后2h,拔出尼龙线,扎紧动脉残端,缝合皮肤,完成MCAO导致局灶性脑缺血—再灌模型。假手术组大鼠麻醉后,仅暴露颈内外动脉分叉,不闭塞MCA。

2.2.2 脑梗塞率和含水量测定 神经功能评分: MCAO/R后第2天、第4天及末次给药后30min,按Bederson等^[12]的方法对动物的神经功能缺陷进行分级评分,标准如下:

0分:未观察到神经症状。1分:提尾悬空时,动物的手术对侧前肢表现为腕肘屈曲,肩内旋,肘外展,紧贴胸壁。2分:将动物置于光滑平面上,推手术侧肩向对侧移动时,阻力降低。3分:动物自由行走时向手术对侧环转或转圈。4分:软瘫,肢体无自发活动。

上述指标测定后,脱颈椎处死大鼠,取出全脑称重。在视交叉及其前后各2mm处做冠状切4刀,切成5片后迅速将脑片置于5mL含有1%TTC的磷酸缓冲溶液中,避光温孵30min,在温孵过程中每隔7~8min翻动1次,温孵30min后取出脑片,用数码相机拍照,之后用眼科镊分离苍白区(梗塞区)和非苍白区(正常区),计算梗塞百分比如下:

梗塞百分比(%) = $\frac{\text{苍白区重量}}{\text{苍白区重量} + \text{非苍白区重量}} \times 100\%$

将染色后的脑组织置于110℃烘箱中烘干,对照大脑湿重求出脑含水量如下:

脑组织含水量(%) = $(1 - \frac{\text{脑组织干重}}{\text{脑组织湿重}}) \times 100\%$

2.3 灵芝子实体醇提物对小鼠出血时间和凝血时间的影响

2.3.1 采用断尾法检测受试药对小鼠出血时间的影响

取健康清洁级ICR小鼠50只,体重18~22g,按体重随机分为5组,每组10只,分别为灵芝子实体醇提物高剂量组(40mg/kg)、灵芝子实体醇提物中剂量组(20mg/kg)和灵芝子实体醇提物低剂量组(10mg/kg)、阳性对照氯吡格雷组15mg/kg和空白组(给以等容积的生理盐水)。每天灌胃给药1次,连续给药7d,给药容积为0.2mL/10g体重。末次给药后30min,将其尾部垂直,用毫米尺测量,并在距尾尖5mm处作标记,然后用手术刀片在鼠尾标记处垂直切断,待血液自行溢出开始计时,每隔30s用滤纸吸去血滴1次,直至血液自然停止(滤纸吸时无血为止)即为出血时间,记录出血时间。

2.3.2 采用玻片法检测受试药对小鼠凝血时间的影响
动物分组、给药剂量及给药方式同出血时间测定试验。末次给药后30min,以内径为1mm的玻璃毛细管插入小鼠眼眶内,使血自动流出,弃去第1滴血,再分别滴血于清洁载玻片的两端,血滴直径为5~10mm,立即开始计时,此后每隔10s用干燥针头挑动血液1次,至针头能挑起纤维蛋白丝为止,即为凝血时间,用秒表记录凝血时间。将结果进行组间t检验比较^[13]。

2.4 统计学方法

数据统计软件为SPSS 22.0,多组间比较方差齐性时采用单因素方差分析进行数据统计,两两比较采用ANOVA检验,两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 灵芝子实体醇提物于MCAO再灌后2h给药对大鼠脑缺血损伤的保护作用

结果表明,MCAO/R后第2、4、7天时,模型组大鼠均有较高的神经行为学评分,说明模型组的大鼠神经功能缺陷严重。与模型组相比,灵芝子实体醇提物高剂量组(20mg/kg)和中剂量组(10mg/kg)均能显著降低脑缺血大鼠的神经功能评分,低剂量组(5mg/kg)仅在第4天表现出神经功能改善的作用($P < 0.05$);与空白组相比,模型组大鼠脑梗死面积和脑含水量均显著升高($P < 0.01$),与模型组相比,灵芝子实体醇提物3个剂量组均能显著降低脑梗死面积和含水量($P < 0.01, P < 0.05$),且整体效果与阳性药氯吡格雷相似。结果见图1、表1和表2。

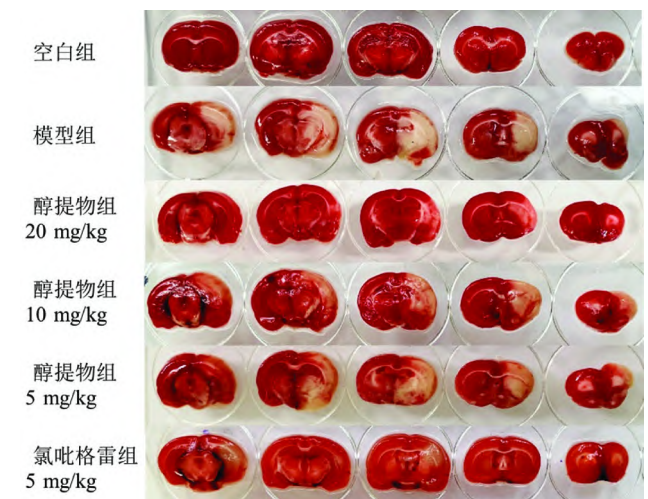


图1 2h给药局灶性脑缺血(MCAO)/再灌注大鼠脑TTC染色代表图(n=8)

Fig. 1 Images of TTC staining in the brain of rats with focal cerebral ischemia (MCAO)/reperfusion after 2 h administration (n=8)

表 1 醇提取物于 MCAO 再灌后 2 h 给药对大鼠神经行为学的影响 (mean±SD, n=6)

Table 1 The effects of alcohol extracts on neurobehavioral in rats 2 h after MCAO reperfusion (mean±SD, n=6)

组别 Group	剂量/(mg/kg) Dose	第 2 天 The second day	第 4 天 The fourth day	第 7 天 The seventh day
模型组	—	3.17±0.41	3.17±0.41	3.17±0.41
醇提取物组	20	1.33±0.52**	1.33±0.52**	1.33±0.82**
	10	1.67±0.82*	1.50±0.55*	1.50±0.55*
	5	1.67±0.52	1.67±0.52*	1.67±0.52
氯吡格雷组	7.5	1.83±0.41	1.50±0.55*	1.33±0.52*

注 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型对照组比较。Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with ischemia model control group.

表 2 醇提取物于 MCAO 再灌后 2 h 给药对大鼠脑梗死率及脑含水量的影响 (mean±SD, n=6)

Table 2 The effect of alcohol extract administration on cerebral infarction rate and cerebral water content in rats 2 h after MCAO reperfusion (mean±SD, n=6)

组别 Group	剂量/(mg/kg) Dose	脑梗塞率/% Cerebral infarction rate	脑含水量/% Brain water content
空白组	—	0	79.54±0.49
模型组	—	30.60±3.26##	82.64±0.41##
醇提取物组	20	8.74±9.59*	79.73±1.13**
	10	8.81±11.45*	80.09±0.72**
	5	12.75±8.28*	80.21±1.21*
氯吡格雷组	7.5	11.32±3.90**	78.45±1.16**

注 ## $P < 0.01$, 与空白对照组比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型对照组比较。Note: ## $P < 0.01$, compared with the sham operation group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the model control group.

3.2 灵芝子实体醇提取物对小鼠出血时间和凝血时间的影响

结果表明,灵芝子实体醇提取物给药 7 d 内,小鼠未出异常的行为学变化,和空白组相比。灵芝子实体醇提取物仅高剂量组 (40 mg/kg) 对小鼠出血时间和凝血时间

有显著的延长作用 ($P < 0.05$), 中剂量组 (20 mg/kg) 和低剂量组 (10 mg/kg) 对小鼠出血时间和凝血时间均无延长作用 ($P > 0.05$)。阳性药氯吡格雷对小鼠出血时间和凝血时间有显著的延长作用 ($P < 0.01$), 结果见表 3。

表 3 醇提取物对小鼠出血时间和凝血时间的影响 (mean±SD, n=10)

Table 3 Effects of alcohol extracts on the bleeding time and coagulation time in mice (mean±SD, n=10)

组别 Group	剂量/(mg/kg) Dose	出血时间/s Bleeding time	凝血时间/s Clotting time
空白对照	—	245.80±58.23	12.00±9.26
醇提取物	40	681.60±243.57*	101.00±59.37*
	20	448.30±183.44	75.00±50.04
	10	375.00±204.52	31.50±29.85
氯吡格雷	15	723.00±254.12**	98.30±46.82**

注 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白组比较。Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the sham operation group.

4 讨论

缺血性脑卒中是脑卒中的一种, 又称脑梗死或者中风, 其发病率逐年上升, 若治疗不及时, 一般伴随认知和/或行动障碍等副作用, 给患者及其家庭带来巨大影响^[14,15]。在所有的卒中病例中, 大约 87% 属于缺血

性脑卒中^[16]。缺血性脑卒中的治疗目前仍是研究的难点之一。根据缺血性脑卒中的发病部位、病因、诊疗思路及现在研究者的新发现, 缺血性脑卒中动物模型分为局灶性缺血性脑卒中和全脑缺血性脑卒中, 常用造模方法有线栓法、开颅电凝阻断法、血栓形成法、栓子

栓塞阻断法和球囊导管法等,造模使用的动物有大鼠、小鼠、家兔和家犬等^[17]。不同动物、不同造模方法的缺血性脑卒中模型有各自的优缺点,选择合适的动物模型对试验研究极其重要。线栓法制作的局灶性脑缺血模型由于与人类脑缺血后的病理改变比较接近,在脑缺血实验中应用较为广泛^[18]。本文参考 Longa 等的方法,采用大鼠 MCAO/R 损伤模型,具有以下优点:无需开颅,避免外力干扰损伤脑组织、脑缺血再灌注时间易于把握且造模所需脑梗死部位及栓塞的血管明确、重复性好等^[19]。

灵芝作为一种药食两用珍贵中药材,在中国已经有 2 000 多年的食用历史。灵芝针对心脏血管疾病预防及治疗具有很好的功效,而且安全性高,未发现不良反应^[20]。文献报道,灵芝通过特定信号分子和途径发挥其生物学作用,通过降低血糖、调节血脂、稳定血压以及保护心肌细胞和大脑细胞等多条途径和靶点,对心脑血管疾病具有较好的协同治疗作用^[21]。灵芝子实体醇提物对灵芝中的灵芝多糖、灵芝三萜和氨基酸等多种功效成分进行了富集^[22],提示我们灵芝醇提物对心脑血管疾病可能具有一定的疗效,值得进一步深入研究。

本文采用对大鼠的神经功能缺陷进行分级评分和检测脑梗塞率和含水量的方法进行模型评价,结果表明,模型组的大鼠神经功能缺陷严重,模型组大鼠脑梗死面积和脑含水量均显著升高,说明脑缺血再灌注模型建立成功。

灵芝子实体醇提物在 MCAO/R 后 2 h 给药能显著降低脑缺血再灌注大鼠的脑梗死面积和脑含水量,并改善行为学变化,并且表现出与阳性药氯吡格雷相似的治疗效果。缺血性脑卒中的药物治疗方案很多,但是目前没有特效药。药物治疗作为保守治疗的一种,是患者比较容易接受的治疗方式,但不同药物产生的疗效和副反应有所不同。灵芝子实体醇提物目前无毒副作用的报道,对该品种的深入研究具有良好的市场前景。

本文同时研究了灵芝子实体醇提物对小鼠出血时间和凝血时间的影响,结果表明灵芝子实体醇提物高剂量组(40 mg/kg)能显著延长小鼠出血时间和凝血时间,且与阳性药氯吡格雷效果类似。以上结果说明灵芝子实体醇提物可有效改善患者血液流变学指标,具有抗凝血的作用,再次提示我们灵芝子实体醇提物或许是对缺血性脑卒中治疗药物的有效补充。

综上所述,应用大鼠局灶性脑缺血(MCAO)再灌注

损伤模型对灵芝子实体醇提物的抗缺血性脑卒中药效学的研究,结果表明醇提物在 2 h 内给药时可以改善脑缺血症状并抗凝血,但其具体的作用机制仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] CAMPBELL B C V, DE SILVA D A, MACLEOD M R, et al. Ischaemic stroke[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2019, 5 (1): 70.
- [2] FEIGIN V L, FOROUZANFAR M H, KRISHNAMURTHI R, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2014, 383 (9913): 245-254.
- [3] YANG G, WANG Y, ZENG Y, et al. Rapid health transition in China, 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2013, 381(9882): 1987-2015.
- [4] STOLL G, NIESWANDT B. Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke-implications for treatment[J]. Nature Reviews neurology, 2019, 15(8): 473.
- [5] HERPICH F, RINCON F. Management of acute ischemic stroke[J]. Critical Care Medicine, 2020, 48(11): 1654.
- [6] TAO T, LIU M, CHEN M, et al. Natural medicine in neuroprotection for ischemic stroke: challenges and prospect[J]. Pharmacology and Therapeutics, 2020, 216: 107695.
- [7] 钟千贵, 陈天赐, 邱铭钰, 等. 无柄灵芝提取物中营养成分及体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 321-326.
- [8] 丁佩娥, 雷林生, 周桂保, 等. 灵芝醇提物对小鼠免疫功能影响的初步研究[J]. 中药材, 2011, 34(2): 259-262.
- [9] 刘宇, 苏海国, 周勤梅. 不同种的灵芝醇提物对肝癌细胞增殖的抑制作用[J]. 食用菌学报, 2018, 25(2): 121-125.
- [10] 李建宏, 李晓云, 江育莹, 等. 灵芝乙醇提取物对 A549 肺癌细胞的作用及其机制[J]. 华西药学杂志, 2022, 37(1): 4.
- [11] LONGA E, WEINSTEIN P, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [12] BEDERSON J B, PITTS L H, TSUJI M, et al. Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [13] 田靖, 崔庆华, 郭平, 等. 小鼠剪尾出血模型的优化[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(1): 40-45.
- [14] 王丹, 钟建国. 基于“多感官刺激”理论的中医综合康复方案对老年缺血性脑卒中后失眠患者睡眠功能的影响[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(12): 1619-1625.
- [15] 吕双, 张敬华, 虞鹤鸣. 中药对缺血性脑卒中炎症/氧化应激抑制的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(2): 357-361.
- [16] PAUL S, CANDELARIO-JALIL E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: an overview of clinical and preclinical studies[J]. Experimental Neurology, 2020, 335: 113518.

(下转第13页)

个潜在分子标记。此外,*KDM6A* g.27102554T > A 位点的多态性与云上黑山羊的初生窝重和断奶窝重显著相关。总体而言,*KDM4C* 和 *KDM6A* 在调控山羊繁殖性能方面有一定的作用。

4 结论

研究表明,*EGR4* g.11029600T > A、*KDM4C* g.37764228T > A 和 *KDM6A* g.27102554T > A 位点与云上黑山羊初生窝重和断奶窝重存在显著关联,可作为云上黑山羊窝重选择的潜在分子标记。*KDM4C* g.37764228T > A 和 *KDM6A* g.27177505C > A 位点与云上黑山羊产羔数存在显著关联,可作为云上黑山羊产羔数选择的潜在分子标记。

参考文献

- [1] 储明星. 绵羊高繁殖力主效基因的研究及应用[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(1): 1-9.
- [2] 程美玲, 赵素梅, 黄英, 等. 云岭黑山羊 FSH 基因表达量与其产羔数相关性研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2010, 25(6): 807-810.
- [3] O'DONOVAN K J, TOURTELLOTT W G, MILLBRANDT J, et al. The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience[J]. Trends in Neurosciences, 1999, 22(4): 167-173.
- [4] DAHL J A, JUNG I, AANES H, et al. Broad histone H3K4me3 domains in mouse oocytes modulate maternal-to-zygotic transition[J]. Nature, 2016, 537(7621): 548-552.
- [5] ZHANG B, ZHENG H, HUANG B, et al. Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development[J]. Nature, 2016, 537: 553-557.
- [6] HUANG J, ZHANG H, WANG X, et al. Impairment of preimplantation porcine embryo development by histone demethylase KDM5B knockdown through disturbance of bivalent H3K4me3-H3K27me3 modifications[J]. Biology of Reproduction, 2015, 92(3): 72.

(上接第5页)

- [17] 王晋晨, 熊晓星. 缺血性脑卒中动物模型研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(10): 7.
- [18] 缪培, 张通, 米海霞. 基于线栓法大鼠大脑中动脉闭塞的局灶性脑缺血模型的比较研究[J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(10): 1190-1195.
- [19] 石永光. “醒脑开窍”针刺法对 MCAO/R 大鼠运动、记忆功能影响的精细评价及其机制研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021, 54.

- [7] WASSON J A, SIMON A K, MYRICK D A, et al. Maternally provided LSD1/KDM1A enables the maternal-to-zygotic transition and prevents defects that manifest postnatally[J]. eLife, 2016, 5: e08848.
- [8] SIKLENKA K, ERKEK S, GODMANN M, et al. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally[J]. Science, 2015, 350(6261): aab2006.
- [9] 陶林, 杨红远, 江炎庭, 等. 云上黑山羊体尺性状对体重影响的通径分析[J]. 家畜生态学报, 2020, 41(7): 18-22.
- [10] 陶林, 杨红远, 江炎庭, 等. 云上黑山羊体重与成年性状的典型相关分析[J]. 中国农学通报, 2020, 36(11): 108-112.
- [11] CROSBY S D, VEILE R A, DONIS-KELLER H, et al. Neural-specific expression, genomic structure, and chromosomal localization of the gene encoding the zinc-finger transcription factor NGFI-C[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1992, 89(14): 6663-6663.
- [12] TOURTELLOTT W G, NAGARAJAN R, AUYEUNG A, et al. Infertility associated with incomplete spermatogenic arrest and oligozoospermia in Egr4-deficient mice[J]. Development, 1999, 126(22): 5061-5071.
- [13] HOGARTH C A, MITCHELL D, SMALL C, et al. EGR4 displays both a cell-and intracellular-specific localization pattern in the developing murine testis[J]. Developmental Dynamics, 2010, 239(11): 3106-3114.
- [14] HADZISELIMOVIC F, HADZISELIMOVIC N O, DEMOUGIN P, et al. EGR4 is a master gene responsible for fertility in cryptorchidism[J]. Sexual Development, 2009, 3(5): 253-263.
- [15] MANSOUR A A, GAFNI O, WEINBERGER L, et al. The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming[J]. Nature, 2012, 488(7411): 409-413.
- [16] BERLETTCH J B, DENG X, NGUYEN D K, et al. Female bias in RhoX6 and 9 regulation by the histone demethylase KDM6A[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(5): e1003489.
- [17] XU K, CHEN X, YANG H, et al. Maternal Sall4 is indispensable for epigenetic maturation of mouse oocytes[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(5): 1798-1807.

- [20] HUANG Z X, LIU L Y, CHEN H, et al. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide on cell activation and apoptosis of hepatocarcinoma cells Huh7 [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(4): 742-746.
- [21] 马传贵, 张志秀, 佟富军. 灵芝对心脑血管保护作用的机制及其研究进展[J]. 医学食疗与健康, 2021, 19(5): 191-192+205.
- [22] 钟千贵, 陈天赐, 邱铭猛, 等. 无柄灵芝提取物中营养成分及体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 321-326.