

网络出版时间:2013-12-25 13:20

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.002

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.002.html

去乙酰化酶 *SIRT1* 基因在猪不同发育阶段卵泡颗粒细胞中的表达规律研究

李碧侠¹, 赵 芳¹, 付言峰¹, 任守文¹, 王金玉²

(1 江苏省农业科学院 畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

[摘 要] **【目的】**分析去乙酰化酶 *SIRT1* 基因在猪不同发育阶段卵泡颗粒细胞中的表达规律, 为进一步了解 *SIRT1* 基因在猪卵泡发育中的调控机制奠定基础。**【方法】**采集猪卵巢, 分离卵泡颗粒细胞, 根据直径将其分为 ≤ 1.5 mm, $>1.5 \sim \leq 3.0$ mm, $>3.0 \sim \leq 5.0$ mm, >5.0 mm 4 个组, 利用免疫组织化学方法分析 *SIRT1* 蛋白在不同发育阶段卵泡颗粒细胞中的表达定位, 利用 qRT-PCR 和 Western blotting 方法分析 *SIRT1* 基因在不同直径卵泡颗粒细胞中 mRNA 和蛋白的表达量。**【结果】***SIRT1* 蛋白在不同发育卵泡颗粒细胞中均有表达, 随着卵泡的发育, *SIRT1* 蛋白表达量逐渐升高, 其在原始卵泡中表达量最低, 在其余卵泡中表达量较高。*SIRT1* mRNA 及其蛋白在不同直径的卵泡中表达趋势一致, 在直径 $>1.5 \sim \leq 3.0$ mm 卵泡中的表达量极显著高于其他直径卵泡 ($P < 0.01$)。**【结论】***SIRT1* 基因在不同卵泡中的表达具有规律性, 与猪卵巢卵泡发育具有潜在的相关性。

[关键词] *SIRT1* 基因; 猪; 卵泡发育

[中图分类号] S828.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)01-0013-05

Expression of deacetylase *SIRT1* in porcine different developmental stages of follicular granulosa cells

LI Bi-xia¹, ZHAO Fang¹, FU Yan-feng¹, REN Shou-wen¹, WANG Jin-yu²

(1 Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China;

2 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: **【Objective】**The present experiment was aimed to analyze regularity of deacetylase *SIRT1* expression in porcine various stages of follicles, to lay the foundation for the study of *SIRT1* gene function in regulation mechanism of the porcine ovarian follicular development. **【Method】**Collecting porcine ovary and separating granulosa cells, granulosa cells were divided into four groups of follicular diameter ≤ 1.5 mm, $>1.5 \sim \leq 3.0$ mm, $>3.0 \sim \leq 5.0$ mm and >5.0 mm. Localization of *SIRT1* protein in different developmental follicular granulosa cells were analyzed by immunohistochemical method, expression levels of *SIRT1* mRNA and protein in different size of follicular granulosa cells were analyzed by qRT-PCR and Western blotting. **【Result】**There had expression of *SIRT1* protein in different developmental follicular granulosa cells. With follicular growth, expression of *SIRT1* protein increased gradually, primordial follicles showed the lowest expression levels, other follicles were the higher expression levels. There had a same expression trend of *SIRT1* mRNA and protein in different diameter follicles, expression levels of *SIRT1* mR-

[收稿日期] 2013-01-25

[基金项目] 江苏省自然科学基金项目(BK2010466); 国家生猪现代产业技术体系南京综合试验站(CARS-36); 江苏省农业种质资源库(BM2011134); 江苏高校省级重点实验室开放研究课题(K12040)

[作者简介] 李碧侠(1979—), 女, 江苏泗阳人, 副研究员, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: bxli790@sina.com

[通信作者] 任守文(1962—), 男, 安徽霍邱人, 研究员, 主要从事猪育种与生产研究。E-mail: renshouwen@yahoo.com.cn

NA and protein in follicular diameter greater than 1.5 mm and less than 3.0 mm ($P < 0.01$). 【Conclusion】 There had a some regularity of expression of deacetylase *SIRT1* in different follicles, and had potential relevance with porcine ovarian follicular development.

Key words: *SIRT1* gene; pig; follicular development

沉默信息调节因子 2 (Silent information regulator 2, SIR2) 是 NAD^+ 依赖的组蛋白去乙酰化酶 (Histone deacetylase, HDAC) 家庭成员之一, 参与了酵母交配型基因、端粒区基因和 rDNA 沉默, 并可抑制 rDNA 的重组, 增加 1 个拷贝的 *SIR2* 基因可延长酵母的寿命, 延缓其衰老^[1-3]。哺乳动物去乙酰化酶 Sirtuins 家族有 7 个成员 (*SIRT1*~*SIRT7*), 其中 *SIRT1* 与 *SIR2* 的同源性最高, 因此受到广泛关注。*SIRT1* 在体内通过对几种控制代谢及内分泌信号的转录因子的去乙酰化作用来调节其活性, 从而广泛参与哺乳动物细胞寿命的不同信号通路、糖代谢及胰岛素分泌等多条代谢通路, 参与众多基因转录、能量代谢及细胞衰老的调节过程^[4-6]。随着对 *SIRT1* 基因生理功能研究的深入, 人们发现 *SIRT1* 基因除了在脂肪代谢、糖代谢、抗氧化等方面发挥作用外, 其还通过对生殖激素受体表达的调控参与动物生殖过程^[7]。*SIRT1* 基因与黄体生成素、雌激素分泌存在密切相关性, 直接或间接参与生殖调控^[8]。

目前, 关于猪 *SIRT1* 基因的研究报道很少, 猪作为一个良好的动物模型, 在研究能量代谢、生殖激素调控等方面有重要作用。卵泡是卵巢最基本的功能单位, 为卵子的发育和成熟提供微环境。卵泡发育是一个以形态变化为特征的不可逆的生长过程, 同时伴随着卵泡功能的分化。因此, 本研究分析 *SIRT1* 基因在猪卵泡发育中的变化规律, 探讨了 *SIRT1* 基因的表达与卵泡发育的相关性, 以期研究 *SIRT1* 基因在猪卵巢卵泡发育、发情排卵中的作用及其生物学特性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验样品

试验猪由江苏省农业科学院六合苏钟猪原种场提供, 采集新鲜健康的猪卵巢, 置于 37℃ 生理盐水 (添加青霉素和链霉素) 中, 2 h 内带回实验室。

1.2 主要仪器与试剂

动物切片石蜡 (熔点 60~62℃) 购自上海标本模型厂, Trizol 试剂盒为 Invitrogen 公司产品, RNase Inhibitor、dNTP Mixture、Buffer、SYBR

Premix Ex Taq™ 为 TaKaRa 公司产品, *SIRT1* 抗体购自 Santa Cruz 公司。主要仪器有: Bio-Rad Iq5 型荧光定量 PCR 仪、SZ-51 连续变倍体视显微镜、Leica 倒置荧光显微镜及 BIO-RAD 电泳凝胶成像系统。

1.3 猪卵泡的分离与分类

将采集的卵巢用 PBS 清洗后, 用眼科剪将卵巢剪开, 再用镊子在体视镜下人工剥离单个卵泡, 根据直径将卵泡分为 ≤ 1.5 mm, $1.5 \sim \leq 3.0$ mm, $3.0 \sim \leq 5.0$ mm, > 5.0 mm 4 个组。

1.4 猪卵泡颗粒细胞 *SIRT1* 蛋白表达的免疫组织化学检测

采集新鲜母猪卵巢, 用 PBS 清洗后放入体积分数 4% 多聚甲醛中固定, 6 h 后修块 1 次, 共固定 24 h, 常规方法制备石蜡切片。取石蜡切片, 用二甲苯脱蜡 3 次, 每次 6 min; 水化、抗原热修复, 用体积分数 3% 甲醇处理 1 h, 以消除内源性过氧化物酶; 加 *SIRT1* 抗体 (稀释倍数 1:150), 室温过夜; 加二抗, 湿盒内 37℃ 反应 1 h; 加 ABC 复合物 (稀释倍数 1:50), 37℃ 作用 30 min; 用 PBS 稀释的体积分数 0.05% DAB + 体积分数 0.01% H_2O_2 显色 2~15 min; 流水冲洗 2 min 后用苏木精复染, 于显微镜下观察, 根据染色情况终止染色。切片重新脱水, 用中性树胶封片, 在显微镜下观察 *SIRT1* 表达情况。棕褐色指示阳性表达, 染色的深浅程度指示蛋白表达的强弱。

1.5 猪卵泡颗粒细胞 *SIRT1* mRNA 表达的 qRT-PCR 检测

根据 GenBank 已公布的猪 *SIRT1* 基因序列 (GenBank 号: EU200984.1) 设计 1 对引物, 其上游引物为: 5'-ATTCTTGTGAAAGTGATGAGGATG-3', 下游引物为: 5'-ATTGTTTCGAGGATCTGTGCC-3', 扩增目的片段长度为 130 bp。同时, 根据 GenBank 已公布的猪管家基因 *GAPDH* 序列 (GenBank 号: NC_010447.3) 设计 1 对引物, 其上游引物为: 5'-TGAAGGTCGGAGTGAACGGAT-3', 下游引物为: 5'-TGGGTGGAATCATACTGGAAC-3', 扩增目的片段长度为 148 bp。引物均由上海生物工程技术有限公司合成。利用 Trizol 法

提取不同直径卵泡颗粒细胞的总 RNA,利用紫外分光光度计检测 RNA 质量和浓度,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定提取 RNA 的完整性。将 RNA 进行反转录,所得的 cDNA 置于-20 ℃保存备用。以合成的 cDNA 为模板,采用荧光定量 PCR 方法检测 *SIRT1* 基因表达量,PCR 反应总体系为 25 μL,包括 SYBR Premix Ex *Taq*TM 12.5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,去离子水 10.5 μL,cDNA 模板 1 μL。试验同时设无模板试剂对照。PCR 反应条件均设置为:94 ℃ 预变性 10 s;然后 94 ℃ 10 s,58 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s,重复 35 个循环。反应结束后,由标准曲线判断目的基因扩增效果与管家基因扩增效果是否一致。

1.6 猪卵泡颗粒细胞 *SIRT1* 蛋白表达的 Western blotting 检测

提取不同直径卵泡颗粒细胞总蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳,每处理设 3 个重复。将电泳后的蛋白转移至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 2 h,加入适宜浓度的一抗,4 ℃ 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次后加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1.5 h,TBST 洗膜 3 次,然后用

化学发光液浸润 PVDF 膜蛋白面,并以 ChemiDoc XRS 曝光系统检测蛋白条带亮度。以 Tubulin 蛋白为内参,用 Quantity One(Bio-Rad,USA)软件分析蛋白条带密度值。各组织的 *SIRT1* 蛋白光密度值除以 Tubulin 蛋白光密度值,即获得 *SIRT1* 蛋白的相对表达量。

1.7 统计分析

每种处理试验均重复 3 次,用 SPSS 13.0 软件进行不同直径卵泡颗粒细胞中 *SIRT1* 表达量的差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 猪不同发育阶段卵泡中 *SIRT1* 蛋白的表达定位

采用免疫组织化学方法分析 *SIRT1* 蛋白在猪不同发育阶段卵泡中的表达定位,结果(图 1)发现,*SIRT1* 蛋白在猪原始卵泡(图 1-A)中表达量较少;而在初级卵泡(图 1-B)、次级卵泡(图 1-C)、三级卵泡(图 1-D)、优势卵泡(图 1-E)中均有较强表达。同时发现 *SIRT1* 蛋白表达主要定位于颗粒细胞和卵母细胞中,膜细胞中 *SIRT1* 蛋白表达量较少。

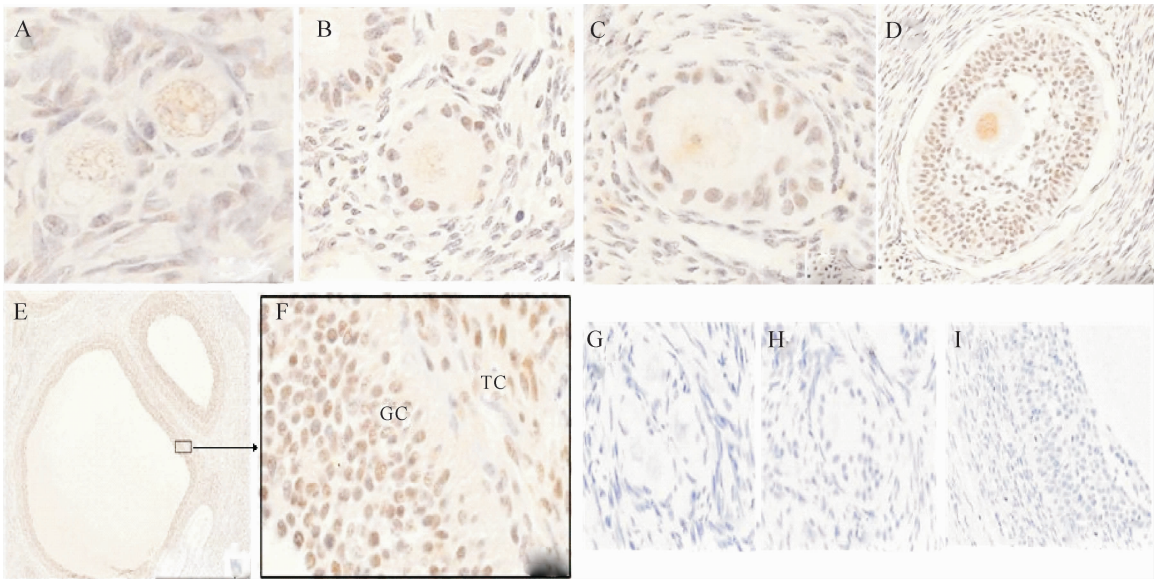


图 1 猪不同发育阶段卵泡中 *SIRT1* 蛋白的表达定位

A. 原始卵泡(×800);B. 初级卵泡(×800);C. 次级卵泡(×800);D. 三级卵泡(×400);E. 优势卵泡(×32);F. E 的局部放大(×800);
G、H. 阴性对照(×400);I. 阴性对照(×320);GC. 颗粒细胞;TC. 膜细胞

Fig. 1 Localization of *SIRT1* protein in follicles at different developmental stages

A. Primordial follicles (×800);B. Primary follicles (×800);C. Secondary follicles (×800);D. Tertiary follicles (×400);E. Dominant follicles (×32);F. Local amplification of E;G、H. Negative control (×400);I. Negative control (×320);GC. Granulosa cells;TC. Theca cells

2.2 猪不同直径卵泡颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 的表达量

利用 qRT-PCR 方法分析不同直径大小卵泡颗

粒细胞中 *SIRT1* mRNA 的表达量,结果如表 1 所示。由表 1 可知,在直径为>1.5~≤3.0 mm 的卵泡颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 表达量最高,直径>

5.0 mm 的卵泡颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 表达量最低;直径 ≤ 1.5 mm 组和 $>1.5\sim\leq 3.0$ mm 组卵泡中 *SIRT1* mRNA 表达量均极显著高于直径 $>3.0\sim\leq 5.0$ mm 和 >5.0 mm 组($P<0.01$),直径 $>3.0\sim\leq 5.0$ mm 与 >5.0 mm 组间差异不显著($P>0.05$)。

表 1 猪不同直径卵泡颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 的相对表达量

Table 1 Relative expression of *SIRT1* mRNA in granulosa cells with different follicular diameters

卵泡直径/mm Follicular diameter	<i>SIRT1</i> mRNA 相对表达量 Relative expression of <i>SIRT1</i> mRNA	卵泡直径/mm Follicular diameter	<i>SIRT1</i> mRNA 相对表达量 Relative expression of <i>SIRT1</i> mRNA
≤ 1.5	1.12 $\pm$ 0.01 bB	$>3.0\sim\leq 5.0$	0.67 $\pm$ 0.01 cC
$>1.5\sim\leq 3.0$	1.24 $\pm$ 0.02 aA	>5.0	0.64 $\pm$ 0.01 cC

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$)。下同。
Note:Different small letters mean significant difference($P<0.05$),different capital letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$). The same below.

2.3 猪不同直径卵泡颗粒细胞中 *SIRT1* 蛋白的表达量

Western blotting 结果(表 2)表明,*SIRT1* 蛋白在猪不同直径卵泡颗粒细胞中均有表达,其中在直径为 $>1.5\sim\leq 3.0$ mm 卵泡中 *SIRT1* 蛋白表达量

极显著高于其他直径的卵泡($P<0.01$),直径 $>3.0\sim\leq 5.0$ mm 与 >5.0 mm 卵泡中 *SIRT1* 蛋白表达量差异未达到显著水平($P>0.05$)。*SIRT1* 蛋白在不同直径大小的卵泡颗粒细胞中表达趋势与 *SIRT1* mRNA 表达趋势一致。

表 2 猪不同直径卵泡颗粒细胞中 *SIRT1* 蛋白的相对表达量

Table 2 Relative expression of *SIRT1* protein in granulosa cells with different follicular diameters

卵泡直径/mm Follicular diameter	<i>SIRT1</i> 蛋白相对表达量 Relative expression of <i>SIRT1</i> protein	卵泡直径/mm Follicular diameter	<i>SIRT1</i> 蛋白相对表达量 Relative expression of <i>SIRT1</i> protein
≤ 1.5	0.55 $\pm$ 0.01 bB	$>3.0\sim\leq 5.0$	0.17 $\pm$ 0.01 cC
$>1.5\sim\leq 3.0$	0.90 $\pm$ 0.01 aA	>5.0	0.15 $\pm$ 0.02 cC

3 讨 论

目前,研究已发现 *SIRT1* 基因参与哺乳动物脂肪代谢、糖代谢、胰岛素分泌等多条信号通路,调节基因转录、能量代谢及细胞衰老^[9-10]。进一步研究发现,人和小鼠的 *SIRT1* 基因与卵巢孕酮、雌激素分泌密切相关。*SIRT1* 基因敲除雄性小鼠与促黄体生成素(LH)、促黄体生成素受体(LHR)、促性腺激素释放激素(GnRH)编码基因突变个体表现出相似的表型^[11]。*SIRT1* 基因敲除雄性小鼠睾丸支持细胞和间质细胞成熟功能缺失,睾丸内睾酮水平下降,表现出雄性不育^[12]。*SIRT1* 基因敲除雌性小鼠卵巢颗粒细胞分泌雌激素水平显著升高^[13]。但猪 *SIRT1* 基因对生殖调控影响的研究尚未见报道。本研究采用免疫组织化学方法分析猪不同发育阶段卵泡中 *SIRT1* 蛋白的表达与定位,结果显示,随着卵泡的发育,*SIRT1* 蛋白表达量逐渐增多,其在原始卵泡中表达最弱,在优势卵泡中表达最强。在人的卵巢组织中,用免疫组织化学方法也发现不同发育卵泡颗粒细胞中均存在 *SIRT1* 蛋白的表达^[14]。在小鼠卵巢颗粒细胞中也存在 *SIRT1* 基因表达,且其表达量可影响颗粒细胞分泌雌激素的能力^[15-16]。

本试验为了进一步分析 *SIRT1* 基因在猪卵泡颗粒细胞中的表达规律,体外根据卵泡直径将其分为 4 组,qRT-PCR 和 Western blotting 结果表明,*SIRT1* 蛋白和 *SIRT1* mRNA 在猪不同直径卵泡颗粒细胞中均有表达,且表达规律一致。随着卵泡直径的变化,*SIRT1* 蛋白和 *SIRT1* mRNA 表达量逐渐增多,在直径 $>1.5\sim\leq 3.0$ mm 卵泡中表达量最高,在直径 >5.0 mm 的优势卵泡中表达量最小。根据研究报道,直径 $>1.5\sim\leq 3.0$ mm 的卵泡多处于腔前卵泡向有腔卵泡的过渡阶段,闭锁率最高^[17],具体的原因还需进一步研究。以上结果说明,*SIRT1* 基因的表达量与卵泡发育存在较大的相关性,可能在卵泡发育过程中起着重要作用。

综上所述,猪 *SIRT1* 基因在不同发育阶段卵泡颗粒细胞中的表达量具有一定的规律性,其表达量与卵泡发育存在相关性,可能参与卵泡的发育调控,但具体调控机制需进一步研究。

[参考文献]

[1] Howitz K T,Bitterman K J,Cohen H Y,et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan [J]. *Nature*,2003,425(6954):191-196.
[2] Ho C,van der Veer E,Akawi O,et al. *SIRT1* markedly extends

- replicative lifespan if the NAD^+ salvage pathway is enhanced [J]. *Febs Lett*, 2009, 583(18): 3081-3085.
- [3] Vaziri H, Dessain S K, Ng Eaton E, et al. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD^2 dependent p53 deacetylase [J]. *Cell*, 2001, 107(2): 149-159.
- [4] Tsutomu S, Tadaihiro K. Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake [J]. *Endocrine Journal*, 2010, 57(11): 939-946.
- [5] Shan T Z, Ren Y, Wu T, et al. Regulatory role of Sirt1 on the gene expression of fatty acid-binding protein 3 in cultured porcine adipocytes [J]. *Cell Biochem*, 2009, 107(5): 984-991.
- [6] Takayama K, Ishida K, Matsushita T, et al. SIRT1 regulation of apoptosis of human chondrocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(9): 2731-2740.
- [7] Yao Y, Li H, Gu Y, et al. Inhibition of SIRT1 deacetylase suppresses estrogen receptor signaling [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(3): 382-387.
- [8] Elangovan S, Ramachandran S, Venkatesan N, et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor α in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(21): 6654-6664.
- [9] Schenk S, McCurdy C E, Philp A, et al. Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(11): 4281-4288.
- [10] Kong X X, Wang R, Liu X J, et al. Function of SIRT1 in physiology [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2009, 74(7): 703-708.
- [11] Ullas K S, Katja T, Dirk G de Rooij, et al. The histone deacetylase SIRT1 controls male fertility in mice through regulation of hypothalamic-pituitary gonadotropin signaling [J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 80(2): 384-391.
- [12] Zhang F P, Tomi P, Zhu F, et al. Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(3): 1453-1463.
- [13] Yao Y, Li H, Gu Y S, et al. Inhibition of SIRT1 deacetylase suppresses estrogen receptor signaling [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(3): 382-387.
- [14] Yoshihiro M, Osamu W H, Tetsu Y, et al. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: An implicative role of SIRT1 in the ovary [J/OL]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012, 10: 14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357324>.
- [15] Eun J Y, Kim S H, Kyu H, et al. Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor α activity and co-activator synergy [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(16): 6932-6943.
- [16] Elangovan S, Ramachandran S, Venkatesan N, et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor α in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(21): 6654-6664.
- [17] Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, et al. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: Regulation of granulosa cell apoptosis during atresia [J]. *Reprod Dev* 2004, 50(5): 493-514.
-
- (上接第 12 页)
- [17] 李传勋, 周琴, 高广猷, 等. 银杏叶黄酮对高血脂大鼠血脂水平的影响 [J]. *大连医科大学学报*, 2011, 23(3): 179-180.
- Li C X, Zhou Q, Gao G Q, et al. The affect of *Ginkgo biloba* flavonoids on high cholesterol lipid levels in rats [J]. *Journal of Dalian Medical University*, 2011, 23(3): 179-180. (in Chinese)
- [18] 苗军, 张馨木, 孙波. 银杏叶提取物对实验性高脂血症血脂代谢的影响及抗氧化作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2006, 26(11): 1544-1545.
- Miao J, Zhang X M, Sun B. The impact of *Ginkgo biloba* extract on experimental hyperlipidemia lipid metabolism and role of antioxidant [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2006, 26(11): 1544-1545. (in Chinese)
- [19] Chisolm G M, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: An overview [J]. *Free Radical Biological Medicine*, 2000, 28(12): 1815-1826.
- [20] Harman D. Free radical theory of aging: Free radicals in biology [M]. New York: Academic Press, 1982: 255-259.
- [21] 黄其春, 郑新添, 陈涛涛, 等. 银杏叶提取物对断奶仔猪血清生化指标和抗氧化功能的影响 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2012, 40(7): 1-6.
- Huang Q C, Zheng X T, Chen T T, et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract on serum biochemical parameters and antioxidant function in weaned piglets [J]. *Journal of Northeast A&F University: Nat Sci Ed*, 2012, 40(7): 1-6. (in Chinese)
- [22] Tsai T Y, Chu L H, Lee C L, et al. Atherosclerosis-preventing activity of lactic acid bacteria-fermented milk-soymilk supplemented with momordica charantia [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57: 2065-2071.