

网络出版时间:2015-01-05 08:59

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.02.005

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150105.0859.005.html

葡萄糖对鹅原代肝细胞增殖的影响

叶凤江,韩春春,刘丹丹,万火福,杨文兰,翁梦珂,苟 丹,龚金祥

(四川农业大学 动物遗传育种研究所,四川 成都 611130)

【摘 要】 【目的】探讨葡萄糖对鹅肝细胞增殖能力的影响。**【方法】**以四川白鹅为供试动物,采用半原位二步胶原酶灌注法采集鹅的肝细胞,之后用含不同浓度(0(对照组,CK),5,20,35 mmol/L)葡萄糖的培养基培养鹅原代肝细胞,培养 48 h 后用 BrdU 免疫荧光染色检测 BrdU 阳性细胞率,BrdU-ELISA 法检测肝细胞 DNA 含量,ELISA 法检测 Cyclin D1 蛋白质量浓度。反转录聚合酶链式反应检测细胞增殖相关基因(*Cyclin D1*、*Cyclin D2* 和 *Cyclin D3*)的 mRNA 表达水平。**【结果】**与对照组比较,20 和 35 mmol/L 葡萄糖可以显著增加 BrdU 阳性细胞率,并可以明显提高原代肝细胞的 DNA 含量;5 和 20 mmol/L 葡萄糖对 Cyclin D1 蛋白质量浓度影响不显著,而 35 mmol/L 葡萄糖对 Cyclin D1 蛋白质量浓度有显著促进作用。*Cyclin D1*、*Cyclin D2* 和 *Cyclin D3* 的 mRNA 表达水平随着葡萄糖浓度的增加而升高,其中 35 mmol/L 葡萄糖的促进作用明显大于其他处理。**【结论】**葡萄糖能够促进鹅原代肝细胞的增殖。

【关键词】 葡萄糖;鹅原代肝细胞;细胞增殖

【中图分类号】 S835;Q78

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)02-0038-06

Effect of glucose on cell proliferation of goose primary hepatocytes

YE Feng-jiang, HAN Chun-chun, LIU Dan-dan, WAN Huo-fu, YANG Wen-lan,
WENG Meng-ke, GOU Dan, GONG jin-xiang

(Institute of Animal breeding & Genetic, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to detect the effect of glucose on the proliferation capability of the goose hepatocytes. **【Method】** Goose primary hepatocytes were isolated from Sichuan White Goose using semi-in situ two-step collagenase perfusion isolation procedure and treated with different glucose solutions (0 (CK), 5, 20, and 35 mmol/L). After 48 h, the rate of BrdU positive cells was measured by BrdU immunofluorescence staining method, the DNA was measured by BrdU-ELISA method, and protein contents of genes involved in cell proliferation were measured by ELISA. Relative mRNA levels of *Cyclin D1*, *Cyclin D2* and *Cyclin D3* were also determined by reverse transcription polymerase chain reaction. **【Result】** Compared with control group, 20 and 35 mmol/L glucose solutions significantly increased the rates of BrdU positive cells and promoted the DNA contents of goose hepatocytes. 5 and 20 mmol/L glucose solutions had no evident effect on protein content of Cyclin D1, while 35 mmol/L glucose significantly increased the protein content of Cyclin D1. Relative mRNA levels of *Cyclin D1*, *Cyclin D2* and *Cyclin D3* increased with the rising of glucose concentration, and the promoting effect at 35 mmol/L glucose was bigger than those of other groups. **【Conclusion】** Glucose could promote the cell proliferation of goose primary hepatocytes.

Key words: glucose; goose primary hepatocytes; cell proliferation

〔收稿日期〕 2013-10-16

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(31101712);高等学校博士学科点专项科研基金项目(201151103120006);四川农业大学本科生物科研兴趣培养计划项目(2013015)

〔作者简介〕 叶凤江(1991—),女,广西桂林人,主要从事特种经济动物养殖研究。E-mail:8744107416@qq.com

〔通信作者〕 韩春春(1980—),女,山东安丘人,副研究员,博士,硕士生导师,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:chunchunhai_510@163.com

葡萄糖可以调控多种动物和细胞模型的细胞增殖,如大鼠、小鼠和啮齿动物的 β 细胞系、大鼠前体脂肪细胞、原代培养神经干细胞及新生大鼠下颌骨成骨细胞等^[1-6]。在小鼠活体试验中,葡萄糖可以诱导 β 细胞增殖^[7-8],但有试验证明葡萄糖能够引起 β 细胞增大,但并没有细胞增殖^[9]。在农业生产中通过对水禽进行填饲碳水化合物能够生产肥肝,这与水禽肝脏具有较强的沉积脂质能力及生长增殖能力有关。然而,对于水禽肝细胞增殖能力的研究还未见报道。本实验室前期研究发现,通过对鹅填饲碳水化合物生产肥肝时细胞周期调控因子 Cyclin D 家族 3 个基因的表达水平升高,表明在肥肝生成过程中细胞增殖被激活。本研究通过检测葡萄糖对鹅原代肝细胞 DNA 合成、BrdU 阳性细胞率、Cyclin D1 蛋白质量浓度及 Cyclin D 家族 3 个基因 mRNA 表达量的影响,探讨葡萄糖对鹅肝细胞增殖能力的影响,为探明碳水化合物在水禽肥肝形成过程中的作用机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 试验用四川白鹅由四川农业大学养禽场提供。

1.1.2 主要试剂与仪器 主要试剂包括Ⅳ型胶原酶、胰酶、青霉素、链霉素双抗(Gibco 公司),胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS, PAA 公司), PBS(Solarbio 公司), Total RNA Kit I 试剂盒(Omega 公司), SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒(Takara 公司);主要仪器有二氧化碳培养箱、荧光定量 PCR 仪、荧光显微镜、酶联免疫检测仪。

1.2 方法

1.2.1 原代肝细胞的分离与培养 采用半原位二步胶原酶灌注法^[10],分离 3 只四川白鹅的肝细胞。将肝细胞接种到 35 mL 培养皿、24 或 96 孔培养板中,静置在 40 ℃、体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱中培养。3 h 后用 PBS 清洗 3 次后更换为体积分数 10% 血清培养基,培养 24 h 后换无血清培养基,再继续培养 24 h 后更换为添加不同浓度(0 (CK), 5, 20, 35 mmol/L)葡萄糖的无血清低糖 DMEM 培养基,培养 48 h 后取样。每处理重复 3 次。

1.2.2 肝细胞的 BrdU 免疫荧光染色 在葡萄糖诱导培养后的肝细胞中加入 BrdU (终质量浓度为 3 μ g/mL), 37 ℃ 培养箱中孵育 2~4 h 后,用体积分

数 2% 多聚甲醛固定 30 min,用 2 mol/L HCl 处理 30 min, 0.1 mol/L 硼酸钠中和,体积分数 5% 血清封闭 1 h,加 BrdU 抗体(稀释倍数 1:100),室温下放置 1 h;之后加入二抗室温孵育 1 h。每张细胞爬片滴加 DAPI 溶液(终质量浓度 1 μ g/mL)孵育 3 min,用 PBS 冲洗 3 次后晾干。显微镜下观察细胞免疫荧光染色结果并记数。BrdU 阳性细胞率=绿色荧光点数/蓝色荧光点数。结果为 3 次相互独立试验的平均值。

1.2.3 肝细胞的 BrdU-双抗体两步夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测 在 96 孔板的肝细胞中加入葡萄糖处理 24 h 后,每孔加入 10 μ L BrdU 标记细胞。弃去上清液后加入固定液(含体积分数 4% 多聚甲醛 PBS),于室温下固定 30 min 使 DNA 变性,洗涤 3 次后加入 BrdU 一抗,洗涤后加入山羊抗小鼠 IgG 过氧化物酶共轭结合物,洗涤后添加 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)过氧化物酶作用底物,之后加入终止反应液终止反应,将 96 孔板放酶标免疫检测仪上用 450 nm 波长检测各孔吸光度(OD₄₅₀)。OD₄₅₀ 值越高,表示样品中 DNA 含量越高。

1.2.4 肝细胞中 Cyclin D1 蛋白质量浓度的测定 采用 ELISA 法检测 Cyclin D1 蛋白的质量浓度,具体按照 Cyclin D1 蛋白酶联免疫分析试剂盒的说明书操作。

1.2.5 肝细胞中 Cyclin D 家族 3 个基因 mRNA 表达水平的反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 采用 Trizol 试剂(Invitrogen, USA)提取肝细胞 RNA,之后用反转录试剂盒 Primer ScriptTM RT system kit (TaKaRa, Japan)将 RNA 逆转录为 cDNA。采用荧光定量 PCR 法对 Cyclin D1、Cyclin D2 和 Cyclin D3 mRNA 表达水平进行定量分析。所用引物见表 1。PCR 反应体系为 25 μ L: SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μ L, 上、下游引物(10 mmol/L)分别 0.5 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, 余下用 ddH₂O 补齐。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 10 min; 95 ℃ 30 s, 62 ℃ 1 min, 共 40 个循环。每个循环后采集荧光生成扩增曲线, 62~92 ℃ 缓慢升温, 产生熔点曲线, 检测引物特异性。所有样本设 3 个重复,并在每次试验时设阴性对照(不加 cDNA 模板,用 ddH₂O 补充)。用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法^[11]计算目标基因的 mRNA 相对表达水平,以内参基因 18S 和 β -actin 进行标准化校正。

表 1 供试的 PCR 引物
Table 1 Sequences of PCR primers

基因 Gene name	GenBank 号 GenBank No	片段长度/bp Length product	引物序列(5'→3') Primer sequence	
<i>βactin</i>	M26111.1	92	上游 Upsream	CAACGAGCGGTTTCAGGTGT
			下游 Downsream	TGGAGTTGAAGGTGGTCTCG
18S	L21170.1	129	上游 Upsream	TTGGTGGAGCGATTTGTC
			下游 Downsream	ATCTCGGGTGGCTGAACG
<i>Cyclin D1</i>	KC424583	158	上游 Upsream	AGGAGCAGAAGTGCGAAGA
			下游 Downsream	TGCGGTCAGAGGAATAGTTT
<i>Cyclin D2</i>	KC424584	80	上游 Upsream	TTCATCGCCCTTTGTGCC
			下游 Downsream	ATTGCTCCACGCTTCCA
<i>Cyclin D3</i>	KC424585	135	上游 Upsream	CTGGTCTCGGTGATAGCG
			下游 Downsream	GACGAAAGTGTAGTCTGTGGC

1.2.6 统计学处理 数据用“平均值±标准差”表示,采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度葡萄糖对鹅原代肝细胞增殖及其 DNA 含量的影响

BrdU-ELISA 免疫荧光染色结果见图 1,图 1 中

绿色为 BrdU 染色细胞,即为增殖细胞;蓝色为 DA-PI 细胞核染色。从图 1 可以看出,随着葡萄糖浓度的增加,染成绿色的 BrdU 阳性细胞增多。在 35 mmol/L 葡萄糖处理组中,染色呈现绿色的细胞数量最多,并且绿色细胞团变大,表明肝细胞增殖较其他 3 组明显。

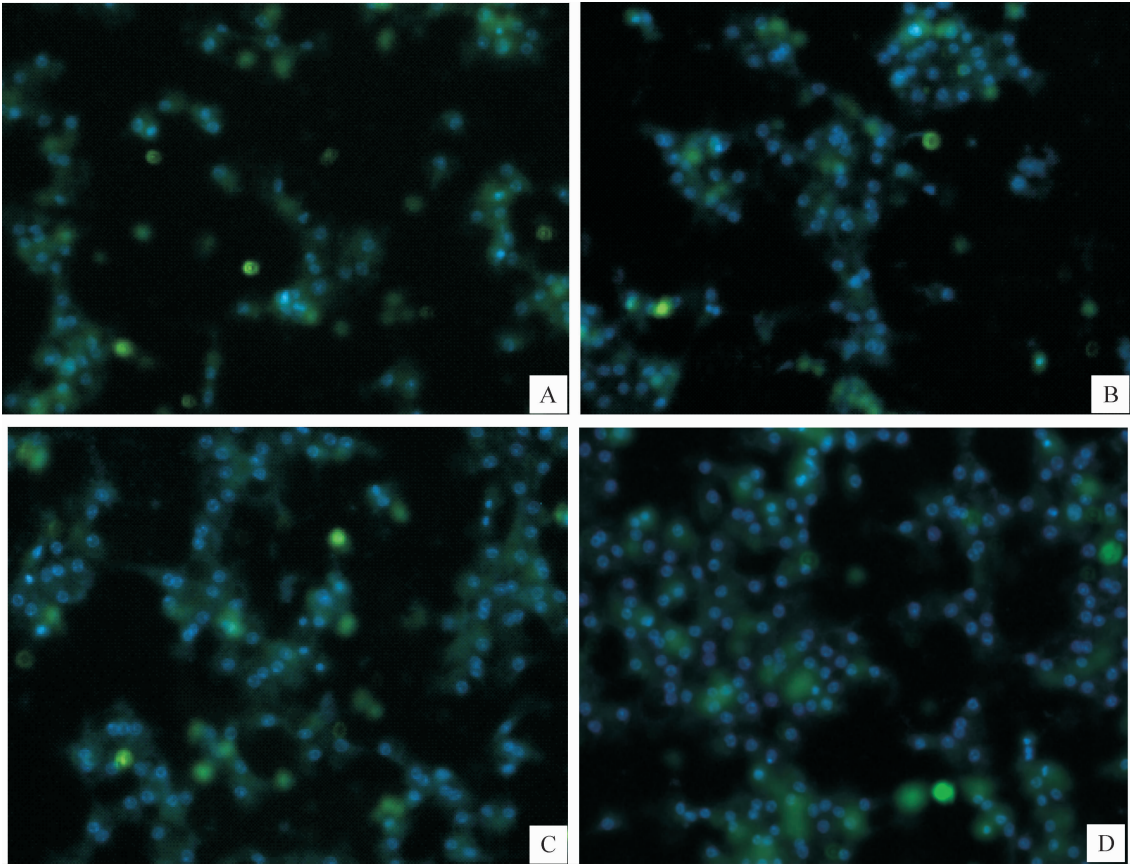


图 1 不同浓度葡萄糖处理后鹅原代肝细胞 BrdU 免疫荧光染色结果(×200)
A、B、C、D 分别表示用 0、5、20 和 35 mmol/L 葡萄糖处理后的肝细胞
Fig. 1 BrdU immunofluorescence cell staining after glucose treatment(×200)
A,B,C,and D indicate glucose treatments with concentrations of 0,5,20 and 35 mmol/L,respectively

从图 2 可以看出,BrdU 阳性细胞率随葡萄糖浓度的升高而增大,与对照组(0 mmol/L 葡萄糖)相比,5 mmol/L 葡萄糖的促进作用不显著,20 和 35 mmol/L 葡萄糖显著促进了鹅原代肝细胞的增殖($P<0.05$),表明葡萄糖能显著促进细胞的增殖。

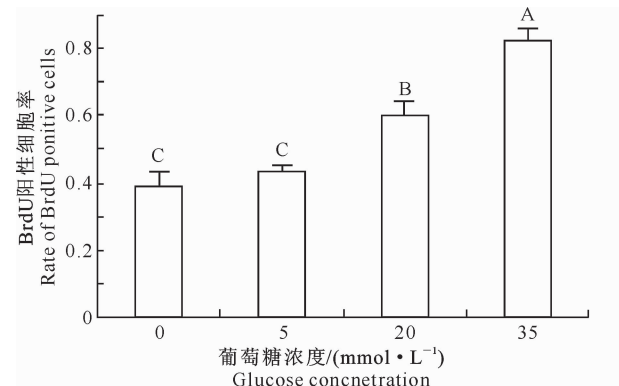


图 2 不同浓度葡萄糖对鹅 BrdU 阳性细胞率的影响
图柱上标不同大写字母者表示处理间差异显著($P<0.05$),下同
Fig. 2 Effect of glucose on rate of BrdU positive cells
Different uppcase letters indicate difference among treatments at $P<0.05$. The same below

2.2 不同浓度葡萄糖对鹅肝细胞中 Cyclin D1 蛋白质量浓度的影响

图 4 显示,与对照组相比,5 和 20 mmol/L 葡萄糖对 Cyclin D1 蛋白质量浓度影响不显著($P>0.05$);当葡萄糖浓度为 35 mmol/L 时,Cyclin D1

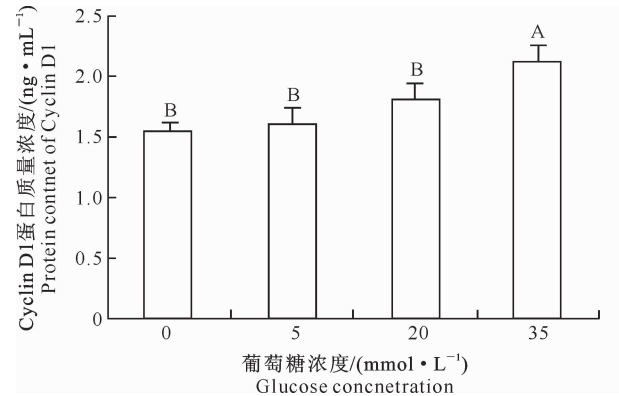


图 4 不同浓度葡萄糖对鹅肝细胞中 Cyclin D1 蛋白质量浓度的影响
Fig. 4 Effect of glucose on protein content of Cyclin D1 in goose hepatocytes

图 5 显示,Cyclin D1、Cyclin D2 和 Cyclin D3 的 mRNA 表达水平都随着葡萄糖浓度的升高而呈上升趋势。与对照组相比,其中 5 mmol/L 葡萄糖对 Cyclin D1、Cyclin D2 和 Cyclin D3 基因的 mRNA 表达水平都无显著影响;与 5 mmol/L 葡萄糖

从图 3 可以看出,与对照组相比,5 和 20 mmol/L 葡萄糖对原代肝细胞中的 DNA 含量没有显著影响,而 35 mmol/L 葡萄糖可以显著促进原代肝细胞中 DNA 含量的升高($P<0.05$)。

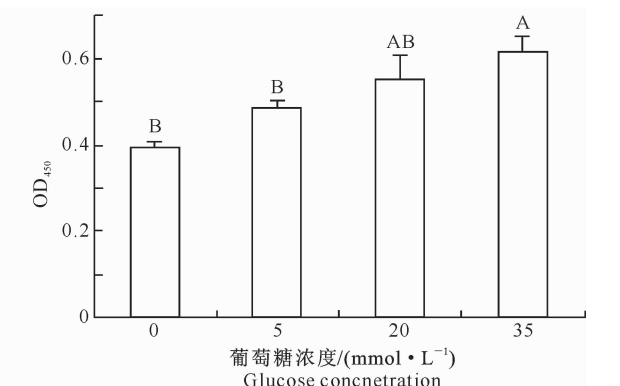


图 3 不同浓度葡萄糖对鹅肝细胞 DNA 含量的影响
Fig. 3 Effect of glucose on DNA content in goose hepatocytes

蛋白的质量浓度显著增加($P<0.05$)。

2.3 不同浓度葡萄糖对 Cyclin D1、Cyclin D2、Cyclin D3 基因表达的影响

不同浓度葡萄糖对 Cyclin D1、Cyclin D2、Cyclin D3 基因表达的影响见图 5。

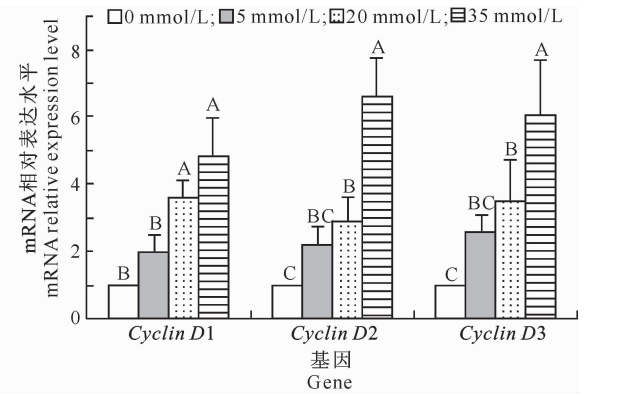


图 5 不同浓度葡萄糖对鹅肝细胞中 Cyclin D1、Cyclin D2 和 Cyclin D3 mRNA 表达水平的影响
Fig. 5 Effect of glucose on mRNA expression levels of Cyclin D1、Cyclin D2 and Cyclin D3 in goose hepatocytes
相比,20 mmol/L 葡萄糖对 Cyclin D1 mRNA 表达水平影响显著,而对 Cyclin D2 和 Cyclin D3 mRNA 表达水平无显著影响($P<0.05$);35 mmol/L 葡萄糖能显著提高 Cyclin D 家族 3 个基因的 mRNA 表达水平($P<0.05$)。

3 讨 论

葡萄糖是动物体主要的能源物质,对细胞的生长和增殖有重要影响。研究表明,高浓度葡萄糖能增加 G_0/G_1 期细胞的百分比,降低 S 期细胞的百分比^[12]。研究显示,低浓度葡萄糖能促进 MG63 细胞和大鼠原代培养前体脂肪细胞的增殖能力,而高浓度葡萄糖能降低 MG63 细胞和大鼠原代培养前体脂肪细胞的增殖能力^[4,13]。Gupta 等^[14] 研究结果显示,高浓度葡萄糖对 MCF-7 细胞影响不显著,但能明显增强 MDA-MB-231 细胞增殖。有研究表明,高浓度葡萄糖能促进肿瘤细胞及血管系膜细胞的增殖^[14-15]。以上研究表明,不同类型细胞对葡萄糖的耐受能力存在差异。本试验结果表明,葡萄糖能显著促进鹅原代肝细胞增殖,低浓度(0 和 5 mmol/L)葡萄糖对肝细胞增殖影响不显著,高浓度(20 和 35 mmol/L)葡萄糖能显著促进肝细胞增殖,说明鹅肝细胞对葡萄糖耐受能力较强。

Cyclin D 家族(Cyclin D1、D2、D3)是重要的细胞周期调控因子。研究表明,葡萄糖可以通过影响 Cyclin D 家族相关因子来调控细胞增殖。在胰腺 β -细胞中,葡萄糖以时间依赖式促进 *Cyclin D1* 基因的表达^[16]。在 MDA-MB-231 细胞中,高浓度葡萄糖可提高 Cyclin D1 蛋白浓度,但在 MCF-7 细胞中高浓度葡萄糖对其没有影响^[14]。对细胞周期蛋白基因的分析证实,在出生后小鼠和胰岛素抗性小鼠中,Cyclin D2 对于 β -细胞增殖非常重要^[17-20]。在内质网核 1 缺失的神经胶质细胞中,葡萄糖匮乏可明显降低 *Cyclin D3* mRNAs 的表达水平^[21]。有研究表明,葡萄糖对 β -细胞 *Cyclin D2* 激活时需要先对钙离子通道进行激活^[22]。有研究认为,敲除碳水化合物反应元件结合蛋白(ChREBP)后降低了小鼠、大鼠和人 β 细胞 *Cyclin D2* 的表达水平^[23]。Cyclin D 家族通过与周期素依赖性蛋白激酶结合来实现其对细胞周期 G_1/S 转化的调控功能,从而实现对细胞增殖的调控^[24]。本试验结果表明,葡萄糖能够提高 Cyclin D1 的质量浓度,并促进 *Cyclin D1*、*Cyclin D2*、*Cyclin D3* 基因的表达。可知葡萄糖能够通过激活细胞周期调控因子 Cyclin D 家族来促进鹅原代肝细胞的增殖。

[参考文献]

[1] Cozar-Castellano I, Harb G, Selk K, et al. Lessons from the first comprehensive molecular characterization of cell cycle control

in rodent insulinoma cell lines [J]. *Diabetes*, 2008, 57: 3056-3068.

- [2] Vasavada R C, Wang L, Fujinaka Y, et al. Protein kinase C-zeta activation markedly enhance β -cell proliferation; An essential role in growth factor mediated β -cell mitogenesis [J]. *Diabetes*, 2007, 56: 2732-2743.
- [3] Assmann A, Ueki K, Winnay J N, et al. Glucose effects on beta-cell growth and survival require activation of insulin receptors and insulin receptor substrate 2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29: 3219-3228.
- [4] 卢建雄, 臧荣鑫, 王树香, 等. 葡萄糖对原代培养大鼠前体脂肪细胞增殖分化的影响 [J]. *西北民族大学学报: 自然科学版*, 2010(1): 53-57.
Lu J X, Zang R X, Wang S X, et al. Effect of glucose on proliferation and differentiation of primary-cultured rat preadipocytes [J]. *Journal of Northwest University for Nationalities: Natural Science*, 2010(1): 53-57. (in Chinese)
- [5] 刘卫平, 王剑博, 姬西团, 等. 葡萄糖浓度对原代培养神经干细胞增殖、分化的影响 [J]. *中华神经医学杂志*, 2007(6): 605-608.
Liu W P, Wang J B, Ji X T, et al. effect of glucose on proliferation and differentiation of primary cultured neural stem cells [J]. *Chinese Journal of Neuromedicine*, 2007(6): 605-608. (in Chinese)
- [6] 鄂玲玲, 刘洪臣, 王东胜. 葡萄糖对新生大鼠下颌骨成骨细胞增殖的影响 [J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2012(6): 321-324.
E L L, Liu H C, Wang D S. Effects of glucose on the proliferation of newborn rat mandibular osteoblasts *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Geriatric Dentistry*, 2012(6): 321-324. (in Chinese)
- [7] Liu Y Q, Han J, Epstein P N, et al. Enhanced rat beta-cell proliferation in 60% pancreatectomized islets by increased glucose metabolic flux through pyruvate carboxylase pathway [J]. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 2005, 88: E471-E478.
- [8] Alonso L C, Yokoe T, Zhang P, et al. Glucose infusion in mice: A new model to induce β -cell replication [J]. *Diabetes*, 2007, 56: 1792-1801.
- [9] Jetton T L, Everill B, Lausier J, et al. Enhanced beta-cell mass without increased proliferation following chronic mild glucose infusion [J]. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 2008, 294: E679-E687.
- [10] Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells [J]. *Methods in Cell Biology*, 1976, 13: 29-83.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [12] Chen J, Guo Y, Cheng W, et al. High glucose induces apoptosis and suppresses proliferation of adult rat neural stem cells following *in vitro* ischemia [J]. *BMC Neurosci*, 2013, 14: 24.
- [13] 曹小俊, 施毕旻. 葡萄糖对成骨样细胞 MG63 增殖及相关基因表达的影响 [J]. *江苏医药*, 2013(3): 253-255.

- Cao X J, Shi B M. Effects of glucose on proliferation and related genes expression of human osteoblast MG63 [J]. Jiangsu Medicine Journal, 2013(3): 253-255. (in Chinese)
- [14] Gupta C, Tikoo K. High glucose and insulin differentially modulates proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells [J]. J Mol Endocrinol, 2013, 51(1): 119-129.
- [15] Yu J, Hu X, Yang Z, et al. Salt-inducible kinase 1 is involved in high glucose-induced mesangial cell proliferation mediated by the ALK5 signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(1): 151-157.
- [16] Cognard E, Dargaville C G, Hay D L, et al. Identification of a pathway by which glucose regulates β -catenin signalling via the cAMP/protein kinase A pathway in β -cell models [J]. Biochem J, 2013, 449: 803-811.
- [17] Georgia S, Bhushan A. β cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal β cell mass [J]. J Clin Invest, 2004, 114: 963-968.
- [18] Kushner J A, Ciemerych M A, Sicinska E, et al. Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic β -cell growth [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25: 3752-3762.
- [19] Kushner J A. β -cell growth: An unusual paradigm of organogenesis that is cyclin D2/Cdk4 dependent [J]. Cell Cycle, 2006, 5: 234-237.
- [20] Georgia S, Hinault C, Kawamori D, et al. Cyclin D2 is essential for the compensatory β -cell hyperplastic response to insulin resistance in rodents [J]. Diabetes, 2010, 59: 987-996.
- [21] Minchenko D M, Hubenya O V, Terletsky B M, et al. Effect of hypoxia, glutamine and glucose deprivation on the expression of cyclin and cyclin-dependent kinase genes in glioma cell line U87 and its subline with suppressed activity of signaling enzyme endoplasmic reticulum-nuclei-1 [J]. The Ukrainian Biochemical Journal, 2011, 83: 5-16.
- [22] Salpeter S J, Klochendler A, Weinberg-Corem N, et al. Glucose regulates cyclin D2 expression in quiescent and replicating pancreatic β -cells through glycolysis and calcium channels [J]. Endocrinology, 2011, 152: 2589-2598.
- [23] Metukuri M R, Zhang P, Basantani M K, et al. ChREBP mediates glucose-stimulated pancreatic β -cell proliferation [J]. Diabetes, 2012, 61(8): 2004-2015.
- [24] Buschges R, Weber R G, Actor B, et al. Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2, and CCND3) in human malignant gliomas [J]. Brain Pathol, 1999, 9(3): 435-443.

(上接第 37 页)

- [10] 王雷, 富丽静, 于翔, 等. 中草药五倍子、诃子有效成分提取工艺的研究 [J]. 水生态学杂志, 2009, 2(1): 135-137.
- Wang L, Fu L J, Yu X, et al. Research of extraction about *Herbs nutgall* and *Myrobalan* of active ingredient [J]. Journal of Hydroecology, 2009, 2(1): 135-137. (in Chinese)
- [11] 刘忠义, 张国威, 何云志. 解脲支原体中药药敏试验 [J]. 中华皮肤科杂志, 1996, 29(5): 349-351.
- Liu Z Y, Zhang G W, He Y Z. Observation of antibacterial of Chinese medicinal herbs against ureaplasma urealyticum *in vitro* [J]. Chinese Journal of Dermatology, 1996, 29(5): 349-351. (in Chinese)
- [12] 舒凌玲, 陈雅, 吴畏, 等. 奥硝唑联用醋酸氯己定对白色念珠菌的体外抗菌活性考察 [J]. 中国药业, 2005, 14(5): 27-28.
- Shu L L, Chen Y, Wu W, et al. The study on antibacterial activity of ornidazole combined with chlorhexidine acetate against *Candida albicans in vitro* [J]. China Pharmaceuticals, 2005, 14(5): 27-28. (in Chinese)
- [13] 周文中, 毕可东, 邹本草, 等. 氟苯尼考与盐酸土霉素体外联合抑菌效果研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 201-202.
- Zhou W Z, Bi K D, Zou B G, et al. Effect research of *in vitro* combination inhibitory florfenicol and oxytetracycline hydrochloride [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 38(7): 201-202. (in Chinese)
- [14] 李菁雯, 陈祥龙, 孟祥智. 虎杖及其提取物的研究进展 [J]. 中医学报, 2011, 39(3): 103-106.
- Li J W, Chen X L, Meng X Z. Advances of *Polygonum cuspidatum* and extract [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2011, 39(3): 103-106. (in Chinese)
- [15] 公衍玲, 王宏波, 赵文英, 等. 虎杖及配伍醇提液不同极性提取物的抑菌活性 [J]. 青岛科技大学学报: 自然科学版, 2008, 29(5): 419-421.
- Gong Y L, Wang H B, Zhao W Y, et al. Antibacterial activities of different polarity extracts in ethonal solutions of *Polygonum cuspidatum* [J]. Journal of Qingdao University of Science and Technology: Natural Science Edition, 2008, 29(5): 419-421. (in Chinese)
- [16] 陈虹, 刘磊, 吴润, 等. 12 种中草药对 8 种畜禽肠道病原菌的体外抑菌试验 [J]. 甘肃农业大学学报, 2009(3): 26-30.
- Chen H, Liu L, Wu R, et al. Bacteriostatic test *in vitro* of the Chinese herbal medicine against livestock and poultry pathogenic enteric bacteria [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2009(3): 26-30. (in Chinese)
- [17] 李安林, 熊双丽. 夏枯草总黄酮的提取与抑菌活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2011, 32(5): 27-29.
- Li A L, Xiong S L. Extraction and bacteriostatic activities of flavonoids from *Prunella vulgaris* Linn [J]. Food Research and Development, 2011, 32(5): 27-29. (in Chinese)