

Nrf2 抗氧化通路在 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤中的保护作用

周清平¹, 蒋孝华¹, 符小波²

(1. 南华大学附一医院感染科, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南耒阳市人民医院神经内科, 湖南 耒阳 421800)

【摘要】 目的 研究 Nrf2 氧化损伤通路在 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤中的保护作用。方法 将 20 只雄性 Wistar 大鼠随机分为溶剂对照组和 CCl₄ 组, 每组 10 只, 另选 10 只雄性 Wistar 大鼠, 通过载体进行转基因大鼠雄原核显微注射, 获得了目的基因 Nrf2-tk 整合与特异表达的转基因大鼠, 作为 CCl₄ + Nrf2 整合组。溶剂对照组静脉给予 1% 聚山梨酯-80, 共 4 d, CCl₄ 组和 Nrf2-tk 整合组静脉给予 1% 聚山梨酯-80, 共 4 d, 第 4 天给予 1% 聚山梨酯-80 30 min 后, 静脉给予 7.5 mg/kg CCl₄, 24 h 后处死大鼠。测定血清中 AST、ALT 和 LDH 的水平, 分别测定肝脏组织中 MDA、GSH、GSSG 的含量, 并计算 GSH/GSSG 比值。留取肝脏组织, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光学显微镜下观察肝脏组织的病理变化。结果 和溶剂对照组相比, CCl₄ 组大鼠的血清 AST、ALT 和 LDH 的水平明显升高 ($P < 0.05$), Nrf2-tk 转基因组大鼠的 AST、ALT 和 LDH 的水平亦有轻度升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。肝脏的 MDA 含量以及 GSH/GSSG 比值显示 Nrf2-tk 整合组可以有效降低 CCl₄ 造成的脂质过氧化损伤和谷胱甘肽的消耗, 肝脏病理观察结果显示和 CCl₄ 组相比, Nrf2-tk 整合组明显减轻了 CCl₄ 造成的损伤。结论 Nrf2 抗氧化损伤通路在 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤中的起着重要的保护作用。

【关键词】 Nrf2; 转基因大鼠; 四氯化碳; 急性肝损伤

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0052-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 03. 011

Effect of Nrf2 signal pathway on acute hepatotoxicity induced by CCl₄ in rat

ZHOU Qing-ping¹, JIANG Xiao-hua¹, FU Xiao-bo²

(1. Department of infectious diseases of the First Affiliated Hospital of University of South China, Hunan Hengyang 421001, China; 2. Department of Internal Medicine of the People's Hospital, Hunan Leiyang 421800, China)

【Abstract】 Objective To determine the effect of Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) on acute hepatotoxicity induced by CCl₄ in male rat. **Methods** 20 male Wistar rats were randomly divided into control group and CCl₄ group, 10 rats in each group, another 10 male Wistar rats were transgenic rats microinjection through the carrier, obtained the Nrf2-tk gene integration and specific transgenic rats, as the CCl₄ + Nrf2 integration group. The groups was given 1% polysorbate 80 for 4 days, Then the CCl₄ and CCl₄ + Nrf2 integration group were intraperitoneally injected with a single dose of CCl₄ 7.5 mg · kg⁻¹ and were killed 24 h after CCl₄ injection. The serum chemical parameters including aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured. Also malonaldehyde (MDA), glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) levels in the liver as well as glutathione (GSH) /oxidized glutathione (GSSG) ratios were detected. Histopathologic changes in the liver were examined. **Results** F1 generation TK transgenic rats in liver and testis and other tissues and organs were not detected the transcription of Nrf2-tk, indicating that Nrf2-tk expression in tissues is specific good. Nrf2 significantly reduced serum AST, ALT and LDH levels in a dose-dependent manner. The results of MDA levels and GSH/GSSG ratios in liver and kidney showed that Nrf2

reduced CCl₄-induced hepatic lipid peroxidation, and ameliorated glutathione depletion. The histopathologic results showed that Nrf2 restrained liver and kidney damage induced by CCl₄. **Conclusion** Nrf2 can effectively protect male rat from acute hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by CCl₄.

【Key words】 Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2); Transgenic rat models; CCl₄; Acute hepatotoxicity induced

核转录因子 Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是机体对抗氧化应激的主要调控因子^[1]。其通过与抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合调控下游抗氧化酶和 II 相解毒酶基因的转录活性, 增强细胞清除活性氧自由基的能力, 从而降低氧化应激对细胞、组织及器官造成损伤^[2]。目前, Nrf2 抗氧化损伤通路在急性肝损伤中的保护作用的研究还较少, 我们拟通过以四氯化碳 (CCl₄) 损伤大鼠为研究对象, 通过血液的生化检查, 肝脏组织的病理形态学分析来研究 Nrf2 抗氧化损伤通路在急性肝损伤中的保护作用。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

山羊抗人 Nrf2 多克隆抗体, 大鼠抗人 Nrf2 单克隆抗体, 大鼠抗人 β actin 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司, Lipofectamine 2000 脂质体, MTT 粉末, 免疫组化 SP 试剂盒, DAB 显色试剂盒均购自北京中杉生物技术公司。pLLtk 真核表达载体、RPMI Medium 1640 培养基、pSV2neo 筛选质粒购于美国 Invitrogen 公司、PTC200 PCR 扩增仪, Westernblot 转印仪, 蛋白电泳仪购自美国 BioRad 公司。另备酶标仪, 漩涡振荡器, 24 孔板, OMEM 培养液, DMSO, 移液枪等。

1.2 大鼠 Palb/Ealb 驱动 Nrf2 载体表达

本研究选择大鼠血清白蛋白基因启动子 (ALB gene promoter, Palb) 与位于 Palb 上游的增强子 (ALB gene enhancer, Ealb) 作为调控元件驱动目的基因 Nrf2 的表达。引进了通过 PCR 获得的含 Kozak 序列的 Nrf2 与不含该序列的 Nrf2 构建载体 pLLtk 与 pLLtk cut, 转染细胞 HepG2 与 HC11, 进一步提高了表达。

1.3 划痕实验检测转染细胞迁移

用 marker 笔在 6 孔板背后均匀划横线, 大约每隔 0.5 ~ 1 cm 一道, 横穿过孔。每孔至少穿过 2 条线。在空中加入约 5×10^5 个细胞, 24 h 后用移液枪头垂直于背后的横线划痕, 用 PBS 洗细胞洗 3 次,

去除划下的细胞, 加入有 Nrf2 基因的无血清培养基, 放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱, 培养, 拍照。使用透射电镜观察、照相。

1.4 Nrf2-tk 转基因大鼠的产生

选取 7 ~ 8 周的 Wistar 大鼠, 雄性, 共 20 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2012 - 0001】。选择重组载体 pLLtk, 经过两步纯化, 并通过雄原核显微注射技术作用于大鼠, 获得了目的基因 Nrf2-tk 整合与特异表达的转基因大鼠, PCR, Western-blot, 定量 PCR 检测转基因的整合。用 Nrf2-tk 抗兔多克隆抗体对转基因大鼠肝脏切片进行免疫组织化学分析^[3]。

1.5 动物分组及给药方案

另选将 20 只 7 ~ 8 周的 Wistar 大鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2012 - 0019】。雄性, 将其随机分为溶剂对照组和 CCl₄ 组, 每组 10 只。将造模成功的 Nrf2-tk 转基因大鼠, 作为 Nrf2-tk 整合组。溶剂对照组静脉给予 1% 聚山梨酯 - 80, 共 4 d, CCl₄ 组和 Nrf2-tk 整合组静脉给予 1% 聚山梨酯 - 80, 4 d, 第 4 天给予 1% 聚山梨酯 - 80 30 min 后, 静脉给予 7.5 mg/kg CCl₄。

1.6 检测指标

经静脉给予 CCl₄ 24 h 后, 将 3 组大鼠内眦静脉取血, 制备血清, 测定血清化学指标 AST、ALT 和 LDH 的水平, 血清化学指标通过 HITACHI 7020 型自动生化分析仪测定。内眦静脉取血后处死大鼠, 取出肝脏称重, 分别切取 50 mg 组织制作组织匀浆, 使用 TBA 法测定肝脏组织中 MDA 含量; 另取 50 mg 组织制作组织匀浆, 使用改良 Hisson 法测定肝脏组织中 GSH、GSSG, 计算 GSH/GSSG 比值。留取肝脏左叶, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光学显微镜下观察肝脏组织的病理变化。

1.7 统计分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 18.0 统计学软件采用单因素方差分析对所得实验数据进行分析, $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

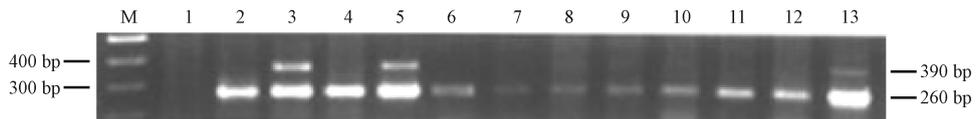
2.1 20 只大鼠通过雄原核显微注射技术成功建立

7 只原代转基因大鼠模型,整合率为 35% (7/20)。定量 PCR 对转基因的拷贝数进行精确定量,可知 7 只建模成功的转基因大鼠其后代均为多拷贝重复,且拷贝数在各家系不相同,但同一家系转基因的拷贝数是相同的。

2.2 Western-blotting 分析

Nrf2-tk 转基因大鼠的整合与多拷贝重复基因的连接方式,结果表明:7 只转基因大鼠外源基因整

合方式以多拷贝头尾串联连接为主。Real-time PCR 分析转基因大鼠 Nrf2-tk 的转录,除肝脏与睾丸外其他组织与器官均没检测到 Nrf2-tk 的转录,说明 Nrf2-tk 的表达具有良好的组织特异性。用 Nrf2-tk 抗兔多克隆抗体对 tk5F1tk455 大鼠肝脏切片进行棉衣组织化学分析,发现 Nrf2-tk 在部分肝实质细胞内表达,表达细胞占总肝细胞的 55% ~ 75% (图 1)。



注:M:100bp ladder,1:空白对照,2:Hep-G2 细胞(未转染),3:Hep-G2 转染 pCMV-tk,4:Hep-G2 转染 pLL-tk,5. Hep-G2 转染 pLL-tk cut, 6. HC-11 细胞(未转染),7. HC-11 转染 pCMV-tk,8. HC-11 转染 pLL-tk,9. HC-11 转染 pLL-tk cut。

图 1 Real-time PCR 分析 Nrf2-tk mRNA 的表达

Note: M:100bp ladder, 1: blank control, 2:Hep-G2 cells (without transfection) and 3:Hep-G2 transfection of pCMV-tk. 4:Hep-G2 transfection of pLL-tk, 5. Hep-G2 transfection of pLL-tk cut, 6. HC-11 cells (without transfection) 7. HC-11 transfection of pCMV-tk. 8. HC-11 transfection of pLL-tk, 9. HC-11 transfection of pLL-tk.

Fig.1 Analysis of the expression of mRNA Nrf2-tk by Real-time PCR

2.3 Real-time PCR 结果显示

阳性对照质粒 pCMV-tk, PLLtk 与 PLLtk cut 转染 Hep-G2 细胞有 390 bp 的 Nrf2-tk DNA 特异性扩增条带,而阴性对照未转染 Hep-G2 细胞和空白对照没有特异性扩增条带。HC-11 细胞经转染后,仅阳性质粒 pCMV-tk 转染细胞出现 390 bp 的 Nrf2-tk DNA 特异性扩增条带。495 bp 的对照组 GAPDH 条带在所有细胞样本均出现,空白对照无。表明质粒

pLLtk 与 pLLtk cut 具有 Nrf2-tk mRNA 组织特异性转录活性。

2.4 3 组大鼠血清生化指标结果

CCl₄组大鼠经静脉给予 CCl₄ 7.5 mg/kg 后,血清中 AST,ALT,LDH 水平升高,与溶剂对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与 CCl₄组比较,Nrf2-tk 转基因组 AST,ALT,LDH 水平明显下降($P < 0.01$)(表 1)。

表 1 3 组大鼠血清生化指标结果($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Biochemical indexes of serum in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST/IU/L	ALT/IU/L	LDH/IU/L
溶剂对照组	10	102 ± 19	38 ± 5.4	251 ± 53
CCl ₄ 组	10	1163 ± 393 a	1748 ± 402 a	3273 ± 1082 a
CCl ₄ + Nrf2 整合组	7	204 ± 104 b	158 ± 104 b	1293 ± 301 b

注:与溶剂对照组比较,a; $P < 0.01$;与 CCl₄ 组比较,b; $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the solvent control group, a; $P < 0.01$; compared with the CCl₄ group, b; $P < 0.01$.

2.5 3 组大鼠肝脏 MDA 和 GSH/GSSG 的比值

与溶剂对照组比较,CCl₄ 组肝脏组织中的 MDA 水平明显升高,GSH/GSSG 比值明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与 CCl₄ 组比较,CCl₄ + Nrf2 转染组肝脏组织 MDA 水平明显下降,肝脏组织 GSH/GSSG 比值明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。

表 2 3 组大鼠肝脏 MDA 和 GSH/GSSG 的比值

Tab.2 The ratio of MDA and GSH/GSSG in liver of 3 groups

组别	n	MDA/ μmol/g	GSH/GSSH
溶剂对照组	10	0.26 ± 0.12	5.74 ± 0.62
CCl ₄ 组	10	0.72 ± 0.27 a	3.83 ± 0.83
CCl ₄ + Nrf2 转染组	7	0.47 ± 0.12 c	5.47 ± 0.74 d

注:与溶剂对照组比较,a; $P < 0.05$,b; $P < 0.01$,与 CCl₄ 组比较,c; $P < 0.05$,d; $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the solvent control group, a; $P < 0.01$; compared with the CCl₄ group, b; $P < 0.01$.

2.6 3 组大鼠肝脏大体检查

肉眼观察可见溶剂对照组大鼠肝脏湿润有光泽,呈红褐色。CCl₄ 组大鼠肝脏失去光泽,颜色灰暗。CCl₄ + Nrf2 转染组大鼠肝脏病变明显减轻,颜色趋于良好。

2.7 组织学观察

溶剂对照组大鼠,肝小叶轮廓清晰,肝组织以中央静脉为中心呈条索状向四周放射状排列,肝细

胞排列整齐,肝细胞未见变性、坏死及脂肪变性(图 1A)。CCl₄ 组可观察到肝组织损伤,肝细胞浊肿、气球样变性,以肝小叶中央静脉为中心的坏死,肝小叶内可见灶性坏死区,可见多量的凋亡细胞(图 1B, D, 图 2A-C)。与 CCl₄ 组比较,CCl₄ + Nrf2 整合组肝脏细胞结构破坏程度较轻,变性坏死细胞较少,整体情况优于 CCl₄ 组(图 1C)。

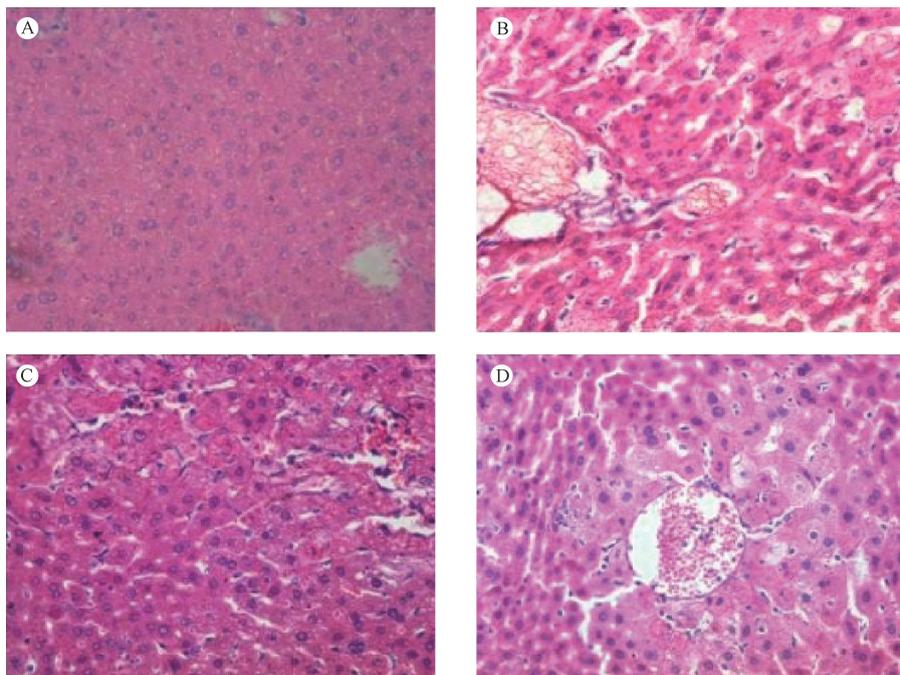


图 2 3 组大鼠肝组织病理切片(HE × 40)

Fig. 2 Pathological sections of rat liver tissue in 3 groups(HE × 40)

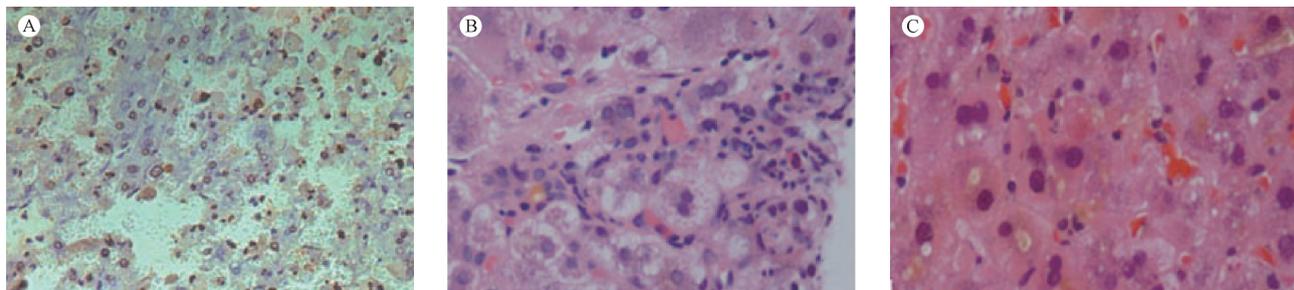


图 3 CCl₄ 组大鼠肝组织病理切片:点状或病灶性坏死,炎性细胞浸润,有凋亡细胞存在,肝细胞增生。(HE × 40)

Fig. 3 Rat liver tissue pathology in CCl₄ group: Point or focal necrosis, inflammatory cell infiltration, cell apoptosis and proliferation liver cell proliferation. (HE × 40)

3 讨论

肝脏疾病作为人类最常见的疾病之一,对人类健康和社会造成严峻威胁。肝脏损伤是各种肝脏疾病的病变结果,其防治是现代医学的重大课题^[4]。因此通过建立肝损伤动物模型,研究肝病的

发生发展的机制,探索肝损伤的治疗方向,具有重要的临床意义^[5-6]。近年来,转基因动物技术在人类肝脏疾病模型建立中发挥了重要的作用。通过转基因技术,可以选择性的杀死动物体的某些特定类型的细胞,从而模仿某种疾病^[7-8]。基于以上研究,本研究拟通过载体将基因 Nrf2 整合入大鼠模

型,制作出特异表达的转基因大鼠,并进一步通过注射 CCl₄ 诱导 Nrf2-tk 转基因大鼠的肝脏损伤,进而明确 Nrf2 氧化损伤通路在 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤中的保护作用。

Nrf2/ARE 是近年新发现的机体抵抗内外氧化和化学等刺激的防御性转导通路^[9-10]。氧化应激作用下, Nrf2 可启动 ARE 调控的 II 相解毒酶及抗氧化酶的表达,如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、血红素氧合酶-1(HO-1)等,从而增加细胞对氧化应激的抗性,为肝脏疾病的发生发展起到积极的防护作用^[9-10]。研究发现,在 Nrf2 敲除的大鼠中,正常情况和诱导情况下的 II 相酶水平如 GST、NQO1、γ-GCS 显著减少。

在本研究中,我们通过雄原核显微注射技术成功建立了原代 Nrf2 转基因大鼠模型^[11-12],随后我们采用 RT-PCR 分析转基因大鼠 Nrf2-tk 的转录,除肝脏与睾丸外其他组织与器官均没检测到 Nrf2-tk 的转录,说明 Nrf2-tk 的表达具有良好的组织特异性。用 Nrf2-tk 抗兔多克隆抗体对 tk5F1tk455 大鼠肝脏切片进行棉衣组织化学分析,发现 Nrf2-tk 在部分肝实质细胞内表达,表达细胞占总肝细胞的 55%~75%,证明 Nrf2 转基因大鼠模型建立良好。

CCl₄ 是经典的肝毒物,其病变主要引起中央静脉周围肝细胞坏死,纤维增生为窦隙为主^[13-14]。本研究中,CCl₄ 组大鼠给予 CCl₄ 24 h 后,其体重下降,肝体比、肾体比增加,血清中 AST、ALT 和 LDH 水平显著上升,肝脏组织病理学改变明显,表明 CCl₄ 对大鼠造成了急性的肝脏损伤。与 CCl₄ 组比较,CCl₄ + Nrf2 整合组 AST、ALT 和 LDH 水平较低,差异有统计学意义。在 CCl₄ + Nrf2 整合组大鼠肝脏的病理学观察中,细胞结构明显优于 CCl₄ 组,细胞坏死减少,组织结构清晰。表明 Nrf2 转基因大鼠可以有效地减弱 CCl₄ 对肝脏造成的损伤。

MDA 是组织中不饱和脂肪酸氧化的最终产物,GSH/GSSG 比值反映了组织抵御氧化性损伤的水平,两者是常用的抗氧化指标^[15-16]。在本研究中,给予 CCl₄ 24 h 后,大鼠肝脏组织中 MDA 水平明显升高,GSH/GSSG 比值明显降低都说明了 CCl₄ 对大鼠的肝脏产生了氧化性损伤。而 CCl₄ + Nrf2 整合组大鼠肝脏组织中 MDA 水平与 CCl₄ 组比较,明显降低;GSH/GSSG 比值与 CCl₄ 组比较,明显升高。提示 Nrf2 可诱导体内 GSH 的合成,进而抑制 CCl₄ 对肝脏造成的损伤^[17]。

经 CCl₄ 处理后,对 3 组大鼠肝脏组织进行病理形态学分析组织学观察,可见 CCl₄ 组可观察到肝组织损伤,肝细胞浊肿、气球样变性,以肝小叶中央静脉为中心的坏死,肝小叶内可见灶性坏死区,可见多量的凋亡细胞。与 CCl₄ 组比较,CCl₄ + Nrf2 整合组肝脏细胞结构破坏程度较轻,变性坏死细胞较少,整体情况优于 CCl₄ 组。以上结果表明 Nrf2-tk 转基因大鼠可有效减轻生理功能与形态学改变的肝脏损伤。

综上所述,根据本研究得到的结果,可以推测 Nrf2/ARE 抗氧化通路可通过调动机体的抗氧化体系来抑制 CCl₄ 对大鼠的肝脏产生的损伤,但对于 Nrf2/ARE 通路是否还存在其他的途径来发挥对肝脏的保护作用仍需要进一步探索。本研究成果为探讨肝病的发病机制提供了科学数据,为肝脏疾病诊断和治疗的研究奠定了基础^[18-19]。

参考文献:

- [1] Jarup L. Cadmium overload and toxicity [J]. *Nephrol Dial Transplant*,2002,17(2):35-39.
- [2] Siu ER, Mruk DD, Porto CS, *et al.* Cadmium-induced testicular injury [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2009,238(3):240-249.
- [3] Uchida H, Kurata Y, Hiratsuka H, *et al.* The effects of a vitamin D-deficient diet on chronic cadmium exposure in rats [J]. *Toxicol Pathol*,2010,38(5):730-737.
- [4] 赵世峰,薛毅琰,李新建. 醋酐酚诱导急性肝损害模型的建立 [J]. *中华实验外科杂志*,2000,17(2):192-197.
- [5] 赖力英,杨旭,许向青,等. 四氯化碳诱导大鼠急性肝功能衰竭动物模型的建立 [J]. *中国现代医学杂志*,2005,15(11):1655-1660.
- [6] 黄正明,杨新波,曹文斌,等. 化学性以及免疫性肝损伤模型的方法学研究 [J]. *解放军药学报*,2005,21(1):42.
- [7] 禄保平,杨晓娜,许家燕. 应用四环素灌胃建立急性肝损伤模型 [J]. *南京医科大学学报*,2008,26(8):671-677.
- [8] 禄保平,杨晓娜,许家艳. 异烟肼灌胃建立大鼠急性肝损伤模型的研究 [J]. *中国医药生物技术*,2007,2(4):286-291.
- [9] SRIRAJ P, BOONMARS T, BOONJARASPINO S, *et al.* Effect of curcumin on pathogenesis of hamster-opisthorchiasis through apoptosis-related gene expression [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*,2009,40(6):1208-1215.
- [10] KHOR TO, YU S, BARVE A, *et al.* Dietary feeding of dibenzoyl-methane inhibits prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model [J]. *Cancer Res*,2009,69(17):7096-7102.
- [11] Li CH, Piao DM, Xu W X, *et al.* Morphological and serum hyaluronic acid, laminin and type IV collagen in dimethylnitrosamine,2005,11(48):7620-7625.
- [12] THIMMULAPPA RK, RANGASAMY T, ALAM J, *et al.*

Dibenzoyl-methane activates Nrf2-dependent detoxification pathway and inhibits benzo(a)pyrene induced DNA adducts in lungs[J]. *Med Chem*,2008,4(5): 473-481.

[13] CHEUNG KL, KHOR TO, HUANG MT, *et al.* Differential in vivo mechanism of chemoprevention of tumor formation in azoxymethane/dextran sodium sulfate rat by PEITC and DBM [J]. *Carcinogenesis*,2010,31(5): 880-885.

[14] Horn T L, Bhattacharjee A, Schook L B. Altered Hepatic mRNA expression of apoptotic genes during Dimethylnitrosamine Exposure [J]. *Toxicological Sciences*,2010,57(2):240-245.

[15] Dojka M, Nimmo M. Marginal zinc deficiency increased the susceptibility to acute lipopolysaccharide injury in rats [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*,2009, 231:553-559.

[16] Song Z Y, Deaciuc I, Song M, *et al.* Silymarin protects against acute ethanol d hepatotoxicity in rat[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010,30:407-413.

[17] Horn T L, Bhattacharjee A, Schook L B. Altered Hepatic mRNA expression of apoptotic genes during Dimethylnitrosamine Exposure [J]. *Toxicological Sciences*,2010,57(2):240-245.

[18] 庞战军,周玫,陈瑗. 自由基医学研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社,2000: 62-64.

[19] 程明亮,杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:366-368.

[修回日期]2016-01-12

中国实验动物学会 2016 年部分活动计划

活动名称	时间	地点
第三届中英实验动物福利伦理国际论坛	2016. 3. 15 - 2016. 3. 17	安徽巢湖
实验动物生物安全培训	2016. 4	湖北武汉
第 63 届日本实验动物学会年会	2016. 5. 17 - 2016. 5. 21	日本
第 13 届欧洲实验动物学会联合会	2016. 6. 12 - 2016. 6. 18	比利时
实验动物专业技术人员等级认可培训	2016. 7 - 2016. 9	网络或待定
第十二届中国实验动物学会年会	2016. 9	广西
实验动物福利伦理培训	2016. 9	广西
实验动物标准宣贯培训	2016. 10	北京
第七届亚洲实验动物学会联合会	2016. 11. 5 - 2016. 11. 9	新加坡

以上各项活动具体安排以正式通知为准, 详情请关注学会网站, 即日起接收报名, 欢迎来电咨询。

中国实验动物学会 秘书处

学会网址: <http://www.calas.org.cn/>

咨询电话: 01067781534 67763674