

血管紧张素-(1-7)对野百合碱诱导的肺动脉高压及右心室重构的影响

陈丽星¹⁾, 孙金华²⁾, 胡 钊¹⁾, 肖践明¹⁾, 郭 涛¹⁾, 赵 玲¹⁾, 韩明华¹⁾,
(1) 昆明医科大学第一附属医院心内科, 云南昆明 650032; 2) 云南省妇幼保健院内科, 云南昆明 650051)

[摘要] **目的** 探讨血管紧张素-(1-7) [Ang-(1-7)]对野百合碱(MCT)诱导的肺动脉高压及右心室重构的影响. **方法** 雄性SD大鼠30只, 随机分为:正常对照组、MCT组、Ang-(1-7)组. MCT组和Ang-(1-7)组一次性颈部注射MCT 60 mg/kg, 24 h后经微泵持续泵入生理盐水或Ang-(1-7) 24 μ g/(kg·h). 对照组一次性颈部注射相同体积的生理盐水, 24 h后泵入生理盐水. 经微泵泵入生理盐水或Ang-(1-7) 4周后, 通过彩色多普勒检测右心室游离壁厚度(RVFWT)、肺动脉加速时间(PAAT)和有无三尖瓣反流. 监测大鼠血流动力学指标: 右室收缩压(RVSP)、平均动脉压(MAP)和心率(HR). 计算大鼠右心室肥厚指数(RVHI)和右心室体重指数(RVMI)的变化. 通过HE染色观察肺动脉和右心室的病理变化, 测定肺小动脉管壁厚度(WT)占动脉外径(ED)的百分比(WT%)及管壁面积(WA)占血管总面积的百分比(WA%). **结果** 野百合碱诱导4周后, MCT组与对照组相比, RVSP、RVHI、RVMI、WT%、WA%和RVFWT显著升高, PAAT显著降低, 部分大鼠出现三尖瓣反流. Ang-(1-7)组上述指标与对照组相比无明显的差异, 未出现三尖瓣反流. 病理切片显示: MCT组出现大鼠右室心肌梗大, 心肌纤维化. Ang-(1-7)组心肌无明显病理改变. **结论** MCT诱导的肺动脉高压模型中, 早期给予Ang-(1-7)进行干预, 能够逆转大鼠肺动脉压的升高和右心室重构.

[关键词] 血管紧张素-(1-7); 野百合碱; 肺动脉高压; 重构

[中图分类号] R543.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2013)01-0047-06

Effects of Ang-(1-7) on Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Remodeling in Monocrotaline-Treated Rats

CHEN Li-xing¹⁾, SUN Jin-hua²⁾, HU Zhao¹⁾, XIAO Jian-ming¹⁾, GUO Tao¹⁾, ZHAO Lin¹⁾,
HAN Ming-hua¹⁾

(1) The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) Dept. of Medicine, The Maternal and Child Health Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650051, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effects of Ang-(1-7) on pulmonary hypertension and right ventricular remodeling in monocrotaline-treated rats. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups: control group, MCT group and Ang-(1-7) group. Rats in MCT group and Ang-(1-7) group received 60mg/kg MCT injection subcutaneously and after 24 hours received either saline or 24 μ g/kg/h of Ang-(1-7) injection via osmotic minipumps for four weeks. The rats in control group were firstly injected saline subcutaneously and then received saline injection via osmotic minipumps for four weeks. Right ventricular free wall thickness (RVFWT), pulmonary arterial acceleration time (PAAT) and tricuspid regurgitation were measured by echocardiography. Right ventricular systolic pressure (RVSP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were measured. The animals' hearts were measured to calculate the ratio of right ventricle to left ventricle plus septum (RVHI=RV/LV+S) and right ventricle mass to body weight (RVMI=RV/BW). Histopathological changes

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2010Y173)

[作者简介] 陈丽星(1977~), 女, 云南宣威市人, 医学博士, 讲师, 主要从事肺动脉高压的研究工作.

[通讯作者] 肖践明. E-mail:cheng_lx@sina.com

of lung and right ventricle were observed by hematoxylin and eosin staining. Percentage of wall thickness (WT%) and percentage of wall area (WA%) of pulmonary arterioles were evaluated. **Results** Four weeks after monocrotaline injection, compared with control group, RVSP, RVHI, RVMI, WT%, WA % and RVFWT were significantly increased in MCT group, PAAT were significantly decreased in MCT group. Some rats occurred tricuspid regurgitation and right ventricle occurred cardiomyocyte hypertrophy in MCT group. However, no significant difference was found between Ang- (1-7) group and control group among the above parameters. **Conclusion** Ang- (1-7) may inhibit pulmonary arterial hypertension and right ventricular remodeling in monocrotaline-treated rats.

[**Key words**] Ang- (1-7); Monocrotaline; Pulmonary arterial hypertension; Remodeling

肺动脉高压是由一组异源性疾病引起的肺血管阻力持续升高和肺循环高压为特征的病理生理综合征, 随着病情进展逐渐出现右心衰竭, 甚至死亡。目前的治疗方法如前列环素类似物、内皮素受体拮抗剂、5-磷酸二酯酶抑制剂, 虽然改善了部分患者的症状、活动能力及生存率, 但远期的生存率依然很低, 肺动脉高压的治疗目前仍然是临床上的难点^[1,2]。动物实验证明肺动脉高压有 RAS 系统的激活和肺组织 Ang II 活性增高^[3]。Ang- (1-7) 是 RAS 系统的新成员, 是 Ang II 的内源性拮抗剂^[4,5]。因此笔者推测 Ang- (1-7) 在肺循环中能够发挥保护作用。本研究旨在通过野百合碱诱导的肺动脉高压模型, 研究 Ang- (1-7) 对肺动脉压力及右心室重构有何影响, 为肺动脉高压的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

动物本实验室所用 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 (SPF 级) 30 只, 质量 280 ~ 320 g, 由中山大学实验动物中心提供 (动物合格证号 NO. 20080323), 饲养在中山大学实验动物中心 (SPF 级), 恒温 (22 ± 2) °C, 恒湿 (55 ± 5) %, 人工光照明暗各 12 h。

1.2 实验试剂及主要仪器

野百合碱 (monocrotaline, MCT) (Sigma 公司, 美国), Ang- (1-7) (Bachem 公司, 美国), 2 ML 型微泵 (Alzet 公司, 美国), PE-50 聚氯乙烯导管 (中山大学辅助循环实验室), BL-420S 生理多导记录仪 (四川成都泰盟公司)。VIVID 7 彩色多普勒超声仪 (美国 GE 公司)。

1.3 实验动物分组及肺动脉高压模型的建立

雄性 SD 大鼠 30 只, 质量 280 ~ 320 g, 随机均分为 3 组: 对照组、MCT 组、Ang- (1-7) 组。先把 MCT 溶于适量 1 N 盐酸中, 然后以 0.1 N 氢氧化钠调节 pH 至 7.3, 最后用生理盐水配置成终浓

度为 20 mg/mL 的溶液^[6]。MCT 组和 Ang- (1-7) 组一次性颈部皮下注射 MCT 60 mg/kg 24 h 后, Ang- (1-7) 组大鼠经微泵泵入 Ang- (1-7), 剂量为 24 μg/(kg·h)^[7,8], MCT 组经微泵给予同等剂量的生理盐水。对照组给予 1 mL 生理盐水颈部皮下注射, 经微泵给予同等剂量的生理盐水。3 组大鼠泵入 Ang- (1-7) 或生理盐水 4 周后观察以下指标。

1.4 大鼠的一般状况

观察大鼠进食, 活动是否自如, 皮毛是否光泽, 呼吸是否急促, 口唇是否发绀等, 测量大鼠体重, 记录实验结束时各组大鼠死亡的数目, 并进行解剖尸体, 分析死亡原因。

1.5 彩色多普勒成像技术评价

通过 VIVID7 彩色超声多普勒成像仪, i13 探头。彩色多普勒血流显像检测三尖瓣返流, M 型超声于肺动脉瓣下大动脉短轴观测测量右心室游离壁厚度 (RVFWT), 脉冲多普勒检测肺动脉血流频谱, 测量肺动脉加速时间 (PAAT)。

1.6 血流动力学监测

将 PE-50 管预充肝素生理盐水后接三通管再经压力换能器和生物信号采集处理器相连, 压力校准备用。(1) 右室收缩压 (RVSP) 测定: 参考孙波方法稍加改进^[9]。基本操作如下: 大鼠称重后, 用 10% 的水合氯醛按 3 mL/kg 浓度腹腔内注射将动物麻醉, 仰卧位固定, 作颈正中偏右切口, 暴露右颈外静脉, 在其下面穿入两根手术丝线备用, 用其中的一根丝线结扎远心端后, 以眼科剪于近心端丝线结扎处向近端剪开血管, 将 PE-50 管插入血管中, 根据压力曲线波形变化判断导管位置。当 PE-50 管到达右心室后, 记录右心室收缩压, 以此来反映肺动脉收缩压; (2) 暴露左侧颈总动脉后结扎远心端, 插入 PE-50 管监测平均动脉压 (MAP) 及心率 (HR)。

1.7 右心室肥厚指数 (RVHI)、右心室质量指数 (RVMI) 的测定

处死动物后取出心脏, 洗去血液, 用滤纸吸去表面水分, 沿房室沟剪去左、右心房及大血管根部, 沿室间隔将心室剪为右心室游离壁和左心室加室间隔两部分. 计算两者质量的比值, 并计算右心室肥厚指数 (RVHI):

$$RVHI = \frac{\text{右心室游离壁 (RV)}}{\text{左心室 + 室间隔 (LV+S)}} \times 100$$

$$\text{右心室质量指数 (RVMI)} = \frac{RV}{BW (\text{体重})}$$

1.8 组织标本的制备及指标的观察

处死动物, 将右下肺浸入 10% 的福尔马林固定, 常规石蜡切片, HE 染色, 随机选管径在 50 ~ 100 μm 肺小动脉各 10 根, 运用 Imagepro Plus 图像分析软件测定管壁厚度 (wall thickness, WT) 及管径 (external diameter, ED), 并计算肺小动脉管壁厚度占管径的百分比 WT%:

$$WT \% = \frac{2 \cdot WT}{ED \cdot 100} \text{ 及管壁面积 (wall area, WA)}$$

占血管总面积的百分比 WA%:

$$WA \% = \frac{TA - LA}{TA \cdot 100}$$

取出右心室, 将心肌制成 4 μm 厚的连续冰冻切片标本, 进行 HE 染色, 用普通显微镜观察心肌的病理改变.

1.9 统计学处理

应用 SPSS 软件包对数据进行统计分析, 血流动力学资料及图象分析结果进行方差分析和两两比较的 q 检验, 各指标用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示.

2 结果

2.1 各组动物的一般情况

MCT 注射第 2 周, MCT 组大鼠开始出现食欲下降, 体重降低, 毛色灰暗、呼吸急促、四肢和口唇发绀、部分大鼠出现鼻出血. Ang- (1-7) 组动物活动基本自如, 毛发较光泽, 口唇无明显发绀, 呼吸基本平稳, 体重与正常对照组动物无明显变化. 实验结束前, 正常对照组和 Ang- (1-7) 组无动物死亡, MCT 组大鼠死亡 2 只, 尸解时发现胸腔积液及腹腔积液, 肺组织大体标本见肺部瘀点及瘀斑, 横切心脏见右室游离壁明显肥厚, 考虑死亡与右心衰有关.

2.2 血流动力学指标的变化

与对照组相比, MCT 诱导 4 周后, MCT 组的右室收缩压 (RVSP) 明显升高 ($P < 0.05$). Ang- (1-7) 组 RVSP 均明显低于与 MCT 组 ($P < 0.05$). 3 组大鼠平均动脉压 (MAP) 及心率 (HR) 均无明显差异 (见表 1).

表 1 各组大鼠的血流动力学比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Hemodynamic indexes of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RVSP (mmHg)	HR (次/min)	MAP (mmHg)
对照组	10	17.68 \pm 1.80	420.44 \pm 18.68	110.28 \pm 21.66
MCT 组	10	33.06 \pm 1.79*	440.84 \pm 26.18	123.58 \pm 19.32
Ang- (1-7) 组	10	20.19 \pm 2.22 $^{\Delta}$	428.24 \pm 22.92	102.86 \pm 20.42

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 MCT 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$.

2.3 彩色多普勒技术评价结果

与对照组相比, MCT 组右心室游离壁厚度 (RVFWT) 明显升高 ($P < 0.05$), Ang- (1-7) 组 RVFWT 明显低于 MCT 组 ($P < 0.05$). 与对照组相比, MCT 组肺动脉加速时间 (PAAT) 显著降低, Ang- (1-7) 组 PAAT 明显高于 MCT 组 (见表 2). MCT 组中有 7 只大鼠出现三尖瓣反流, 正常对照组和 Ang- (1-7) 组大鼠未见三尖瓣反流.

2.4 右心室肥厚指数 (RVHI) 和右心室质量指数 (RVMI) 的变化

与对照组相比, MCT 组大鼠 RVHI 和 RVMI 明显增加 ($P < 0.05$), 说明出现右心室肥大. Ang-

(1-7) 干预后可明显抑制右心室肥厚 ($P < 0.05$) (见表 3).

2.5 肺动脉血管图像分析结果

与对照组相比, 野百合碱诱导 4 周后, MCT 组肺动脉管壁厚度占管径的百分比 (WT%) 和肺动脉管壁面积占血管总面积的百分比 (WA%) 明显升高 ($P < 0.05$), 而 Ang- (1-7) 组与对照组相比 WT% 和 WA% 无显著差异 (见表 4).

2.6 右心室病理形态结构的影响

与正常对照组相比, MCT 组大鼠右心室的心肌细胞排列紊乱, 心肌细胞肥大, 心胞浆肿胀, 部分心肌细胞胞核宽大畸形, 心肌细胞间质增加, 出

现炎细胞浸润, 但未见明显的坏死病灶; 与 MCT 组相比, Ang- (1-7) 组大鼠的心肌细胞排列基本无紊乱, 胞浆无明显肿胀, 胞核无明显宽大畸形, 心肌细胞无明显纤维化增生, 未见炎细胞浸润。

表 2 各组大鼠的右心室游离壁厚度和肺动脉加速时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 RVFWT and PAAT of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	RVFWT ($\times 10^{-1}$ mm)	PAAT (ms)
对照组	10	4.61 \pm 0.36	40.74 \pm 9.46
MCT 组	10	10.24 \pm 1.06*	21.98 \pm 8.41*
Ang- (1-7) 组	10	5.82 \pm 0.86 Δ	38.45 \pm 7.82 Δ

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 MCT 组比较, $\Delta P < 0.05$.

表 3 各组大鼠右心室肥厚指数和右心室质量指数的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 RVHI and RVMI of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	RVHI ($\times 10^{-2}$)	RVMI ($\times 10^{-4}$)
对照组	10	28.41 \pm 2.71	5.92 \pm 0.41
MCT 组	10	40.23 \pm 2.98*	14.01 \pm 0.46*
Ang- (1-7) 组	10	29.32 \pm 2.61 Δ	7.45 \pm 0.63 Δ

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 MCT 组比较, $\Delta P < 0.05$.

表 4 各组大鼠的肺血管重构指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Degree of arterial remodeling of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	WT (%)	WA (%)
对照组	10	34.51 \pm 2.65	48.28 \pm 3.76
MCT 组	10	58.06 \pm 4.72*	74.40 \pm 3.61*
Ang- (1-7)	10	40.56 \pm 3.96 Δ	54.68 \pm 3.96 Δ

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 MCT 组比较, $\Delta P < 0.05$.

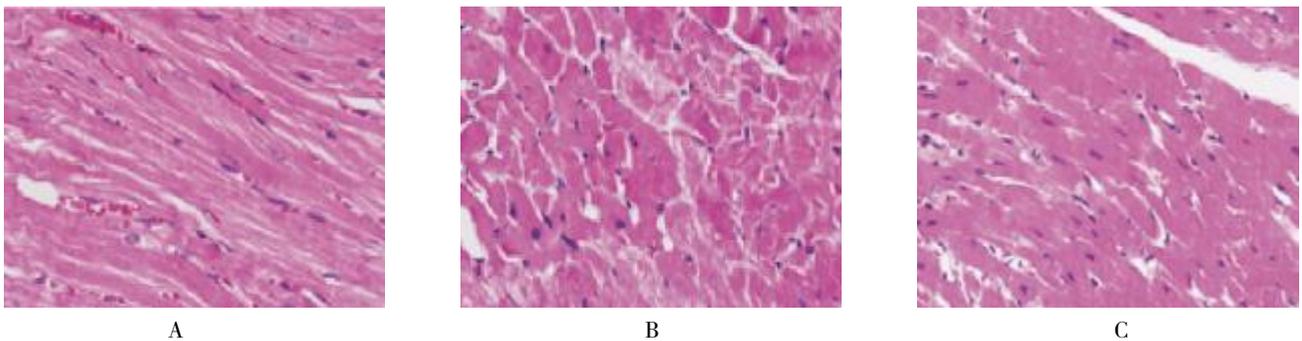


图 1 各组大鼠右心室的病理改变

Fig. 1 Histopathological change of right ventricle in each group

A:正常对照组; B:MCT 组; C:Ang-(1-7)组

3 讨论

目前制备肺动脉高压的模型主要有以下几种方法: (1) MCT 诱导的肺动脉高压模型; (2) 低氧诱导的肺动脉高压模型; (3) 体-肺循环的分流肺动脉高压模型. 通过外科手术建立体-肺循

环的分流模型, 能较好模拟先天性心脏病的左向右分流, 但这类模型手术较创伤大, 血管间吻合要求手术操作精细, 要求试验动物较多, 死亡率较高. 低氧模型需要低压低氧仓或需要高原环境来建立模型, 制备起来也存在困难. 因此, 一次性皮下或腹腔注射 MCT 是最常用的动物模型之一. MCT 诱导

大鼠肺动脉高压模型最早是在 1961 年由 Lalich 等建立的^[1], 野百合碱本身并无生物活性, 进入体内在肝脏中经细胞色素 P450 代谢后形成脱氢产物—吡咯野百合碱 (MCTP), 吡咯野百合碱能选择性的作用于肺血管内皮细胞 (对体循环系统无明显细胞毒性作用), 导致其变性、坏死, 从而引起肺小动脉中膜增厚, 导致肺动脉高压的形成和右心室重构, 甚至出现右心衰竭。

本实验中笔者采用右心导管和彩色多普勒超声法监测肺动脉压力。通过多普勒二维超声法检测肺动脉加速时间 (PAAT), 评价肺动脉压的高低。PAAT 越短, 肺动脉压越高, 反之 PAAT 越长, 肺动脉压越低^[2]。MCT 注射 4 周后, 笔者通过多普勒二维超声法检测, 发现 PAAT 明显缩短, 同时右心导管检测发现右室收缩压明显升高, 说明成功建立了大鼠肺动脉高压模型。

笔者通过计算右心室肥厚指数和右心室质量指数这两个指标, 观察右室是否肥大, 是否出现右室重构。实验中发现 MCT 诱导 4 周后, MCT 组大鼠右心肥大指数和右心室质量指数明显升高, 并且多普勒超声法检测右心室游离壁厚度明显升高, 通过心肌病理切片观察到 MCT 组大鼠的心肌细胞排列紊乱, 心肌细胞肥大, 核肥大、畸形, 心肌细胞基质增加, 间质纤维增生, 出现右心室重构的改变。

本实验中笔者在 MCT 皮下注射 1 d 后, 外源性的泵入 Ang-(1-7) 给予早期干预。Ang-(1-7) 是 RAS 系统的新成员, Ang-(1-7) 与其特异的 G 蛋白偶联受体 Mas 相结合, 构成 Ang-(1-7)-Mas 轴, 产生扩血管、降压、抗心肌细胞增殖和纤维化以及改善内皮细胞功能等保护心血管的生物学作用^[3]。Ang-(1-7) 可舒张犬和猪的冠状动脉、犬的大脑中动脉、兔肾脏入球小动脉、大鼠的主动脉环和猫的肠系膜血管床^[4]。自发性高血压大鼠以及肾血管性高血压犬静脉输注 Ang-(1-7) 可显著降低其血压。Ang-(1-7) 可以明显降低体外心肌培养细胞 ERK1/ERK2 的活性, 抑制心肌细胞生长, 减小心肌梗后的心肌细胞大小, 减轻心室功能紊乱和心室重构^[5]。但是, 对于不同种属的动物和不同血管床, Ang-(1-7) 的这种血管活性作用并不完全一致。Ang-(1-7) 能否在肺循环中发挥保护性的作用, 目前这方面的研究较少。本实验中给予 Ang-(1-7) 干预四周后, Ang-(1-7) 组大鼠与 MCT 组的大鼠相比, 右室收缩压明显降低, 多普勒二维超声法检测, 肺动脉加速时间明显延长, 说明 Ang-(1-7) 早期干预可预防肺动脉高压的发生。Ang-(1-7) 组的大鼠右心室肥

厚指数以及右心室质量指数这两个指标较 MCT 组大鼠明显降低, 右心室 HE 病理切片未见明显右心室重构, 多普勒超声检测右心室游离壁厚度明显降低, 未见三尖瓣反流, 以上均说明 Ang-(1-7) 抑制了右心室的重构。MCT 诱导后导致肺动脉压力升高, 肺血管重构, 右心室后负荷增加是野百合碱引起右心室重构的原因之一。Ang-(1-7) 早期干预后, 可抑制右心室的重构, 其原因是因为 Ang-(1-7) 降低了肺动脉压力, 减轻了右心室的后负荷, 还是直接作用于右室的心肌细胞, 亦或是两者发挥协同机制而产生的效果, 以及何种信号通路在其中发挥作用, 笔者将在以后的研究中进一步探讨。

[参考文献]

- [1] LANG I, GOMEZ-SANCHEZ M, KNEUSSL M, et al. Efficacy of long-term subcutaneous treprostinil sodium therapy in pulmonary hypertension [J]. *Chest*, 2006, 129 (6): 1 636 - 1 643.
- [2] BARST R J, LANGLEBEN D, BADESCH D, et al. Treatment of pulmonary arterial hypertension with the selective endothelin-A receptor antagonist sitaxsentan [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47 (10): 2 049 - 2 056.
- [3] ORTE C, POLAK J M, HAWORTH S G, et al. Expression of Pulmonary vascular angiotensin-converting enzyme in primary and second Plexiform Pulmonary hypertension [J]. *J Pathol*, 2000, 192(3): 379 - 384
- [4] SANTOS R A, CAMPAGNOLE-SANTOS M J, ANDRADE S P. Angiotensin-(1-7): an update [J]. *Regul Peptide*, 2000, 91(1-3): 45 - 62.
- [5] FERREIRA A J, SANTOS R A S. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7) [J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005, 38(4): 499 - 507.
- [6] KOHTARO A, HIROAKI S, KEIKO M, et al. Long-term treatment with a rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats [J]. *Circulation Research*, 2004, 94(3): 385 - 393.
- [7] LOOT A E, ROKS A J, HENNING R H, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats [J]. *Circulation*, 2002, 105 (13): 1 548 - 1 550.
- [8] BAS L, WIEK H, VAN G, et al. Angiotensin-(1-7) Attenuates neointimal formation after stent implantation in the rat [J]. *Hypertension*, 2005, 45(1): 138-141
- [9] 孙波. 右心导管测定大鼠肺动脉压的实验方法 [J]. *中国医学科学院学报*, 1984, 6: 465 - 466.
- [10] SHINICHI K, YI-JEN L, PAUL C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor preserves p21 and endothelial ni-

- tric oxide synthase expression in monocrotaline- induced pulmonary arterial hypertension in rats [J]. *Circulation*, 2001,104(21):945 - 950.
- [11] ESTEP J E, LAME M W, MORIN D, et al. [14C]monocrotaline kinetics and metabolism in the rat [J]. *Drug Metab Dispos*, 1991, 19 (1):135 - 139.
- [12] SPINALE F G, CRAWFORD F A, HEWETT K W, et al. Ventricular failure and cellular remodeling with chronic supraventricular tachycardia [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1991, 102:874 - 882.
- [13] GONZALES S, NORIEGA G O, TOMARO M L, et al. Angiotensin- (1-7) stimulates oxidative stress in rat kidney [J]. *Regul Pept*, 2002, 106(1-3):67 - 70.
- [14] TALLANT E A, FERRARIO C M, GALLAGHER P E. Angiotensin- (1 - 7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289 (4) :1 560 - 1 566. (2012 - 11 - 03 收稿)

(上接第 22 页)

- [12] 刘志杰,李如举,曾智勇,等. 多重PCR反应的影响因素及其优化[J]. *黑龙江畜牧兽医(科技版)*, 2011, (7): 26 - 28.
- [13] HENEGARIU O, HEEREMAN A, DLOUHY S R, et al. Multiplex PCR:critical parameters and step-by-step protocol[J]. *Biotechniques*, 1997, 23(3):504 - 511.
- [14] 朱岩芳, 祝水金, 王洋, 等. 均匀设计优化棉花ISSR-PCR 反应体系[J]. *棉花学报*, 2010, 22(3):202 - 208.
- [15] 刘瑞江, 张业旺, 闻崇炜, 等. 正交试验设计和分析方法研究[J]. *实验技术与管理*, 2010, 27(9):52 - 55.
- [16] 黄芳, 黄子杰. 均匀设计及其在药学研究中的应用[J]. *数理医药学杂志*, 2007, 20(5):20 - 22.
- [17] 朱红霞, 胡利宗, 邓小莉. 均匀设计优化野生狗牙根的SRAP-PCR 反应体系 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25 (18):41 - 16.
- [18] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W著. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译, 第3版. 北京:科学出版社, 2002:598 - 600.
- [19] TATIANA M, KARAFET, FERNANDO L, et al. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree[J]. *Genome Res*, 2008, 18:830 - 838.
- [20] SHI H, DONG Y L, WEN B, et al. Y-chromosome evidence of southern origin of the East Asian-specific haplogroup O3-M122 [J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 77:408 - 419.
- [21] HINDS D A, STUVE L L, NILSEN, G B, et al. Whole - genome patterns of common DNA variation in three human populations[J]. *Science*, 2005, 307: 1 072-1 079. (2012 - 10 - 14 收稿)