

单核细胞趋化蛋白-1和血管内皮生长因子 mRNA 在急性甲醇中毒大鼠脑组织的表达

李 璠¹⁾, 查 皓²⁾, 陈伟伟²⁾, 杨崇猛³⁾, 李娟娟²⁾, 童宗武³⁾, 吴春云²⁾

(1) 昆明医科大学科研实验中心; 2) 人体解剖学与组织胚胎学系, 云南昆明 650500;

3) 玉溪市人民医院肾内科, 云南玉溪 653100)

[摘要] **目的** 观察大鼠急性甲醇中毒后脑组织趋化因子单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 及血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 水平的表达变化。**方法** 健康成年 SD 大鼠 75 只, 应用通有混合气体 (N₂O/O₂) 的密闭有机玻璃箱并灌胃相应剂量甲醇溶液复制急性高剂量甲醇中毒大鼠和急性低剂量甲醇中毒大鼠 (n=5)。分不同时段 (2 h, 12 h, 24 h, 3 d, 1 周) 取大鼠右心房静脉血, 采用气相色谱法检测大鼠血液的甲醇浓度, 取大鼠脑组织进行总 RNA 提取, 经逆转录得 cDNA, 用 SYBRGreen 荧光实时定量 PCR 技术动态定量监测脑组织中 MCP-1 和 VEGF mRNA 在急性甲醇中毒后不同时间点表达的变化。**结果** (1) 甲醇浓度检测结果: 低剂量组在 2 h、12 h 的血液甲醇浓度较生理盐水组显著升高 ($P < 0.05$), 高剂量组在 2 h、12 h、24 h 的血液甲醇浓度较低剂量组和生理盐水组显著升高 ($P < 0.05$), 各组在 3 d 和 1 周均未测出甲醇; (2) MCP-1 mRNA 表达变化: 在甲醇中毒后 2 h 明显升高, 24 h 达到高峰, 各个时间点与对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 在 2 h、3 d 和 1 周高剂量组高于低剂量组; (3) VEGF mRNA 表达变化: 在甲醇中毒后 2 h 明显升高, 24 h 达到高峰, 各个时间点与对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 在 2 h 和 12 h 高剂量组高于低剂量组。**结论** 急性甲醇中毒后, MCP-1 和 VEGF mRNA 的表达显著升高, 程度与甲醇中毒剂量有关, 可能在脑损伤形成和发展过程中起着重要作用。

[关键词] 单核细胞趋化蛋白 1; 血管内皮生长因子; 急性甲醇中毒; 脑损伤

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 01-0015-06

Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Vascular Endothelial Growth Factor mRNA in Rats with Acute Methanol Poisoning

LI Fan¹⁾, ZHA Hao²⁾, CHEN Wei-wei²⁾, YANG Chong-meng³⁾, LI Juan-juan²⁾, TONG Zong-wu³⁾,
WU Chun-yun²⁾

(1) Dept. of Experiment Center for Medical Science Research; 2) Dept. of Anatomy/Histology and Embryology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 3) Yuxi People's Hospital, Yuxi Yunnan 653100, China)

[Abstract] **Objective** This study was aimed to investigate the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in rats with acute methanol poisoning. **Methods** Animal models of acute methanol poisoning in rats were duplicated using a plexiglas chamber exposed to a mixture of N₂O/O₂. Right atrium venous blood of rats were taken at each time point (2 h, 12 h, 24 h, 3 d, 1 w), and gas chromatography was used to determine the methanol concentration of the rat blood (n=5). Then got brain tissue to extract total RNA and reverse transcription (n=3). SYBRGreen real-time PCR was used to monitor the expression of MCP-1 and VEGF mRNA. **Results** (1) Results of methanol concentration determination: The blood

[基金项目] 云南省应用基础研基金资助项目 (2009ZC097M); 云南省应用基础研究计划项目 (2011FB243)

[作者简介] 李璠 (1984~), 女, 云南临沧市人, 在读硕士研究生, 助理实验师, 主要从事分子生物学实验技术工作。

[通讯作者] 吴春云. E-mail:wuchunyunkm@163.com; 童宗武. E-mail:tongzongwud@126.com

methanol concentration of the low-dose group was significantly increased in comparison with that of the saline control group at 2 h and 12 h time points ($P < 0.05$). In the high-dose group, the blood methanol concentration was increased significantly compared with the low-dose group as well as the saline group at 2 h, 12 h and 24 h time points ($P < 0.05$); (2) The expression of MCP-1 mRNA: The expression level of MCP-1 were significantly enhanced along with the time lapse after acute poisoning, and became most severely at 24 h. The expression levels of MCP-1 have significant differences in groups, of which high-dose group was higher than low-dose group at 2 h, 3 d and 1 w ($P < 0.05$); (3) The expression of VEGF mRNA: The expression level of VEGF was significantly enhanced along with the time lapse after acute poisoning, and became most severely at 24 h. The expression levels of MCP-1 have significant differences in groups, of which high-dose group was higher than low-dose group at 2 h and 12 h ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression levels of MCP-1 and VEGF mRNA were significantly enhanced, and the degree of poisoning was apparently related with the dose administered. MCP-1 and VEGF might play the important roles in the pathogenesis and progression of brain injured.

[Key words] Monocyte chemoattractant protein-1; Vascular endothelial growth factor; Methanol poisoning; Brain injured

甲醇 (Methanol, CH_3OH), 是结构最简单的饱和一元醇, 也称为木醇, 是一种无色有毒的挥发性酒精气味液体, 可经呼吸道胃肠道及皮肤吸收入血, 从而导致中毒, 是假酒的主要致毒物质^[1]. 近几年因饮入假酒致甲醇中毒的病例时有发生, 随着甲醇在人们生产和生活中的应用越来越广, 其意外中毒的可能日益增加.

甲醇中毒后表现主要为中枢神经系统损伤、眼部损伤和代谢性酸中毒, 多见于临床的病例报道, 缺乏相关实验研究, 特别是急性甲醇中毒后出现的脑损伤中一些细胞因子的病理变化定量研究至今未见报道, 因此有必要利用动物模型来进行相关探讨. 根据研究报道, 脑损伤过程中多种炎症因子以及细胞生长因子参与其中, 发挥了重要作用. 一方面, 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1), 转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 等促进了神经细胞死亡, 对中枢神经系统造成病理损伤^[2]; 另一方面, 有实验结果显示, 长期脑缺氧后, 血管内皮生长因子 (VEGF) 系统存在着负反馈机制, 即缺氧时 VEGF 的表达增高, 氧含量正常时 VEGF 迅速降低^[3].

本实验选取炎症趋化因子 MCP-1 及细胞生长因子 VEGF 作为研究对象, 采用通有等比 (1:1) 混合气体 ($\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$) 的自制密闭有机玻璃箱复制典型的大鼠急性高剂量和低剂量甲醇中毒模型, 通过提取不同时间点大鼠脑组织 RNA, 逆转录为 cDNA, 并采用 SYBRGreen 嵌合荧光 PCR 技术对 SD 大鼠急性甲醇中毒后脑组织中 MCP-1、VEGF mRNA 水平的变化进行动态研究.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物分组 75 只健康成年 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 雌雄不限, 体重 (280 ± 30) g, 由昆明医科大学实验动物中心提供. 随机数字表法分为 A (高剂量组)、B (低剂量组)、C (生理盐水对照组) 共 3 组, 每组 5 只. 动物于实验前 3 d 运到实验室, 于安静环境下分笼饲养, 自由进食和饮水, 室温控制在 (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 自然光照.

1.1.2 气体及试剂 分析纯甲醇 (天津市风船化学试剂科技有限公司), 以生理盐水稀释成质量浓度为 30% 的甲醇溶液; 40 L 压缩 $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ 混合气体 (1:1, 广州盛盈气体有限公司); 肝素钠注射液 (2 mL:12 500 U, 上海第一生化药业有限公司); 戊巴比妥钠 (广州化学试剂厂). Trizol (MRC), RNA 逆转录试剂盒 (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit #K1622), 实时荧光定量 PCR 试剂 SYBRGreen Master ROX (Roch).

1.2 方法

1.2.1 甲醇中毒大鼠模型复制及采血 各组模型复制参考 Eells JT 等的方法^[4], 将实验大鼠置于通有 $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ (1:1) 混合气体的密闭有机玻璃箱中, 分别给予各组大鼠灌胃高剂量甲醇溶液 (2 g/kg)、低剂量甲醇溶液 (1 g/kg) 或生理盐水, 首剂量加倍、重复 2 次灌胃.

模型复制完成后, 对各组大鼠进行如下操作: 用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 仰卧固定在冰袋上以降低氧耗, 暴露胸腔, 从其右心房中抽取静脉

血 1.5 mL 注入肝素钠抗凝管中充分振荡, 采用气相色谱法检测大鼠在急性甲醇中毒后不同时间点的血液甲醇浓度, 然后断头处死大鼠, 取脑组织进行总 RNA 提取, 经逆转录得 cDNA 后对目的基因进行实时荧光定量 PCR 分析.

1.2.2 实时荧光定量 PCR 反应 (1) cDNA 制备快速断头处死各组实验动物, 冰盘上操作取海马区脑组织 50 ~ 100 mg, 立即放入 Trizol 试剂中进行 RNA 抽提. 以 260 nm 及 280 nm 吸光度值计算所获 RNA 浓度及纯度, 分装后 -80 °C 保存. 逆转录过程按照试剂盒说明书操作; (2) PCR 引物设计 MCP-1 及 VEGF 引物设计均根据标准荧光定量 PCR 引物设计原则, 通过 Primer 5.0 程序设计, 经过 NCBI Blast 验证, 由上海生工生物工程公司合成, 序列见表 1; (3) PCR 实验过程 SYBRGreen Master (ROX) 10 μ L、MCP-1/VEGF/ β -actin (10 μ M) 1 μ L、模板 cDNA 1 μ L、ddH₂O 8 μ L (总体积 20 μ L) 于 PCR 反应管中, 其中模板 cDNA 在加样前用 ddH₂O 稀释 10 倍. 在 7300 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司) 上行 PCR, 扩增条件如下: ① 95 °C 10 min 预变性; ② 95 °C 15 s 变性, 60 °C 1 min. 退火延伸, 40 个循环. (4) 实时荧光定量 PCR 分析 分别测定每个样品的 MCP-1、VEGF 和 β -actin mRNA 的 Ct 值, 每个样品均作三复孔以减少操作误差. 对 PCR 反应过程中的每一循环的系统荧光强度进行实时检测, 根据扩增曲线确定 Ct 值 (cycle threshold), 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算出 MCP-1、VEGF mRNA 的相对拷贝数 (实验组目的基因的表达相对于对照组的倍数) [9].

1.3 统计学方法

所有统计资料均采用 SPSS 软件处理, 结果均用均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用方差分析, 方差不齐采用秩和检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 甲醇浓度检测结果

急性甲醇中毒后, 低剂量组在 2 h、12 h 的血液甲醇浓度较生理盐水组显著升高 ($P < 0.05$). 高剂量组在 2 h、12 h、24 h 的血液甲醇浓度较低剂量组和生理盐水组显著升高 ($P < 0.05$), 各组的 3 d 和 1 周及生理盐水组均未测出甲醇, 表明大鼠吸入等比混合气体 (N₂O/O₂) 并给予高、低剂量甲醇溶液灌胃能够复制出典型的急性高、低剂量甲醇中毒大鼠模型, 见图 1、表 2.

2.2 MCP-1 表达的变化

急性甲醇中毒后低剂量组和高剂量组不同时间脑组织 MCP-1 mRNA 表达均发生变化. 2 h 明显升高 ($P < 0.05$), 24 h MCP-1 mRNA 表达水平达高峰, 较对照组显著升高 ($P < 0.05$). 24 h 后开始逐渐下降, 3 d 和 1 周仍高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 甲醇中毒后, 低剂量组与高剂量组在 2 h、3 d 和 1 周 MCP-1 mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高剂量组 MCP-1 mRNA 的表达水平高于低剂量组. 2 组在 12 h 和 24 h MCP-1 mRNA 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2、表 3.

2.3 VEGF 表达的变化

急性甲醇中毒后低剂量组和高剂量组不同时间脑组织 VEGF mRNA 表达均发生变化. 2 h 明显升高 ($P < 0.05$), 24 h VEGF mRNA 表达水平达高峰, 较对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 24 h 后开始逐渐下降, 3 d 和 1 周仍高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 低剂量组与高剂量组在 2 h 和 12 h VEGF mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高剂量组略高于低剂量组, 其余时间点高低剂量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3、表 4.

3 讨论

急性甲醇中毒主要与其代谢的产物甲酸有关, 而甲酸的代谢主要依赖于体内四氢叶酸的水平. 人的四氢叶酸水平低, 因此急性甲醇中毒后的中毒表现明显, 而大鼠因其体内四氢叶酸水平高, 能辅助降解毒物甲酸, 使得中毒的表现轻微. 本实验根据国外学者 Eells JT 等人的研究, 采用混合气体 N₂O/O₂ 能够降低大鼠体内四氢叶酸水平、减少毒物甲酸的降解, 从而使得大鼠呈现接近于人的中毒情况, 并出现精神萎靡、步态蹒跚等表现 [9], 参照此法复制大鼠急性甲醇中毒模型, 并设立高、低不同剂量组来模拟人所发生的不同中毒情况. 结果发现中毒大鼠吸入混合气体后表现出接近于人所出现的中毒行为, 且高剂量组中毒情况较较低剂量组严重, 而生理盐水对照组大鼠情况与正常大鼠无差异, 说明混合气体 N₂O/O₂ 对大鼠的正常生理状态无影响. 此外, 急性甲醇中毒后, 气相色谱法测得低剂量组和高剂量组大鼠血液甲醇浓度相比对照组显著升高, 且高剂量组血液甲醇浓度远高于其他 2 组, 证明造模成功.

近年来, 学者多对急性甲醇中毒的患者的脑区

表 1 目标基因引物序列
Tab. 1 Sequence of specific primers

基 因	上游 (5'-3')	下游 (5'-3')	扩增片段 (bp)
MCP-1	AGCACCTTTGAATGTGAACCTG	TCTAGTATTCATGGAAGGGAATAGTGTA	196
VEGF	TTCAACTATTTATGAGGATGCATCTC	GCAGAGCTGAGTGTTAGCAAAAT	179
β-actin	AGCCATGTACGTAGCCATCC	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA	222

表 2 大鼠血液甲醇浓度 (mg/100 mL)
Tab. 2 The methanol concentrations in rat bloods (mg/100 mL)

组 别	各时间点血液甲醇浓度				
	2 h	12 h	24 h	3 d	1 周
生理盐水组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
低剂量组	142.30 ± 17.99*	72.08 ± 10.80*	16.97 ± 3.53	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
高剂量组	400.98 ± 23.03*▲	279.08 ± 9.41*▲	195.80 ± 11.14*▲	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

与同时段生理盐水对照组比较, *P < 0.05; 与同时段低剂量组比较, ▲P < 0.05.

表 3 中毒后 MCP-1 mRNA 表达 (x̄ ± s)
Tab. 3 The expression of MCP-1 mRNA after poisoning (x̄ ± s)

组 别	各时间点 MCP-1 mRNA 表达水平				
	2 h	12 h	24 h	3 d	1 周
生理盐水组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
低剂量组	1.68 ± 0.11*	2.51 ± 0.27*	3.99 ± 0.10*	1.87 ± 0.02*	1.24 ± 0.09*
高剂量组	2.31 ± 0.16*▲	3.41 ± 0.41*▲	4.41 ± 0.45*	3.44 ± 0.38*	1.98 ± 0.06*

与同时段生理盐水对照组比较, *P < 0.05; 与同时段低剂量组比较, ▲P < 0.05.

表 4 中毒后 VEGF mRNA 表达 (x̄ ± s)
Tab. 4 The expression of VEGF mRNA after poisoning (x̄ ± s)

组 别	各时间点 VEGF mRNA 表达水平				
	2 h	12 h	24 h	3 d	1 周
生理盐水组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
低剂量组	2.95 ± 0.12*	3.08 ± 0.15*	5.97 ± 0.61*	5.11 ± 0.28*	4.99 ± 0.34*
高剂量组	4.34 ± 0.26*▲	4.70 ± 0.17*	6.30 ± 0.21*	5.92 ± 0.13*▲	5.51 ± 0.03*▲

与同时段生理盐水对照组比较, *P < 0.05; 与同时段低剂量组比较, ▲P < 0.05.

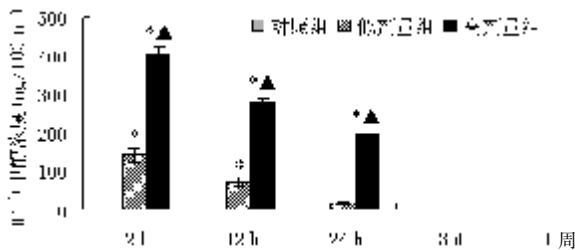


图 1 各组大鼠血液甲醇浓度比较

Fig. 1 Comparison of rat blood methanol concentration in groups

与同时段生理盐水组比较, *P < 0.05; 与同时段低剂量组比较, ▲P < 0.05.

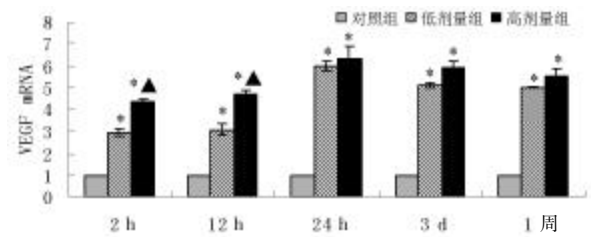


图 2 低剂量和高剂量甲醇中毒不同时间 MCP-1 mRNA 变化

Fig. 2 Comparison of MCP-1 mRNA expression in groups after poisoning

与同时段生理盐水组比较, *P < 0.05; 与同时段低剂量组比较, ▲P < 0.05.

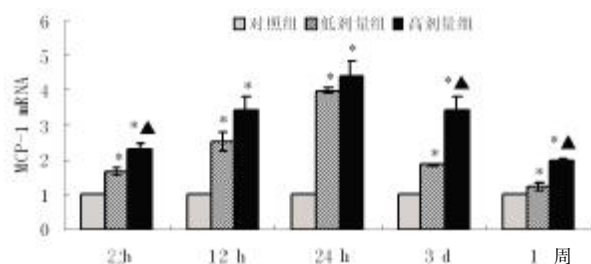


图3 低剂量和高剂量甲醇中毒不同时间 VEGF mRNA 变化

Fig. 3 Comparison of VEGF mRNA expression in groups after poisoning

与同时段生理盐水组比较, * $P < 0.05$; 与同时段低剂量组比较, ^ $P < 0.05$.

的研究多集中在影像学方面, 至今未见急性甲醇中毒脑损伤后脑组织病理变化的分子生物学研究报道^[7-10]. 本研究首次针对可能参与脑损伤过程的炎症趋化因子 MCP-1 及细胞生长因子 VEGF 进行了实时荧光定量 PCR 动态监测.

单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 是第一个被发现的人 CC 类趋化因子, 主要功能是趋化和激活单核/巨噬细胞, 吸引单核细胞 T 淋巴细胞以及自然杀伤细胞到炎症部位^[11]. 最初对 MCP-1 的研究主要为针对其对粒细胞的趋化作用, 但随后深入研究发现, 其在过敏免疫缺陷性疾病、肾病、炎症性肠病、骨再造、血脑屏障通透性的相关疾病、动脉粥样硬化和肿瘤等疾病过程中都发挥了重要作用^[12]. 其中, 血脑屏障是由脑血管内皮细胞以及它们之间的紧密连接所构成. 为了调节和保护脑内微环境, 血脑屏障保持紧张且通透性低下. 在很多病理条件下, 尤其是伴随炎症或新血管生成的时候, 血脑屏障的通透性就会大大增高. 血管内皮生长因子 (VEGF) 是血管内皮细胞特异性肝素结合生长因子, 在体内体外均可诱导新生血管的形成, 其广泛分布于自身各个组织中^[13]. VEGF 的功能主要是促进血管内皮细胞的增殖, 因此其最终目的为促进血管的生成, 有研究表明, VEGF 与血管密度和新生血管密切相关, 主要作用机制是其本身一种促内皮细胞分裂素, 在体内体外均能促进内皮细胞分裂增殖和血管形成, 其除了能促进血管内皮增殖血管形成外, 还具有增加血管通透性维持血管功能, 影响血流动力学及组织愈合. 引起 VEGF 表达增加的因素较多, 常见的包括以下几种: (1) 血氧浓度, 缺氧时, VEGF 表达显著增多; (2) 癌基因和抑癌基因对 VEGF 进行调节; (3) 各种细胞因子和其他介质对 VEGF 的影响^[14,15]. 最近还有研究发现

MCP-1 还参与到血管内皮生长因子 (VEGF) 介导的血管生成, 并能增加血管通透性, 上调 VEGF 的表达.

本研究结果显示急性甲醇中毒后, MCP-1 mRNA 表达在 2 h 就显著升高, 24 h 其表达水平到达高峰, 3 d 后直到 1 周与对照组仍有显著差异, 高剂量组相比低剂量组表达变化更为明显, 在 2 h, 3 d 和 1 周表达均高于低剂量组, 推测 MCP-1 的表达程度和所摄入的剂量有关. MCP-1 表达的升高说明脑内发生了炎症反应, 从而使得血脑屏障的通透性大大增加, 而作为一种重要的前炎症性趋化因子, 在早期就高度表达, 推断其参与了脑损伤的发生、发展过程.

研究结果显示急性甲醇中毒后脑组织中 VEGF mRNA 水平显著高于对照组, 在急性甲醇中毒后 24 h 达高峰, 3 d 直到 1 周仍保持较高表达, 高剂量组相比低剂量组表达变化更为明显, 在 2 h 和 12 h 均高于低剂量组. 它的表达增高, 一方面原因是长期脑缺氧, VEGF 系统的负反馈机制, 即缺氧时 VEGF 表达增高, 氧含量正常时 VEGF 表达迅速降低, 推测 VEGF 的表达程度和所摄入的剂量有关. 另一方面原因可能是血脑屏障通透性增加, MCP-1 的表达的升高, 参与了 VEGF 介导的血管生成, 上调了 VEGF 的表达.

MCP-1 及 VEGF 表达的显著升高使得血脑屏障的通透性大增, 而血脑屏障通透性的增加反过来也调高了 MCP-1 和 VEGF 的表达, 两者呈相互促进的关系.

由于细胞因子作用具有网络性, 推测 MCP-1 和 VEGF 可能通过与其它多种免疫细胞和各种细胞因子的相互作用, 共同参与了急性甲醇中毒后脑损伤的过程. 本实验中 MCP-1 和 VEGF mRNA 的表达显著升高, 但是其对应表达的蛋白是否增加, 以及它们的细胞来源和细胞定位如何有待进一步的实验研究.

[参考文献]

- [1] 吕海辰, 齐曾鑫, 傅晓健, 等. 甲醇中毒大鼠视网膜及肝脏细胞的超微结构改变 [J]. 大连医科大学学报, 2012, 34(2):138-141.
- [2] WU C Y, C KAUR, S VISWANATHAN, et al. Kv1.1 expression in microglia regulates production and release of proinflammatory cytokines, endothelins and nitric oxide [J]. Neuroscience, 2009, 158(4):1500-1508.
- [3] IMAGAWA S, YAMAGUCHI Y, HIGUCHI M, et al. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients

- with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. *J Blood*, 2001, 98 (4):1 255 - 1 257.
- [4] EELLS J T, HENRY M M, SUMMERFELT P, et al. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (6): 3 439 - 3 444.
- [5] 徐春阳, 李爽, 邵坤, 等. 单核细胞趋化蛋白1及其受体 CCR2 mRNA 在急性酒精中毒大鼠脑组织的表达[J]. *中国应用生理学杂志*, 2011, 27(3):274 - 275, 283, 379.
- [6] MARTINASEVIC M K, GREEN M D, BARON J, et al. Folate and 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in human and rat retina: relation to methanol toxicity[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 141(2):373 - 381.
- [7] SEFIDBAKHT S, RASEKHI A R, KAMALI K, et al. Methanol poisoning: acute MR and CT findings in nine patients [J]. *Neuroradiology*, 2007, 49(5):427 - 435.
- [8] VARES M, ALVAREZ-ROCHA L, LOPEZ-RIVADULLA M, et al. Sequelae-free survival in a case of potentially fatal methanol poisoning using CVVHDF as dialysis technique [J]. *Med Intensiva*, 2012, 36(5):379 - 380.
- [9] PETERS A S, SCHWARZE B, TOMANDL B, et al. Bilateral striatal hyperintensities on diffusion weighted MRI in acute methanol poisoning [J]. *Eur J Neurol*, 2007, 14(9): 1 - 2.
- [10] BESSELL-BROWNE R, BYNEVELT M. Two cases of methanol poisoning: CT and MRI features [J]. *Australas Radiol*, 2007, 51(2):175 - 178.
- [11] 陈冰. 单核细胞趋化蛋白-1与代谢综合征[J]. *内科*, 2011, 6(5):473 - 475.
- [12] 吴四海, 楼跃, 黄磊. 单核细胞趋化蛋白-1的作用机制研究进展 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2012, 6(10):2 773 - 2 775.
- [13] 罗美蓉, 王正伟, 安志星. 人血管内皮生长因子研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(17):3 835 - 3 837.
- [14] 刘兰. 血管内皮生长因子对肿瘤血管生成影响的研究进展 [J]. *中华临床医学研究杂志*, 2007, 13(13): 1 918 - 1 919.
- [15] 赵忠泽. 血管内皮生长因子(VEGF)及其受体在胶质瘤血管生成及侵袭中的作用 [J]. *中国医药导报*, 2008, 5(3):18 - 20.

(2013-12-04 收稿)

(上接第 7 页)

- the design of chemotherapeutic agents [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1980, 23(4):347 - 357.
- [2] SCANLON K J, BERKOWITZ K, PALLAI M E, et al. Inhibition of methionine transport by methotrexate in mitogen-stimulated human lymphocytes [J]. *Cancer Treatment Reports*, 1983, 67(7-8):631 - 639.
- [3] BREILLOUT F, ANTOINE E, POUAPON M F. Methionine dependency of malignant tumors: a possible approach for therapy [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, 82(20):1 628 - 1 632.
- [4] GOSEKI N, YAMAZAKI S, ENDO M, et al. Antitumor effect of methionine depleting total parenteral nutrition with doxorubicin administration on Yoshida sarcoma bearing rats [J]. *Cancer*, 1992, 69(7):1 865 - 1 872.
- [5] TAKAKURA T, ITO T, YAGI S, et al. High-level expression and bulk crystallization of recombinant L-methionine γ -lyase, an anticancer agent [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(2):183 - 192.
- [6] 胡振良, 张芳, 田腊梅, 等. 重组蛋氨酸裂解酶原核体系的表达及纯化 [J]. *昆明医学院学报*, 2012, 33(6): 3 - 7.
- [7] 彭江丽, 赵瑜, 张晓芳, 等. METase 在不同原核表达系统中的表达和活性比较 [J]. *中国民族民间医药杂志*, 2009, 18(7):20 - 23.
- [8] 刘勇, 方勇. 雷帕霉素在顺铂诱导 HeLa 细胞凋亡中的协同作用 [J]. *Central China Medical Journal*, 2009, 33(6):300 - 303.
- [9] DURANDO X, FARGES M C, BUC E, ABRIAL C, et al. Dietary methionine restriction with FOLFOX regimen as first line therapy of metastatic colorectal cancer: a feasibility study [J]. *Oncology*, 2010, 78(3-4):205 - 209.
- [10] ZHAO R, DOMANN F E, ZHONG W. Apoptosis induced by selenomethionine and methioninase is superoxide mediated and p53 dependent in human prostate cancer cells [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5(12):3 275 - 3 284.
- [11] MACHOVER D, ZITTOUN J, SAFFROY R, et al. Treatment of cancer cells with methioninase produces DNA hypomethylation and increases DNA synthesis [J]. *Cancer Research*, 2002, 62(16):4 685 - 4 689.
- [12] HU J, CHEUNG N K. Methionine depletion with recombinant methioninase: in vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutic drugs [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(7):1 700 - 1 706.

(2013-12-10 收稿)