

甘肃鼯鼠哈氏腺组织结构及其抗氧化能力

孟婷婷^{①②} 王倩^① 葛宝^① 潘巧琳^① 李金钢^① 何建平^{①*}

① 陕西师范大学生命科学学院 西安 710062; ② 西安培华学院医学院 西安 710125

摘要: 为探讨甘肃鼯鼠 (*Myospalax cansus*) 哈氏腺的结构特征及其在低氧应激下的抗氧化能力, 用组织解剖学方法观察甘肃鼯鼠哈氏腺整体及其显微结构, 分光光度计测定哈氏腺低氧应激前、后超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性及丙二醛 (MDA) 含量。结果显示, 甘肃鼯鼠哈氏腺肥大, 包围在眼周, 位于颧骨下的颧窝, 为管泡状腺体, 由柱状细胞构成, 依胞质中分泌物含量分为厚细胞和薄细胞。常氧下, 甘肃鼯鼠超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性显著高于 SD 大鼠 (*Rattus norvegicus*), 但谷胱甘肽还原酶活性显著低于 SD 大鼠; 在低氧应激 4 h 后, 甘肃鼯鼠超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性迅速升高, 显著高于 SD 大鼠, 谷胱甘肽还原酶的活性在低氧 2、4 和 6 h 无显著性变化, 但均显著低于 SD 大鼠; 在低氧 8 h 后, 甘肃鼯鼠谷胱甘肽还原酶的活性较氧 2 ~ 6 h 显著升高。甘肃鼯鼠丙二醛含量在常氧和低氧应激中均显著低于 SD 大鼠。结果说明, 甘肃鼯鼠在低氧应激后, 哈氏腺通过提高抗氧化酶超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性, 清除低氧诱导产生的多余自由基, 谷胱甘肽还原酶在抗氧化中不起主要作用。地下鼠甘肃鼯鼠抗氧化模式与地面鼠明显不同。

关键词: 甘肃鼯鼠; 低氧; 哈氏腺; 抗氧化酶; 丙二醛

中图分类号: Q494 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2017) 02-283-11

The Harderian Gland of the Gansu Zokor (*Myospalax cansus*): A Structural and Antioxidant Study

MENG Ting-Ting^{①②} WANG Qian^① GE Bao^① PAN Qiao-Lin^① LI Jin-Gang^① HE Jian-Ping^{①*}

① *College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062*; ② *College of Medicine, Xi'an Peihua University, Xi'an 710125, China*

Abstract: To the present study investigated the structure of Harderian gland and its antioxidases during low oxygen stress in Gansu Zokor (*Myospalax cansus*). The overall gross anatomic structure of Harderian gland was described and its microstructure was observed by paraffin H.E staining. The activities of antioxidases in Harderian gland including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and content of malondialdehyde (MDA) in normoxia and hypoxia were measured by a spectrophotometer. The data were analyzed by the single factor analysis of variance using SPSS13.0. The results were as follows:

基金项目 陕西省自然科学基金项目 (No. 2016JM3024);

* 通讯作者 E-mail: hejianping@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 孟婷婷, 女, 硕士研究生; 研究方向: 比较神经生理学; E-mail: mengtingting1983@163.com.

收稿日期: 2016-01-15, 修回日期: 2016-06-16 DOI: 10.13859/j.cjz.201702012

Harderian gland of Gansu Zokor was large (Table 1), surrounding around the eye and lying in the temporal fossa under the jugal bridge (Fig. 1b). It was a tube vesicular gland and composed of columnar cells (Fig. 2a). According to the active state, the cells could be divided into thick and thin cells (Fig. 2c). In normoxic condition, the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) were significantly higher than those in Rat (*Rattus norvegicus*), and the activity of glutathione reductase (GR) was significantly lower than that of SD Rat. The activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) increased rapidly and significantly, higher than those in SD Rat at low oxygen after 4 hours. The activity of glutathione reductase (GR) showed no significant change at low oxygen after 2 - 4 hours, and significantly lower than that of SD Rat. The activity of glutathione reductase (GR) was significantly higher after 2 - 6 hours (Table 1). Significantly lower malondialdehyde (MDA) content was observed in Gansu Zokor than in SD Rat (Table 2). The activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) in Gansu Zokor increased rapidly and significantly, higher than those in SD Rat at low oxygen after 4 hours. The same result was observed in activity of glutathione reductase (GR) after 8 hours. Significantly lower malondialdehyde (MDA) content was found than in SD Rat (Table 2). The results show that Gansu Zokor can maintain normal activity through increasing the activity of antioxidant, removing excessive free radicals induced by low oxygen condition and adapt to the environment. Glutathione reductase (GR) dose not paly a major role in antioxidant function. Underground Rodents antioxidant model was obviously different from that of the ground Rats.

Key words: Gansu Zokor, *Myospalax cansus*; Hypoxia; Harderian Gland; Antioxidase; Malondialdehyde (MDA)

地下鼠 (subterranean rodents) 是一类终生营地下洞道生活的小型哺乳类动物 (Ellerman 1956, Nevo 1979)。地下洞道使其避开众多捕食者, 是其栖息、取食和繁殖的重要场所 (李晓晨等 2001)。但也面临多种生存压力, 洞道环境相对封闭, 与外界气体交换有限, 为典型的低氧、高二氧化碳环境, 氧气和二氧化碳浓度会随着降雨及土质不同而波动, 在雨季, 黏土洞道内二氧化碳含量最高可达 6.1%, 最小氧含量 7.2%; 旱季, 沙土洞道中二氧化碳含量只有 0.43%, 氧含量高达 18.9% (Kennerly 1964, Maclean 1981, Kuhnen 1986, Shams et al. 2005)。长期生活于低氧环境中的地下鼠, 在生理生化及分子水平上进化形成了一系列适应性特征, 如肺泡壁薄, 利于气体扩散 (Arieli et al. 1981); 心、肺和骨骼肌中毛细血管密度增加, 肌肉组织中线粒体数目显著增加, 利于快速供能 (Lechner 1977, Widmer et al. 1997); 有较高的红细胞数量、血红蛋白浓度及氧亲和力,

提高血液携氧和利用氧的能力 (Turrens et al. 1980, Kleinschmidt et al. 1984); 低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1-1 α , HIF-1 α) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在低氧下持续高水平表达 (Avivi et al. 1999, 李月明 2007)。

低氧环境下, 生物体内会产生大量的活性氧, 导致膜脂质过氧化、碱基突变、DNA 链断裂和蛋白质损伤等 (Freeman et al. 1982, 张伟等 2004)。机体正常情况下, 抗氧化防御作用和自由基氧化作用处于动态平衡 (Hardeland et al. 2003, 杨静等 2006)。机体氧自由基清除系统, 包括细胞内的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR) 等 (谭志鑫等 2009)。体内抗氧化酶 (antioxidant enzyme) 活性的高低与抗氧化水平密切相关。地下鼠通过提高抗氧化酶和 ATP 酶的活性对抗自由基对机体的攻击。Schülke 等 (2012) 利用

实时定量 RT-PCR 技术研究发现, 过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶-1 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、谷胱甘肽转移酶-Pil (glutathione S-transferase, GST-Pil)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、超氧化物歧化酶-1 (superoxide dismutase-1, SOD-1) 和超氧化物歧化酶 7 种抗氧化酶基因的 mRNA 水平以及核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2) 在以色列生活的犹太山盲鼯鼠 (*Spalax judaei*) 和戈兰高地盲鼯鼠 (*S. golani*) 的多种组织中均显著高于大鼠 (*Rattus norvegicus*)。Nrf2 有一个氨基酸发生替换, 这种替换对其正选择作用有一定的影响, 在低氧耐受的进化适应中具有重要作用 (Schiilke et al. 2012)。甘肃鼯鼠 (*Myospalax cansus*) 心肌抗氧化酶在低氧应激下迅速升高 (唐燕红等 2013)。这些结果表明, 抗氧化在地下鼠的低氧适应中发挥着重要的作用。

哈氏腺广泛存在于两栖爬行动物、鸟类及大多数哺乳动物眼眶内, 在啮齿类动物中尤为发达 (Antolín-González et al. 1993, Coto-Montes et al. 2001)。肥大的哈氏腺紧靠眼球后面, 呈不规则的带状分布, 内含大量的分泌细胞, 富含脂滴和嗜酸性颗粒, 可合成脂肪、吡啶和吡啶等物质 (Shanas et al. 1998)。哈氏腺不仅具有湿润眼球的作用, 后续研究发现, 哈氏腺还参与免疫反应、温度调节, 以及合成、释放信息素等多项生理功能 (Shanas et al. 1998)。在部分啮齿类动物中还具有抗氧化作用 (Balemans 1980, Hardeland et al. 1995)。叙利亚仓鼠 (*Mesocricetus auratus*) 哈氏腺内超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性较高 (Coto-Montes et al. 2001), 提示哈氏腺可能在地下鼠的低氧适应中发挥作用。甘肃鼯鼠是我国黄土高原特有种, 终生营地下生活, 栖息环境属于典型的低氧高二氧化碳环境, 是研究低氧适应机制的理想模式动物。以往的研究表明, 甘肃鼯鼠在 4.0% 氧浓度下存活 10 h 以上, 其心肌组织显微和超微结构随着低氧应

激时间的延长损伤逐渐恢复正常 (严婷婷等 2012)。低氧适应后, 甘肃鼯鼠红细胞数量多, 红细胞压积大, 血红蛋白浓度高, 红细胞膜表面积大, 血红蛋白的利用率较高 (杨静等 2006)。血液中促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 分泌升高, 促使皮质酮含量增加, 进而促使血液中红细胞数量、血红蛋白浓度和红细胞压积增大, 血液红细胞携氧能力增强 (李月明 2007, 谢芬等 2012)。心肌抗氧化酶活性和 ATP 酶活性升高, 清除低氧诱导产生的多余自由基, 保证正常心电活动 (唐燕红等 2013)。利用酶标技术, 发现甘肃鼯鼠血清儿茶酚胺类激素和去甲肾上腺素含量随着低氧时程加大而呈现增高趋势, 说明甘肃鼯鼠通过激素调节适应低氧环境 (谢惠春等 2012)。骨骼肌形态结构无显著变化但其中的肌红蛋白含量显著高于 SD 大鼠, 说明甘肃鼯鼠骨骼肌具有较强的低氧耐受能力, 肌红蛋白为其高强度地下挖掘活动提供足够的氧 (高媛等 2012)。以上结果表明, 甘肃鼯鼠机体内存在一系列与低氧相适应的结构和功能机制, 但有关甘肃鼯鼠哈氏腺的组织结构及其在低氧应激中的作用还未有研究。本实验以甘肃鼯鼠为研究对象, 观察哈氏腺的整体形态及显微结构, 并对其在常氧和低氧条件下抗氧化酶超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性和丙二醛 (MDA) 含量作为机体氧化损伤指标, 揭示甘肃鼯鼠哈氏腺在低氧适应中的可能作用, 为地下鼠低氧适应研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用甘肃鼯鼠 42 只, 雌雄各半, 体重 220 ~ 300 g, 性成熟, 采自陕西省延安市, 饲以胡萝卜; SD 大鼠 42 只, 雌雄各半, 体重 220 ~ 280 g, 性成熟, 购自西安交通大学实验动物中心鼠类培养室, 饲以鼠粮, 自由饮水。实验动物在实验室内单笼饲养, 棉花做巢材, 锯末

做垫料，室温 (21 ± 1) °C，适应一周后开始实验。

1.2 动物分组及低氧应激

将甘肃鼯鼠和 SD 大鼠各分 7 组，每组 6 只，雌雄各半，低氧组在 6.5% 氧浓度下分别适应 2、4、6、8、10 和 16 h，常氧组为对照组。低氧组动物置于低氧仓内，JRC-1020 型热磁氧分析仪（北京均方理化科技研究所）监控舱内氧浓度，保持氧浓度 6.5%。

1.2.1 哈氏腺整体形态 甘肃鼯鼠用 20% 氨基甲酸乙酯（按照体重注射剂量为 1.5 g/kg）腹腔注射麻醉，0.01 mol/L PBS 及 4% 多聚甲醛灌注，立即沿颞侧矢状面剖开，暴露眼和哈氏腺，去除眼，剔除哈氏腺外围筋膜并称重，体视镜（Olympus SXZ12）观察整体形态并拍照。

1.2.2 哈氏腺组织显微结构观察 将哈氏腺切成头和尾两部分，置于 4% 多聚甲醛中固定，常规石蜡包埋，切片厚 6 μm ，Harris 苏木精-伊红（H.E）染色，中性加拿大树胶封片，NIKON 显微系统（Nikon ECLIPSE 80i）观察并拍照。

1.2.3 酶活力测定 低氧应激后，乙醚麻醉，即刻取哈氏腺，在冰盒上剔除筋膜，置于预冷的 0.01 mol/L PBS 中漂洗，称重，锡箔纸包裹，液氮冷冻 5 min 后，于 -80°C 冰箱中备测。

将待测组织剪碎，按重量比加 9 倍预冷的生理盐水匀浆研磨 5 min，制成 10% 组织匀浆，低温冷冻离心机（德国 SIGMA）3 000 r/min 离心 5 min，取上清，测定过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽还原酶（GR）活力和丙二醛（MDA）的含量，部分稀释为 1% 组织匀浆，测定超氧化物歧化酶（SOD）活力。按试剂盒（南京建成生物工程研究所）说明用紫外分光光度计（上海天美 UV2300）分别测定超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽还原酶（GR）和丙二醛（MDA）含量。

1.3 数据统计与分析

SPSS13.0 软件分析，结果以平均值 \pm 标准差（Mean \pm SD）表示，单因素方差分析比较组间差异， $0.01 \leq P < 0.05$ 为差异显著， $P <$

0.01 为差异极显著。

2 结果

2.1 甘肃鼯鼠哈氏腺位置及整体形态

甘肃鼯鼠眼萎缩退化，体积减少（图 1a），哈氏腺包围在眼周围，并向后侧延伸，位于颞骨弓下的颞窝，向眼窝中部延伸，呈带状分布。与周围颞肌、咬肌和皮肤三种肌肉相邻，后中部的颞肌几乎包围整个哈氏腺，二者连接较松弛；前方为咬肌，与哈氏腺连接较紧密，皮肤在前上方与哈氏腺连接，这三种肌肉牵拉、固定哈氏腺（图 1b）。

哈氏腺腺体肥大，重约 0.31 g，约为体重的千分之一左右，雌性哈氏腺略重于雄性，但无显著性差异（ $P > 0.05$ ，表 1）。哈氏腺外表包裹一层薄膜，眼睛亦完全被包裹在内，形成一个类似封闭的囊，与周围组织易分离，但在眼处留有开口。新鲜的哈氏腺呈奶油色，近卵圆形，长约（ 8.90 ± 0.10 ）mm，宽约（ 6.95 ± 0.45 ）mm，厚约（ 3.15 ± 0.15 ）mm， $n = 42$ 。腺体头部较窄（图 1c），尾部较宽（图 1d），其长轴沿后外侧到前内侧。

2.2 甘肃鼯鼠哈氏腺显微结构

哈氏腺表面有一薄层结缔组织被膜，被膜由网状胶原纤维和平滑肌纤维构成（图 2a），被膜结缔组织伴随血管和神经进入实质，将实质分割构成间质。哈氏腺为管泡状腺，呈分叶状，不同分叶间由结缔组织相连接。腺泡合并形成较宽的分泌管道，开口于结膜囊，腺泡壁由柱状上皮细胞构成（图 2b），分泌细胞胞质呈嗜酸性，内含大量大小不等的脂质小泡，在 H.E 染色切片中，胞质内较多的脂滴被溶解，使细胞呈空泡状，着色淡。胞核较大，着色较深。腺泡细胞依其活动状态分为两种类型，在功能活跃时，细胞增高呈高柱状，使腺泡壁增厚，体积减小，称之为“厚细胞”；功能不活跃时，呈矮柱状，体积大，腺泡壁变薄为“薄细胞”。在哈氏腺尾部，“厚细胞”数量比“薄细胞”要多（图 2c），“薄细胞”相对较少。但



图 1 甘肃鼯鼠及哈氏腺位置和整体形态

Fig. 1 The position and overall morphology of Harderian gland in Gansu Zokor

a. 甘肃鼯鼠的外形; b. 眼和哈氏腺的位置, 箭头示哈氏腺; c. 哈氏腺正面观 (7 ×); d. 哈氏腺背面观 (7 ×).

a. The appearance of Gansu Zokor; b. The position of the eye and Harderian gland, the arrow indicates the Harderian gland; c. Harderian gland's anterior view (7 ×); d. Harderian gland's dorsal view (7 ×).

D. 皮肤; E. 眼; H. 哈氏腺头部; M. 咬肌; P. 吻; Te. 颞肌; Ta. 哈氏腺尾部。

D. Dermal muscle; E. Eye; H. Head of Harderian gland; M. Masseter muscle; P. Proboscis; Te. Temporal muscle; Ta. Tail of Harderian gland.

表 1 甘肃鼯鼠哈氏腺重量及其与体重之比 (平均值 ± 标准差)

Table 1 The weight of Harderian gland and its ratio with body weight in Gansu Zokor (Mean ± SD)

	雄 Female (n = 21)	雌性 Male (n = 21)	P
哈氏腺重量 Harderian gland weight (g)	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.08	> 0.05
哈氏腺与体重比 The ratio of Harderian and body weight	0.001 ± 0.0002	0.001 ± 0.0002	> 0.05

在腺体头部, 即哈氏腺较窄的部分, 存在大量腔隙结构, “薄细胞”比“厚细胞”多 (图 2b)。在腺体间质可见均质、淡粉色的基质 (图 2b), 以及少量条索状、波浪形的胶原纤维束, 腺体外围可见结缔组织 (图 2d)。

2.3 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性变化

甘肃鼯鼠低氧组和常氧组比较, 随着低氧时程的延长, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性逐渐增强, 雌雄变化趋势一致。低氧 2 h 后, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性升高, 但与常氧组相比没有显著性差异, 低氧 4 ~ 16 h, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性较常氧组显著升高 ($0.01 < P < 0.05$)。在常氧和低氧初期 2 h, 雌雄间超氧

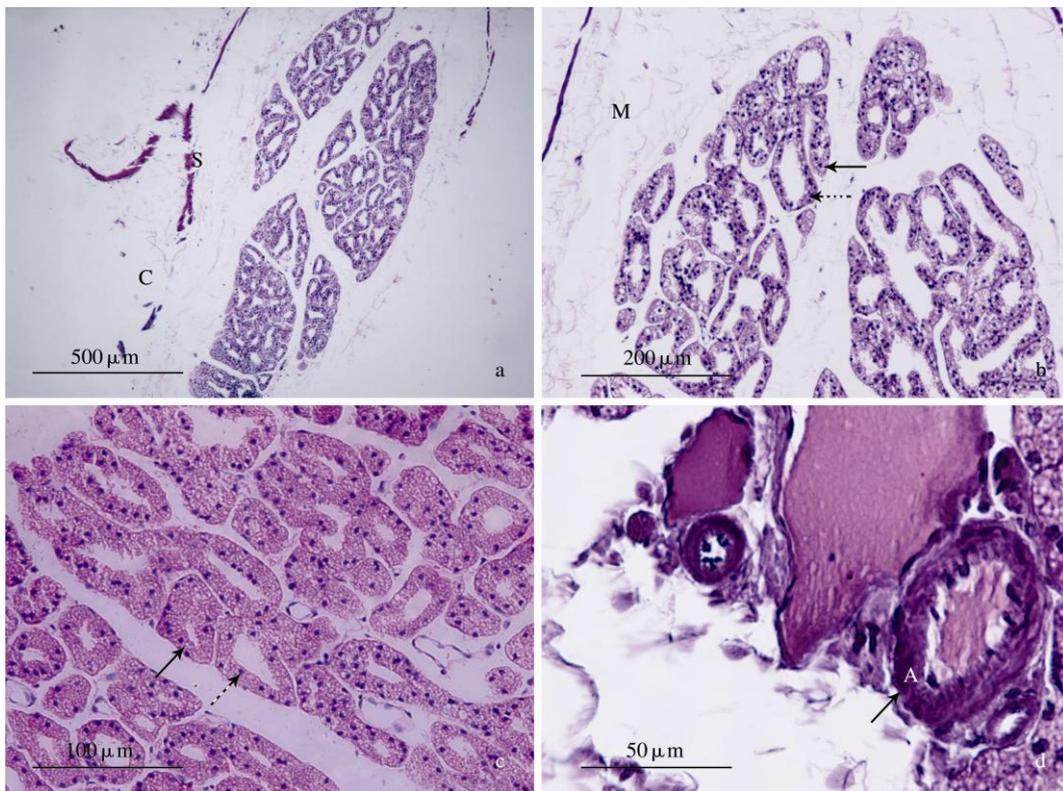


图 2 甘肃鼯鼠哈氏腺的显微结构

Fig. 2 The microstructure of Harderian gland in Gansu Zokor

a. 甘肃鼯鼠哈氏腺切片 (10 ×); b. 甘肃鼯鼠哈氏腺头部, 虚线箭头示“薄细胞”, 实线箭头示“厚细胞” (20 ×); c. 甘肃鼯鼠哈氏腺管腺泡状结构, 虚线箭头示“薄细胞”, 实线箭头示“厚细胞” (30 ×); d. 甘肃鼯鼠哈氏腺泡结构 (40 ×)。

a. A cross-section of the Gansu Zokor whole Harderian gland (10 ×); b. The head of the Harderian gland, the solid arrow represents the thick cell, and the virtual arrow represents the thin cell (20 ×); c. Tubular and vesicular structures of Harderian gland in Gansu Zokor, the solid arrow represents the thick cell, and the virtual arrow represents the thin cell (30 ×); d. Tubular and vesicular structures of Harderian gland in Gansu Zokor (40 ×).

A. 腺泡; C. 网状胶原纤维; M. 基质; S. 平滑肌纤维。A. Acinus; C. Collagenous reticular fibres; M. Matrix; S. Smooth muscle fibres.

化物歧化酶 (SOD) 活性无显著性差异, 4 h 后, 雌性超氧化物歧化酶 (SOD) 活性显著高于雄性 ($0.01 < P < 0.05$)。SD 大鼠低氧 2 h 时超氧化物歧化酶 (SOD) 活性与常氧组无显著差异, 4 h 后超氧化物歧化酶 (SOD) 活性显著升高 ($0.01 < P < 0.05$), 8 h 后死亡, SD 大鼠雌雄间无显著性差异。甘肃鼯鼠和 SD 大鼠相比, 无论是常氧还是低氧状态, 甘肃鼯鼠超氧化物歧化酶 (SOD) 活性始终显著高于 SD 大鼠 ($0.01 < P < 0.05$) (表 2)。

低氧 2 h 后, 甘肃鼯鼠过氧化氢酶 (CAT) 活性降低, 但与常氧组相比没有显著性差异, 低氧 4 h 后, 过氧化氢酶 (CAT) 活性显著升高 ($0.01 < P < 0.05$), 之后趋于稳定; 雌雄间变化趋势一致。在常氧和低氧初期 2 h 甘肃鼯鼠过氧化氢酶 (CAT) 活性雌雄间无显著性差异; 低氧 4 h 后, 雄性过氧化氢酶 (CAT) 活性显著高于雌性 ($0.01 < P < 0.05$)。低氧 2 h 时, SD 大鼠过氧化氢酶 (CAT) 活性较常氧组无显著性变化, 低氧 4 h 后, 过氧化氢酶 (CAT)

活性显著升高 ($0.01 < P < 0.05$), 8 h 后死亡, SD 大鼠雌雄间无显著性差异。甘肃麝鼠和 SD 大鼠相比, 无论是常氧还是低氧应激, 甘肃麝鼠过氧化氢酶 (CAT) 活性始终显著高于 SD 大鼠 ($0.01 < P < 0.05$), 雌性几乎是 SD 大鼠的 5 倍, 雄性可达到 10 倍 (表 2)。

甘肃麝鼠谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性雌雄变化趋势一致。在常氧和低氧 2、4、6 h 时, 谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性变化没有显著性差异, 低氧 8 h 后, 谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性

显著性升高 ($0.01 < P < 0.05$), 雌雄间无显著性差异。SD 大鼠谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性在常氧和低氧 2、4、6 h 后均无显著性变化, 低氧 8 h 后死亡, 雌雄间无显著性差异。不同氧条件下甘肃麝鼠和 SD 大鼠两两相比, 谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性始终显著低于 SD 大鼠 ($0.01 < P < 0.05$) (表 2)。

2.4 丙二醛 (MDA) 含量变化

甘肃麝鼠丙二醛 (MDA) 含量在常氧和低氧 2、4、6、8 h 处理后无显著差异, 低氧 10 h

表 2 甘肃麝鼠与 SD 大鼠超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶活性
(U/mg, 平均值 \pm 标准差, $n = 3$)

Table 2 Activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase
in Gansu Zokor and SD Rat (U/mg, Mean \pm SD, $n = 3$)

	低氧时间(h) Hypoxia time	SD 大鼠 SD Rat		甘肃麝鼠 Gansu Zokor	
		雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase (SOD)	0	59.796 \pm 13.106 ^a	60.832 \pm 6.7960 ^a	89.285 \pm 18.681 ^c	107.85 \pm 17.534 ^c
	2	66.350 \pm 8.175 ^a	60.832 \pm 6.796 ^a	134.371 \pm 15.636 ^c	143.34 \pm 10.742 ^c
	4	90.031 \pm 9.073 ^b	73.348 \pm 11.296 ^b	148.744 \pm 27.478 ^d	300.623 \pm 32.724 ^e
	6	95.738 \pm 15.415 ^b	93.654 \pm 18.860 ^b	171.483 \pm 23.250 ^d	308.814 \pm 28.984 ^e
	8	—	—	198.163 \pm 20.130 ^d	269.561 \pm 32.765 ^e
	10	—	—	223.208 \pm 12.296 ^d	285.878 \pm 25.675 ^e
	16	—	—	231.793 \pm 20.951 ^d	320.592 \pm 34.402 ^e
过氧化氢酶 Catalase (CAT)	0	29.403 \pm 5.043 ^a	20.763 \pm 2.590 ^a	235.243 \pm 33.819 ^c	182.678 \pm 23.936 ^c
	2	23.020 \pm 13.964 ^a	18.826 \pm 4.339 ^a	191.553 \pm 16.606 ^c	166.144 \pm 25.126 ^c
	4	41.593 \pm 8.269 ^b	37.666 \pm 7.853 ^b	526.409 \pm 48.008 ^d	231.256 \pm 23.053 ^e
	6	44.801 \pm 18.305 ^b	48.805 \pm 8.620 ^b	514.029 \pm 59.521 ^d	231.105 \pm 37.529 ^e
	8	—	—	440.130 \pm 35.502 ^d	269.891 \pm 36.791 ^e
	10	—	—	468.072 \pm 23.756 ^d	300.485 \pm 20.593 ^e
	16	—	—	548.272 \pm 74.240 ^d	280.633 \pm 32.207 ^e
谷胱甘肽还原酶 Glutathione reductase (GR)	0	38.954 \pm 4.067 ^a	23.864 \pm 8.837 ^a	12.658 \pm 2.293 ^b	12.557 \pm 1.493 ^b
	2	44.078 \pm 16.327 ^a	41.619 \pm 9.484 ^a	13.968 \pm 4.360 ^b	12.484 \pm 3.927 ^b
	4	31.618 \pm 5.6461 ^a	45.791 \pm 12.489 ^a	14.100 \pm 8.357 ^b	13.723 \pm 5.974 ^b
	6	41.660 \pm 4.125 ^a	36.341 \pm 10.108 ^a	12.890 \pm 1.024 ^b	11.823 \pm 4.190 ^b
	8	—	—	16.151 \pm 2.390 ^c	15.823 \pm 5.633 ^c
	10	—	—	18.009 \pm 4.857 ^c	15.261 \pm 4.223 ^c
	16	—	—	23.713 \pm 4.707 ^c	21.056 \pm 3.315 ^c

每行及每列数据上标字母相同, 表示数据间差异不显著 $P \geq 0.05$, 上标字母不同表示数据间差异显著 ($0.01 < P < 0.05$)。表中“—”表示动物死亡, 无该组数据。

In each row, data sharing the same letter are not significantly different, $P \geq 0.05$, and data sharing the different letters are significantly different, $0.01 < P < 0.05$. The “—” shows the animal death, absence of data.

后, 丙二醛 (MDA) 含量显著增加 ($0.01 < P < 0.05$), 雌雄间无显著差异。随着低氧时程延长, SD 大鼠丙二醛 (MDA) 含量呈上升趋势, 低氧 4 h 后显著性增加 ($0.01 < P < 0.05$), 雌雄间无显著差异, 低氧 8 h 后死亡。甘肃麝鼠和 SD 大鼠相比, 无论是常氧还是低氧状态, SD 大鼠丙二醛 (MDA) 含量始终高于甘肃麝鼠, 并且, 随着低氧时程延长, SD 大鼠 MDA 含量升高速率显著快于 SD 大鼠 ($0.01 < P < 0.05$), 其含量为甘肃麝鼠的 2 倍多 (表 3)。

3 讨论

3.1 甘肃麝鼠哈氏腺解剖学结构

地下鼠常年在地下洞道生活, 具发达的前足爪和门齿, 利于其掘土挖洞及在震动通讯过程中撞击洞壁, 这对眼易产生撞击性伤害, 眼周围包围肥大的哈氏腺, 在一定程度上可以缓冲撞击, 保护眼睛 (Heth et al. 1987, 李金钢等 2001)。盲鼯鼠 (*S. ehrenbergi*) 哈氏腺具性二型, 并且随季节的变化, 其重量会发生变化, 雌性哈氏腺重量小于雄性, 仅在在繁殖季节, 雌性哈氏腺重量接近雄性 (Shanas et al. 1996)。本实验结果表明, 甘肃麝鼠哈氏腺重量在雌雄

间没有显著性差异, 雌性重量略小于雄性, 哈氏腺重量约为体重的千分之一左右。与鼯鼠结果不同, 可能与实验的时间有关, 本实验在 2013 年的 3 ~ 4 月间, 这时甘肃麝鼠进入繁殖期, 可能导致雌雄间没有显著性差异。但甘肃麝鼠哈氏腺重量是否会随着季节发生变化还有待于进一步的研究。

显微结构显示, 甘肃麝鼠哈氏腺不具有真正的管道系统, 腺体内管道是由腺泡合并形成, 腺泡由单层柱状上皮细胞围成囊泡状结构, 与 Shanas 等 (1996) 对盲鼯鼠哈氏腺显微结构的研究结果一致。单层柱状上皮细胞形态不同, 有的细胞内分泌物含量高, 使细胞体积增高而成柱状, 腺泡壁增厚, 称之为“厚细胞”; 有的细胞内分泌物含量少, 细胞体积变小、变低, 呈矮柱状, 腺泡壁变薄, 为“薄细胞”。在腺体不同区域, 这两种细胞均存在。在腺体头部“薄细胞”较多, 这可能与哈氏腺周围分布的肌肉如颞肌、咬肌和皮肤等相关, 这些肌肉不仅对哈氏腺起到牵拉和固定的作用, 同时也有利于哈氏腺分泌物的排出。腺泡内的分泌细胞中存在有大量脂滴, 可分泌到腺体内毛细血管, 最终到达靶器官或组织, 这减少了液体流经管

表 3 SD 大鼠和甘肃麝鼠丙二醛水平 (U/mg, 平均值 ± 标准差, $n = 3$)

Table 3 The comparison of malondialdehyde between Gansu Zokor and SD Rat (U/mg, Mean ± SD, $n = 3$)

低氧时间 (h) Hypoxia time	SD 大鼠 SD Rat		甘肃麝鼠 Gansu Zokor	
	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female
0	20.433 ± 2.747 ^a	18.620 ± 2.258 ^a	11.175 ± 5.427 ^c	12.461 ± 2.600 ^c
2	25.108 ± 2.616 ^a	26.620 ± 6.247 ^a	12.885 ± 3.186 ^c	13.452 ± 2.604 ^c
4	30.980 ± 7.242 ^b	34.916 ± 7.458 ^b	11.464 ± 3.776 ^c	15.306 ± 4.566 ^c
6	48.098 ± 2.118 ^b	43.602 ± 3.048 ^b	13.079 ± 3.475 ^c	16.107 ± 2.778 ^c
8	—	—	12.343 ± 2.981 ^c	16.354 ± 3.911 ^c
10	—	—	18.289 ± 4.730 ^d	16.649 ± 2.740 ^d
16	—	—	20.229 ± 4.988 ^d	16.5514 ± 3.760 ^d

每行及每列数据上标字母相同, 表示数据间差异不显著 $P \geq 0.05$, 上标字母不同表示数据间差异显著 ($0.01 < P < 0.05$)。表中“—”表示动物死亡, 无该组数据。

In each row, data sharing the same letter are not significantly different, $P \geq 0.05$, and data sharing the different letters are significantly different, $0.01 < P < 0.05$. The “—” shows the animal death, absence of data

道产生的压力, 为分泌提供了一个新通路 (Payne 1994)。光线能够破坏哈氏腺结构, 使其上皮细胞鳞状化, 这是由于阳离子自由基、超氧化阴离子以及兴奋的原卟啉IX产生的单态氧引起 (Strum et al. 1982, Pevet et al. 1984), 哈氏腺内脂质小泡组成的分泌细胞, 可分泌大量的原卟啉IX, 其前体物质 δ -氨基乙酰丙酸就参与光反应。另外, 哈氏腺产生的褪黑素可以促进超氧化物歧化酶, 减少 δ -氨基乙酰丙酸的表达, 以提高抗氧化能力 (Pevet et al. 1984), 应对低氧, 同时褪黑素能够解除因原卟啉IX减少产生的自由基 (Hardeland et al. 1995), 促进哺乳动物的谷胱甘肽还原酶 (Barlow-Walden et al. 1995) 等, 利于地下鼠适应低氧环境。

3.2 甘肃鼯鼠和SD大鼠低氧应激后哈氏腺超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽还原酶(GR)的活性变化

正常生理条件下, 机体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生和清除处于动态平衡, 当产生大于清除时, 过多的活性氧会攻击机体, 即氧化应激 (李培峰等 1994, 黄丽英等 2007)。活性氧不仅可氧化损伤DNA, 还可与生物膜上的脂类、蛋白质、糖等物质发生反应而造成机体损伤 (崔剑等 2000)。活性氧具强烈的氧化作用, 使不饱和脂肪酸发生氧化或过氧化, 生成脂质过氧化物, 并降解成丙二醛 (MDA), 所以丙二醛 (MDA) 是反映脂质过氧化 (lipid peroxide, LPO) 水平的有效指标, 是活性氧过量引起氧化损伤的重要标志之一 (李培峰等 1994, Soria-Valles et al. 2010)。能够清除活性氧等自由基的酶称为抗氧化酶, 机体内存在抗氧化酶系统, 主要包括超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、和谷胱甘肽还原酶 (GR), 其中前二者是抗氧化系统中最有代表性的酶 (谭志鑫等 2009)。

本实验中, 甘肃鼯鼠在 6.5% 氧浓度应激可达 16 h 以上, 而 SD 大鼠在低氧 8 h 过程中死亡, 说明甘肃鼯鼠具有极强的低氧应激能力。甘肃鼯鼠在低氧 10 h 内, 丙二醛 (MDA) 水

平无显著变化, 雌雄间亦无差异, 说明机体能够对抗低氧所产生过多的自由基, 有效避免脂质过氧化, 维持机体稳态。这与机体抗氧化酶超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 在低氧应激下活性迅速增加, 及时清除机体低氧下产生的活性氧相关。甘肃鼯鼠超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 的活性在迅速升高后维持在一个稳定水平, 说明机体内自由基水平趋于稳定。在低氧 10 h 时丙二醛 (MDA) 含量呈显著性提高 ($0.01 < P < 0.05$), 可能是长时间脂质过氧化物 (LPO) 产物积累引起, 然后趋于平稳, 达到一个相对平衡。与 SD 大鼠相比, 甘肃鼯鼠丙二醛 (MDA) 含量始终处于低水平, 说明甘肃鼯鼠哈氏腺在抗氧化酶作用下, 较少受到低氧损伤。

甘肃鼯鼠哈氏腺超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性在低氧 4 h 后显著提高, 说明甘肃鼯鼠低氧 4 h 后活性氧产生速率提高, 机体显著增加超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性来清除增加的活性氧, 使机体活性氧达到相对平衡。甘肃鼯鼠哈氏腺超氧化物歧化酶 (SOD) 及过氧化氢酶 (CAT) 活性在低氧 4 h 后雌雄间差异显著, 显示出不同的抗氧化能力。这与鼯鼠的报道相似, 鼯鼠超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性存在着雌雄差异, 雌鼠超氧化物歧化酶 (SOD) 活性明显高于雄鼠, 雌鼠过氧化氢酶 (CAT) 活性明显低于雄鼠, 雌鼠与雄鼠的丙二醛 (MDA) 水平无显著差异 (Schiike et al. 2012)。这可能与地下鼠行为相关, 雌鼠怀孕产仔, 雌鼠与仔共处, 使洞内耗氧量增大, 迫使雌鼠提高酶活性抗低氧, 长期进化, 形成稳定的遗传 (Caballero et al. 2006)。本实验中甘肃鼯鼠哈氏腺的谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性显著低于 SD 大鼠 ($0.01 < P < 0.05$), 说明甘肃鼯鼠哈氏腺中过氧化氢主要靠过氧化氢酶 (CAT) 清除, 谷胱甘肽还原酶 (GR) 的作用处于次要地位, 与地面 SD 大鼠明显不同。

总之, 本研究结果表明, 甘肃鼯鼠哈氏腺是由具有内分泌功能的上皮细胞组成的独立腺体。低氧应激后, 哈氏腺增加超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性有效地清除产生的多余自由基, 避免产生氧化损伤, 谷胱甘肽还原酶(GR)在其抗氧化中不起主要作用。甘肃鼯鼠哈氏腺的抗氧化机制与地面 SD 大鼠不同。

参 考 文 献

- Antolín-González I, Urá H, Tolivia D, et al. 1993. The Harderian gland of the rodent *Octodon degus*: a structural and ultrastructural study. *Tissue and Cell*, 25(1): 129–139.
- Arieli R, Ar A. 1981. Heart rate responses of the mole rat (*Spalax ehrenbergi*) in hypercapnic, hypoxic, and cold conditions. *Physiological Zoology*, 54(1): 14–21.
- Avivi A, Resnick M B, Nevo E, et al. 1999. Adaptive hypoxic tolerance in the subterranean mole rat *Spalax ehrenbergi*: the role of vascular endothelial growth factor. *FEBS Letters*, 452(3): 133–140.
- Balemans M G M, Pevet P, Legerstee W C, et al. 1980. Preliminary investigations on melatonin and 5-methoxytryptophol synthesis in the pineal, retina and Harderian gland of the mole rat and in the pineal of the mouse “eyeless”. *Journal of Neural Transmission*, 49(4): 247–255.
- Barlow-Walden L R, Reiter R J, Abe M, et al. 1995. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochemistry International*, 26(5): 497–502.
- Caballero B, Tomas-Zapico C, Vega-Naredo I, et al. 2006. Antioxidant activity in *Spalax ehrenbergi*: a possible adaptation to underground stress. *Journal of Comparative Physiology: A*, 192(7): 753–759.
- Coto-Montes A, Boga J A, Tomás-Zapico C, et al. 2001. Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland—sex differences in antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(7): 785–792.
- Ellerman J R. 1956. The subterranean mammals of the world. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 35(1): 11–20.
- Freeman B A, Crapo J D. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation: a Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(5): 412–426.
- Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, et al. 1995. On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *Journal of Pineal Research*, 18(2): 104–111.
- Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B. 2003. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiology International*, 20(6): 921–962.
- Heth G, Frankenberger E, Raz A, et al. 1987. Vibrational communication in subterranean mole rats (*Spalax ehrenbergi*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 21(1): 31–33.
- Kennerly T E. 1964. Microenvironmental conditions of the pocket gopher burrow. *Texas Journal of Science*, 16(4): 395–441.
- Kleinschmidt T, Nevo E, Braunitzer G. 1984. The primary structure of the hemoglobin of the mole rat (*Spalax ehrenbergi*, rodentia, chromosome species 60). *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 365(1): 531–538.
- Kuhnen G. 1986. O₂ and CO₂ concentrations in burrows of euthermic and hibernating golden hamsters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 84(3): 517–522.
- Lechner A J. 1977. Metabolic performance during hypoxia in native and acclimated pocket gophers. *Journal of Applied Physiology*, 43(6): 965–970.
- Maclean G S. 1981. Factors influencing the composition of respiratory gases in mammal burrows. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 69(3): 373–380.
- Nevo E. 1979. Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10: 269–308.
- Payne A P. 1994. The Harderian gland: a tercentennial review. *Journal of Anatomy*, 185(1): 1–49.
- Pevet P, Heth G, Hiam A, et al. 1984. Photoperiod perception in the blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*, Nehring): involvement of the Harderian gland, atrophied eyes, and melatonin. *Journal of Experimental Zoology*, 232(1): 41–50.
- Schülke S, Dreidax D, Malik A, et al. 2012. Living with stress: Regulation of antioxidant defense genes in the subterranean,

- hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax*. *Gene*, 500(2): 199–206.
- Shams I, Avivi A, Nevo E. 2005. Oxygen and carbon dioxide fluctuations in burrows of subterranean blind mole rats indicate tolerance to hypoxic-hypercapnic stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 142(3): 376–382.
- Shanas U, Arensburg B, Hammel I, et al. 1996. Quantitative histomorphology of the blind mole rat Harderian gland. *Journal of Anatomy*, 188(2): 341–347.
- Shanas U, Gozlan I, Murawski U, et al. 1998. Identification of main lipid components of mole rat Harderian gland. *Journal of Chemical Ecology*, 24(12): 2181–2193.
- Soria-Valles C, Caballero B, Vega-Naredo I, et al. 2010. Antioxidant responses to variations of oxygen by the Harderian gland of different species of the superspecies *Spalax ehrenbergi*. *Canadian Journal of Zoology*, 88(8): 803–807.
- Strum J M, Shear C R. 1982. Constant light exposure induces damage and squamous metaplasia in Harderian glands of albino mice. *Tissue and Cell*, 14(1): 149–161.
- Turrens J F, Boveris A. 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*, 191(2): 421–427.
- Widmer H R, Hoppeler H, Nevo E, et al. 1997. Working underground: respiratory adaptations in the blind mole rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5): 2062–2067.
- 崔剑, 李兆陇, 洪啸吟. 2000. 自由基生物抗氧化与疾病. *清华大学学报: 自然科学版*, 40(6): 9–12.
- 高媛, 熊晓毅, 谢惠春, 等. 2012. 甘肃鼯鼠与SD大鼠骨骼肌低氧适应的比较. *动物学杂志*, 47(3): 122–128.
- 黄丽英, 翁锡全, 林文弢, 等. 2007. 间歇低氧训练对抗氧化酶系统及其适应能力的影响. *广州体育学院学报*, 27(2): 111–115.
- 李金钢, 王廷正, 何建平, 等. 2001. 甘肃鼯鼠的震动通讯. *兽类学报*, 21(2): 153–154.
- 李培峰, 方允中. 1994. 活性氧对蛋白质的损伤作用. *生命的化学: 中国生物化学会通讯*, 14(6): 1–3.
- 李晓晨, 李娜, 王冬. 2001. 鼯鼠洞道结构的建筑工程学分析. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 29(3): 86–90.
- 李月明. 2007. 甘肃鼯鼠低氧适应研究. 西安: 陕西师范大学硕士学位论文, 15–30.
- 谭志鑫, 肖本见, 廖艳华. 2009. 急性低氧对大鼠微血管反应性及抗氧化酶的影响. *中国应用生理学杂志*, 25(4): 438–471.
- 唐燕红, 王剑, 李金刚, 等. 2013. 低氧应激下甘肃鼯鼠与SD大鼠心脏抗氧化酶和ATP酶活性的比较. *兽类学报*, 33(2): 178–185.
- 谢芬, 李涛, 何建平. 2012. 低氧对甘肃鼯鼠体内ACTH及血液生理指标的影响. *动物学杂志*, 47(5): 119–123.
- 谢惠春, 陈志, 何建平, 等. 2012. 急性低氧应激下甘肃鼯鼠与SD大鼠血清儿茶酚胺类激素含量比较. *动物学杂志*, 47(4): 130–134.
- 严婷婷, 樊魏伟, 何建平. 2012. 低氧耐受对甘肃鼯鼠心肌结构的影响. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 40(2): 62–66.
- 杨静, 李金钢, 何建平, 等. 2006. 甘肃鼯鼠血象及其与低氧适应的关系. *动物学杂志*, 41(2): 112–115.
- 张伟, 张昱. 2004. 不同海拔地区小鼠氧自由基的改变. *青海医学院学报*, 25(3): 178–179.