

荆防颗粒对寒冷刺激诱导小鼠机体损伤的保护作用

赵亚芳¹, 姜雨乔^{1#}, 李郁茹², 程国良¹, 王恩力³, 谭玉军³, 姚景春³, 赵 琰^{1*}, 张贵氏^{3*}

1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

3. 鲁南制药集团股份有限公司, 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276000

摘要: **目的** 研究荆防颗粒对寒冷刺激诱导小鼠机体损伤的保护作用及其作用机制。**方法** 雄性昆明小鼠随机分为对照组、模型组和荆防颗粒高、中、低剂量(16、8、4 g/kg), 每组 8 只。给予相应药物连续干预 7 d, 同时每天进行冰水浴寒冷刺激以建立小鼠机体损伤模型, 每天测定小鼠体质量, 实验结束后测定并计算脏器指数; 观察小鼠耳组织外观和病理损伤程度; 检测血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)活性及三酰甘油(triglycerides, TG)、肌酐(creatinine, CRE)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平; 检测肌肉组织中抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)水平。**结果** 经荆防颗粒干预后, 各组小鼠体质量无显著性差异, 体质量变化较为平稳, 其中荆防颗粒低剂量组小鼠体质量增长较快, 脏器指数无显著差异; 耳组织外观及病理切片结果显示, 小鼠受寒冷刺激诱导的损伤程度减轻; 血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 BUN 水平降低($P<0.05$ 、 0.01); 肌肉组织中 AFP 水平升高($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的机体损伤具有保护作用, 其作用机制与抑制炎症反应、增加 AFP 水平有关。

关键词: 荆防颗粒; 寒冷刺激; 机体损伤; 炎症; 抗冻蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)23-7455-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.23.016

Protective effect of Jingfang Granules on cold-induced injury in mice

ZHAO Ya-fang¹, JIANG Yu-qiao¹, LI Yu-ru², CHENG Guo-liang¹, WANG En-li³, TAN Yu-jun³, YAO Jing-chun³, ZHAO Yan¹, ZHANG Gui-min³

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000, China

Abstract: **Objective** To study the protective effect and mechanism of Jingfang Granules (荆防颗粒) on body injury induced by cold stimulation in mice. **Methods** Male Kunming mice were randomly divided into control group, model group and Jingfang Granules high-, medium- and low-dose (16, 8, 4 g/kg) groups, with eight mice in each group. Mice were given corresponding drugs for 7 d, and body injury model was established by ice water bath for cold stimulation every day. Body weight of mice was measured every day, and organ index was measured and calculated after the experiment; The appearance and pathological damage of ear tissue were observed; The activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and levels of triglycerides (TG), creatinine (CRE), blood urea nitrogen (BUN), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were detected; The level of antifreeze protein (AFP) in muscle tissue was detected. **Results** After Jingfang Granules intervention, there was no significant difference in body weight of mice in each group, and body weight change was relatively stable. The body weight of mice in Jingfang Granules low-

收稿日期: 2022-08-31

基金项目: 荆防颗粒二次开发研究项目(2180071720113)

作者简介: 赵亚芳, 女, 博士研究生。E-mail: zyf2640594023@163.com

*通信作者: 赵 琰(1973—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为经典方剂的配伍与应用。Tel: (010)64286705 E-mail: zhaoyandr@bucm.edu.cn

张贵氏(1969—), 男, 工程硕士, 工程应用研究员, 研究方向为新药研发。Tel: (010)64286705 E-mail: lunanzhangguimin@163.com

#共同第一作者: 姜雨乔, 女, 硕士研究生。E-mail: 838140387@qq.com

dose group was rapidly increased, and organ index had no significant difference; The results of ear tissue appearance and pathological section showed that the degree of injury induced by cold stimulation in mice was reduced; IL-6, IL-1 β , TNF- α and BUN levels in serum were decreased ($P < 0.05, 0.01$); The level of AFP in muscle tissue was increased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Jingfang Granules has protective effect on body injury induced by cold stimulation, and its mechanism is related to inhibition of inflammatory reaction and increasing of AFP level.

Key words: Jingfang Granules; cold stimulation; body injury; inflammation; antifreeze protein

现代医学认为寒冷是一种常见的应激原, 流行病学结果表明, 寒冷会对人体的生理和代谢产生不良影响。寒冷刺激程度过强或持续时间过长则导致机体的异常反应, 轻者会引起躯体冻伤, 重者不仅会出现感觉障碍, 同时还可能造成心、脑、肺脏、心血管系统、中枢神经系统、泌尿系统等多脏器、多系统的损伤, 甚至危及作业者的生命安全。同时增加了风湿类疾病、心脑血管疾病发生的风险^[1]。因此, 对于寒冷刺激致机体损伤机制的研究以及预防和改善措施一直是研究特殊自然环境的医学领域持续关注和亟待解决的重要课题, 对于保障人民的身体健康和生活质量具有重要意义。

荆防颗粒^[2-4]是根据古代经典名方荆防败毒散, 采用现代制药工艺提取、加工、浓缩制成的中成药颗粒制剂, 是源于经典、遵古守方的现代中成药典范。荆防败毒散方剂的使用距今已 400 多年, 对后世影响深远, 沿用至今。荆防颗粒制剂的生产销售也已达 30 多年, 其可靠的疗效和安全性被临床实践反复验证, 该方具有发汗解表、散风祛湿之功效, 是临床中常用于治疗风寒侵袭所致类病的辛温之剂。荆防颗粒由提取物浸膏和大量辅料组成, 为避免添加辅料对实验的影响, 本研究以荆防颗粒浸膏为研究对象, 采用冰水浴建立寒冷刺激诱导的小鼠机体损伤模型, 评价荆防颗粒浸膏对寒冷刺激诱导机体损伤的保护作用, 并通过检测血清中炎症因子、肌肉组织中抗冻蛋白 (antifreeze protein, AFP) 的水平初步探究其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性昆明小鼠 40 只, 体质量 (35 $\pm$ 2) g, 7 周龄, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 合格证号 SYXK(京)2020-0033。动物饲养于湿度 55%~65%、温度 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 、昼夜节律 12/12 h 的条件下, 自由进食饮水。动物实验经北京中医药大学动物实验伦理委员会批准 (批准号 BUCM-4-2021052802-2044)。

1.2 药品与试剂

荆防颗粒浸膏 (批号 80022202002) 由鲁南制药集团股份有限公司提供; 小鼠 AFP ELISA 试剂盒 (批号 07/2021) 购自上海江莱生物科技有限公司; 小鼠白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (批号 L210701101)、IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 L210520738)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 L21064727) 购自武汉云克隆科技股份有限公司; 本实验用水均为去离子水。

1.3 仪器

SYD-B-F 型石蜡包埋机 (沈阳誉德电子仪器有限公司); RM2016 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司); Eclipse Ti-SR 型倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); AU-480 型全自动生化分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

小鼠适应性饲养 3 d, 随机分为对照组、模型组和荆防颗粒高、中、低剂量 (16、8、4 g/kg, 分别相当于临床剂量的 2、1、0.5 倍), 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的去离子水, 1 次/d, 连续 7 d。参考文献方法^[5]建立寒冷刺激诱导的机体损伤模型, 每次药物干预 2 h 后, 将动物置于冰水浴 (0 $^{\circ}\text{C}$) 中 5 min, 取出后用吹风机吹干, 连续 7 d, 最后 1 次冰水浴结束后取材, 实验前 12 h 禁食不禁水。实验过程中每天定时记录小鼠体质量。

2.2 小鼠脏器指数测定

各组小鼠摘眼球取血后, 脱颈椎处死, 迅速摘取心、肺并称定质量, 计算脏器指数。

脏器指数 = 脏器质量 / 体质量

2.3 耳组织外观形态及病理学观察

取各组小鼠双耳组织, 拍照观察其损伤程度; 剪取同一区域的耳组织, 置入 4% 多聚甲醛中性固定液固定 24 h, 乙醇梯度脱水后进行石蜡包埋与苏

木素-伊红(HE)染色,于光学显微镜下观察耳组织病理变化。

2.4 血清中炎症因子及生化指标检测

取各组小鼠全血,室温静置 2 h, 3000 r/min 离心 15 min 后收集血清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平,通过全自动血清生化分析仪测定血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)活性及三酰甘油(triglycerides, TG)、肌酐(creatinine, CRE)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)水平。

2.5 肌肉组织 AFP 水平测定

剪取各组小鼠大腿两侧肌肉组织, PBS 缓冲液冲洗后,用滤纸吸干表面水分,置于 10 mL 的离心管中,加入 9 倍量 PBS 缓冲液,制备组织匀浆,5000 r/min 离心 10 min 后取上清液,按 ELISA 试剂盒说明书测定肌肉组织中 AFP 水平。

2.6 统计方法

采用 SPSS 20.0 统计软件分析,所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用方差分析。单因素 ANOVA 分析方法用于实验数据服从正态分布,同时方差齐,组间差异则运用 LSD 方法统计。

3 结果

3.1 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠体质量变化的影响

如图 1 所示,各组小鼠体质量无统计学差异。荆防颗粒高、中剂量组小鼠体质量增长较为缓慢,而荆防颗粒低剂量组小鼠体质量增长较为迅速,且荆防颗粒组较对照组体质量变化较为平稳。

3.2 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠脏器指数的影响

在寒冷应激条件下,心、肺等重要脏器的核心体温必须经常维持在 37.2 $^{\circ}\text{C}$,对于保证人体正常的生化反应具有重要作用。脏器指数可客观反映相关脏器的功能,是实验动物重要的生物学指标之一^[6]。

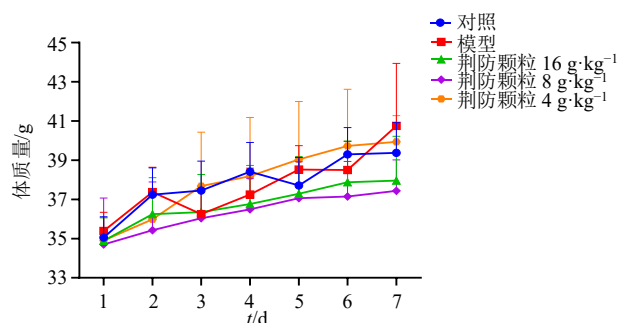


图 1 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of Jingfang Granules on body weight of mice stimulated by cold ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

如表 1 所示,各组小鼠心、肺脏器指数无显著性差异,表明寒冷刺激对小鼠心、肺脏器指数的影响并不显著。

3.3 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠耳组织外观形态及病理变化的影响

小鼠的耳组织几乎无被毛覆盖,主要由软骨组织构成,在受到刺激时容易造成损伤,且容易被观察。如图 2 所示,模型组小鼠耳尖出现糜烂、出血,局部血管扩张,病灶边界清楚。与模型组比较,给予荆防颗粒后,小鼠耳部冻伤症状均有不同程度减轻。表明荆防颗粒减轻了寒冷刺激诱导的小鼠耳组织损伤程度。

如图 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠耳组织有明显水肿,组织壁增厚,细胞间质大量炎性细

表 1 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Jingfang Granules on organ indexes of mice stimulated by cold ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	心指数/%	肺指数/%
对照	—	0.40 ± 0.06	0.45 ± 0.04
模型	—	0.42 ± 0.06	0.44 ± 0.05
荆防颗粒	16	0.43 ± 0.07	0.49 ± 0.08
	8	0.46 ± 0.10	0.49 ± 0.06
	4	0.47 ± 0.05	0.52 ± 0.02



图 2 各组小鼠耳组织外观形态图

Fig. 2 Appearance and morphology of ear tissue of mice in each group

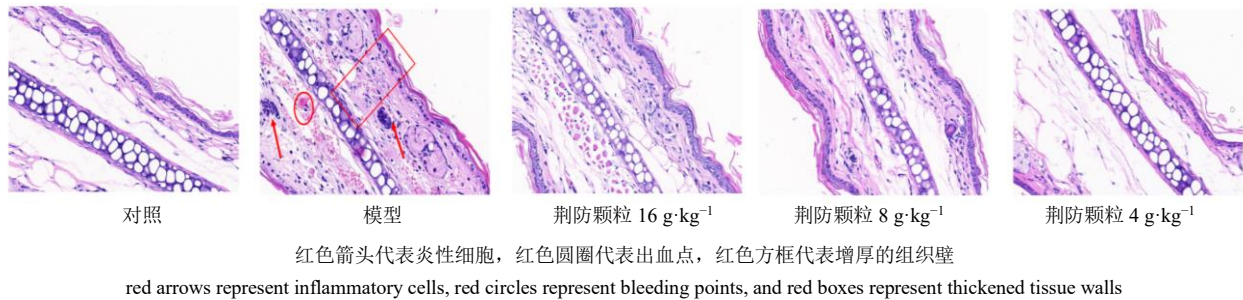


图 3 各组小鼠耳组织病理切片图 (HE, ×200)

Fig. 3 Histopathological sections of ear tissue of mice in each group (HE, × 200)

胞浸润, 且有明显的微灶出血。给予荆防颗粒后, 小鼠耳组织炎症、水肿以及出血等病理损伤情况均有不同程度的改善, 表明荆防颗粒可以通过减轻寒冷对耳组织造成的刺激从而保护耳组织, 其中荆防颗粒低剂量组效果最好。

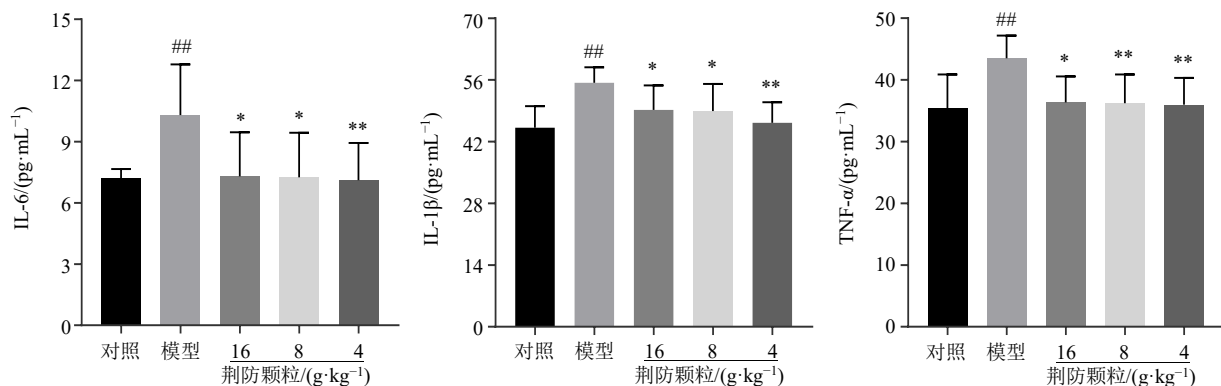
3.4 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠血清中炎症因子水平的影响

在寒冷刺激状态下机体会出现炎症反应, 如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型

组比较, 各给药组小鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。表明荆防颗粒能够减轻寒冷导致的炎症性损伤, 且各剂量的荆防颗粒抑制炎症损伤的作用相当。

3.5 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠血清中 ALT、AST 活性及 TG、BUN、CRE 水平的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 BUN 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 荆防颗粒低剂量组小鼠血清中 BUN 水平显著降低 ($P < 0.05$), 其余指标各组之间均无明显差异。



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figure

图 4 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠血清中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Fig. 4 Effect of Jingfang Granules on IL-6, IL-1 β and TNF- α levels in serum of mice stimulated by cold ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)表 2 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠血清中 ALT、AST 活性及 TG、BUN、CRE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Table 2 Effect of Jingfang Granules on ALT, AST activities and TG, BUN, CRE levels in serum of mice stimulated by cold ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TG/(U·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	CRE/(μ mol·L ⁻¹)
对照	—	43.88 $\pm$ 11.43	146.08 $\pm$ 28.03	3.23 $\pm$ 1.05	11.44 $\pm$ 1.13	8.60 $\pm$ 6.07
模型	—	38.89 $\pm$ 6.57	124.58 $\pm$ 22.96	1.99 $\pm$ 0.46	10.16 $\pm$ 0.99 [#]	7.28 $\pm$ 4.82
荆防颗粒	16	42.00 $\pm$ 12.08	148.63 $\pm$ 26.28	3.34 $\pm$ 1.94	10.78 $\pm$ 1.60	8.51 $\pm$ 3.32
	8	44.43 $\pm$ 10.20	121.40 $\pm$ 20.69	2.31 $\pm$ 0.73	9.40 $\pm$ 0.95	7.94 $\pm$ 3.84
	4	41.17 $\pm$ 11.60	145.07 $\pm$ 21.17	1.93 $\pm$ 0.84	8.60 $\pm$ 1.32*	6.89 $\pm$ 2.89

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

3.6 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠肌肉组织中 AFP 水平的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠肌肉组织中 AFP 水平显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肌肉组织中 AFP 水平均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。

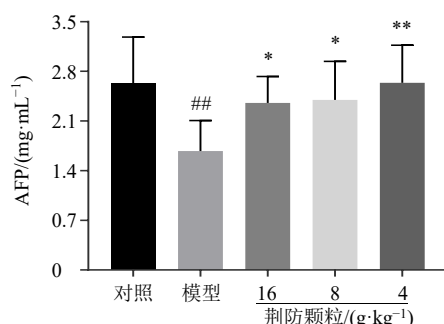


图 5 荆防颗粒对寒冷刺激诱导的小鼠肌肉组织中 AFP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 5 Effect of Jingfang Granules on AFP level in muscle tissue of mice stimulated by cold ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

4 讨论

荆防败毒散应用历史悠久,临床记载颇多。该方味辛性平,处方严谨。方中荆芥辛温,气味芳香质轻透散,驱肌肤风寒之邪,防风辛温而甘,散骨肉风寒之痹,2药相伍共散表里之邪;羌活、独活皆为辛温之品,羌活入太阳之经,善透游走之风;独活入少阴之脉,能移入里之寒,4药相伍则内外动静之邪可除,上4味共为主药。茯苓、甘草补气健脾,使水湿得化,正气得充。桔梗、枳壳、前胡、柴胡使气血畅行无阻。生姜助以解表,薄荷防邪化热,共为使药^[7]。全方合用共奏驱风散寒、宣疏解表之功。全方之气又以“平”性为主,“平而不凡,卓而有度”,拓宽了该方的临床适应证和受众人群。因此荆防败毒散具有巨大的临床潜在应用价值。荆防颗粒作为荆防败毒散的中成药颗粒制剂,在临床中应用广泛,其简便、易于保存和运输,本研究选用荆防颗粒浸膏探讨其对寒冷刺激致小鼠机体损伤的保护作用来拓展荆防颗粒的临床应用。

本研究中各组小鼠的体质量变化无显著性差异,但荆防颗粒组的小鼠体质量变化较为平稳,可能的原因为荆防颗粒能够减少寒冷对小鼠的刺激从而使其体质量波动不大,同时荆防颗粒低剂量组小鼠体质量增长迅速也提示该剂量的药物能更好地帮助小鼠抵抗寒冷的刺激,对小鼠进食饮水的状况影响较小,更加有利于体质量的稳定增长。而心、肺

对于维持人的核心体温,保证机体的生理生化反应以及进行正常的神经传导具有重要作用^[1],各组小鼠心、肺脏器指数无显著性差异,表明寒冷刺激对心、肺脏器的影响不大。

寒冷刺激会造成机体损伤,同时在复温和复冻过程中会引起组织充血水肿,甚至糜烂坏死,同时血管的收缩和舒张会损伤内皮,造成血栓加剧组织损伤的程度^[8-10]。小鼠耳组织外观形态及病理切片结果表明荆防颗粒可以明显改善寒冷刺激造成的组织损伤,具有保护作用。正常生理情况下,人体处于炎症与抗炎动态平衡状态,而在寒冷应激时,促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高。在艾叶炭抗冻能力研究中,小鼠冰水浴后血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平显著升高^[5];同时有研究证实寒冷刺激会增加血清中 IL-6、TNF- α 的水平^[11]。本研究结果显示,模型组小鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平明显高于对照组,而荆防颗粒各剂量组小鼠血清中炎症因子水平显著降低。表明荆防颗粒可以减轻小鼠寒冷应激过程中的炎症反应,减少寒冷刺激对机体的损伤。

动物在受到寒冷应激后,生理代谢过程有机地发生变化。氧化过程加强,产热增加,某些蛋白质也被分解供能^[12],由于 ALT 和 AST 参与机体内转氨基作用,可反映蛋白质合成和分解代谢的状况。BUN 是蛋白质代谢后产生的废物,机体内蛋白质代谢良好则血清中 BUN 含量降低;反之则升高^[13]。而 CRE 代表蛋白质被分解的程度,含量越高,蛋白质被分解得越多^[14]。TG 的水平则反映脂质代谢的情况。本研究结果发现经过冷刺激后小鼠血清中 ALT、AST 活性及 TG、BUN、CRE 水平降低,表明在寒冷刺激条件下,小鼠体内某些蛋白质和脂质的分解减少,同时代谢产物减少,经过荆防颗粒干预后,高剂量的荆防颗粒可增加蛋白质和脂质的分解供能。

AFP 是生物体为抵御低温冻害而进化出的一类蛋白质,是一种高效的生物抗冻剂^[15-16],最初被应用于保存食品或生物标本^[17],后逐渐应用于生物学领域。有研究报道在寒冷或冰冻环境中的生物体内 AFP 含量丰富,这些蛋白质以非依从性方式减少寒冷引起的损伤^[18-19]。AFP 与细胞膜相互作用,稳定细胞膜结构和细胞功能,能够有效地防止细胞在冷冻解冻中的损伤^[20]。研究发现 AFP 转基因小鼠的抗寒能力强于非转基因小鼠^[21],表明 AFP 有助于生

物体抵御寒冷刺激。肌肉在寒冷应激中具有重要作用^[22],本研究测定了肌肉组织中 AFP 水平,发现与对照组比较,模型组小鼠肌肉组织中 AFP 水平显著降低,给予荆防颗粒干预后,AFP 水平显著升高。提示荆防颗粒可以通过促进小鼠 AFP 表达发挥保护作用,且低剂量荆防颗粒保护作用最佳。

本研究发现荆防颗粒对寒冷诱导的机体损伤具有很好的保护作用,并初步探讨其发挥药效的可能作用机制。此研究尊古而又拓古,临床可将此方进行预防性给药减轻寒冷导致的机体损伤。同时荆防败毒散因其轻巧透散、药性平和,临床适用人群广泛。因此,本研究为拓宽荆防败毒散的临床应用提供了实验依据,对指导临床用药具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 毕娜,刘玉莹,张绍敏,等.冷环境对野外作业人员的影响及防护对策[J].解放军护理杂志,2003,20(2):47-48.
- [2] 梁红宝,姜宇,袁晓梅,等.基于 GC-MS 和 UPLC-Q-Exactive MS 技术的荆防颗粒化学成分研究[J].中草药,2022,53(6):1697-1708.
- [3] 董利洋,程国良,姚景春,等.荆防颗粒对异丙肾上腺素诱导大鼠急性心肌梗死的保护作用研究[J].中草药,2022,53(21):6785-6794.
- [4] 曹天佑,屈会化,董利洋,等.荆防颗粒对马兜铃酸 I 致小鼠急性肾损伤的预防和保护作用研究[J].中草药,2022,53(18):5742-5749.
- [5] Kong H, Zhao Y S, Zhu Y F, et al. Carbon dots from *Artemisiae Argyi Folium Carbonisata*: Strengthening the anti-frostbite ability [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2021, 49(1): 11-19.
- [6] Storey K B, Storey J M. Molecular biology of freezing tolerance [J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(3): 1283-1308.
- [7] 李富育,张灵,赵久定.荆防败毒散治疗羊风寒感冒夹湿症[J].中兽医学杂志,2000(1):23-24.
- [8] Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells [J]. *Fed Proc*, 1965, 24: S175-S182.
- [9] Hegggers J P, Robson M C, Manavalen K, et al. Experimental and clinical observations on frostbite [J]. *Ann Emerg Med*, 1987, 16(9): 1056-1062.
- [10] Washburn B. Frostbite: what it is: How to prevent it: Emergency treatment [J]. *N Engl J Med*, 1962, 266: 974-989.
- [11] 赵丹丹. 纳米炭黑颗粒复合冷刺激对小鼠呼吸系统及机体能量代谢的影响 [D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2018.
- [12] Beneke S, Rooney S A. Glucocorticoids regulate expression of the fatty acid synthase gene in fetal rat type II cells [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Biol Lipids*, 2001, 1534(1): 56-63.
- [13] 周玉香,吕玉玲,王洁,等.血液生化指标在动物生产与营养调控研究中的应用概况[J].畜牧与饲料科学,2012,33(S1):72-74.
- [14] 宋荣渊,王洪荣,王欢莉,等.不同能氮同步化释放日粮对泌乳奶牛生产性能和血液生化指标的影响[J].饲料工业,2010,31(23):38-40.
- [15] DeVries A L, Wohlschlag D E. Freezing resistance in some Antarctic fishes [J]. *Science*, 1969, 163(3871): 1073-1075.
- [16] Graether S P, Kuiper M J, Gagné S M, et al. Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect [J]. *Nature*, 2000, 406(6793): 325-328.
- [17] Rodway G W, McIntosh S E, Askew E W. Bradford Washburn's 1962 NEJM article "Frostbite: What it is-how to prevent it-emergency treatment": Historical background and commentary [J]. *Wilderness Environ Med*, 2011, 22(2): 177-181.
- [18] Patel S N, Graether S P. Structures and ice-binding faces of the alanine-rich type I antifreeze proteins [J]. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88(2): 223-229.
- [19] Venketesh S, Dayananda C. Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2008, 28(1): 57-82.
- [20] Tomczak M M, Hinch D K, Estrada S D, et al. A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein [J]. *Biophys J*, 2002, 82(2): 874-881.
- [21] Heisig M, Mattessich S, Rembisz A, et al. Frostbite protection in mice expressing an antifreeze glycoprotein [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116562.
- [22] Shi H Z, Yao R Z, Lian S, et al. Regulating glycolysis, the TLR4 signal pathway and expression of RBM3 in mouse liver in response to acute cold exposure [J]. *Stress*, 2019, 22(3): 366-376.

[责任编辑 李亚楠]