

人工诱导冬眠对中华蟾蜍血液和组织中 宏量营养素的影响

崔弘 蔡善鑫[#] 路丹 李鹤 彭双 国奥 李秀国^{*}

延边大学医学院 吉林延吉 133002

摘要: 为探寻冬眠期间两栖动物血液和组织中宏量营养素的适应性改变过程, 经人工诱导冬眠, 检测了中华蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 在冬眠第 1、3、7、14、28、42、56 天的体重和脏器指数, 以及血液、心、肝和骨骼肌组织中宏量营养素的含量。结果显示: 1) 冬眠期间中华蟾蜍体重未出现显著性变化, 无性别差异。雄性蟾蜍的心、肝和腓肠肌的脏器指数显著性大于雌性 ($P < 0.01$), 但同一性别的脏器指数在冬眠期间无显著性变化。2) 血中葡萄糖浓度自冬眠第 42 天起显著下降 ($P < 0.01$); 总蛋白在冬眠后第 56 天显著降低 ($P < 0.05$), 总胆固醇变化不显著。血中宏量营养素无性别差异。3) 肝糖原自冬眠第 42 天起显著下降 ($P < 0.01$), 肌糖原自冬眠第 1 天起显著性下降 ($P < 0.05$), 而骨骼肌和心肌组织蛋白含量无显著变化。组织中宏量营养素无性别差异。人工诱导冬眠条件下, 中华蟾蜍血液和组织中的糖类含量先迅速下降, 血液中的蛋白成分只在深眠时才显著减少, 但血液和组织中的宏量营养素水平可在 1 个月内维持稳定, 这可能是其适应冬眠的主要生理学机制之一。

关键词: 人工冬眠; 血液; 组织; 宏量营养素; 中华蟾蜍

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 06-1018-09

Effects of Artificially Induced Hibernation on the Macronutrients in Blood and Tissues in Asiatic Toads, *Bufo gargarizans*

CUI Hong CAI Shan-Xin[#] LU Dan LI He PENG Shuang GUO Ao LI Xiu-Guo^{*}

College of Medicine, Yanbian University, Yanji, Jilin Province 133002, China

Abstract: To investigate the effects of artificially induced hibernation on the consumption of macronutrients in the blood and tissues in Asiatic Toads, *Bufo gargarizans*, hibernation was artificially induced for 56 days, and the body mass, organic indexes of heart, liver and gastrocnemius muscle, as well as the concentrations of glucose, total protein and total cholesterol in blood, the contents of glycogen in the hepatic tissue and skeletal muscle, and protein in the skeletal muscle and myocardium were measured on the day before hibernation and

基金项目 延边大学 2016 年大学生创新创业训练计划项目暨第八届本科生科研项目省级 (校定) 研究课题 (No. ydbksky2016465);

***** 通讯作者, E-mail: lixg@ybu.edu.cn;

第一作者介绍 崔弘, 女, 博士; 研究方向: 病理生理学和动物实验方法; E-mail: cuihong@ybu.edu.cn;

共同第一作者介绍 蔡善鑫, 女, 本科生; 研究方向: 动物实验方法; E-mail: 1340573174@qq.com.

收稿日期: 2015-12-14, 修回日期: 2016-05-04 DOI: 10.13859/j.cjz.201606010

the day of 1, 3, 7, 14, 28, 42 and 56 post hibernation. Results showed that, compared with the pre-hibernation, the body mass did not change significantly during hibernation, and there was not significant sexual difference (Plot a1 and a2 in Fig. 1). The organic indexes of the heart, liver and gastrocnemius muscle in male toads were significantly higher than those in females ($P < 0.01$) (Plot b2, c2 and d2 in Fig. 1), while both the males and females showed no significant change in organic indexes during hibernation (Plot b3, c3 and d3 in Fig. 1). The blood glucose concentration decreased significantly after day 42 ($P < 0.01$) (Plot a1 in Fig. 2), the concentration of total protein decreased significantly ($P < 0.05$) on day 56 (Plot b1 in Fig. 2), but total cholesterol did not change significantly (Plot c1 in Fig. 2). The blood macronutrients did not show significant sexual difference (Plot a2, b2 and c2 in Fig. 2). The hepatic glycogen decreased significantly after day 42 of hibernation ($P < 0.01$) (Plot a1 in Fig. 3), and the muscular glycogen decreased significantly after day 1 ($P < 0.05$) (Plot b1 in Fig. 3), but the protein contents in the skeletal muscle and myocardium did not show significant differences (Plot c1 and d1 in Fig. 3). The tissue macronutrients showed no significant sexual difference (Plot a2, b2, c2 and d2 in Fig. 3). The contents of carbohydrate in the blood and tissue decreased first, and the blood protein decreased significantly only after deep hibernation, but the macronutrients in the blood and tissue could keep a relatively stable state within 1 month. It might be one of the major physiological mechanisms to adapt to hibernation in toads.

Key words: Artificial hibernation; Blood; Tissue; Macronutrients; Asiatic Toads, *Bufo gargarizans*

由于蟾蜍机体的生理特性与人类 (*Homo sapiens*) 相似, 使其经常被作为实验动物应用于心血管、运动系统、泌尿生殖和感觉系统等方面的研究 (Burggren et al. 2007, Coble et al. 2011, 夏敏等 2012, Yao et al. 2014)。不同于哺乳动物, 蟾蜍饲养条件特殊, 普通实验室饲养困难, 现在教学科研多使用野生动物。动物使用量较大时, 野外捕捉难以保证动物个体间的生理状态和体重的均衡, 从而限制了它作为实验动物在更广泛科研领域中的应用。蟾蜍作为变温动物具有冬眠特性。在食物缺乏的冬季低温环境中, 蟾蜍机体通过适应季节的表型可塑性变化, 降低代谢和减少活动, 从而保证有效地利用自身能源储备越冬。组织器官比较发现, 冬季末期安第斯刺蟾 (*Bufo spinulosus*) 的胃、小肠、肝、脂肪体等较冬眠前不同程度变小, 但心、肺和大肠等无明显变化 (Naya et al. 2009); 春季冬眠后的黑斑侧褶蛙 (*Pelophylax nigromaculata*) 肝和脂肪体也较秋季冬眠前明显变小, 心和肾无明显变化 (金晨晨等 2014); 4 月份出眠时的中华蟾蜍 (*B.*

gargarizans) 肝和脂肪体指数也较 12 月份冬眠初期明显变小 (史双鸽等 2014); 11 月下旬冬眠初期肝细胞中堆积的大量糖原颗粒在次年 3 月出眠时减少或几乎消失, 但线粒体的数量、细胞核和胆小管的形态结构均无明显差异 (米志平等 2000)。在生理生化方面, 冬眠后期安第斯刺蟾消化道的麦芽糖酶、海藻糖酶和氨肽酶 N 等水解酶的活性较冬眠前明显降低, 小肠管壁变薄, 代谢率降到 7.8%; 中华蟾蜍的肝糖原和肌糖原在冬眠过程中(11 月至次年的 2 月) 逐渐下降 (冯照军等 2007), 血清总蛋白和白蛋白含量也呈下降趋势 (于洪川等 2006)。生物体的能量来自被称为宏量营养素 (macronutrients) 的糖、脂肪和蛋白质三大营养素的分解氧化 (高永清等 2008)。机体所需能量主要由体内的糖类提供, 其次是脂肪, 蛋白质分解氧化提供的能量仅占总能量的 18% (刘新光等 2007)。低温冬眠条件下, 营养成分摄入中断, 只能通过动物体内宏量营养素代谢提供维持机体生命活动的能量。研究冬眠条件下蟾蜍机体的宏量营养素变化对认识其低温生物

学特点,并在科研中对其有效合理应用具有重要意义。为此,本文通过检测人工诱导冬眠 56 d 内的中华蟾蜍血液和重要脏器组织中糖、蛋白质和脂类等变化,研究冬眠对蟾蜍血液和组织中宏量营养素的影响。同时,为了研究冬眠蟾蜍的脏器指数与相应脏器组织的宏量营养素水平变化趋势相关性,检测了心、肝和腓肠肌的脏器指数。

1 材料与方法

1.1 实验动物的采集

实验用中华蟾蜍 48 只于 2014 年 10 月末捕自吉林省长春市九台区郊外(北纬 44°04'12.00", 东经 125°42'0"),雌雄各半,体重(68.97 ± 2.02) g。实验各项指标检测从 2014 年 11 月 6 日开始,到 2015 年 1 月 8 日结束。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 前期研究已经发现人工冬眠蟾蜍的心和骨骼肌的收缩功能以及坐骨神经的电生理功能在 60 日内未出现明显改变(李秀国等 2013)。为了进一步证实作为产能物质的血液和相应组织中宏量营养素在相同时期内的变化趋势,本研究设计了 56 d 的观察期限。蟾蜍随机分为正常对照组和 7 个实验组(低温冬眠后第 1、3、7、14、28、42、56 天),每组 6 只。实验动物盒中加入少量水,使环境温度/相对湿度维持在 20 ~ 23°C/38% ~ 44%(用电子干湿温度计在距盒底面 15 cm 处测得)。适应 2 d 后,正常组称重,采取血液和组织标本。为了诱导蟾蜍低温冬眠,参照文献(Naya et al. 2009, 李秀国等 2013),实验组蟾蜍移到冰箱中冷藏,使其温度/相对湿度维持在 3 ~ 5°C/75% ~ 85%。整个实验过程中每隔 2 d 换水 1 次。为了检测冬眠蟾蜍在适应室温后的各项生理生化功能,冬眠蟾蜍称重取样前移到室温环境中放置 12 h 以上。

1.2.2 取样 采血前将蟾蜍洗净,用清洁纱布充分吸去皮肤水分后,称重。粗剪刀的一侧页片插入蟾蜍口腔,将蟾蜍头部经双侧耳后腺后

横向剪去,用含有肝素的 1.5 ml 离心管采取颈动脉血 1 ml。文献中多采用经麻醉或毁脑毁髓后,心穿刺采血(Iimori et al. 2005, 张红梅 2009)。这种方法的缺陷是血液采集量少,不适用于用同一蟾蜍血液检测多项指标。本实验采用的方法类似小鼠(*Mus musculus domesticus*)断头取血,能够使蟾蜍瞬间出现去大脑强直致全身骨骼肌收缩,在短时间内既能获取 1 ml(体重 60 g 左右)以上血液,且能够最大限度减少蟾蜍临终前痛苦。样本在离心机上以 6 000 r/min 离心 5 min,取上层血浆,在 -20°C 冰箱中冷冻,以备检测血糖、总蛋白和总胆固醇浓度。取心、肝、左侧腓肠肌,0.9%生理盐水洗净,滤纸吸干后,称重,计算脏器指数。取肝左叶和左侧股二头肌肌腹各 70 ~ 80 mg,心室和左侧股三头肌肌腹各 500 mg 左右,0.9%生理盐水漂洗,滤纸吸干,冷冻保存,留测肝糖原、肌糖原和组织蛋白含量。

1.2.3 测定指标 血浆和组织标本在室温解冻,组织标本用 DY89-II 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技有限公司)在冰盐水中研匀。根据试剂盒说明书,利用 V-580 分光光度计(上海元析仪器有限公司),葡萄糖氧化酶法测定血糖浓度,考马斯亮蓝法测定血浆和股三头肌的蛋白含量,葱酮比色定糖法测定肝糖原和肌糖原含量,COD-PAP 法测定血浆总胆固醇浓度。葡萄糖测定试剂盒(货号: M010)、肝/肌糖原测定试剂盒(货号: A043)和蛋白测定试剂盒(货号: A045-2)均购于南京建成生物工程有限公司,总胆固醇测定试剂盒(货号: K074)购于长春汇力生物技术有限公司。

1.3 统计方法

所得数据均用 SPSS 12.0 统计学软件进行数据处理,以平均值 ± 标准误(Mean ± SE)表示。脏器指数是以组织器官的重量除以体重后乘以 100,得到的组织器官相对重量(%)。体重采用以性别和组别为固定因素的双因素方差分析(Two-Way ANOVA),脏器指数和其他指标采用以性别和组别为固定因素,体重为

协变量的双因素协方差分析 (Two-Way ANCOVA)。若指标有性别差异, 则进一步对单一性别进行以组别为固定因素, 体重为协变量的单因素协方差分析 (One-Way ANCOVA)。组间比较采用了 LSD t 检验, $P < 0.05$ 判定具有显著性差异。

2 结果

2.1 人工诱导冬眠前后的蟾蜍体重和脏器指数的变化

冬眠前后蟾蜍体重和脏器指数检测结果见图 1。在冬眠 56 d 内, 蟾蜍体重未出现显著性变化 ($F_{7,39} = 0.893$, $P > 0.05$, 图 1a1), 无性别差异 ($F_{1,39} = 3.652$, $P > 0.05$, 图 1a2)。心、肝和腓肠肌的脏器指数也无显著性变化 (心 $F_{7,38} = 1.316$, $P > 0.05$, 图 1b1; 肝 $F_{7,38} = 2.041$, $P > 0.05$, 图 1c1; 腓肠肌 $F_{7,38} = 0.833$, $P > 0.05$, 图 1d1), 但雄性的脏器指数显著性大于雌性 (心 $F_{1,38} = 13.885$, $P < 0.01$; 肝 $F_{1,38} = 22.235$, $P < 0.01$; 腓肠肌 $F_{1,38} = 30.00$, $P < 0.01$, 图 1b2、1c2 和 1d2)。按性别分别比较, 心、肝和腓肠肌冬眠期间脏器指数在雄性 (心 $F_{7,15} = 0.718$, $P > 0.05$; 肝 $F_{7,15} = 0.749$, $P > 0.05$; 腓肠肌 $F_{7,15} = 0.811$, $P > 0.05$) 和雌性 (心 $F_{7,15} = 0.666$, $P > 0.05$; 肝 $F_{7,15} = 1.260$, $P > 0.05$; 腓肠肌 $F_{7,15} = 0.349$, $P > 0.05$) 中均无显著性变化 (图 1b3、1c3 和 1d3)。

2.2 人工诱导冬眠前后的蟾蜍血中宏量营养素浓度的变化

冬眠前后蟾蜍血中宏量营养素浓度检测结果见图 2。与冬眠前比较, 血糖浓度在冬眠 14 d 内维持稳定, 第 28 天时开始下降, 第 42 和 56 天时显著降低 ($F_{7,38} = 6.484$, $P < 0.01$, 图 2a1), 未出现显著的性别差异 ($F_{1,38} = 0.765$, $P > 0.05$, 图 2a2); 总蛋白在第 56 天显著性下降 ($F_{7,38} = 2.213$, $P < 0.05$, 图 2b1), 无性别差异 ($F_{1,38} = 0.163$, $P > 0.05$, 图 2b2); 总胆固醇虽呈下降趋势, 但无统计学差异 ($F_{7,38} = 1.462$, $P > 0.05$, 图 2c1), 也无性别差异 ($F_{1,38} = 1.149$, $P > 0.05$,

图 2c2)。

2.3 人工诱导冬眠前后蟾蜍组织中宏量营养素含量的变化

诱导冬眠前后的蟾蜍组织中宏量营养素含量检测结果见图 3。与冬眠前比较, 肝组织中的糖原自冬眠 42 天起显著下降 ($F_{7,38} = 5.019$, $P < 0.01$, 图 3a1), 但无性别差异 ($F_{1,38} = 0.521$, $P > 0.05$, 图 3a2)。骨骼肌中的糖原自冬眠第 1 天起即显著下降 ($F_{7,38} = 3.110$, $P < 0.05$, 图 3b1), 但在整个冬眠期无明显变化, 且无性别差异 ($F_{1,38} = 0.775$, $P > 0.05$, 图 3b2)。骨骼肌和心肌组织中蛋白含量在冬眠 56 d 内无显著性变化 (骨骼肌 $F_{7,38} = 0.186$, $P > 0.05$; 心肌 $F_{7,38} = 0.254$, $P > 0.05$, 图 3c1 和 3d1), 且无性别差异 (骨骼肌 $F_{1,38} = 0.339$, $P > 0.05$; 心肌 $F_{1,38} = 0.069$, $P > 0.05$, 图 3c2 和 3d2)。

3 讨论

内脏器官组织功能变化将导致生物体形态学的改变, 脏器指数常反映动物总的营养状态和内脏器官的部分生理功能 (Naya et al. 2009, 金晨晨等 2014)。本研究中人工诱导冬眠 56 d 内的蟾蜍体重以及心、肝和腓肠肌的脏器指数均未出现显著性变化。蟾蜍皮肤薄, 保湿功能差, 在干燥环境中容易失去水分, 导致体重明显下降 (Malvin et al. 1991); 室温干燥条件下的蟾蜍体重自第 2 天起即显著下降, 但在室温保湿、低温保湿和低温冬眠条件下其体重均无明显变化 (李秀国等 2013)。然而, 与本研究结果不同, 史双鸽等 (2014) 发现野生雄性中华蟾蜍出眠时 (次年 4 月份) 的体重, 以及肝和脂肪体的脏器指数显著低于冬眠期 (12 月份), 这可能与其生活在变化无常的自然环境和冬眠时间较长 (至少 4 个月), 导致作为主要的能量贮存器官的肝和脂肪体过度消耗有关。Naya 等 (2009) 研究发现, 冬眠蟾蜍心和肺的脏器指数未出现明显变化, 认为可能与心和肺即使在休眠状态下也要保持呼吸和泵血功能有关。同理, 腓肠肌指数无明显变化应该

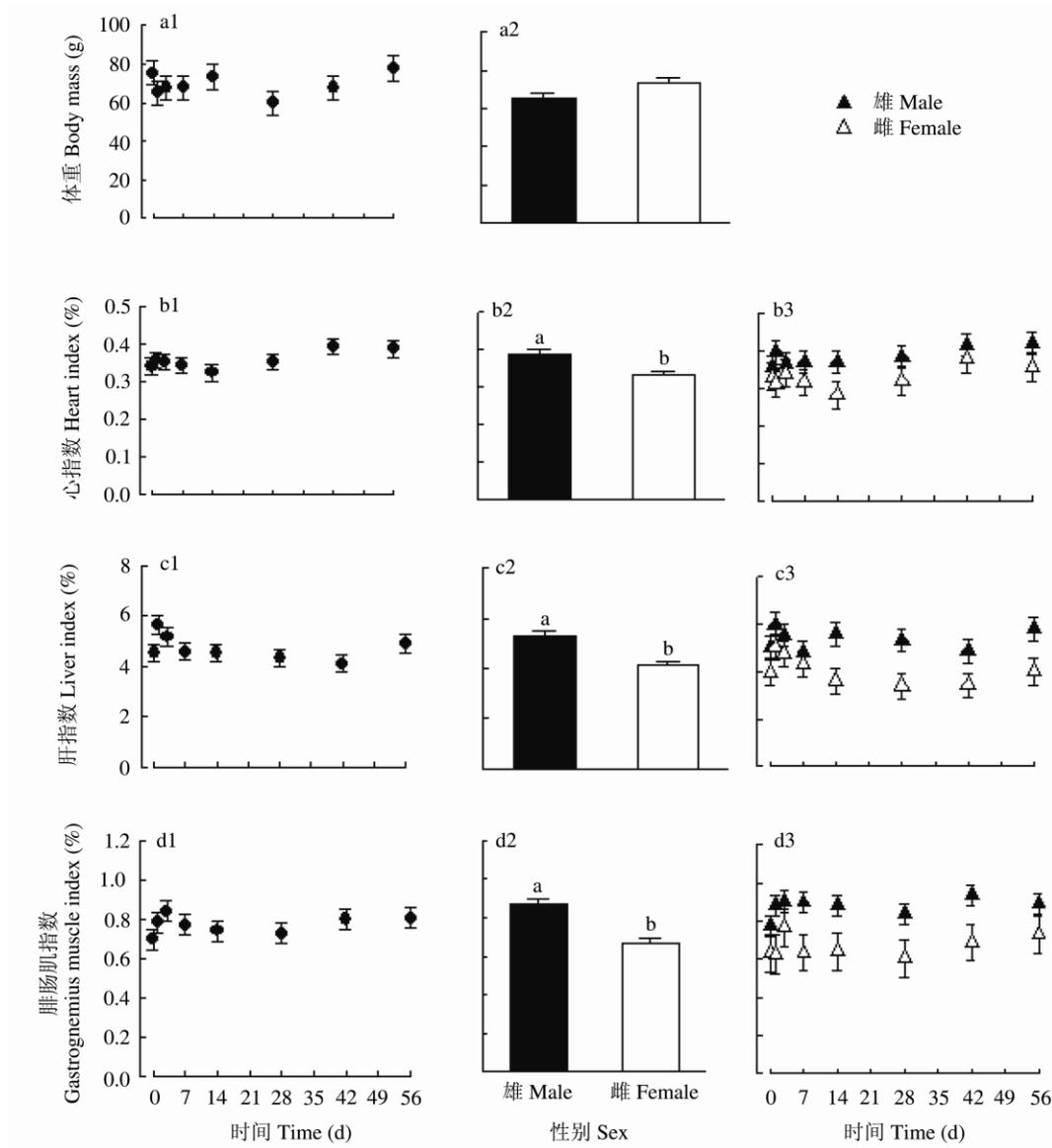


图 1 人工诱导冬眠蟾蜍的体重和脏器指数

Fig. 1 The body mass and organic index in toads during the artificial hibernation

图 a、b、c 和 d 分别为蟾蜍体重，以及心、肝和腓肠肌的脏器指数。a1 ~ d1 为观察指标-时间曲线，a2 ~ d2 为两因素方差（或协方差）分析中性别（固定因素）差异，b3 ~ d3 为按性别分开后的观察指标-时间曲线。数据为基于统计分析模型校正后的平均值 ± 标准误，b、c 和 d 的协变量体重为 69.27 g（子图 1 和 2）或 65.05 g（子图 3 雄性）或 73.47 g（子图 3 雌性）。标注不同字母表示经 LSD *t* 检验，组间差异显著（*P* < 0.05）。

Plot a, b, c and d represents the body mass, and the organic index of the heart, liver and gastrocnemius muscle, respectively. a1 - d1 represent the time curve of the parameters, a2 - d2 represent the sexual (fixed factor) difference in two-way ANOVA (or ANCOVA); b3 - d3 represent the time curve of the parameters post sexual division. Values presented are adjusted Mean ± SE based on the statistic analysis model, covariates in plot b, c and d: Body mass = 69.27 g (plot 1 and 2) or 65.05 g (male in plot 3) or 73.45 g (female in plot 3). Different letters indicate significant differences (*P* < 0.05) after LSD *t*-test.

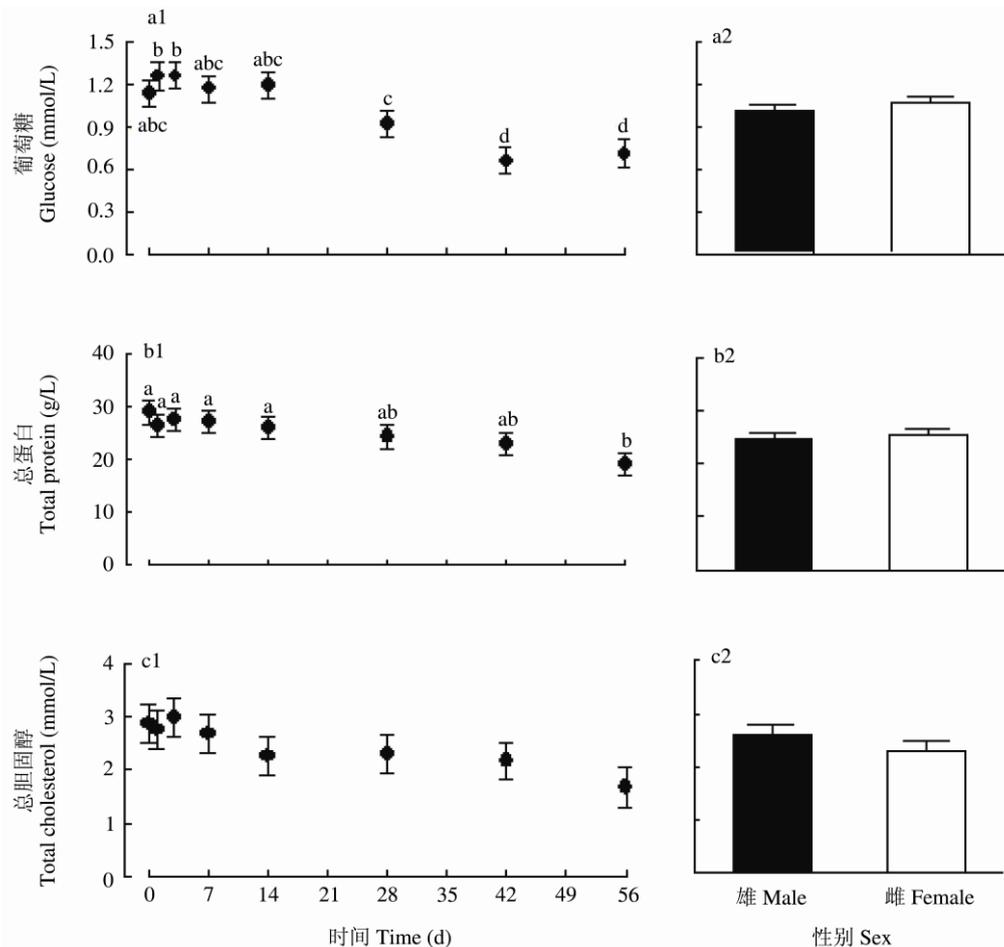


图 2 人工诱导冬眠蟾蜍血浆宏量营养素浓度

Fig. 2 The plasma concentration of macronutrients in toads during the artificial hibernation

图 a、b 和 c 分别为血浆中葡萄糖、总蛋白和总胆固醇的浓度。a1 ~ c1 为观察指标-时间曲线, a2 ~ c2 为两因素协方差分析中性别(固定因素)差异。数据为校正后的平均值 ± 标准误(协变量: 体重 = 69.27g)。标注不同字母表示经 LSD *t* 检验, 组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Plot a, b and c represents the plasma concentration of glucose, total protein and total cholesterol, respectively. a1 - c1 represent the time curve of the parameters, a2 - c2 represent the sexual (fixed factor) difference in two-way ANCOVA. Values presented are adjusted Means ± SE (covariates: Body mass = 69.27 g). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) after LSD *t*-test.

与其在冬眠状态下仍保持一定的肢体活动有关。本研究中雌性的脏器指数明显小于雄性, 但单一性别的冬眠期脏器指数未出现显著性变化。秋季雌性蟾蜍腹中充满颗粒状卵粒的卵巢使其他脏器相对重量减少, 可能导致出现这一结果。血糖在冬眠 28 d 内呈先升后降趋势, 自冬眠第 42 天才开始明显下降。初期血糖升高可能与低温导致蟾蜍机体防冻机制的启动有关。两栖动物在低温环境中血糖变高, 维持体液的

高渗状态, 以防止细胞体积变小皱缩 (Irwin et al. 2003)。本研究中, 冬眠早期的血糖未出现显著性升高, 可能与在取血前将蟾蜍在室温 (20 ~ 23°C) 中复苏 12 h 有关。因为从低温环境移到室温时, 蟾蜍对突然提升的温度发生适应性调节。温度突然升高可使机体交感神经兴奋性增高, 肾上腺素分泌增加, 心率加快 (Liu et al. 2005, 刘伟等 2014)。机体活动增多, 能量代谢增强, 导致产能物质消耗增多, 葡萄糖分解

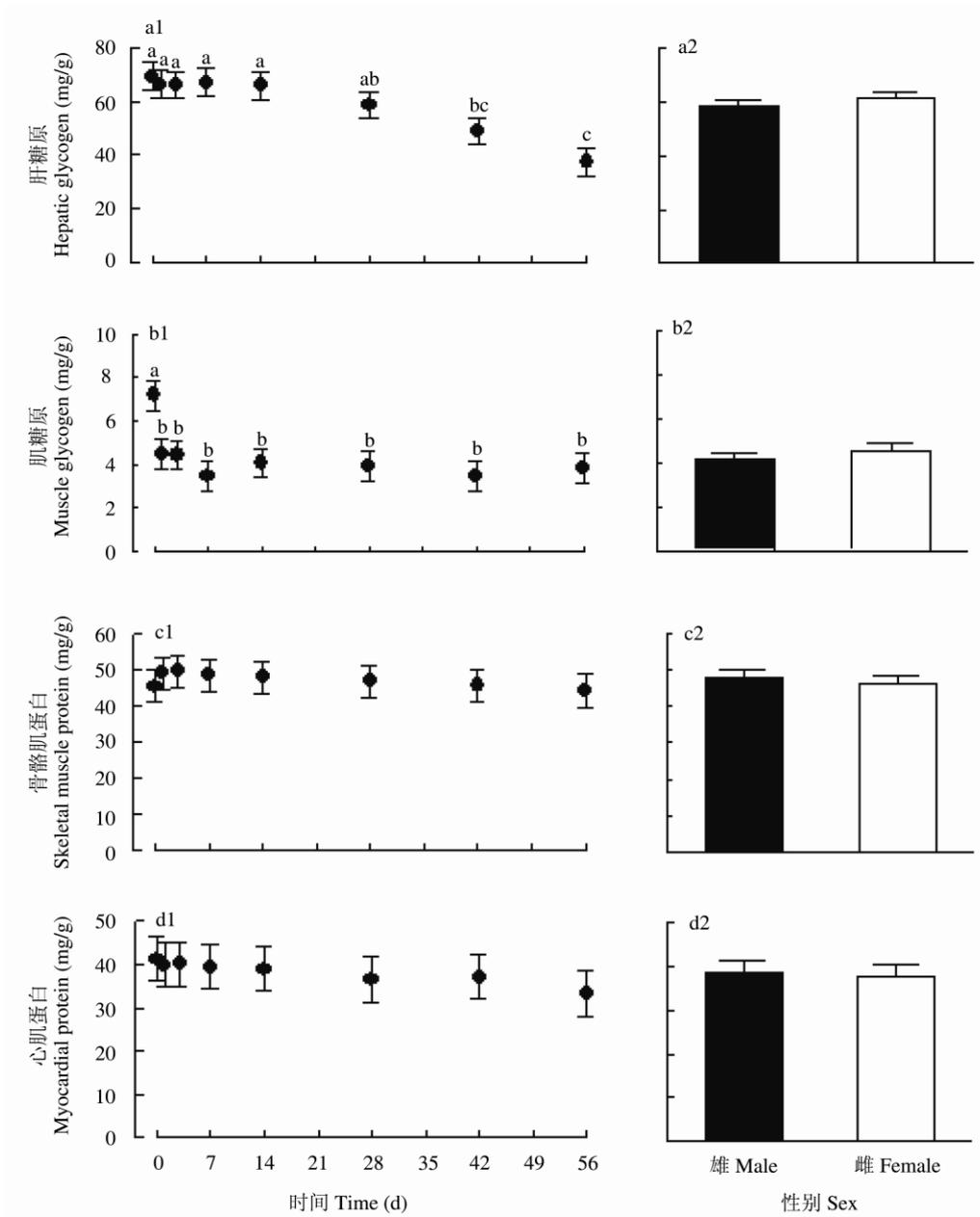


图 3 人工诱导冬眠蟾蜍的组织中宏量营养素含量

Fig. 3 The contents of the tissue macronutrients in toads during the artificial hibernation

图 a、b、c 和 d 分别为肝糖原、肌糖原、骨骼肌蛋白和心肌蛋白含量。a1 ~ d1 为观察指标-时间曲线，a2 ~ d2 为两因素协方差分析中性别（固定因素）差异。数据为修正后的平均值 ± 标准误（协变量：体重 = 69.27g）。标注不同字母，表示经 LSD *t* 检验，组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Plot a, b, c and d represents the content of hepatic glycogen, muscular glycogen, skeletal muscle protein and myocardial protein respectively. a1 - d1 represent the time curve of the parameters, a2 - d2 represent the sexual (fixed factor) difference in two-way ANCOVA. Values presented are adjusted Means ± SE (covariates: Body mass = 69.27 g). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) after LSD *t*-test.

代谢速度加快。血中总蛋白在第 56 天明显下降, 总胆固醇虽然呈下降趋势, 但在冬眠 56 d 内未出现统计学差异。糖原是动物体内糖的储存形式。摄入的糖类大部分转变成脂肪, 只有一小部分以糖原形式储存。本实验中, 肝糖原自冬眠 42 天起显著性下降, 与血糖下降时期相同; 而肌糖原自冬眠开始之日起下降, 并在整个冬眠期间无明显变化。冯照军等 (2007) 发现, 中华蟾蜍的肝糖原和肌糖原在冬眠期间 (11 月至次年的 2 月) 均是逐渐下降的, 其肌糖原变化形式与本研究结果不同。具体原因有待证实, 但可能与血糖相似, 和检测方式不同有一定关系。肝是糖异生的主要器官, 而肌肉的糖异生活性很低。由于蟾蜍在取样前从低温冬眠环境中移到室温后, 温度升高的适应性反应, 导致肌糖原较肝糖原消耗迅速, 且不能得到及时补充可能是肌糖原从冬眠早期开始就明显减少的原因之一。骨骼肌和心肌组织中蛋白含量在冬眠 56 d 内无显著性变化, 而血中总蛋白在冬眠 56 天明显下降, 提示机体蛋白消耗可能以血液中的蛋白为先。已证实蟾蜍脂肪体作为体内脂肪主要储存形式, 在冬眠期显著性减小 (周化民 1996, 史双鸽等 2014)。由此可以推测, 脂肪体应该是冬眠期蟾蜍血液和组织器官中宏量营养素的主要来源。由于前期研究发现中华蟾蜍的心、坐骨神经和骨骼肌的生理功能在人工冬眠 60 日相对稳定 (李秀国等 2013), 本研究进一步观察了冬眠 56 日内蟾蜍的血液, 以及心、肝和骨骼肌的宏量营养素的变化, 以分析人工冬眠对蟾蜍的这些器官组织产能物质水平的影响。同时, 为研究宏量营养素与相应脏器形态学变化的相关程度, 检测了心、肝和腓肠肌的脏器指数。由于已有多个文献证实蟾蜍的脂肪体为冬眠期的主要能量来源, 为避免重复, 本文中未予检测。

综上所述, 在人工诱发冬眠条件下, 蟾蜍血液和组织中的糖类首先出现明显变化, 其次是血液中的蛋白成分。由于低温冬眠导致机体代谢水平适应性降低, 蟾蜍能源储备能够使血

液和组织中宏量营养素水平在冬眠 1 个月内维持在相对稳定水平 (肌糖原之外)。利用蟾蜍的这一生理适应性变化, 以低温诱导冬眠方式使其生理生化功能处于“暂停”阶段, 使其成为质量相对稳定的两栖类实验动物模型具有了一定的可能性。

参 考 文 献

- Burggren W W, Warburton S. 2007. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *ILAR Journal*, 48(3): 260–269.
- Coble D J, Taylor D K, Mook D M. 2011. Analgesic effects of meloxicam, morphine sulfate, flunixin meglumine, and xylazine hydrochloride in African-clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(3): 355–360.
- Iimori E, D'Occhio M J, Lisle A T, et al. 2005. Testosterone secretion and pharmacological spermatozoal recovery in the cane toad (*Bufo marinus*). *Animal Reproduction Science*, 90(1/2): 163–73.
- Irwin J T, Lee R E Jr. 2003. Geographic variation in energy storage and physiological responses to freezing in the gray treefrogs *Hyla versicolor* and *H. chrysoscelis*. *The Journal of Experimental Biology*, 206(16): 2859–2867.
- Liu C B, Li R D. 2005. Electrocardiogram and heart rate in response to temperature acclimation in three representative vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology*, 142(4): 416–421.
- Malvin G M, Wood S C. 1991. Behavioral thermoregulation of the toad, *Bufo marinus*: effects of air humidity. *The Journal of Experimental Zoology*, 258(3): 322–326.
- Naya D E, Veloso C, Sabat P, et al. 2009. The effect of short- and long-term fasting on digestive and metabolic flexibility in the Andean toad, *Bufo spinulosus*. *The Journal of Experimental Biology*, 212(14): 2167–2175.
- Yao L H, Meng W, Song R F, et al. 2014. Modulation effects of cordycepin on the skeletal muscle contraction of toad gastrocnemius muscle. *European Journal of Pharmacology*, 726(1): 9–15.
- 冯照军, 季丽萍, 施雯, 等. 2007. 中华蟾蜍糖原含量的季节变化.

- 动物学报, 53(6): 1048–4053.
- 高永清, 吴小南, 蔡美琴. 2008. 营养与食品卫生学. 北京: 科学出版社, 15.
- 金晨晨, 瞿康山, 张志强. 2014. 黑斑侧褶蛙饱满度及脏器重量的性别和季节差异. 四川动物, 33(1): 106–112.
- 李秀国, 李鸿雁, 李海东, 等. 2013. 温度和湿度对蟾蜍生理功能的影响. 四川动物, 32(2): 734–738.
- 刘伟, 路丹, 纪翠宁, 等. 2014. 监测蟾蜍动态心电图的简便有效方法. 中国病理生理杂志, 30(12): 2300–2304.
- 刘新光, 罗德生. 2007. 生物化学. 北京: 科学出版社, 176–177.
- 米志平, 苏学辉, 代庆阳. 2000. 中华大蟾蜍冬眠前与出眠初期肝细胞超微结构的观察. 四川师范学院学报: 自然科学版, 21(1): 98–101.
- 史双鸽, 王文哲, 谷玲军, 等. 2014. 雄性中华大蟾蜍冬眠期和出眠初期部分内脏器官的变化. 湖北农业科学, 53(2): 373–375.
- 夏敏, 杜瑞卿, 赵田田, 等. 2012. 绿茶浸出液对蟾蜍离体心脏活动的影响. 四川动物, 31(4): 623–625, 629.
- 于洪川, 魏智清, 孙世旭. 2006. 中华蟾蜍血清蛋白及血红蛋白浓度浓度的季节性变化. 农业科学研究, 27(4): 32–34.
- 张红梅. 2009. 巯基乙酸对蟾蜍血清转氨酶和钙含量的影响. 四川动物, 28(5): 680–682, 690.
- 周化民. 1996. 花背蟾蜍冬眠期几项生理常数间的关系. 四川动物, 15(4): 162–164.