

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.010

鼠伤寒沙门菌 pStSR100 质粒对生物膜形成的影响 *

王 虎¹ 黄 洋² 李媛渊¹ 黄 瑞^{1△}

(1 苏州大学医学部病原生物学系 江苏 苏州 215123; 2 苏州光景生物科技有限公司 江苏 苏州 215123)

摘要 目的:鼠伤寒沙门菌在多种表面形成的生物膜对其致病性和引起食物中毒等方面起着重要作用,本研究探讨鼠伤寒沙门菌 pStSR100 质粒对细菌在不同材质表面生物膜形成的影响。**方法:**用 LB(Luria-Bertani, LB)培养基和 TSB(Tryptose Soya Broth, TSB)培养基分别将携带 pStSR100 质粒的野生株在 96 孔板与放置无菌小圆玻片的 24 孔板中静态培养 48 h,用结晶紫半定量法确定生物膜形成的适宜培养基。将野生株与消除质粒的突变株,用结晶紫半定量法和激光共聚焦显微镜(Confocal Laser scanning microscopy, CLSM)观察其在聚苯乙烯培养板和小圆玻片表面形成生物膜的差异。**结果:**用 LB 培养时细菌生物膜的形成能力高于用 TSB 培养, LB 培养基更适宜生物膜形成;结晶紫半定量法结果表明野生株比突变株在小圆玻片表面形成生物膜的能力明显增强,而在聚苯乙烯培养板表面两者则无明显差异;CLSM 观察发现,野生株在小圆玻片表面形成融合成片的大克隆,突变株仅形成较小克隆。**结论:**鼠伤寒沙门菌 pStSR100 质粒能促进该菌在亲水性材质表面生物膜的形成,但其对该菌在疏水性材质表面生物膜的形成未见明显影响,这一新发现为进一步研究鼠伤寒沙门菌生物膜形成的调控机制,研制抗感染材料提供了理论和实验依据。

关键词:鼠伤寒沙门菌; 生物膜; 质粒

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)01-47-05

The Effect of Salmonella Typhimurium pStSR100 Plasmid on Salmonella Biofilm Formation*

WANG Hu¹, HUANG Yang², LI Yuan-yuan¹, HUANG Rui^{1△}

(1 Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China;

2 Lumigenex (Suzhou) Co. Ltd, Suzhou, Jiangsu, 215123, China)

ABSTRACT Objective: The ability of Salmonella typhimurium biofilm formation on different surfaces contribute greatly to its pathogenicity, causing food poison and so on, our study was to investigate the effect of Salmonella typhimurium (S. typhimurium) pStSR100 plasmid on the S. typhimurium biofilm formation on plastic and glass surfaces. **Methods:** Wild type strain carrying plasmid pStSR100 was cultured in LB or TSB in 96 wells and 24 wells with sterilized round glass discs submerged in the broth for 48 h to determine the optimum medium of biofilm formation using crystal violet semi-quantitative method. Wild type strain and pStSR100 deletion mutant strain were allowed to develop biofilm on plastic and glass discs surfaces, Crystal violet staining and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) were used to evaluate the effect of plasmid on S. typhimurium biofilm formation. **Results:** The ability of bacterial biofilm formation was better when cultured in LB, which is the optimum medium for Salmonella biofilm formation. Furthermore, when cultured in LB, the carrying plasmid wild type strain formed more biofilm on round glass discs surface compared to the mutant strain using Crystal violet semi-quantitative method; however, no difference was observed on plastic surface. When observed in CLSM, wild type strain tended to form more bigger colonies compared to the mutant strain on round glass discs surface. **Conclusion:** The carriage of plasmid pStSR100 leads to increased Salmonella typhimurium biofilm formation on hydrophilic material, however, no significant increased biofilm formation on hydrophobic material was observed. Here, we demonstrate a new link between plasmid carriage and biofilm formation on hydrophilic material, which can provide the theoretical and experimental basis for further studying on the regulatory mechanism of Salmonella biofilm formation and discovering new antibacterial materials.

Key words: Salmonella typhimurium; Biofilm; Plasmid

Chinese Library Classification(CLC): Q93 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)01-47-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30972768)

作者简介:王虎(1986-),男,硕士研究生,研究方向:微生物学,

电话:18862390803, E-mail:wh576019033@163.com

△通讯作者:黄瑞,女,教授, E-mail:hruisdm@163.com

(收稿日期:2013-06-24 接受日期:2013-07-24)

前言

沙门菌(*Salmonella*)是引起食源性疾病的主要病原之一,全球每年约有9千多万沙门菌感染病例,其中约15万人死亡^[1]。鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)是一种重要的人畜共患病原菌,其感染发病率居沙门菌感染的首位,可导致医院感染和爆发性食物中毒,病死率较高^[2,3]。生物膜是依附于某载体表面的由胞外多聚物和基质网包被的高度组织化和系统化的微生物膜性聚合物^[4]。与单细胞浮游状态的微生物不同,在载体表面增殖的微生物群体在整体上表现出一系列新的生物学特征并具有较强的适应外界环境的能力,这也是导致微生物产生抗药性及感染性疾病难以治疗的重要原因之一。鼠伤寒沙门菌在食品运输及加工,医院留置插管和器械治疗时可以在许多无机物表面,如聚苯乙烯、玻璃和不锈钢等表面均能形成生物膜^[5-7],因此其形成机制、影响因素及相关药靶的研究成为能否有效治疗沙门菌感染的关键。

Ghigo 等人首次报道可接合的 F 质粒能够促进大肠杆菌生物膜的形成^[8];2010 年 Paul 等人随后发现可接合的 TOL 质粒也能促进假单胞菌(*Pseudomonas putida*)生物膜的生成^[9]。PStSR100 是一种从鼠伤寒沙门菌中分离的分子量 100 kb 的质粒^[10]。本实验室的前期研究表明,它是可接合转移的、使宿主菌产生对细胞和动物感染模型具有一定毒力的一种质粒,可以加重感染结局,但其对鼠伤寒沙门菌形成生物膜能力的影响所知甚少。

迄今关于 PStSR100 质粒与鼠伤寒沙门菌生物膜形成关系的研究尚未见报道,本研究以 PStSR100 为对象,在体外建立鼠伤寒沙门菌生物膜模型,利用结晶紫染色半定量法,激光共聚焦显微镜观察,研究其对宿主菌在不同介质表面形成生物膜的影响,为深入研究该质粒的致病机制提供理论和实验依据。

1 材料

携带 PStSR100 野生株 X3306 和消除 PStSR100 的突变株 X3337,由美国亚利桑那州立大学 Roy Curtiss III 教授惠赠。24 孔板和 96 孔板(polystyrene)购自 Corning 公司;小圆玻片购自盛泰公司。pGFPuv 质粒(Clontech)公司;酶标仪为美国 Biotek 公司产品;TCS-SP2 型共聚焦激光扫描显微镜为德国 Leica 公司产品。

2 方法

2.1 细菌生长曲线的测定

LB 平板上挑选野生株与突变株单克隆分别接种于 10 mL LB 中,30℃ 培养过夜;用 LB 稀释细菌悬浮液至 OD₆₀₀ 为 0.1,30℃ 200 r/min 振荡培养,每隔 1 h 取 1 mL 细菌悬液测定 OD₆₀₀ 值,连续测定 7 h。

2.2 聚苯乙烯培养板与小圆玻片表面生物膜适宜培养基的测定

细菌在聚苯乙烯培养板与小圆玻片表面形成生物膜的测定主要参照 Crawford 等人的文献进行^[11]。聚苯乙烯培养板表面生物膜形成适宜培养基的测定,用 LB 和 TSB 分别稀释处于对数生长期的野生株菌液至 OD₆₀₀ 为 0.05 后接种于 96 孔板,200

μL/孔。30℃ 静置培养;在 6 h,12 h,24 h 及 48 h 倾去培养物,PBS 洗 3 遍,轻轻拍干;每孔加 200 μL 0.5%结晶紫,染色 5 min,再用 PBS 洗 3 次,轻轻拍干;滴加 33%冰乙酸,室温下反应 30 min,轻轻混合后测定 OD₅₉₀ 值。小圆玻片表面生物膜形成适宜培养基的测定,LB 稀释对数生长期的菌液至 OD₆₀₀ 至 0.05 后接种于 24 孔板,200 μL/孔,置无菌的小圆玻片于稀释菌液中,30℃ 静态培养。分别在 6 h,12 h,24 h 及 48 h 各时间点倾去培养物,PBS 洗 3 遍,加入 99%的甲醇固定 15 min,倾去甲醇后,室温干燥。每孔加 200 μL 0.5%结晶紫染色 5 min,弃去结晶紫,PBS 洗 3 次后移取小圆玻片至新的 24 孔板中。OD₅₉₀ 测定方法同上。以上实验每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。

2.3 结晶紫染色半定量法检测生物膜的形成

野生株与突变株在聚苯乙烯培养板与小圆玻片表面生物膜的培养方法同上,每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。

2.4 带有绿色荧光蛋白标记发光菌的构建

为用激光共聚焦扫描显微镜(Confocal Laser scanning microscopy,CLSM)观察野生株与突变株在小圆玻片表面形成生物膜的差异,参照 Ma(2011)等人的文献报道构建绿色荧光蛋白标记的发光菌^[12]。制备感受态细胞后置于冰上,加入质粒轻轻混匀静置 10 min,42℃ 水浴锅中热激 90 s,涂布于含终浓度 100 mg/μL 氨苄青霉素(Ampicillin,Amp)的 LB 固体培养基平板上,挑选发光菌并在荧光显微镜下镜检。

2.5 CLSM 观察生物膜的形成

24 孔板内放置无菌小圆玻片,按上述方法接种绿色荧光蛋白标记的野生株与突变株。LB 培养基中 30℃ 静置培养 48 h;小圆玻片上形成生物膜后弃去菌液,PBS 洗 3 遍,室温下 10%的甲醛固定 30 min,PBS 洗 3 次后置小圆玻片于载玻片,指甲油密封固定后 CLSM 观察。

2.6 统计学处理

所有数据输入 SPSS11.5 统计软件包,并行正态分布检测,均符合正态分布,P<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细菌生长曲线

图 1 实验结果显示,野生株消除 PStSR100 质粒后并未影响其对数生长期生长曲线的变化,两者未见显著差异(P>0.05)。

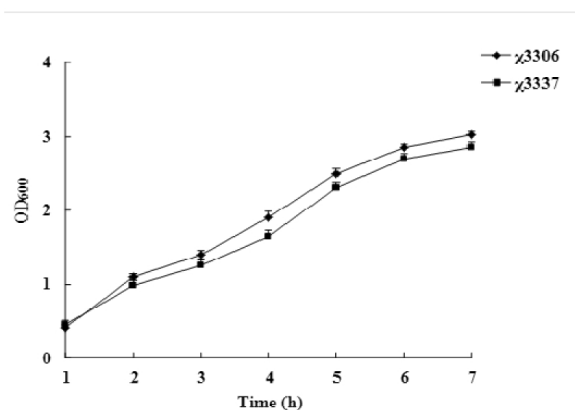


图 1 野生株与突变株生长曲线

Fig.1 Growth curve of wild type and mutant strain

3.2 生物膜在聚苯乙烯培养板与小圆玻片表面适宜培养基的

测定

受试菌用 LB 与 TSB 在聚苯乙烯培养板与小圆玻片表面培养时,用 LB 培养结晶紫染色 OD590 值明显高于用 TSB 培

养的 OD590 值。以上结果表明 LB 培养基较适宜细菌在聚苯乙烯培养板与小圆玻片表面生物膜的形成(图 2)。本研究后续实验选用 LB 作为观察生物膜形成的培养基。

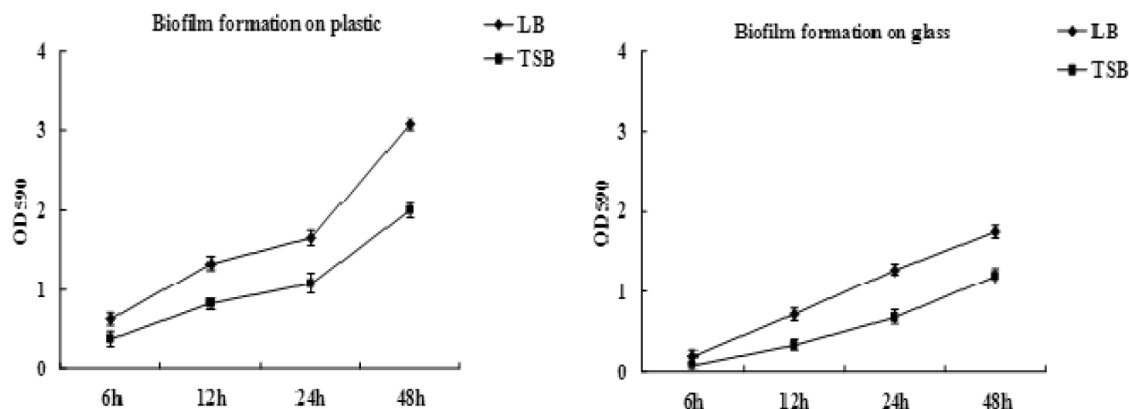


图 2 不同培养基对细菌在聚苯乙烯培养板与小圆玻片表面生物膜形成的影响(误差线表示标准偏差)

Fig.2 The effect of two different medium on bacteria biofilm formation on plastic and glass surface during 48h

(Error bars indicate the standard deviation)

3.3 结晶紫染色半定量法检测生物膜的形成

野生株与突变株在 96 孔板中 30℃ 静态培养 48 h 的各个时间点,结晶紫染色 OD590 值表明两者未见明显差异($P>0.05$) (图 3)。提示 PStSR100 质粒对于鼠伤寒沙门菌在聚苯乙烯材质上生物膜的形成无明显影响。

野生株与突变株在小圆玻片上 48 h 内形成的生物膜的 OD590 值均可见明显差异,野生株结晶紫染色的 OD590 值明显多于突变株 OD590 值且差异具有统计学意义($P<0.05$) (图 3)。提示该质粒与鼠伤寒沙门菌在亲水性材质表面生物膜的形成密切相关。

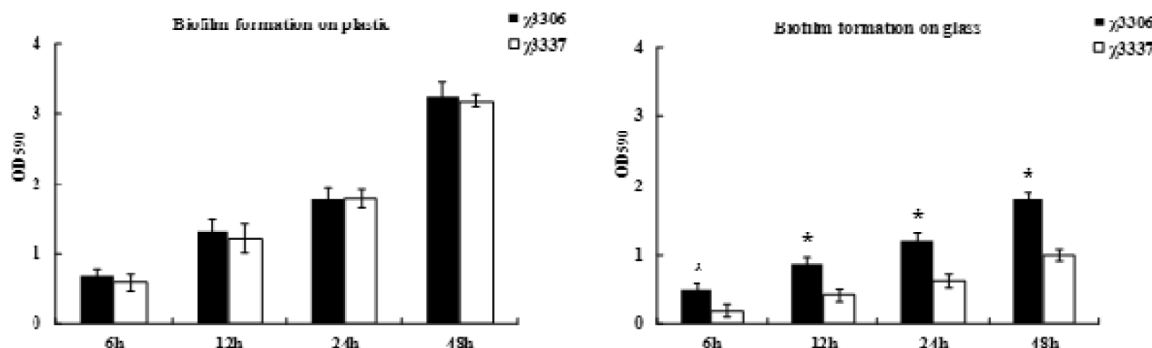


图 3 野生株与突变株 48 h 内在聚苯乙烯培养板与小圆玻片表面生物膜的形成。误差线表示标准偏差,* 表示 P 值小于 0.05

Fig.3 Wild type and mutant strains biofilm formation on plastic and glass surfaces during 48 h. Error bars indicate standard deviation.

Asterisks designate a value of $P<0.05$.

3.4 CLSM 观察生物膜的形成

由于无适宜聚苯乙烯材质可供激光穿透,故本实验仅观察野生株与突变株在亲水性材质小圆玻片表面形成的生物膜。用构建的带有绿色荧光蛋白标记的野生株与突变株按前述方法培养后用 CLSM 观察。如图 4 所示,野生株在小圆玻片上可形成融合成片的大克隆且较为紧密,而突变株仅形成较少小克隆且较为松散。用计算机软件 COMSTAT^[13]分别对野生株与突变株形成生物膜的图像进一步分析时发现,野生株生物膜的平均厚度和最大厚度分别是 25 μm 与 30 μm ;而突变株生物膜的平均厚度和最大厚度仅分别为 15 μm 与 18 μm 。

4 讨论

沙门菌是一种重要的肠道病原菌,通常表现为肠炎和急性肠胃炎等。鼠伤寒沙门菌是一种能引起人畜共患病的常见致病菌,在动物体内、食品、运输和包装材料表面形成生物膜样结构,可抵御抗生素、宿主免疫系统和消毒剂等的作用,从而导致疾病的发生和反复感染^[14-16]。因此,鼠伤寒沙门菌生物膜形成机制、影响因素及相关药靶的研究成为能否有效治疗鼠伤寒沙门菌感染的关键。目前的研究已经发现了许多与沙门菌生物膜形成相关的基因,如与生物膜形成第一阶段细胞与材料表面黏附相关的 Curli、BapA 蛋白;调节群体感应系统(Quorum sensing)的 SdiA、调节生物膜主要成份纤维素表达的 csgD 等^[17],但生物膜形成的机制不是很清楚。

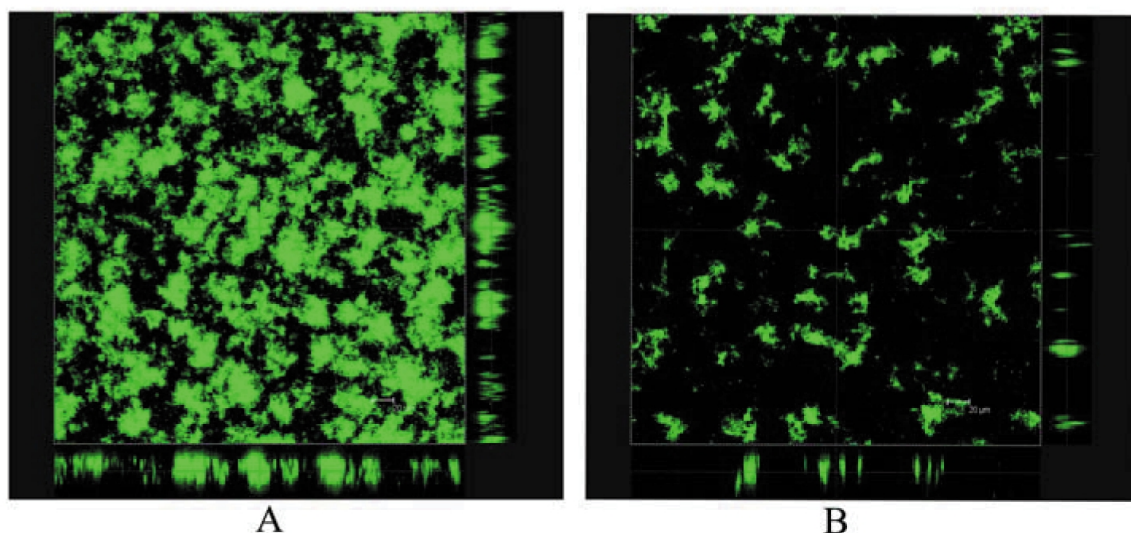


图4 激光共聚焦显微镜观察野生株与突变株在小圆玻片表面生物膜的形成。每幅图中间面板表示 x-y 轴扫描图像,相邻的底部和侧面面板分别表示 x-z,y-z 轴扫描图像。A,野生株;B,突变株

Fig. 4 Observation of wild type and mutant strains biofilm formation on round glass discs by confocal laser scanning microscopy. For each micrograph, the middle panel represents the x-y plane, and the adjacent bottom and side panels represent the x-z and y-z planes, respectively. A, wild type strain and B, mutant strain

本文所研究的 PSStSR100 质粒在该菌的血清抗性中起着很重要的作用,Gulig 等人很早就通过突变证明了 PSStSR100 质粒在血清抗性中的作用^[10];本实验室的前期研究表明,它是可接合转移的、使宿主菌产生对细胞和动物感染模型具有一定毒力的一种质粒,可以加重感染结局,但其对鼠伤寒沙门菌形成生物膜能力的影响所知甚少。Ghigo 等人发现可接合的 F 质粒能够促进大肠杆菌在亲水性介质表面生物膜的形成^[8];2010 年 Paul 等人发现可接合的 TOL 质粒能促进恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)在亲水性介质与疏水性介质表面生物膜的生成^[9]。这都引发人们去思考可接合的 PSStSR100 质粒是否与鼠伤寒沙门菌生物膜的形成有关。

生物膜的形成是一个复杂的动态过程,包括细菌可逆性附着、细菌不可逆性黏附、细菌繁殖和细菌播散。不同因素共同影响着上述生物膜的形成过程。营养条件是细菌生长的必要因素,不同的培养基成分可不同程度影响细菌生物膜的形成^[18,19]。在本研究中,首先检测了不同培养基成分对于细菌生物膜形成的影响,结果表明用 LB 培养时细菌生物膜的形成能力高于用 TSB 培养,因此 LB 培养基更适宜生物膜形成;为了了解 PSStSR100 质粒是否与鼠伤寒沙门菌生物膜的形成有关,我们利用结晶紫染色半定量法,激光共聚焦显微镜观察,研究其对宿主菌在聚苯乙烯培养板和小圆玻片表面形成生物膜的影响。聚苯乙烯培养板属于疏水性材质而小圆玻片则属于亲水性材质,本实验结晶紫半定量法结果显示野生株比突变株在亲水性材质小圆玻片表面形成生物膜的能力明显增强($P<0.05$),而在疏水性材质聚苯乙烯表面两者则无明显差别($P>0.05$);当用 CLSM 进一步观察发现,野生株在小圆玻片表面形成融合成片的大克隆群体,生物膜的平均厚度和最大厚度分别是 $25\ \mu\text{m}$ 与 $30\ \mu\text{m}$,突变株却仅形成稀疏的较小克隆,生物膜的平均厚度和最大厚度分别是 $15\ \mu\text{m}$ 与 $18\ \mu\text{m}$ 。以上结果提示,鼠伤寒沙门菌可接合传递的 PSStSR10 毒力质粒与该菌在亲水性材质上生

物膜的形成密切相关,这与 Ghigo 等人的报道一致^[8];而其对于该菌在疏水性材质上生物膜的形成却未见显著影响。Solano 等分别从外界环境、牛奶制品和病人体内分离肠炎沙门菌,发现在鸡腹腔感染实验中仅有毒力的菌株才能在玻璃试管上形成生物膜^[20];本文结果显示携带有 PSStSR100 毒力质粒能够早在 6 h 就能明显促进该菌在亲水性介质表面生物膜的形成。生物膜的形成是一个层递的过程,细菌首先要接近到固体的表面,才能形成成熟的生物膜,所以吸附到附着物表面是细菌从游离的单个细胞到生物膜形成的关键阶段,它涉及到细胞的胞外黏附结构与附着物表面的物理化学反应。沙门菌的胞外黏附结构包括 Fim 菌毛、Lpf (long polar fimbriae)菌毛、Tafi (Thin aggregative fimbriae) 菌毛、BapA 等^[21]。Austin 等研究结果表明编码 Tafi 菌毛基因突变后沙门菌在亲水性材质不锈钢表面生物膜合成能力明显减弱^[22]。Ghigo 等研究发现,在大肠杆菌中天然接合型质粒可通过介导胞外黏附结构性菌毛的合成进而诱导细菌在亲水性材质表面生物膜的形成。对于本文 PSStSR100 如何介导鼠伤寒沙门菌在亲水性材质上生物膜的形成,我们推测其可能与细菌胞外黏附结构的合成有关,具体机制还有待于进一步研究。

总之,通过在体外建立生物膜模型,利用结晶紫染色半定量法,激光共聚焦显微镜观察,我们首次报道了 PSStSR100 质粒能诱导鼠伤寒沙门菌在亲水性材质表面生物膜的形成,这一现象的发现为进一步研究鼠伤寒沙门菌生物膜在不同材质表面生物膜形成的调控机制,研制抗感染材料奠定了基础。下一步我们将探究 PSStSR100 质粒与该菌在亲水性材质表面不同胞外黏附结构表达之间的关系。

致谢:

感谢苏州大学李冰燕老师对于激光共聚焦扫描显微镜观察提供的技术支持。

参考文献(References)

- [1] Majowicz S E, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis [J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50: 882-889
- [2] Feasey N A, Dougan G, Kingsley R A, et al. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa [J]. *Lancet*, 2012, 379: 2489-2499
- [3] Dechet A M, Scallan E, Gensheimer K, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium definitive type 104 infection linked to commercial ground beef, northeastern United States, 2003-2004[J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 42(6): 747-752
- [4] Popat R, Cruz S A, Messina M, et al. Quorum-sensing and cheating in bacterial biofilms[J]. *Proc Biol Sci*, 2012, 279: 4765-4771
- [5] Vestby L K, Mørtrø T, Langsrud S, et al. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal-and feed factories[J]. *BMC Vet Res*, 2009, 5: 20
- [6] Prouty A M and Gunn J S. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass [J]. *Infect and Immun*, 2003, 71: 7154-7158
- [7] Moretro T, Vestby L K, Nesse L L, et al. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 106(3): 1005-1012
- [8] Ghigo J M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development[J]. *Nature*, 2001, 412: 442-445
- [9] D'Alvise P W, Sjøholm O R, Yankelevich T, et al. Tol plasmid carriage enhances biofilm formation and increases extracellular DNA content in *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. *FEMS microbiol Lett*, 2010, 312: 84-92
- [10] Gulig P A, Curtiss R 3rd. Cloning and transposon insertion mutagenesis of virulence genes of the 100-kilobase plasmid of *Salmonella typhimurium*[J]. *Infect Immun*, 1988, 56(12): 3262-3271
- [11] Crawford R W, Gibson D L, Kay W W, et al. Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for *Salmonella* biofilm formation on gallstone surfaces[J]. *Infect and Immun*, 2008, 76(11): 5341-5349
- [12] Ma L, Zhang G and Doyle M P. Green fluorescent protein labeling of *Listeria*, *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 for safety-related studies[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e18083
- [13] Heydorn A, Nielsen A T, Hentzer M, et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT[J]. *Microbiology*, 2000, 146: 2395-2407
- [14] Ledebøer N A, Frye J G, McClelland M, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(6): 3156-3169
- [15] Hamilton S, Bongaerts R J, Mulholland F, et al. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 599
- [16] Crull K, Rohde M, Westphal K, et al. Biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar typhimurium colonizing solid tumours [J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(8): 1223-1233
- [17] Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, et al. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication [J]. *Food Research International*, 2012, 45(2): 502-531
- [18] Stepanović S, Cirković I, Ranin L, et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 38: 428-432
- [19] Jung J H, Choi N Y, Lee S Y. Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions[J]. *Food Microbiol*, 2013, 34(1): 70-80
- [20] Solano C, Sesma B, Alvarez M, et al. Discrimination of strains of *Salmonella enteritidis* with differing levels of virulence by an in vitro glass adherence test[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 674-678
- [21] Wagner C, Hensel M. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica* [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 715: 17-34
- [22] Austin J W, Sanders G, Kay W W, et al. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 162: 295-301
- (上接第 182 页)
- [22] Li Fu-qiang, Bai Hong-ying, Lou Ji-yu, et al. Postconditioning attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition [J]. *Apoplexy and Nervous Diseases*, 2011, 28(9): 1003-2754
- [23] Li Yan, Wang Cui-lan, Lu Ying-yun. Effects of limbs ischemic postconditioning on mitochondria structure and function after cerebral ischemic reperfusion in diabetic rats[J]. *Clin Neurol*, 2009, 22(1): 1004-1648
- [24] Zhao H G, Li W B, Liu H Q, et al. Limb ischemic preconditioning decreases hippocampal ischemia/reperfusion injuries in rats [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2004, 20(1): 50-53
- [25] Shen Jia, Sun Li na, et al. mito KATP and opioid receptor mediate the neuroprotective effect of limb ischemic postconditioning on rat brain ischemia/reperfusion injury[J]. *Chin J Appl Physiol*, 2009, 25(3):1000-6834