

新狼毒素 A 诱导人黑色素瘤 A375 细胞凋亡的机制研究

丁杨芳¹, 李德芳², 陈小宇², 任博雪¹, 赵 微¹, 郑秋生^{1,2*}

¹ 石河子大学药学院 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 石河子 832002;

² 滨州医学院中西医结合学院, 烟台 264003

摘要:为探讨新狼毒素 A 抑制人黑色素瘤 A375 细胞增殖及诱导凋亡的作用。本实验采用噻唑蓝 (MTT) 法检测新狼毒素 A 对人黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响, Hoechst 33258 法观察细胞形态, 流式细胞仪检测细胞凋亡率和线粒体膜电位, Western blot 检测凋亡相关蛋白表达。结果显示新狼毒素 A 以时间剂量依赖性的方式显著抑制 A375 细胞的增殖; 不同浓度新狼毒素 A (0、15、30、45 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 A375 细胞 48 h 后细胞出现显著凋亡特征, 新狼毒素 A 增加 A375 细胞的凋亡率且降低了线粒体膜电位, 上调 Bax、caspase-3 和细胞色素 C (Cytochrome C) 蛋白的表达, 下调 Bcl-2 蛋白的表达。以上结果说明新狼毒素 A 抑制 A375 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与诱导线粒体途径的凋亡有关。

关键词:新狼毒素 A; 人黑色素瘤 A375; 抗肿瘤; 凋亡

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)7-1240-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.7.017

Study on the apoptosis mechanism of human melanoma A375 cells induced by Neochamaejasmin A

DING Yang-fang¹, LI De-fang², CHEN Xiao-yu², REN Bo-xue¹, ZHAO Wei¹, ZHENG Qiu-sheng^{1,2*}

¹ Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China

² College of Chinese Medicine and Western Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

Abstract: To explore the effect of Neochamaejasmin A on the proliferation and apoptosis in human melanoma cell line A375 cells. MTT (thiazolyl blue) was applied to detect the cell viability of A375 cells treatment with Neochamaejasmin A. Hoechst 33258 was employed in observing the cell morphology. Flow cytometry was applied to assess the apoptosis rate and mitochondrial membrane potential. The protein expression levels were assessed with Western Blot. Data showed that Neochamaejasmin A significantly suppressed the proliferation and growth of A375 cells at a time-concentration-dependent manner. The A375 cells were treated with different concentration Neochamaejasmin A (0, 15, 30 and 45 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h, the cells showed significant apoptosis characteristics. The apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.01$) and mitochondrial membrane potential was significantly reduced ($P < 0.01$). Western blot showed that Neochamaejasmin A upregulated the protein levels (Bax, caspase-3 and Cytochrome C) and downregulated expression level of Bcl-2 protein. The above results indicated that Neochamaejasmin A inhibited proliferation and induced apoptosis in A375 cells. Its mechanism might be related to the induction of apoptosis in the mitochondrial pathway.

Key words: Neochamaejasmin A; human melanoma cell A375; antitumor; apoptosis

黑色素瘤是皮肤癌中最致命的高度恶性肿瘤。据统计, 2018 年新发黑色素瘤病例 287 723 例, 死亡 60 712 例^[1]。黑色素瘤在早期时可以诊断出来并

且可以通过手术切除治愈, 然而当癌细胞扩散转移后, 治疗会变得非常棘手甚至会影响患者的生存质量。除外科手术外, 治疗恶性黑色素瘤的方法还有放疗, 化疗, 生物治疗以及靶向治疗等^[2]。放疗与化疗都可以在一定程度上对抗癌细胞的生长, 但是这两种治疗方法都会带来诸多的不良反应且严重影

收稿日期: 2018-12-29 接受日期: 2019-05-09

基金项目: 国家自然科学基金 (31870338)

* 通信作者 Tel: 86-018615016380; E-mail: zqsyt@sohu.com

响患者的生活质量,因此,寻找具有潜在抗肿瘤的活性化合物就显的尤为重要。

新狼毒素 A 是从瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* L. 或狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud. 和月籐大戟 *Euphorbia ehracteolata* Hayata. 的根中提取出来的具有多种生理活性的黄酮类化合物。狼毒中的主要活性成分有黄酮类、香豆素类、二萜类、木脂素类、倍半萜类、苯丙醇苷类、挥发油、氨基酸、三萜类、树脂等^[3]。研究表明,狼毒具有抗病毒^[4]、调节免疫活性^[5]、抑菌^[6]、杀虫^[7]、抗癫痫^[8],除此之外还具有抗肿瘤^[9]的作用。而狼毒有效成分抗肿瘤的机制有以下方面如抑制肿瘤细胞增殖^[10,11]、抗多药耐药性^[12]、调节肿瘤细胞周期^[13]和诱导细胞凋亡^[14]。同时也有研究发现新狼毒素 A 除了具有杀虫的功效外还可以抑制多种肿瘤细胞的增殖且诱导细胞的凋亡^[15]。然而,至今没有关于新狼毒素 A 对人黑色素瘤细胞的影响的详细报道,本研究选用狼毒中活性成分新狼毒素 A,探究新狼毒素 A 在体外对人黑色素瘤 A375 增殖的抑制作用及对细胞凋亡的影响。为新狼毒素 A 的研究与开发打下基础。

1 材料

1.1 细胞株

人黑色素瘤 A375 从中国科学院上海细胞库购买。

1.2 药品及主要试剂

新狼毒素 A (武汉 ChemFaces 公司,纯度 $\geq 98\%$,批号: CFS01701); 噻唑蓝 (MTT) (批号: 1117X054), 胰蛋白酶 (批号: 8250024), Hoechst 33258 荧光染料 (批号: 1225A0310), 高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液 (批号: 20180321) 和 DMSO (批号: 520C0324) 均购于北京索莱宝公司; DMEM 培养基 (批号: 1645781) 购于 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS) (批号: J30329) 购于北京全式金公司, Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (批号: 20171122) 和 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒 (批号: 20170913) 购于凯基生物; Anti-Bax, anti-Bcl-2 和 anti-Cytochrome C (批号: 5023T, 3498T 和 4280T) 均购于美国 Cell Signaling Technology 公司; Anti-caspase-3 (批号: GR219726-18) 购于 Abcam 公司; β -actin (批号: 17AV0411), 山羊抗小鼠辣根酶标记 IgG (H + L) (批号: 131224) 和山羊抗兔辣根酶标记 IgG (H + L) (136080) 购于北京中杉金桥生物公司; ECL 高效发光液 (TA260115) 购于美国 Thermo; 青链霉素 (批

号: J160021) 购于 Hyclone 公司。

1.3 主要仪器

细胞培养箱 (美国 Thermo 公司, Thermo 3131 型); 酶标仪 (美国 Thermo 公司, Thermo 3001 型); 倒置生物显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司, BDS200-PH); 流式细胞仪 (美国 BD 公司, FACS-Calibur/Calibur), 化学发光成像系统 (EC3 510 Imaging System, 美国思博明科学器材有限公司); 半干转电转仪 (BIO RAD 公司, Trans-Blot SD Cell); 脱色摇床 (北京六一仪器厂, WD-9405D); 艾柯实验室超纯水机 (成都艾柯水处理设备有限公司, Exceed-Ad-60)。

2 实验内容

2.1 细胞培养及新狼毒素 A 储备液的配制

用 DMEM (使用时加 10% FBS 和 1% 双抗) 培养 A375 细胞, 完全的 DMEM 配制: 将一包 DMEM 粉末倒入 1 000 mL 的烧杯里, 加入 1 000 mL 的超纯水溶解均匀并加入 3.7 g 的 NaHCO_3 , 并用 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 目的在于除菌, 过滤好的 DMEM 培养基分装后在 4°C 冰箱备用, 使用时加入 10% 的 FBS 和 1% 的双抗 (青霉素和链霉素)。A375 细胞用配制好的完全培养基置于温度为 37°C , 5% 的 CO_2 培养箱培养, 每隔 3 天消化传代一次。

新狼毒素 A 储备液的配制: 取 10 mg 的新狼毒素 A 于 200 μL 的 EP 管中, 同时向 EP 管中加入 184.5 μL 的 DMSO, 得到 $1 \times 10^5 \mu\text{mol/L}$ 的母液, 封装放置于 -20°C 长期保存。

2.2 新狼毒素 A 对 A375 细胞增殖能力的影响

将对数生长期 (生长到 80% ~ 90%) 的 A375 细胞消化后, 按每孔 100 μL 铺于 96 孔板 (1×10^5 个/mL) 培养 24 h, 然后吸出旧培养基, 加入含新狼毒素 A 的培养基 (0、15、30、45、60 $\mu\text{mol/L}$) 继续培养, 培养时间为 24 h 或 48 h, 吸出旧的含药培养基加入含 MTT (5 mg/mL) 的新鲜培养基 10 μL 继续培养 4 h, 用 150 μL 的 DMSO 代替含 MTT 的培养基, 并在振荡仪上震荡 10 min, 用酶标仪检测吸光度 (570 nm) 并计算其抑制率。

2.3 Hoechst 33258 观察细胞形态

取处于对数期的细胞消化后接种于 6 孔板 (3×10^5 个/mL), 每孔 2 mL 培养培养 24 h, 吸出旧培养基, 加入含新狼毒素 A 的培养基 (0、15、30、45 $\mu\text{mol/L}$) 培养 48 h, 用 PBS 洗涤 2 遍细胞后加入 1 mL 的固定液 (甲醇: 冰乙酸 = 3: 1) 作用 15 min, PBS

洗 2 遍,加入 Hoechst 33258 染料 (Hoechst 33258: PBS = 1:1 000)作用 10 min,弃去染料,用 PBS 洗涤后加入 PBS 浸没 A375 细胞,在倒置荧光显微镜下观察新狼毒素 A 作用于细胞后对细胞形态的改变。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

取处于对数期的细胞消化后接种于 6 孔板 (3×10^5 个/mL),每孔加 2 mL 培养基培养 24 h,吸出旧培养基,加入含新狼毒素 A 的培养基 (0、15、30、45 $\mu\text{mol/L}$)作用 48 h,收集细胞,用 PBS 洗 2 遍,加入 500 μL 的 Binding Buffer,轻轻混匀后,再加入 5 μL 的 Annexin V-FITC,轻轻混匀,再加入 5 μL 的 PI 染色 10 min 后,用流式细胞仪检测新狼毒素 A 作用于细胞 48 h 后细胞凋亡率。

2.5 JC-1 染色法检测细胞线粒体膜电位变化

将对数生长期 (生长到 80% ~ 90%) 的细胞接种于 6 孔板 (3×10^5 个/mL),24 h 后吸出旧培养基,加入含新狼毒素 A 培养基 (0、15、30、45 $\mu\text{mol/L}$)作用 48 h,收集细胞,加入用稀释好的 JC-1 溶液 500 μL 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,稀释好的 $1 \times$ Incubation Buffer 洗涤 2 次,加入 500 μL 的 $1 \times$ Incubation Buffer 混匀细胞,用流式细胞仪检测新狼毒素 A 作用于细胞 48 h 后细胞线粒体膜电位的变化,酶标仪检测红色与绿色荧光,以红色与绿色荧光比值代表线粒体线粒体膜电位的变化。

2.6 Western blot 检测 Bax, Bcl-2, caspase-3 和 Cytochrome C 的蛋白表达

取对数期生长的细胞接种于中培培养 (5×10^5 个/mL),24 h 后吸出旧培养基,加入含新狼毒素 A 培养基使其终浓度为 (0、15、30、45 $\mu\text{mol/L}$)作用 48 h 后,加入高效细胞裂解液在冰上裂解 30 min,并且每 5 min 来回晃动几下,裂解结束后用细胞刮将细胞刮下后离心 (12 000 rpm, 5 min),收集上清蛋白,在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

将提取好的蛋白用 $4 \times$ 蛋白上样缓冲液和电泳液煮蛋白后加入到 15% 的聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 进行电泳,电泳结束后将 SDS-PAGE 胶上的特定蛋白转到 PVDF 膜上,转膜结束后用 5% 脱脂奶粉或者 5% BSA 封闭 PVDF 膜 2 h,20 mL 的 TBST 溶液洗 4 次膜 (每次 5 min),洗膜结束后用稀释好的一抗抗体孵育过夜,次日用 20 mL 的 TBST 溶液洗膜 (4 次,每次 5 min),结束后用相应的辣根酶标记的二抗孵育 1 h,同样用 20 mL 的 TBST 溶液洗 4 次膜 (每次 5 min),用 ECL 发光液浸没膜,化学发

光成像系统曝光条带,用 Image J 处理数据。

2.7 数据处理

以上所有实验至少重复 3 次,用 SPSS19.0 进行统计分析,用平均值 \pm 标准差表示,使用 t 检测进行组间统计学检测。 $P < 0.05$ 表示具有统计学上的显著性差异, $P < 0.01$ 表示具有统计学上的极显著性差异。

3 结果

3.1 新狼毒素 A 抑制 A375 细胞的增殖

如图 1 所示,不同浓度的新狼毒素 A 处理 A375 细胞 24 h 和 48 h 后,与正常组相比,新狼毒素 A 处理组细胞的抑制率随着新狼毒素 A 浓度的增加和时间的延长也逐渐增加。给药 48 h 时各组细胞抑制率分别为 $22.88\% \pm 4.50\%$, $31.49\% \pm 3.61\%$, $51.64\% \pm 4.47\%$ 和 $59.4\% \pm 5.20\%$ 。

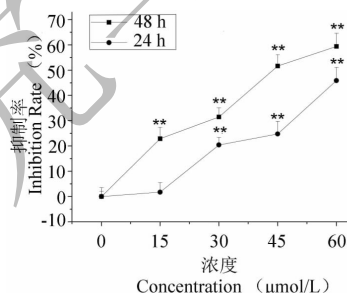


图 1 新狼毒素 A 抑制 A375 细胞的增殖 ($n = 3$)

Fig. 1 Effect of Neochamaejasmin A on proliferation in A375 cells ($n = 3$)

注:与正常组相比,** $P < 0.01$ 。

Note: ** $P < 0.01$, compared with normal group.

3.2 新狼毒素 A 诱导 A375 细胞形态发生改变

如图 2 所示,新狼毒素 A 处理细胞 48 h 后,正常组细胞呈圆形或椭圆形,荧光染色均匀,细胞饱满透亮。新狼毒素 A 处理 A375 细胞后出现显著的凋亡特征如组细胞间隙变大,细胞体积变小,皱缩,核质浓缩,凋亡小体形成。

3.3 新狼毒素 A 诱导 A375 细胞发生凋亡

不同浓度新狼毒素 A 作用于 A375 细胞 48 h 后,各组细胞总凋亡率分别为 $2.88\% \pm 0.9\%$, $21.39\% \pm 4.93\%$, $30.96\% \pm 4.77\%$ 和 $44.78\% \pm 5.43\%$,此结果显示,与正常组相比,新狼毒素 A 处理组细胞凋亡率随着浓度的增加而逐渐增加,且呈剂量依赖性 ($P < 0.01$) (如图 3)。

3.4 新狼毒素 A 降低 A375 细胞线粒体膜电位

如图 4 所示,不同浓度的新狼毒素 A 作用于细

胞后,细胞的红色荧光与绿色荧光的比值随着新狼毒素 A 浓度的增大而逐渐降低且呈现剂量依赖性

($P < 0.01$),这说明新狼毒素 A 降低了 A375 细胞线粒体膜电位。

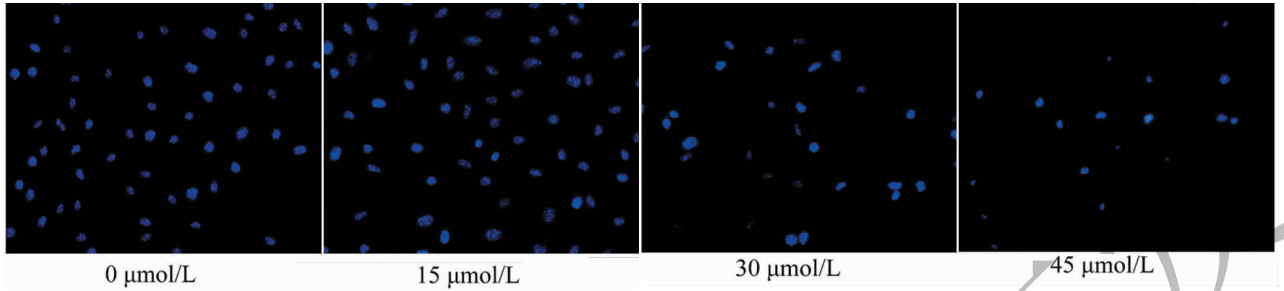


图 2 新狼毒素 A 对 A375 细胞形态的影响 (×400) (n=3)

Fig. 2 Effect of Neochamaejasmin A on morphology in A375 cells (×400) (n=3)

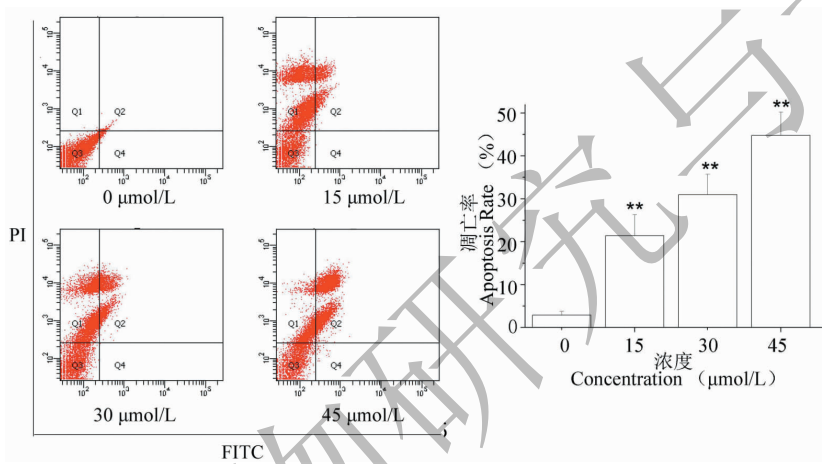


图 3 新狼毒素 A 诱导 A375 细胞凋亡 (n=3)

Fig. 3 Effect of Neochamaejasmin A on apoptosis rate in A375 cells (n=3)

注:与正常组相比, ** $P < 0.01$ 。

Note: ** $P < 0.01$, compared with normal group.

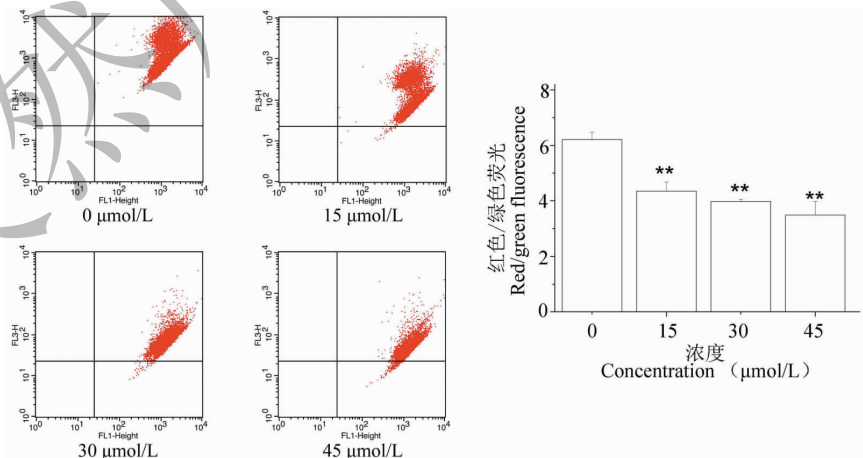


图 4 新狼毒素 A 诱导 A375 细胞线粒体膜电位的改变 (n=3)

Fig. 4 Effect of Neochamaejasmin A on mitochondrial membrane potential in A375 cells (n=3)

注:与正常组相比, ** $P < 0.01$ 。

Note: ** $P < 0.01$, compared with normal group.

3.5 新狼毒素 A 诱导 Bax, Bcl-2 和 caspase-3 和 Cytochrome C 的蛋白改变

如图 5 所示,与正常组相比,各处理组 A375 细胞的 Bax, caspase-3 和 Cytochrome C 的蛋白表达显

著增加,而 Bcl-2 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。这表明新狼毒素 A 通过线粒体途径诱导 A375 细胞的凋亡。

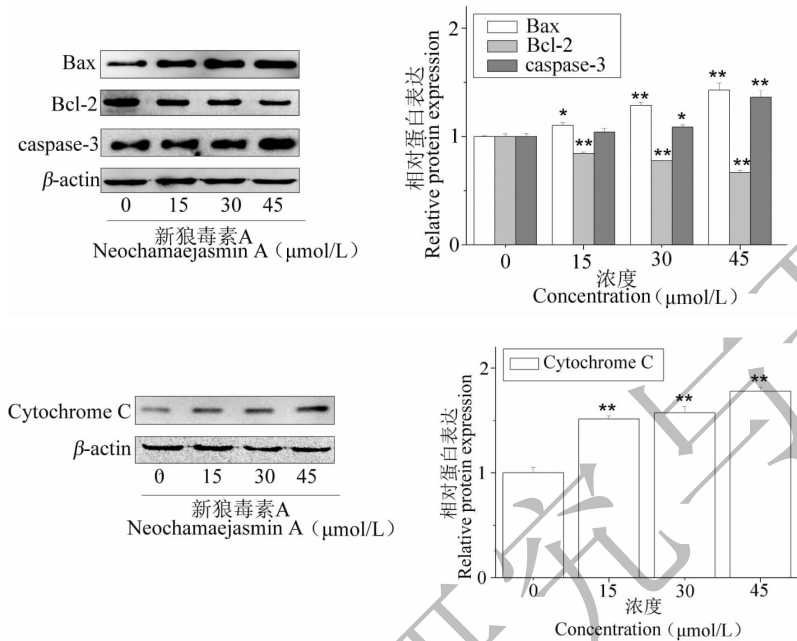


图 5 新狼毒素 A 引起 A375 细胞 Bax, Bcl-2, caspase-3 和 Cytochrome C 的蛋白改变 ($n = 3$)

Fig. 5 Effect of Neochamaejasmin A on Bax, Bcl-2, caspase-3 and Cytochrome C in A375 cells ($n = 3$)

注:与正常组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared with normal group.

4 讨论

黑色素瘤是由黑色素细胞恶性转化而来的恶性程度很高的人类肿瘤,其具有转移性高的特点。现有的一些化疗药物不仅无法起到预期的效果还具有很大的不良反应,严重影响患者的生存健康。而从天然化合物中寻找活性物质成为了很多学者研究的焦点。

研究表明,狼毒里的多种有效成分都能显著抑制多种细胞的增殖^[10,11]。为了探究新狼毒素 A 是否能影响 A375 细胞的生长和增殖,MTT 实验用于检测 A375 细胞的活力,在本实验中新狼毒素 A 以时间剂量依赖性的方式显著抑制 A375 细胞的生长和增殖。Hoechst 33258 结果显示新狼毒素 A 处理 A375 细胞后,细胞体积变小,细胞皱缩,核质浓缩且凋亡小体形成。这表明新狼毒素 A 显著抑制 A375 细胞的增殖,这种作用可能是通过诱导凋亡来实现的。Bcl-2 家族在凋亡途径中起着至关重要的作用^[16]。Bcl-2 是抗凋亡蛋白,Bax 是促凋亡蛋白。当

细胞受到内部或者外部的刺激后,位于细胞质中的 Bax 会被召集到线粒体膜上,帮助细胞色素 C 释放至细胞质从而活化 caspase 家族启动细胞凋亡级联反应。存在于线粒体膜上的 Bcl-2 蛋白能稳定线粒体膜电位,抑制细胞色素 C 的释放,而起到抑制细胞凋亡的作用^[17]。Bax 和 Bcl-2 的比率能判断细胞是否进入凋亡。研究发现当 Bcl-2 高表达时,Bcl-2 会与 Bax 形成异源二聚体而抑制细胞凋亡,当 Bax 高表达时,Bax 会自身形成同源二聚体促进细胞凋亡^[18]。caspase 家族是细胞凋亡信号通路的共同通路,caspase-3 是细胞凋亡过程中的执行者。当 Bax 被激活后,从细胞质进入线粒体后,线粒体膜通透性会因此发生改变,Cytochrome C 及其他凋亡诱导因子也会因此大量释放^[19],细胞色素 C 能够与凋亡蛋白酶活化因子(Apaf-1)形成聚合物,活化 procaspase-9 成为具有活性的 caspase-9,诱使下游的 procaspase-3 活化,最终导致细胞发生凋亡。研究发现,Bcl-2 不仅是 caspase-3 的上游,还可以作为

caspase-3 的直接底物^[20]。本实验结果显示新狼毒素 A 作用 A375 细胞后,凋亡率随着新狼毒素 A 剂量的增加而逐渐增加,而线粒体膜电位却在逐渐降低,除此之外,线粒体凋亡相关蛋白表达如 Bax, caspase-3 和 Cytochrome C 的表达逐渐增加,但 Bcl-2 的蛋白表达逐渐减少。

以上结果综合表明,新狼毒素 A 能显著抑制 A375 细胞的增殖并诱导细胞凋亡。其机制可能与诱导线粒体途径的凋亡有关。

参考文献

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68: 394-424.
- 2 Zhang GQ, Zhang ZL, Ding ZY, et al. New progress in the treatment of malignant melanoma[J]. Chin J Gerontol (中国老年学杂志), 2015, 35: 6281-6284.
- 3 Li XQ, Rahman K, Zhu JY, et al. Chemical constituents and pharmacological activities of *Stellera chamaejasme* [J]. Curr Pharm Des, 2018, 24: 2825-2838.
- 4 Asada Y, Sukemori A, Watanabe BT, et al. Stelleralides A-C, novel potent anti-hiv daphnane-type diterpenoids from *Stellera chamaejasme* L. [J]. Org Lett, 2011, 13: 2904-2907.
- 5 Fan JJ, Jia ZP, Xie JW, et al. Effect of polysaccharide in ruixiang langdu (*Stellera chamaejasme* L.) on immune function in mice treated with cyclophosphamide [J]. Med J ND-FNC (西北国防医学杂志), 2000, 21: 263-265.
- 6 Li WJ, Gong XX, Wang H, et al. Preliminary study of the antibiotic activities of the roots of toxin stellera chamaejasme in the qinghai-tibet plateau [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin (西北植物学报), 2005, 25: 1661-1664.
- 7 Cui HY, Jin H, Wang DD, et al. Nematicidal activities of isoneochamaejasmin A and neochamaejasmin B from the roots of *Stellera chamaejasme* L. against bursaphelenchus xylophilus and bursaphelenchus mucronatus [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2014, 26: 639-644.
- 8 Feng BM. Research on the anti-epilepsy constituents of *Stellera chamaejasme* L. and citrus grandis osbeck [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学), 2002.
- 9 Liu F, Liu H, Sun L. Quantitative expression of telomerase after treating human lung cancer cells NCI-H446 [H446] with radix euphorbiae fischerianae [J]. J Hebei North Univ: Health Sci (河北北方学院学报:医学版), 2008, 25: 27-29.
- 10 Zhang C, Zhou SS, Feng LY, et al. In vitro anti-cancer activity of chamaejasmenin B and neochamaejasmin C isolated from the root of *Stellera chamaejasme* L. [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34: 262-270.
- 11 Wang ZX, Cheng MC, Zhang XZ, et al. Cytotoxic biflavones from stellera chamaejasme [J]. Fitoterapia, 2014, 99: 334-340.
- 12 Wang YJ, Li Q, Xiao HB, et al. Chamaejasmin B exerts anti-MDR effect *in vitro* and *in vivo* via initiating mitochondria-dependant intrinsic apoptosis pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 5301-5313.
- 13 Zhang T, Yu H, Dong G, et al. Chamaejasmine arrests cell cycle, induces apoptosis and inhibits nuclear NF- κ B translocation in the human breast cancer cell line MDA-MB-231 [J]. Molecules, 2013, 18: 845-858.
- 14 Zhang SD, Shan L, Li W, et al. Isochamaejasmin induces apoptosis in leukemia cells through inhibiting bcl-2 family proteins. [J]. Chin J Nat Med, 2015, 13: 660-666.
- 15 Liu WK, Cheng FW, Liu BP, et al. Involvement of p21 and FasL in induction of cell cycle arrest and apoptosis by neochamaejasmin A in human prostate LNCaP cancer cells [J]. J Nat Prod, 2008, 71: 842-846.
- 16 Tsukahara S, Yamamoto S, Shwe TT, et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the bcl-2/bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice [J]. Neuroimmunomodulation, 2006, 13: 63-68.
- 17 Haeberlein SL. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death [J]. Neurochem Res, 2004, 29: 521-530.
- 18 Jiang YS, Jiang SM, Song N, et al. Effects of yangwei jiedu mixture on intestinal tissue of rats with sepsis apoptosis factors bax, bcl2 and caspase3 [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2018, 36: 1450-1453.
- 19 Perier C, Bové J, Wu DC, et al. Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental parkinson's disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 8161-8166.
- 20 Voutsadakis IA. Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma [J]. Acta Oncol, 2000, 39: 151-156.