

· 药理 ·

## 从线粒体途径探讨凉血化瘀方对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 致肝细胞凋亡的保护作用

姜泽群, 姚志华, 邓正亭, 蒋鑫超, 颜晓静, 陈卫平\*  
(南京中医药大学, 南京 210023)

**[摘要]** **目的:**从线粒体途径探讨凉血化瘀方对肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和 *D*-氨基半乳糖 (*D*-GalN) 所致肝细胞凋亡的保护作用。**方法:**体外培养人正常肝 L02 细胞, 用 TNF- $\alpha$  ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 *D*-GalN ( $44 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 诱导肝细胞损伤模型, 荧光显微镜观察细胞凋亡的形态学变化; 采用细胞增殖实验 (MTT) 法检测细胞活力; Annexin V-FITC/PI 双染色法结合高内涵细胞成像系统检测肝细胞凋亡; 罗丹明 123 (Rh123) 染色结合高内涵分析系统检测线粒体跨膜电位; Western-blot 检测线粒体途径凋亡标志蛋白凋亡蛋白酶激活因子 (Apaf-1)、细胞凋亡诱导因子 (AIF)、胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9) 表达水平的变化。**结果:**与正常对照组相比, TNF- $\alpha$  和 *D*-GalN 可明显抑制 L02 肝细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 使细胞线粒体跨膜电位明显下降, 并使促凋亡蛋白 Apaf-1, AIF, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 的表达显著增加。不同浓度的凉血化瘀方作用后, 与 TNF- $\alpha$ /GalN 损伤组相比, 可显著减轻 L02 肝细胞的增殖抑制、减少细胞凋亡, 抑制细胞线粒体跨膜电位的下降, 并促使凋亡蛋白 Apaf-1, AIF, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 的表达量呈逐渐下降的趋势。**结论:**凉血化瘀方对 TNF- $\alpha$  和 *D*-GalN 所诱导的肝细胞凋亡具有抑制作用, 其机制可能与稳定线粒体的膜电位和下调促凋亡基因 Apaf-1, AIF, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 的表达有关。

**[关键词]** 肝细胞凋亡; 凉血化瘀方; 线粒体

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0169-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013180169

## Protective Effects of Liangxue Huayu Recipe on Hepatic Cell Apoptosis Induced by TNF- $\alpha$ through the Mitochondrial Pathway

JIANG Ze-qun, YAO Zhi-hua, DENG Zheng-ting, JIANG Xin-chao, YAN Xiao-jing, CHEN Wei-ping\*  
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**[Abstract]** **Objective:** The present study was designed to examine whether Liangxue Huayu recipe (LHR) had the protective effects on *D*-galactosamine (*D*-GalN) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-treated human L02 hepatocytes and its possible association through the mitochondrial pathway. **Method:** Hepatocytes L02 injured by *D*-GalN and TNF- $\alpha$  was treated by LHR. The morphological changes of the cells were observed under inverted phase-contrast microscopy. The percentage of cell viability was evaluated by MTT. Apoptosis and mitochondrial membrane potential (MMP) were determined by high content screening (HCS) assay. In addition, the expression levels of apoptosis protease activation factor-1 (Apaf-1), apoptosis induced factor (AIF), cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 were detected by Western-blot analysis in L02 cells. **Result:** It revealed that LHR pretreatment improved the morphology of TNF- $\alpha$ /GalN-treated human L02 hepatocytes. The study also showed

**[收稿日期]** 20130515(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81072777, 81273638); 江苏省高校优势学科建设工程项目(PAPD); 江苏省高等学校大学生创新训练计划项目(011042001000, 640)

**[第一作者]** 姜泽群, 博士, 讲师, 从事中药分子药理研究, Tel: 025-85811930, E-mail: jiangzq@sina.com

**[通讯作者]** \* 陈卫平, 教授, 博导, Tel: 025-85811923, E-mail: wp2002123@163.com

that incubation with LHR caused significant increase in the viability of L02 cell and decrease of cell apoptosis. Furthermore, LHR prevented the loss of MMP, inhibited the upregulation of Apaf-1 and AIF protein expression, which was accompanied with a decrease in cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 activation in this cell model. **Conclusion:** These results indicate that LHR is effective in attenuating hepatocyte apoptosis in human L02 cells, and this effect is partly mediated through prevention on the loss of MMP and subsequent regulation of particular proapoptotic gene expression.

[ **Key words** ] hepatocyte apoptosis; Liangxue Huayu Recipe (LHR); mitochondria

凉血化瘀方是在叶天士温病“凉血散血”基本治法的基础上,结合多年临床治疗经验和重型肝炎瘀热相搏的病理特点而确立的方药,具有清热养阴、凉血化瘀、泻火解毒作用,方药通过正交设计优选最终由生地黄、制大黄、赤芍组成,其用药配伍合理,药效安全可靠<sup>[1-5]</sup>。前期研究结果显示,凉血化瘀方对重型肝炎和实验性肝衰竭确有较好的防治作用,初步探明了凉血化瘀法防治肝衰竭的作用机制是通过抗肝细胞凋亡保护肝细胞、减轻肝损伤而发挥良好的治疗作用<sup>[6-10]</sup>。本实验拟在前期研究的基础上,利用肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和D-氨基半乳糖(D-GalN)所诱导的肝细胞凋亡模型,以线粒体凋亡途径为核心,探讨凉血化瘀方抗肝细胞凋亡作用的可能机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 凉血化瘀方药物组成:赤芍、生地黄、制大黄。饮片在安徽省医药公司购买,由南京中医药大学中药鉴定教研室鉴定,按照2005年版《中国药典》一部各中药项下要求,进行相关质量分析包括主要成分含量测定,确保所用饮片质量符合《中国药典》的规定。称取赤芍300 g,生地黄200 g,制大黄200 g,置不锈钢锅中加10倍蒸馏水浸润1 h,然后置电炉上加热煎煮1 h,用纱布过滤药液,取滤液;药物残渣加5倍蒸馏水煎煮40 min,纱布过滤,取滤液,重复1次;合并3次滤液,用旋转蒸发器将之浓缩为100 mL,加3倍95%乙醇4℃过夜,在低温超速离心机中20 000 r·min<sup>-1</sup> 4℃离心10 min,取上清。旋转蒸发器挥发乙醇至尽,并将药液浓缩成含生药量1 000 g·L<sup>-1</sup>的糊状药液,0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,-20℃冰箱保存备用。细胞培养时用无血清的DMEM培养基稀释到相应终浓度(分别为1,0.1,0.01 g·L<sup>-1</sup>),并将pH调到7.0即可。

**1.2 试剂** DMEM高糖培养基(Gibco,批号12100-038)、胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号090802)、胰蛋白酶(Bio-sharp,批号27250-018)、二甲基亚砜(DMSO,分析纯,国药集团化学试

剂有限公司,批号T20070917);D-GalN,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、罗丹明123(Rh123,美国Sigma公司),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ , Cytolab/Peptrotechasia公司),双染Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(Invitrogen公司),凋亡蛋白酶激活因子(apoptosis protease activation factor-1, Apaf-1),细胞凋亡诱导因子(apoptosis induced factor, AIF),半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9)以及 $\beta$ -actin一抗和相应二抗,均购自Santa Cruz公司;化学发光(ECL)检测试剂盒Pierce公司。

**1.3 细胞株** 人正常肝细胞株L02购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

**1.4 仪器** BP221S型电子天平(Sartorius),倒置显微镜(重庆光学仪器厂),3111型恒温孵育箱(Thermo),3K-15型超低温高速离心机(Sigma),TE2000-S型荧光显微镜(Nikon),MK3酶标仪(Thermo),高内涵细胞分析系统(Thermo Fisher Scientific),多功能核酸蛋白测定仪(Bio Spec MiNi, Shimadzu)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养和分组** 将人正常肝L02细胞接种于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,在含有5%CO<sub>2</sub>的37℃恒温孵育箱中培养,用0.25%胰蛋白酶消化传代,每1~2 d传代1次。取处于生长对数期的L02细胞随机分为空白对照组,损伤组和药物保护组。对照组未加任何处理因素;损伤组即常规培养24 h后,用含有TNF- $\alpha$  100 ng·mL<sup>-1</sup>和D-GalN 44 μg·mL<sup>-1</sup>(TNF- $\alpha$ /GalN)的培养基继续孵育24 h诱导肝细胞损伤;凉血化瘀方保护组即用凉血化瘀方0.01,0.1,1 g·L<sup>-1</sup>预处理细胞24 h后,换含TNF- $\alpha$ /GalN的培养基继续孵育24 h。各组在相同时间点加入TNF- $\alpha$ /GalN,空白对照组加入等量PBS,每组均设3个平行孔。

**2.2 检测肝细胞活力** 取处于对数生长期的L02细胞,用0.25%胰蛋白酶消化制成细胞悬液,调整密

度为  $1 \times 10^5$  个/mL 加入 96 孔培养板,每孔 0.1 mL,接种于 96 孔板中,设对照组、损伤组和保护组,各组处理方法见 2.1。培养结束后,采用经典的 MTT 比色法测定吸光度,在 550 型酶联免疫检测仪于波长 490 nm (参考波长 610 nm) 处测定各孔的吸光度 ( $A_{490}$ )。

**2.3 Annexin V-FITC/PI 双标记凋亡检测** 取对数生长期的单细胞悬液,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL,将细胞接种于 96 孔板,每孔 0.1 mL,24 h 后换液,分组处理方法和时间同 2.1,后消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次,重悬于 Binding Buffer 中,加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 3  $\mu$ L,室温避光染色 15 min,用高内涵细胞成像分析系统检测观察正常、早期凋亡和晚期凋亡细胞。

**2.4 线粒体跨膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 的测定** 取对数生长期的单细胞悬液,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL,将细胞接种于 96 孔板,每孔 0.1 mL,24 h 后换液,分组处理一定时间(处理方法和时间同 2.1)后,0.25% 胰蛋白酶消化、收集细胞,经 PBS 清洗 2 次,与  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Rh123 在 37  $^{\circ}\text{C}$  共同孵育 30 min, PBS 清洗 2 次,用高内涵细胞成像分析系统 (Thermo Fisher Scientific 公司) 检测其荧光强度,以处理组细胞的荧光强度与正常细胞的比值为相对跨膜电位。

**2.5 Western blot 方法检测线粒体途径 Apaf-1, AIF, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 的表达** 取对数生长期的单细胞悬液,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL,将细胞接种于 6 孔板,每孔 1 mL,24 h 后换液,分组处理一定时间(处理方法和时间同 2.1)后,刮法收集细胞。冰上裂解细胞 1 h 后,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清即为总蛋白。以 Bradford 法测定蛋白浓度后,取 30  $\mu\text{g}$  蛋白加上样缓冲液,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳结束后湿法转膜(硝酸纤维素膜),然后用封闭液 4  $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜,洗膜后加入适当稀释比例一抗抗体、孵育过夜,常规洗膜 3 次,继而与二抗抗体室温孵育 2 h,常规洗膜,显影,定影,读取结果。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 软件对所得数据进行统计处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用  $t$  检验。

### 3 结果

**3.1 对 L02 细胞增殖的影响** 与正常对照组相比, TNF- $\alpha$  和 GalN 作用于 L02 肝细胞后,细胞的增殖受到明显抑制,不同浓度的凉血化瘀方作用后,对

TNF- $\alpha$ /GalN 造成的肝细胞增殖抑制有明显的恢复作用,并表现出剂量依赖性的保护效果(表 1)。

表 1 凉血化瘀方对 TNF- $\alpha$ /GalN 处理 L02 肝细胞增殖和线粒体 MMP 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_{490}$	MMP/%
正常对照	-	$1.084 \pm 0.103$	$100 \pm 14$
损伤 <sup>4)</sup>	1	$0.368 \pm 0.042^{1)}$	$30 \pm 8^{1)}$
凉血化瘀方 <sup>4)</sup>	0.01	$0.418 \pm 0.061$	$45 \pm 3^{2)}$
	0.1	$0.568 \pm 0.080^{2)}$	$76 \pm 6^{3)}$
	1	$0.727 \pm 0.095^{3)}$	$82 \pm 9^{3)}$

注:与正常对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与损伤组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~3 同);<sup>4)</sup> TNF- $\alpha$ /GalN 剂量为 0.1, 44  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.2 对线粒体跨膜电位的影响** 经过 TNF- $\alpha$ /GalN 处理后,L02 细胞内线粒体跨膜电位显著降低 ( $P < 0.01$ ),提示 TNF- $\alpha$ /GalN 对 L02 细胞的线粒体造成了损伤。经过不同浓度的凉血化瘀方预处理后,细胞线粒体膜电位有明显的提高 ( $P \leq 0.05$ ),说明凉血化瘀方对 TNF- $\alpha$ /GalN 引起的线粒体损伤有明显的保护作用(表 1)。

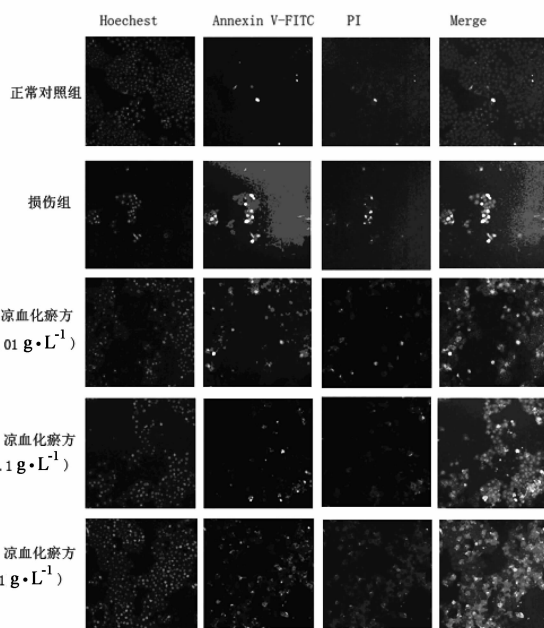


图 1 凉血化瘀方对 TNF- $\alpha$ /GalN L02 肝细胞凋亡的影响

**3.3 对肝细胞凋亡的影响** Hoechst/Annexin V/PI 标记法结果显示,正常对照组肝细胞几乎无坏死和凋亡。TNF- $\alpha$ /GalN 损伤组早期和晚期凋亡、坏死细胞数量明显增多;凉血化瘀方保护组随着加药浓度的增大,凋亡和坏死细胞的数目明显减少,正常细胞的比例则相应增加(图 1,表 2)。

**3.4 对线粒体途径凋亡蛋白 Apaf-1, AIF, cleaved**

表 2 凉血化瘀方对 TNF- $\alpha$ /GalN 处理的 LD2 肝细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分组	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	Hoechst 荧光强度	FITC 荧光强度	PI 荧光强度
正常对照	-	6 437.93 $\pm$ 112.70	11.99 $\pm$ 0.51	4.4 $\pm$ 0.28
损伤 <sup>4)</sup>	-	1 794.18 $\pm$ 38.87 <sup>1)</sup>	599.31 $\pm$ 17.02 <sup>1)</sup>	189.03 $\pm$ 7.44 <sup>1)</sup>
凉血化瘀方 <sup>4)</sup>	0.01	2 711.38 $\pm$ 201.08 <sup>2)</sup>	124.58 $\pm$ 18.89 <sup>3)</sup>	76.2 $\pm$ 3.25 <sup>3)</sup>
	0.1	3 363.38 $\pm$ 102.24 <sup>3)</sup>	113.78 $\pm$ 15.35 <sup>3)</sup>	64.40 $\pm$ 1.51 <sup>3)</sup>
	1	4 571.91 $\pm$ 234.51 <sup>3)</sup>	100.09 $\pm$ 12.12 <sup>3)</sup>	39.40 $\pm$ 0.82 <sup>3)</sup>

Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 表达的影响

Western-blot 结果显示,经过 TNF- $\alpha$ /GalN 刺激后,线粒体途径凋亡基因 Apaf-1, AIF, cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 的蛋白表达量显著增加,凉血化瘀方作用后对以上促凋亡蛋白的表达有不同程度的抑制作用,且呈明显的量效关系,证实了线粒体凋亡途径的参与(图 2,表 3)。

4 讨论

肝细胞凋亡是病毒性肝炎及肝衰竭的重要发病机制之一,细胞凋亡是级联式基因表达的结果,细胞内部的基因直接调控凋亡的发生和发展,细胞外部因素通过信号转导通路影响这些基因的表达,从而

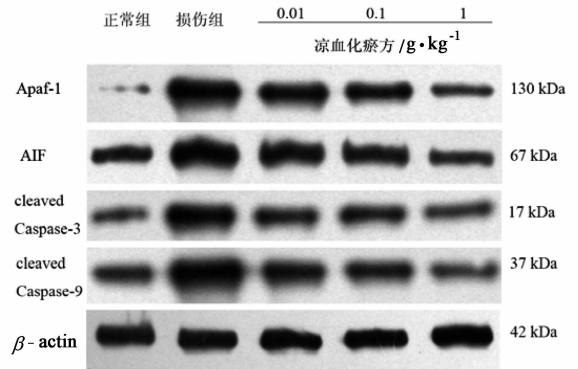


图 2 凉血化瘀方对 TNF- $\alpha$ /GalN 处理后线粒体途径 Apaf-1, AIF, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白表达水平的影响

表 3 凉血化瘀方对 TNF- $\alpha$ /GalN 刺激后线粒体途径 Apaf-1, AIF, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白相对表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分组	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	Apaf-1/ $\beta$ -actin	AIF/ $\beta$ -actin	Cleaved Caspase-3/ $\beta$ -actin	Cleaved Caspase-9/ $\beta$ -actin
正常对照	-	0.17 $\pm$ 0.006	1.17 $\pm$ 0.016	0.69 $\pm$ 0.004	1.31 $\pm$ 0.019
损伤 <sup>4)</sup>	-	2.60 $\pm$ 0.024 <sup>1)</sup>	2.37 $\pm$ 0.021 <sup>1)</sup>	2.12 $\pm$ 0.021 <sup>1)</sup>	3.24 $\pm$ 0.033 <sup>1)</sup>
凉血化瘀方 <sup>4)</sup>	0.01	1.97 $\pm$ 0.020 <sup>2)</sup>	1.87 $\pm$ 0.020 <sup>2)</sup>	1.32 $\pm$ 0.019 <sup>3)</sup>	1.11 $\pm$ 0.014 <sup>3)</sup>
	0.1	1.41 $\pm$ 0.014 <sup>3)</sup>	1.39 $\pm$ 0.017 <sup>2)</sup>	1.21 $\pm$ 0.015 <sup>3)</sup>	1.01 $\pm$ 0.024 <sup>3)</sup>
	1	0.80 $\pm$ 0.015 <sup>3)</sup>	1.01 $\pm$ 0.014 <sup>3)</sup>	1.03 $\pm$ 0.008 <sup>3)</sup>	0.87 $\pm$ 0.016 <sup>3)</sup>

间接调控凋亡。肝细胞的凋亡通路主要有两条:一条是外源性通路,即死亡受体介导的凋亡通路,此通路由死亡受体及配体系统激发的凋亡信号引发细胞凋亡(作者前期研究主要针对此通路,已证实凉血化瘀方对其的调控作用<sup>[8-10]</sup>)。另一通路称为内源性通路,即线粒体介导的凋亡通路,在细胞凋亡过程中,通过呼吸电子漏途径,线粒体产生大量活性氧,使其通透性转换孔开放,引起线粒体跨膜电位降低,导致凋亡蛋白酶激活因子 Apaf-1、细胞凋亡诱导因子 AIF 等凋亡蛋白从线粒体释放到胞浆,随之引起半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase)瀑布式活化和细胞死亡<sup>[11-14]</sup>。

在线粒体介导的细胞凋亡过程中,线粒体膜电位是最早出现的细胞内反应之一,一旦发生线粒体膜电位耗散,细胞就会进入一种不可逆的凋亡过

程<sup>[15]</sup>。本实验结果表明:TNF- $\alpha$  和 GalN 处理 L02 肝细胞后,导致线粒体膜电位显著下降,抑制了细胞增殖,诱导了细胞凋亡,出现了典型的凋亡形态学变化。TNF- $\alpha$  在肝细胞发生异常凋亡的过程中起着关键性的作用,而 GalN 可有效抑制细胞的转录过程而促进 TNF- $\alpha$  的凋亡效应,当 TNF- $\alpha$  和 GalN 联用后可抑制细胞的增殖,增强细胞的损伤,其中尤以细胞凋亡呈增加趋势<sup>[16-18]</sup>。本研究再次证明了 TNF- $\alpha$  和 GalN 联用能引起肝细胞的增殖抑制和诱导其凋亡的发生,从而损伤肝细胞。而凉血化瘀方可有效拮抗 TNF- $\alpha$  和 GalN 诱导的肝细胞凋亡,不同浓度的凉血化瘀方作用 L02 细胞后,抑制了线粒体膜电位的下降,使细胞凋亡数目显著减少,其机制可能与线粒体介导的凋亡通路密切相关。

经线粒体途径引发的肝细胞凋亡是一个非常复

杂的过程,很多凋亡因子都参与其中,如凋亡蛋白酶激活因子 Apaf-1 可与细胞色素 C, Caspase-9 前体形成复合体即凋亡小体,活化的 Caspase-9 再激活下游的 Caspase-3, Caspase-3 是细胞凋亡的最终执行者。未活化的 Caspase-3 以酶原的形式存在,被激活后可裂解产生  $1.7 \times 10^4$  的活性片段,后者可进入核内激活核酸内切酶从而切割 DNA, 导致细胞凋亡<sup>[19]</sup>。线粒体膜间隙还有细胞凋亡诱导因子 AIF, 正常情况下, AIF 定位于线粒体双层膜间隙中, 当细胞受到凋亡诱导因素刺激时, AIF 经线粒体膜通透性转运孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 从线粒体释放到胞浆中, 继而进入胞核中, 使细胞发生凋亡样程序性细胞死亡<sup>[19]</sup>。本实验结果表明, 在 TNF- $\alpha$  和 GalN 诱导的肝细胞凋亡模型中加入凉血化瘀方后, 线粒体途径促凋亡基因 Apaf-1, AIF, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 的表达均显著下降, 提示凉血化瘀方是通过调控线粒体途径凋亡相关基因的表达来影响细胞凋亡的发生, 而对肝细胞起到保护作用。

综上所述, 线粒体在调节肝细胞凋亡过程中发挥着关键作用, 凉血化瘀方拮抗 TNF- $\alpha$  和 D-GalN 诱导肝细胞凋亡的作用机制与线粒体介导的凋亡通路密切相关, 其机制可能是通过稳定细胞线粒体的跨膜电位、干扰细胞凋亡相关因子 Apaf-1, AIF, caspase 蛋白酶的表达而实现抑制细胞凋亡的目的。通过以上研究, 进一步揭示了凉血化瘀方保肝的作用机制, 为中医药防治肝损伤相关疾病提供了可行的方法和新的理论依据。

#### [参考文献]

- [1] 高学明. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010:144.
- [2] 吴清和. 中药药理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2010:87.
- [3] 刘鸣昊, 薛博瑜. 近 5 年来肝纤维化中医证治用药规律的文献研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):279.
- [4] 官宗华, 宋捷民. 中医实热证的研究及改进设想 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22):349.

- [5] 唐仕欢, 杨洪军. 中医组方用药规律研究进展述评 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5):359.
- [6] 陈卫平, 汪悦, 丁斐, 等. 凉血化瘀方抗肝细胞凋亡效应及对半胱天冬酶-3 mRNA 表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(4):300.
- [7] 陈卫平, 毕蕾, 张旭, 等. 凉血化瘀方对肝衰竭小鼠肝细胞凋亡和相关基因作用机制的初步研究 [J]. 中国中医药科技, 2006, 13(3):143.
- [8] 陈卫平, 汪悦. 凉血化瘀方抗肝细胞凋亡效应及对半胱天冬酶-3 mRNA 表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(4):300.
- [9] 陈卫平, 曾莉, 丁斐, 等. 内毒素肝损伤中 FADDmRNA 表达及凉血化瘀方的影响 [J]. 中国中医急症杂志, 2004, 13(1):39.
- [10] 陈卫平, 毕蕾, 张旭, 等. 凉血化瘀方对肝衰竭小鼠肝细胞凋亡和相关基因作用机制的初步研究 [J]. 中国中医药科技, 2006, 13(3):143.
- [11] 赵小祺, 王小荣, 张静. 线粒体相关物质与细胞凋亡 [J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2009, 26(6):80.
- [12] 周艺群, 谷志远. 线粒体与细胞凋亡 [J]. 解剖学进展, 2006, 12(1):60.
- [13] 陈旭, 王娟, 蒋晓山, 等. 莪术醇对肺癌 A549 细胞凋亡诱导因子、聚 ADP 核糖聚合酶及 Caspase-3 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 19:157.
- [14] 范颖, 才丽平, 于彩娜, 等. 参附汤、芪附汤、姜附汤对阿霉素心脏毒性损伤大鼠线粒体途径细胞凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8):135.
- [15] 吴兰芳, 杨爱珍, 刘和, 等. 线粒体调控细胞凋亡的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(8):63.
- [16] 臧国庆, 周霞秋, 俞红, 等. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  诱导肝细胞凋亡在暴发性肝衰竭中的作用 [J]. 中华消化杂志, 2000, 20(3):163.
- [17] 冯承恩, 毕宏, 李润祥, 等. 益肝散对 D-氨基半乳糖所致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 17(20):234.
- [18] 胡文军, 邓朝晖, 李国锋. 复方脑康胶囊对 D-半乳糖老化小鼠海马神经元凋亡级联反应的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):198.
- [19] 朱玉山, 陈佳. 线粒体与细胞凋亡调控 [J]. 生命科学, 2008, 20(4):506.

[责任编辑 聂淑琴]