

基于 Cer 通路探讨肝豆汤对 Wilson 病模型高铜诱导海马神经元细胞损伤的保护作用

徐陈陈¹, 董健健¹, 王训², 韩咏竹¹, 程楠^{1*}

(1. 安徽中医药大学神经病学研究所附属医院, 合肥 230061;

2. 安徽医科大学第二附属医院, 合肥 230601)

[摘要] **目的:**探讨肝豆汤调控海马神经元内神经酰胺(Cer)信号通路的分子靶点并观察其相应的调控机制。**方法:**本实验采用海马神经元 HT-22 细胞,分为正常组,模型组,10%,15%及20%肝豆汤组5个组,模型组为硫酸铜(CuSO₄)孵育 HT-22 细胞所得,正常组加入空白含药血清,10%,15%及20%肝豆汤组分别加含不同体积分数(10%,15%,20%)肝豆汤兔血清的培养基培养。噻唑蓝(MTT)比色法检测不同剂量 CuSO₄ 作用不同时间点对 HT-22 细胞生长和增殖的影响;流式细胞仪检测细胞内活性氧(ROS)释放量的变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Cer 信号通路相关蛋白表达情况。**结果:**MTT 结果显示 CuSO₄ 在一定时间和浓度范围内对 HT-22 细胞生长和增殖有明显抑制作用;流式细胞仪检测发现,与正常组比较,模型组 ROS 荧光强度显著增加($P < 0.01$),肝豆汤组较模型组可显著降低细胞内 ROS 的释放量($P < 0.01$)。Western blot 检测结果与模型组比较,肝豆汤组可明显降低细胞内酸性鞘磷脂水解酶(ASM),Cer,p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK),细胞色素 C(Cyt C),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**高铜可诱导 HT-22 细胞内线粒体氧化应激并引起 Cer 信号通路失活,从而诱导海马神经元损伤的发生。肝豆汤可能通过促进过量铜排出而抑制细胞内 ASM,Cer,p38 MAPK,Cyt C,Caspase-9,Caspase-3 蛋白的表达,从而减轻高铜对海马神经元的损伤作用。肝豆汤可通过减少脑内铜含量,进而调控 Cer 信号通路达到减轻高铜诱导海马神经元损伤的治疗效果。

[关键词] Wilson 病;肝豆汤;Cer 信号通路;HT-22 细胞

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)07-0056-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190701

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181217.0955.001.html>

[网络出版时间] 2018-12-18 11:12

Protective Effect of Gandou Decoction on Cer Signaling Pathway in HT-22 Induced by High Copper

XU Chen-chen¹, DONG Jian-jian¹, WANG Xun², HAN Yong-zhu¹, CHENG Nan^{1*}

(1. Hospital Affiliated to Neurological Institute, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China)

[Abstract] **Objective:** To detect ceramide (Cer) signaling pathway-related proteins expression levels in HT-22 with Gandou decoction (GDD), in order to explore its molecular targets and mechanism in regulating Cer signaling pathway. **Method:** The experiment was divided into normal group (normal HT-22 cultured by 10% blank rabbit serum), model group (HT-22 cells incubated with CuSO₄), and GDD group (HT-22 cells incubated with CuSO₄, continuously cultured by rabbit serum containing 10%, 15%, 20% GDD). HT-22 cells were incubated with different concentrations of CuSO₄. The cell growth and proliferation were assessed using methyl thiazolyl

[收稿日期] 20181010(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603596,81573954,81673948)

[第一作者] 徐陈陈,硕士,医师,从事神经系统遗传性疾病研究,E-mail:15209827776@163.com

[通信作者] *程楠,博士,副教授,从事神经系统遗传性疾病研究,E-mail:neurodoc120@163.com

tetrazolium (MTT) method; flow cytometry was used to analyze the expression of reactive oxygen species (ROS); Western blot was used to detect relevant protein expression of Cer signaling pathway. **Result:** The results of MTT showed that CuSO_4 inhibited the growth and proliferation of HT-22 cells in a time and concentration-dependent manner; flow cytometry results showed that the model group increased the release of ROS compared with the normal group ($P < 0.01$); compared with the model group, GDD could significantly reduce the release of ROS ($P < 0.01$). Western blot indicated that GDD concentration-dependently decreased the expressions of acid sphingomyelinase (ASM), Cer, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), cytochrome C (Cyt C), cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase)-9, Caspase-3 in HT-22 compared with the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** High copper can induce oxidative stress and deactivate Cer signaling pathway, which led to hippocampal neuron injury. These findings suggest that GDD reduces neurotoxicity induced by copper overload by increasing the copper excretion that inhibits the expressions of ASM, Cer, p38 MAPK, Cyt C, Caspase-9, Caspase-3. GDD reduces neurotoxicity induced by copper overload by decreasing copper levels in brain and then regulating Cer signaling pathway.

[**Key words**] Wilson's disease; Gandou decoction; Cer signaling pathway; HT-22 cell

Wilson 病(Wilson's disease, WD)是常见的遗传性铜代谢障碍性疾病,部分 WD 患者特别是脑型患者伴有较明显认知功能减退,表现为记忆力减退、思维缓慢、学习能力和处理问题能力下降,严重影响患者的工作、学习等生活质量^[1]。其可能机制为铜离子在大脑中沉积导致大脑皮质神经细胞变性坏死、神经元减少和神经胶质细胞增生^[2]。前期研究发现铜负荷大鼠学习记忆能力的损伤可能与高铜诱导丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路活化损伤海马相关神经元有关,但其作用机制还不明确^[3]。本课题自 20 世纪 70 年代根据 WD 患者多有口臭、舌红、苔黄腻、脉数、便干、溲赤等证候,结合《黄帝内经》所云:“诸逆冲上,皆属于火”,“诸痿项强,皆属于湿”,认为本病系铜毒在体内积聚化热生湿,引起肝胆湿热、经脉淤阻,出现肝、脑损害等症状,创用清热解毒、通腑养髓利湿治法以大黄、黄连、泽泻等组方“肝豆汤”治疗 WD 患者,使患者临床症状明显改善,好转率达到 84.1%^[4-5]。近年来从铜代谢通路、铜损伤所致的细胞程序性死亡(凋亡、自噬等)角度通过对肝豆汤疗效机制的系列研究证明了肝豆汤组方的合理性、配伍的必要性和用药的准确性^[6]。本研究采用流式细胞仪及蛋白免疫印迹法(Western blot)等技术旨在观测肝豆汤对高铜诱导海马神经元及神经酰胺(Cer)信号通路相关蛋白表达水平的影响,以期揭示肝豆汤通过调控 Cer 信号通路从而发挥神经保护作用的作用环节及作用靶点。

1 材料

1.1 细胞 HT-22 细胞(中国科学院上海细胞库),培养基为 15% 胎牛血清的 DMEM,HT-22 细胞放在

37 °C 5% CO_2 培养箱中培养。

1.2 药物及试剂 肝豆汤均购自北京同仁堂药店安徽合肥分店,并经安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》项下标准,按原方比例(大黄 20 g,黄连 20 g,金钱草 24 g,姜黄 20 g,三七 3 g 泽泻 24 g)称取药材,由安徽中医药大学神经病学研究所附属医院基础实验室按大黄后下标准,采用水煎法制备中药液,将中药置于煎药锅内,并加入蒸馏水 200 mL,煮沸后加入大黄,再以文火煎 30 min,经纱布滤过后置玻璃烧杯中,药渣再加入 200 mL 蒸馏水,重复煎煮过滤。最后把 2 次滤液合并,文火浓缩至 150 mL,冷却后倒入棕色瓶内,并于 4 °C 冰箱保存备用。基础培养基 DMEM 及胎牛血清(FBS)(美国 Hyclone 公司,批号分别为 AD12854263, GZE124);兔抗细胞内酸性鞘磷脂水解酶(ASM),Cer,p38 MAPK 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-6318R, bs-0701R, bs-0637R); β -肌动蛋白(β -actin),兔抗细胞色素 C (Cyt C),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (Caspase-9),Caspase-3 多克隆抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(英国 Abcam 公司,批号分别为 GR-2650121, GR45115-12, GR54565-14, GR46235-14, GR231489-1);噻唑蓝(MTT,北京索莱宝科技有限公司,批号 804W0518);活性氧(ROS)检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,批号 R03726)。

1.3 仪器 BSC-1300 II A2 型生物安全柜(苏净集团安泰公司);Dura12FV 型实验室超纯水系统[美国 The-Lab Corporation 泽拉布仪器科技(上海)有限

公司]; TGL-16 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); PowerPac Basic 型蛋白电泳仪及转膜仪(美国伯乐公司); Cytomics FC 500 型流式细胞仪(美国贝克曼公司); GOLD-SIM 型 CO₂ 培养箱(美国 SIM 公司); IMS-40 型全自动雪花制冰机(陕西鹏展科技有限公司); GRX-140 型热空气消毒箱(上海三发科学仪器有限公司); 培养瓶, 96 孔培养板(美国 Corning 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备及保存 20 只家兔适应性喂养 3 d 后, 随机分为 2 组, 分别为正常组和肝豆汤组, 每组 10 只。正常组给予生理盐水 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 肝豆汤组给予中药浓煎液 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃(含生药量 2.2 g·mL⁻¹), 每日 2 次, 连续 10 d。末次灌胃禁食 12 h 后, 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉采血, 室温静置 2 h, 让血清充分析出, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸取上层血清, 后无菌条件下 0.22 μm 滤器过滤除菌后置 -20 °C 保存备用。

2.2 MTT 比色法检测不同浓度 CuSO₄ 作用不同时间点对 HT-22 细胞生长和增殖的影响 细胞以每孔 1 × 10⁴ 个接种于 96 孔板中, 实验组分别加入 CuSO₄ 终浓度为 100, 200, 400, 500, 600, 800, 1 000, 1 200 μmol·L⁻¹ 的溶液, 正常组加无 FBS 培养基, 正常组加磷酸盐缓冲液(PBS), 分别培养 12, 24, 36, 48 h 后, 每孔加 MTT 20 μL, 继续孵育 4 h, 弃培养液, 每孔加二甲亚砜(DMSO) 150 μL, 摇床振荡, 用酶标仪检测, 计算平均半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3 分组及药物处理 实验分别设正常组, 模型组, 10%, 15% 及 20% 肝豆汤组 5 个组, 分别取对数生长期的细胞, 于正常组加入空白含药血清, 10%, 15% 及 20% 肝豆汤组分别加含不同体积分数(10%, 15%, 20%) 肝豆汤兔血清的培养基继续培养 1 h, 按照 2.2 项方法中 CuSO₄ 平均半数抑制浓度及作用时间处理模型组及和 10%, 15% 及 20% 肝豆汤组。

2.4 流式细胞仪检测细胞中 ROS 释放量的变化 取对数生长期的细胞, 按照 2.3 项方法处理细胞后于 37 °C 培养箱中继续培养, 消化收集细胞, 加入二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA) 工作液, 置于 37 °C 培养箱内避光孵育 30 min, 每 5 min 摇晃一次, 过滤加入流式管, 上机待测。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Cer 通路相关蛋白的表达 取对数生长期的细胞, 按照 2.3 项实验分组及药组处理方法处理细胞, 消化收集细胞后裂解, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白含量。取

蛋白 20 μg 作电泳, 将蛋白样本转移至 NC 膜上。膜用 5% 脱脂奶粉封闭 4 h, 洗涤缓冲液(TBST) 洗 3 次, 每次 10 min, 分别加入 ASM(1:100), Cer(1:200), p38(1:200), Cyt C(1:1 000), Caspase-9(1:1 000), Caspase-3(1:1 000) 多克隆抗体, 4 °C 过夜。分别加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1:1 万), 脱色摇床摇 1.5 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。以 β-actin 作为内参。凝胶成像系统拍照, 并扫描分析各条带的灰度值, 以 β-actin 的表达量为对照计算各组目的蛋白的相对表达量, 采用 Image J 软件对各目的条带与内参条带进行灰度比较。

2.6 统计学方法 各项实验均重复 3 次后计算结果, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间比较采用 *t* 检验, 使用统计软件 SPSS 17.0 进行统计, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同剂量 CuSO₄ 作用于 HT-22 不同细胞时间活性的影响 CuSO₄ 作用不同时间点对 HT-22 细胞的损伤呈现一定的量效和时效关系。随着 CuSO₄ 作用剂量的增加及作用时间的延长, HT-22 细胞存活率呈现明显的下降趋势。500 μmol·L⁻¹ 的 CuSO₄ 作用 HT-22 细胞 24 h 后, HT-22 细胞的存活率最接近 IC₅₀。见图 1。

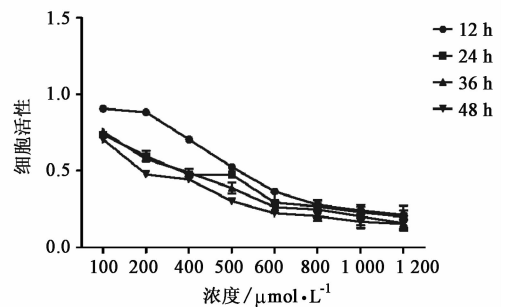


图 1 不同剂量 CuSO₄ 作用于 HT-22 不同时间活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 1 HT-22 were treated by different concentrations of CuSO₄ at different times($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 肝豆汤兔血清作用于海马神经元 HT-22 细胞 24 h 后 ROS 荧光强度的影响 与正常组比较, 模型组荧光强度显著增加(*P* < 0.01); 与模型组比较, 含肝豆汤兔血清作用细胞 24 h 后, 可明显降低 ROS 的荧光强度(*P* < 0.05, *P* < 0.01), 并呈一定浓度依赖性。见表 1。

3.3 肝豆汤兔血清对海马神经元 HT-22 细胞 Cer 信号通路相关蛋白相对表达水平的影响 与正常组比较, 模型组 ASM, Cer, p38 MAPK, Cyt C, Caspase-9,

表 1 肝豆汤兔血清作用于海马神经元 HT-22 细胞 24 h 后 ROS 荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Fluorescence intensity of HT-22, which were treated by different concentrations of rabbit serum with Gandou decoction (GDD) for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 体积分数/% | ROS |
|-----|--------|----------------------------|
| 正常 | - | 19.57 ± 1.28 |
| 模型 | - | 72.51 ± 3.09 ²⁾ |
| 肝豆汤 | 10 | 65.76 ± 2.23 ³⁾ |
| | 15 | 52.06 ± 2.35 ⁴⁾ |
| | 20 | 33.22 ± 2.21 ⁴⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

Caspase-3 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,肝豆汤组 HT-22 细胞内 ASM, Cer, p38 MAPK, Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 并且 Cer, p38 MAPK, Caspase-3 蛋白表达随肝豆汤血清浓度增加而降低,

表 2 肝豆汤兔血清对海马神经元 HT-22 细胞 Cer 信号通路相关蛋白相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of rabbit serum with GDD on expression of Cer signaling pathway related proteins expression levels in HT-22 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 体积分数/% | ASM/ β -actin | Cer/ β -actin | p38 MAPK/ β -actin | Cyt C/ β -actin | Caspase-9/ β -actin | Caspase-3/ β -actin |
|-----|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 0.49 ± 0.05 | 0.32 ± 0.02 | 0.43 ± 0.04 | 0.64 ± 0.05 | 0.84 ± 0.04 | 0.52 ± 0.02 |
| 模型 | - | 0.74 ± 0.03 ²⁾ | 0.52 ± 0.03 ²⁾ | 0.87 ± 0.02 ²⁾ | 1.28 ± 0.02 ¹⁾ | 1.36 ± 0.02 ²⁾ | 0.87 ± 0.01 ²⁾ |
| 肝豆汤 | 10 | 0.56 ± 0.04 ⁴⁾ | 0.34 ± 0.01 ⁴⁾ | 0.53 ± 0.02 ⁴⁾ | 0.61 ± 0.02 ³⁾ | 0.88 ± 0.05 ⁴⁾ | 0.65 ± 0.01 ⁴⁾ |
| | 15 | 0.37 ± 0.02 ⁴⁾ | 0.24 ± 0.01 ⁴⁾ | 0.37 ± 0.03 ⁴⁾ | 0.68 ± 0.07 ³⁾ | 0.89 ± 0.02 ⁴⁾ | 0.48 ± 0.01 ⁴⁾ |
| | 20 | 0.51 ± 0.02 ⁴⁾ | 0.14 ± 0.01 ⁴⁾ | 0.33 ± 0.02 ⁴⁾ | 0.73 ± 0.04 ³⁾ | 0.85 ± 0.03 ⁴⁾ | 0.18 ± 0.01 ⁴⁾ |

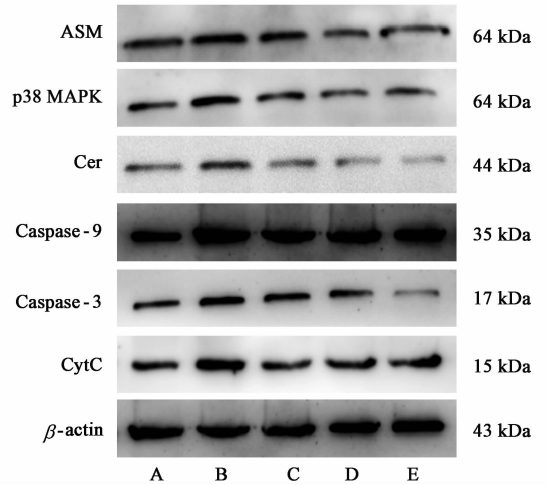
4 讨论

铜是人体必需的微量元素之一,在人体中具有许多重要的生理功能,对维持人体正常的生理功能不可或缺^[2]。而环境或遗传因素所致的体内铜缺乏或沉积均会导致中枢神经系统(CNS)损伤,如游离铜大量沉积所致的WD。人体内游离的铜离子大量蓄积于脑内,导致海马、神经基底节及相关认知区域受累是脑型WD认知功能障碍的可能发病机制。

Pichili 等^[7]研究发现在铜所诱导的神经元损伤中 ROS 起着重要作用,本实验发现高铜状态下的 HT-22 细胞 ROS 释放量显著增加,表明高铜可激活氧化应激。

ASM 是鞘磷脂代谢中一种重要的酶,但在某些应激条件下可活化水解脂筏中的鞘磷脂从而产生 Cer^[8-9]。Cer 作为细胞膜上脂筏结构的基础和鞘磷脂信号途径的中心分子,参与细胞膜信号的传递,起

呈一定的浓度依赖性。见图 2,表 2。



A. 正常组;B. 模型组;C. 10% 肝豆汤组;D. 15% 肝豆汤组;E. 20% 肝豆汤组

图 2 海马神经元 Cer 信号通路相关蛋白相对表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Cer signaling pathway related proteins expression levels in HT-22

第二信使效应分子作用^[10],参与激活多种蛋白酶,调节诸如凋亡、增殖、分化和生长停滞等信号过程^[11-14],其中最重要的是调节凋亡^[15]。笔者前期研究发现高铜可增加 Wilson's 病模型 TX 乳鼠神经元内 Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 蛋白的表达^[16]。本实验研究结果显示与正常组相比,模型组 ROS 荧光强度显著增加,模型组 ASM, Cer, p38 MAPK, Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 蛋白表达增加。这表明高铜环境下的 HT-22 细胞可诱导 ROS 大量释放,促进 Cyt C 释放至胞质,正反馈性促进 ROS 产生,形成恶性循环,同时 ROS 作为第二信使激活 Cer 信号通路,终活化 Caspase,参与促细胞凋亡进程,引起神经元凋亡。与模型组相比,肝豆汤组能明显降低神经元胞内 ROS 含量且呈一定的浓度依赖性;肝豆汤组 ASM, Cer, p38 MAPK, Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 蛋白含量均较模型组显著降低。综合表明,肝豆汤可

促进铜排出,减少 ROS 产生,抑制 Cer 通路,阻断凋亡发生,保护神经元。肝豆汤可改善高铜损伤神经元状态,延缓细胞凋亡。

[参考文献]

- [1] Rodriguez-Castro K I, Hevia-Urrutia F J, Sturniolo G C. Wilson's disease: a review of what we have learned [J]. World J Hepatol, 2015, 7(29): 2859-2870.
- [2] Banci L, Bertini I, Cantini F, et al. Cellular copper distribution: a mechanistic systems biology approach [J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(15): 2563-2589.
- [3] 王佳炜, 王训. 四硫钼酸铵调节 Wilson 病铜负荷大鼠铜代谢及 MAPK 相关信号转导机制的研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2013.
- [4] 杨任民, 韩咏竹, 任明山, 等. 中药治疗肝豆状核变性 107 例疗效观察[J]. 中医杂志, 1993, 34(11): 676-677, 644.
- [5] 董健健, 韩咏竹, 程楠. 肝豆汤对 Wilson 病模型 TX 小鼠肝细胞内铜代谢通路的分子调控机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 128-133.
- [6] 程楠, 杨任明. 中药肝豆汤治疗 Wilson 病疗效机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 49-55.
- [7] Pichili V B R, Kakulavarapu V R R, Michael D N. The mitochondrial permeability transition, and oxidative and nitrosative stress in the mechanism of Cutoxicity in cultured neurons and astrocytes [J]. Laboratory Investigation, 2008, 88: 816-830.
- [8] Brewer G J. A brand new mechanism for Cu toxicity [J]. J Hepatol, 2007, 47(4): 621-622.
- [9] 罗磊, 钟霞丽, 钟才高, 等. 生物样品中酸性鞘磷脂酶活性测定[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(4): 515-517.
- [10] 张露勇, 罗菲亚, 胡培丽, 等. 神经酰胺通过 JNK-c-Jun 信号通路诱导胶质瘤细胞自噬性死亡[J]. 首都医科大学学报, 2015, 36(2): 276-281.
- [11] Truman J P, Al Gadban M M, Smith K J, et al. Acid sphingomyelinase in macrophage biology [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(20): 3293-3305.
- [12] HOU Q, JIN J, ZHOU H, et al. Mitochondrially targeted ceramides preferentially promote autophagy, retard cell growth, and induce apoptosis [J]. J Lipid Res, 2011, 52(2): 278-288.
- [13] 张阔军, 顾勤兰, 王明慧, 等. 酸性鞘磷脂酶/神经酰胺通路在疾病发生发展中作用机制的研究进展[J]. 药学进展, 2015, 39(11): 838-845.
- [14] Iwayama H, Ueda N. Role of mitochondrial Bax, caspases and MAPKs for ceramide-induced apoptosis in renal proximal tubular cells [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 379(1/2): 37-42.
- [15] 刘哲, 李博, 李龙江. 神经酰胺抗肿瘤作用的研究进展[J]. 现代口腔医学杂志, 2016, 30(1): 39-40.
- [16] 徐陈陈, 董健健, 程楠, 等. 肝豆汤改良方对 Wilson's 病模型 TX 小鼠神经元内 Cyt C/Caspase 信号通路的分子调控机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 143-148.

[责任编辑 周冰冰]