

• 实验研究 •

薏苡附子败酱散抗肝癌作用的实验研究*

孙 燕¹, 张露蓉^{1, 2△}, 姚 霏^{1, 2}, 陈 江¹

(1. 南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 2150092. 苏州市吴门医派研究院, 江苏 苏州 215009)

摘要: **目的** 探讨薏苡附子败酱散对肝癌的抑制作用及可能的凋亡机制。**方法** 应用 C57BL/6 荷瘤小鼠模型考察薏苡附子败酱散动物体内对肝癌生长的抑制作用, 24 只荷瘤小鼠, 随机分为模型对照组、顺铂阳性药物组(5 mg/kg)、薏苡附子败酱散低、高剂量组(7.735、15.47 g/kg), 灌胃 14 d。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法研究薏苡附子败酱散不同生药浓度(10、20、30、40、50 mg/mL)及不同处理时间(24、48、72 h)对 Hepa1-6 肝癌细胞增殖的影响。流式细胞术检测其对肝癌细胞凋亡的作用。Western blot 检测细胞中 Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白水平。**结果** 体内实验结果显示, 与模型对照组比较, 阳性药组、薏苡附子败酱散不同剂量组均可抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。体外实验结果显示, 与空白对照组相比, 阳性药组、薏苡附子败酱散组均能够明显抑制 Hepa1-6 细胞增殖, 且呈时间-剂量依赖性, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。流式细胞术结果表明, 薏苡附子败酱散可以诱导肝癌细胞发生凋亡, 可使促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、cleaved Caspase-3 表达升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低, Bax/Bcl-2 比值增高, 与空白对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 薏苡附子败酱散具有抗肝癌效应, 可诱导肝癌细胞凋亡, 作用机制与调控 Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达有关。

关键词: 薏苡附子败酱散; 抗肝癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2019)05-0001-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.05.001

Experimental Study on the Anti-Hepatocellular Carcinoma of Yiyi Fuzi Baijiang Powder

SUN Yan¹, ZHANG Lurong^{1, 2}, YAO Fei^{1, 2}, CHEN Jiang¹

(1. Suzhou TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou, 215009, China;

2. Suzhou Academy of Women Chinese Medicine, Suzhou, 215009, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the inhibitory effect and possible mechanism of apoptosis of Yiyi Fuzi Baijiang Powder (YFBS) on hepatocellular carcinoma. **Methods** C57BL/6 mice model were used to observe the inhibitory effect of YFBS on liver cancer. 24 tumor-bearing mice were divided into model control group, platinum group (5 mg/kg), and low and high dose groups of Yiyi Fuzi Baijiang Powder (7.735, 15.47 g/kg, respectively), treated for 14 d. The effects of different concentrations (10, 20, 30, 40, 50 mg/mL) of YFBS and different treatment time (24, 48, 72 h) on Hepa1-6 cell proliferation were detected by MTT method. Flow cytometry (FCM) was used to detect the apoptosis of hepatoma cells. The levels of Caspase-3, cleaved Caspase-3, Bax and Bcl-2 were detected by western blot. **Results** The results showed that compared with the model control group, the positive drug group and YFBS groups could inhibit tumor growth of tumor-bearing mice *in vivo*, with statistically significant differences($P<0.05$). Also compared with the blank control group, both the positive

收稿日期: 2019-09-06

* 基金项目: 苏州市科技发展计划(SYS2018093)

第一作者简介: 孙燕(1995-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 临床中医学。

△通信作者: 张露蓉, E-mail: suzhouzlr2013@163.com

group and YFBS groups could significantly inhibit the proliferation of Hepa1-6 cells in a time-dose dependent manner *in vitro* ($P<0.05$). The results of flow cytometry showed that YFBS could induce the apoptosis of liver cancer cells, and it had dose-effect relationship. The expressions of pro-apoptotic protein Bax, Caspase-3 and cleaved Caspase-3 increased, while anti-apoptotic protein Bcl-2 decreased, and the ratio of Bax/Bcl-2 increased ($P<0.05$). **Conclusion** YFBS had anti-hepatocellular carcinoma effect, inducing carcinoma cell apoptosis by regulating Caspase-3, cleaved Caspase-3, Bax and Bcl-2 protein expression.

KEY WORDS: Yiyi Fuzi Baijiang Powder; anti-hepatocellular carcinoma; cell proliferation; cell apoptosis

肝癌是中国常见的消化道恶性肿瘤之一,病死率在肿瘤中居第 2 位^[1]。由于肝癌的恶性程度及侵袭性高,多数患者确诊时已经为中晚期^[2],使得治疗形势不容乐观^[3-5]。中医认为,阳气亏虚、湿热聚毒、气滞血瘀等是肝癌发生的病理基础^[6],具有寒、湿热、瘀等特点。中医药治疗寒、湿、瘀之病症,注重辨证施治、扶正驱邪、调理气机,以达到补阳散寒、祛湿化瘀解毒的功效^[7]。

薏苡附子败酱散在《金匱要略·疮痈肠痈浸淫病脉证并治》中有所记载,方中包括薏苡仁、附子、败酱草 3 味药,具有破瘀散结,温补阳气的功效^[8-10],常用于由寒、湿、瘀所致的多种疾病的治疗^[11-14]。这与肝癌的发病机理所对症。此外,有文献报道君药薏苡仁中的有效成分薏苡仁油可以抑杀肝癌细胞,并已制成康莱特注射液供临床上使用^[15];附子提取物对移植性肝癌 H22 细胞的生长具有抑制作用^[16];黄花败酱总皂苷、总黄酮类亦对肿瘤有一定的抑制作用^[17]。可见,从中医病因和单味药角度,薏苡附子败酱散可拓展应用于肝癌的治疗。临床上,对肝癌的治疗虽未见报道,但应用此方加味联合化疗治疗大肠癌颇有成效^[18]。因此,本文围绕薏苡附子败酱散,探讨其抗肝癌的效应及有可能的作用机理,为该方临床用于抗肝癌提供实验依据,亦为临床合理使用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料 仪器 基础电泳仪电源(北京百晶生物技术有限公司);酶标仪(Molecular Devices 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);凝胶成像分析系统(美国 ProteinSimple 公司)。

试剂 DMEM 培养液(GIBCO 公司,批号:1993895);胎牛血清(杭州天杭生物科技股份有限公司,批号:18120503);胰蛋白酶(闪晶生物公司,批号:2594141);二甲亚砜(天津 DAMAO 化学试剂厂,

批号:20150906);顺铂(齐鲁制药有限公司,批号:AA1A8028B);四甲基偶氮唑盐(BioFROXX 公司,批号:EZ2811A179);Annexin V-PE 细胞凋亡试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司,批号:20180518);BCA 蛋白含量检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0010);ECL 检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:20180228); β -actin(CMCTAG 公司,批号:1832NJ);Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 抗体(Cell Signaling 公司,批号分别为:0012,0037,0005,0005)。

药材 薏苡仁(批号产地:190306 河北);附片(黑顺片)(批号产地:190306 四川);败酱草(批号产地:190306 河北)。购自于苏州市春辉堂药业有限公司。

细胞株及动物 小鼠肝癌细胞株 Hepa1-6 由苏州大学生命科学院馈赠。SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 18~22 g,购自苏州昭衍新药研究中心有限公司,动物生产许可证号:SCXK(JING)2014-0004。

1.2 药液制备 按经方比例称取薏苡仁 30 g,附子 6 g,败酱草 15 g,按照 8 倍量纯水冷浸 30 min,回流提取 1 h,倾出药液;药渣再按 6 倍量加入纯水,回流提取 30 min,倾出药液。将两次药液进行减压浓缩,最终至生药含量 1 g/mL,冷藏备用。

1.3 荷瘤小鼠模型建立及给药 参照实验室建立的方法制备荷瘤小鼠模型^[19]:用 PBS 把 Hepa1-6 肝癌细胞密度调整为 1×10^7 个/mL,然后取 0.2 mL 的细胞悬液接种于 C57 BL/6 小鼠的腋下,建立模型。种瘤 8~10 d 之后观察成瘤情况。将成瘤小鼠分为模型组、顺铂阳性药物组(5 mg/kg),薏苡附子败酱散低、高剂量组(7.735、15.47 g/kg),每组 6 只小鼠。灌胃给药,持续 14 d,每天 1 次,最后 1 次给药 12 h 后,处死小鼠,测定瘤重。抑瘤率 = $[1 - (\text{给药组瘤重} / \text{对照组瘤重})] \times 100\%$ 。

1.4 细胞培养 Hepa1-6 肝癌细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM (pH 7.0)完全培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养,每 24 h 更换 1 次培养液,待细胞生长至对数生长期时,用 0.25%胰酶进行消化、传代,取第 3~4 代对数生长期的 Hepa1-6 细胞用于实验。

1.5 MTT 检测细胞活力 将对数生长期的 Hepa1-6 细胞,接种于 96 孔板。分别加入不同生药浓度(10、20、30、40、50 mg/mL)的薏苡附子败酱散药液并作用 24、48、72 h。以不加药物为空白组,顺铂(50 $\mu\text{g/mL}$)为阳性药物组。加入 MTT 后培养 4 h,弃去上清,加入 DMSO,在酶标仪 490 nm 得到吸光度 OD(λ)值。细胞增殖抑制率=[(1-给药组 OD 值/对照组 OD 值)] $\times 100\%$ 。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将 Hepa1-6 肝癌细胞接种于 6 孔板,给药组分别加入不同生药浓度的薏苡附子败酱散(10、20、30、40、50 mg/mL),空白组不加药,培养 48 h 后分别加入 Annexin V 和 FITC 进行染色,流式细胞仪检测。

1.7 Western blot 检测 取对数生长期的 Hepa1-6 肝癌细胞,接种于 6 孔板。给药组分别加入 30、40、50 mg/mL 生药浓度的薏苡附子败酱散,空白组不加入药物,培养 48 h。裂解,离心,提取蛋白,用

BCA 法定量;SDS-PAGE 电泳;PVDF 膜转膜,封闭;一抗(1:1 000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 漂洗,二抗(1:1 000)室温孵育 1 h,TBST 漂洗;ECL 曝光、显影。以 β -actin 为内参,计算蛋白相对表达量。

1.8 统计学处理 实验数据采用“均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)”表示,组间比较采用 one-way ANOVA,两两比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 薏苡附子败酱散体内外对 Hepa1-6 细胞的抗肝癌效应 观察薏苡附子败酱散在体内抗肿瘤作用时发现,与模型对照组瘤重(1.83 $\pm$ 0.72)g 相比,7.735、15.47 g/kg 薏苡附子败酱散组瘤重分别为 (1.21 $\pm$ 0.33)g 和 (0.79 $\pm$ 0.33)g,抑瘤率分别为 (33.78 $\pm$ 17.85)%、(56.95 $\pm$ 18.17)%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。随着薏苡附子败酱散剂量的增加,瘤重减小,抑瘤率增大,表明薏苡附子败酱散对 Hepa1-6 荷瘤小鼠肿瘤的生长具有抑制作用,见图 1A、1B。

从体外对 Hepa1-6 肝癌细胞增殖抑制的实验中发现,随着给药浓度以及作用时间的增加,抑制率增加,并呈一定的剂量-时间依赖关系,见图 1C。以上结果表明薏苡附子败酱散体内外均具有抗肝癌效应。

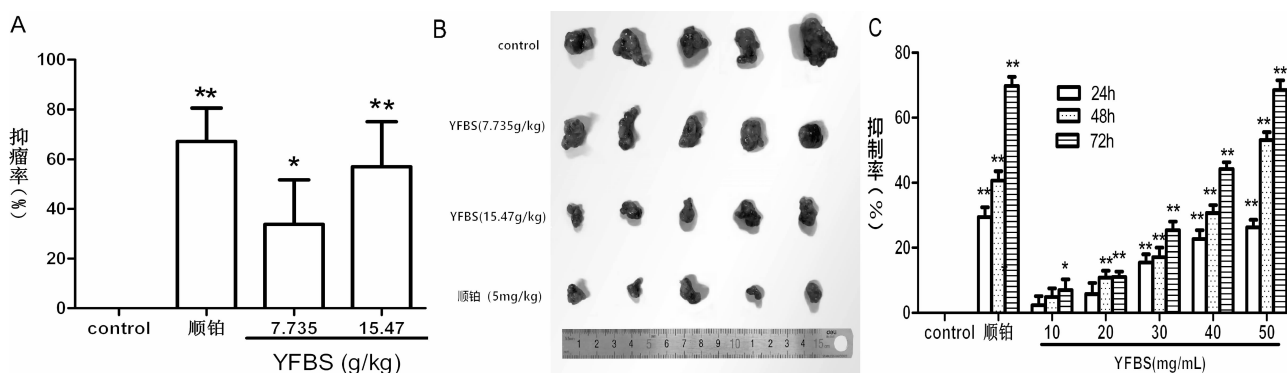
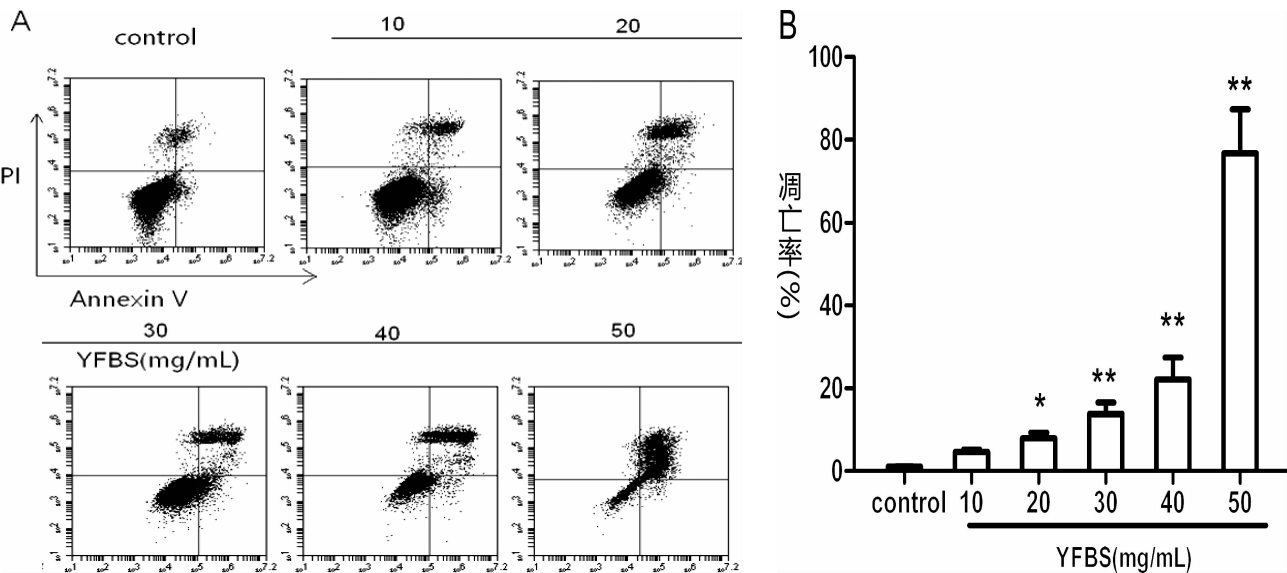


图1 薏苡附子败酱散体内外对 Hepa1-6 细胞的抗肝癌效应

A. 薏苡附子败酱散对裸鼠移植瘤的抑制率;B. 薏苡附子败酱散对裸鼠移植瘤生长的影响;C. 薏苡附子败酱散对 Hepa1-6 细胞增殖的抑制作用。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 薏苡附子败酱散对 Hepa1-6 细胞凋亡的影响 为了探究薏苡附子败酱散的抗肝癌机理,检测了对 Hepa1-6 细胞凋亡的影响。结果显示,与空白对照组相

比,随着薏苡附子败酱散浓度的增加,凋亡率逐渐上升,差异具有统计学意义($P<0.05$),说明薏苡附子败酱散可促进 Hepa1-6 细胞凋亡,并有剂量依赖性,见图 2。

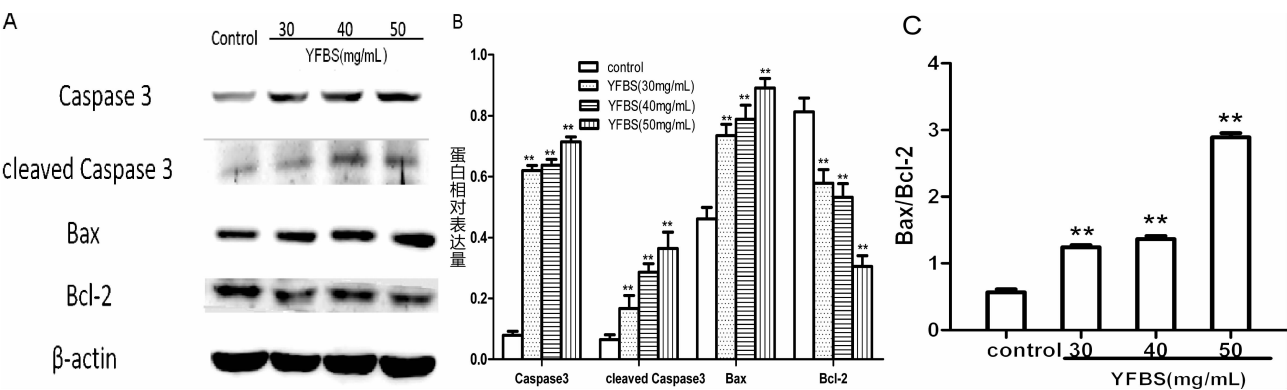


A. Hepa1-6 细胞凋亡的流式图;B. 对图 A 的定量结果。与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 2 薏苡附子败酱散对 Hepa1-6 细胞凋亡的影响

2.3 薏苡附子败酱散对 Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 由于薏苡附子败酱散对 Hepa1-6 细胞具有促凋亡作用,因此随后检测了凋亡相关蛋白的表达情况。发现与空白组相比,随着薏苡附子败酱散浓度的增加,促凋亡蛋白

Bax、Caspase-3、cleaved Caspase-3 表达升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降(见图 3A、3B),Bax/Bcl-2 值上升(见图 3C),差异具有统计学意义($P<0.05$)。说明薏苡附子败酱散通过调控凋亡相关蛋白的表达来促进肝癌细胞凋亡,见图 3。



A. 凋亡相关蛋白的表达水平;B. 蛋白表达的相对定量结果;C. Bax/Bcl-2 的比值。

与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;以 β -actin 为内参,计算各蛋白相对表达量

图 3 薏苡附子败酱散对 Hepa1-6 细胞中凋亡蛋白表达的影响

3 讨论

肝癌在中医药史上属于“癥瘕”“胁肋胀痛”等范畴^[20],历代医家对其有一定的记录,如“肝脉微急为肥气,在胁下”“伏梁,环脐而痛”等^[21],并认为肝癌是由正虚邪实、内外交争引起的,阳气不足、瘀毒湿热是形成肝癌的病因^[22-23]。薏苡附子败酱散中薏苡仁和败酱

草化湿消肿散结、泻火解毒化瘀,再加上附子性热味辛、助阳祛寒,通达经络,行郁滞之气,增强薏苡仁和败酱草的渗湿、除瘀、散结之功,共达散寒助阳、化瘀祛湿之效^[24]。现代药理学研究发现,该方有消炎止痛、抑制肿瘤生长的功效^[24-25],并且方中 3 味单药均有抗肝癌效应^[15-17],提示薏苡附子败酱散在抗肝癌方面有

应用潜能。因此,在应用 C57 BL/6 荷瘤小鼠模型评价该方的体内抗肝癌效应时,发现该方可以降低荷瘤小鼠的瘤重,抑制肿瘤生长。通过体外细胞实验表明,该方能够抑制 Hepa1-6 细胞增殖,体现出一定的肝癌抑制效应。综上结果,表明该方对肝癌的生长具有抑制作用。

诱导肿瘤细胞凋亡是抗肝癌机制之一^[26-27]。研究表明,肝癌细胞在体内外因素的影响下,经过相关信号转导通路的调控,使细胞发生特性改变从而诱导凋亡^[28]。从流式细胞术结果中发现,薏苡附子败酱散可诱导肝癌细胞凋亡,说明该方通过促进细胞凋亡来抑制增殖。Bcl-2 家族中 Bcl-2 和 Bax 分别为抑制和促进凋亡的两个核心蛋白^[29],Bax/Bcl-2 值是判断线粒体外膜通道稳定与否和细胞凋亡发生与否的重要评判标准^[30]。Caspases 家族有 10 个成员,分为凋亡起始者和执行者^[31]。其中 Caspase-3 具有抑制剂特异性,降解 PARP、DFF-45,抑制 DNA 的修复并启动 DNA 的降解,参与细胞凋亡的执行^[32];而 Caspase-3 活化产生的 cleaved Caspase-3,其表达程度可反映 Caspase-3 的活性和细胞凋亡情况^[33]。进一步研究其促凋亡作用机制,发现薏苡附子败酱散组可使 Bax 表达升高,Bcl-2 表达下降,Bax/Bcl-2 值上升,同时可调控 Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达,且有剂量依赖效应。综上表明,薏苡附子败酱散可能通过调控线粒体凋亡途径诱导 Hepa1-6 肝癌细胞发生凋亡。

本研究结果显示,薏苡附子败酱散动物体内能抑制肿瘤生长,体外能抑制 Hepa1-6 细胞增殖,并且诱导肝癌细胞凋亡。其机制可能与调控 Bax、Bcl-2、Caspase-3、cleaved Caspase-3 等凋亡相关蛋白表达相关。本研究为薏苡附子败酱散抗肝癌的临床应用提供了实验依据,但是,薏苡附子败酱散抗肝癌具体机制和特点尚未完全阐明,另外,给药途径为口服的中药复方,本文只用水提液进行体外细胞试验,对于评价其临床活性还有所欠缺。因此薏苡附子败酱散抗 Hepa1-6 肝癌细胞生长作用未来能否转化为临床用于肝癌的治疗还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] SU T S, LU H Z, CHENG T, et al. Long-term survival analysis in combined transarterial embolization and stereotactic body radiation therapy versus stereotactic body radiation monotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma >5cm[J]. Bmc Cancer, 2016, 16(1):834.
- [2] 杨晓辉,彭焱. 原发性肝癌并门静脉癌栓的临床治疗进展[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(23):3863-3867.
- [3] 刘珍,邓天好,程华初,等. 原发性肝癌临床治疗新进展[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(7):207-210.
- [4] ZHOU Y, LI Y, ZHOU T, et al. Dietary natural products for prevention and treatment of liver cancer[J]. Nutrients, 2016, 8(3):156.
- [5] 周滢,周萍. 邓中甲教授治疗肝癌经验分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):260-261.
- [6] 艾望,夏玉坤,王秀萍,等. 原发性肝癌中医药治疗研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(3):133-136.
- [7] 张英杰,杨雪军,霍正强,等. 薏苡附子败酱散的临床应用[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(10):22-24.
- [8] 富晓旭,谢春光. 薏苡附子败酱散的临床研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(4):579-580.
- [9] 周政,刘丽萍,刘海涛,等. 正交试验优选薏苡附子败酱散提取工艺[J]. 中药材, 2016, 39(4):829-832.
- [10] 王三虎. 薏苡附子败酱散 [J]. 河南中医, 2017, 37(11):1955.
- [11] 王蓓. 薏苡附子败酱散合三仁汤化裁治疗湿热瘀结证痤疮 68 例[J]. 环球中医药, 2018, 11(7):1141-1144.
- [12] 陈玲玲,张思为,陈威,等. 薏苡附子败酱散加减治疗糖尿病性便秘的临床研究[J]. 中国临床医生杂志, 2018, 46(3):370-373.
- [13] 马军,郑月萍,严兴海,等. 加味薏苡附子败酱散治疗寒湿血瘀型慢性前列腺炎 38 例临床研究[J]. 西部中医药, 2012, 25(12):7-9.
- [14] 叶道冰,宋红旗,李宾,等. 薏苡附子败酱散加味联合康复新液治疗溃疡性结肠炎 36 例疗效观察 [J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(15):84.
- [15] 谢和平,李跃,王凤林,等. 康莱特注射液联合肝动脉化疗栓塞术治疗原发性肝癌临床疗效[J]. 中成药, 2018, 40(12):2821-2823.
- [16] 林玉坤,张舒慧,李海云,等. 生附子对小鼠 H22 肝癌皮

- 下移植瘤模型的抗肿瘤作用研究[J]. 河南大学学报(医学版), 2017, 36(4): 235-238.
- [17] 魏一萌, 王帅, 孟宪生, 等. 基于 SMMC-7721 肝癌细胞生长抑制的两种败酱草药效比较及提取方法研究[J]. 中国医药科学, 2013, 3(11): 35-37.
- [18] 杜艳林, 王泽民, 芦殿荣, 等. 薏苡附子败酱散联合化疗治疗大肠癌 33 例 [J]. 中国中医药科技, 2015, 22(2): 213-214.
- [19] ZHANG L R, JIANG G R, YAO F, et al. Osthole promotes anti-tumor immune responses in tumor-bearing mice with hepatocellular carcinoma [J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2015, 37(3): 301-307.
- [20] 张心愿. 中医多视角解读肝癌 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(67): 124-125.
- [21] 汪昂. 医学原理 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 571.
- [22] 程玉佩, 张明香. 中医药治疗原发性肝癌研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(01): 167-169.
- [23] 诸佳瑜, 陈闯, 欧杰, 等. 中医辩证治疗原发性肝癌的研究进展[J]. 当代医药论丛, 2017, 15(10): 32-34.
- [24] 彭金咏. 薏苡附子败酱散的药效物质基础、制备工艺及药效学研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2006.
- [25] 张春虎, 王杨, 黄卫, 等. 加味薏苡附子败酱散含药血清对人肝癌 Bel-7404 细胞株 Notch 信号通路的影响[C]//第十二次全国中西医结合实验医学专业委员会暨第七次湖南省中西医结合神经科专业委员会学术年会论文集. 长沙: 中西医结合实验医学专业委员会、湖南省中西医结合神经科专业委员会, 2015: 2.
- [26] SPENCER S L, SORGER P K. Measuring and modeling apoptosis in single cells[J]. Cell, 2011, 144(6): 926-939.
- [27] MEIER P, FINCH A, EVAN G. Apoptosis in development [J]. Nature, 2000, 407(6805): 796-801.
- [28] BABICHEV Y, KABAROFF L, DATTI A, et al. PI3K/AKT/mTOR inhibition in combination with doxorubicin is an effective therapy for leiomyosarcoma [J]. Journal of Translational Medicine, 2016, 14(1): 67-71.
- [29] OLA M S, NAWAZ M, AHSAN H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 351(1-2): 41-58.
- [30] MA L, LI W. Emodin inhibits LOVO colorectal cancer cell proliferation via the regulation of the Bcl-2/Bax ratio and cytochrome[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(4): 1225-1228.
- [31] FAN T J, HAN L H, CONG R S, et al. Caspase family proteases and apoptosis[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2005, 37(11): 719-727.
- [32] HACKER G, PASCHEN S A. Therapeutic targets in the mitochondrial apoptotic pathway [J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(4): 515-526.
- [33] 李永宁, 肖晶晶, 赵建勇. Caspase-3 及 Cleaved-Caspase-3 在氟中毒大鼠肝脏中表达 [J]. 贵州医药, 2016, 40(3): 239-240.