

Bcl-xL 及 Bax 表达变化在大黄素影响脓毒症患者中性粒细胞凋亡中的作用

邓秋明¹ 陈爱² 尚东¹

(1. 大连医科大学附属第一医院, 辽宁 大连 116011; 2. 大连市友谊医院, 辽宁 大连 116100)

【摘要】目的 通过检测抑/促凋亡调控基因 Bcl-xL/Bax 表达变化, 研究大黄素(EMD)影响脓毒症患者中性粒细胞(PMN)凋亡的机制。**方法** 采集 5 例健康志愿者及 16 例脓毒症患者 PMN 进行体外培养。健康志愿者的血标本作为对照组(HC 组); 脓毒症患者分为脓毒症组(SE 组, 8 例)、EMD 干预脓毒症组(EMD-SE 组)。采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫细胞化学技术检测 PMN 抑凋亡基因 Bcl-xL 或促凋亡基因 Bax 的 mRNA 及蛋白表达水平的差异。**结果** SE 组抑凋亡基因 Bcl-xL mRNA [吸光度(A 值)]表达和蛋白阳性率均较 HC 组显著增加[Bcl-xL mRNA: 0.98 ± 0.12 比 0.32 ± 0.07 , Bcl-xL 蛋白: 87.5% (7/8) 比 20.0% (1/5), 均 $P < 0.05$], 而促凋亡基因 Bax 表达与 HC 组比较差异无统计学意义[Bax mRNA (A 值): 1.13 ± 0.08 比 1.28 ± 0.13 , Bax 蛋白: 62.5% (5/8) 比 80.0% (4/5), 均 $P > 0.05$]; EMD-SE 组 Bcl-xL 表达均较 SE 组明显减少[Bcl-xL mRNA (A 值): 0.39 ± 0.06 比 0.98 ± 0.12 , Bcl-xL 蛋白: 25.0% (2/8) 比 87.5% (7/8), 均 $P < 0.05$], EMD-SE 组与 SE 组 Bax 表达差异均无统计学意义[Bax mRNA (A 值): 1.19 ± 0.11 比 1.13 ± 0.08 , Bax 蛋白: 87.5% (7/8) 比 62.5% (5/8), 均 $P > 0.05$]。SE 组 Bcl-xL/Bax mRNA 明显高于 HC 组(0.87 ± 0.07 比 0.25 ± 0.04 , $P < 0.05$), EMD-SE 组 Bcl-xL/Bax mRNA 明显低于 SE 组(0.32 ± 0.03 比 0.87 ± 0.07 , $P < 0.05$)。**结论** EMD 可使脓毒症时增高的 Bcl-xL/Bax 比值下调, 提示在 EMD 促 PMN 凋亡中抑/促凋亡调控基因 Bcl-xL/Bax 表达变化可能是其分子机制之一。

【关键词】 脓毒症; 全身炎症反应综合征; 中性粒细胞; 凋亡; 大黄素; Bcl-xL/Bax

The role of Bcl-xL and Bax expression changes in emodin effect on polymorphonuclear neutrophil apoptosis in patients with systemic inflammatory response syndrome Deng Qiuming*, Chen Aihe, Shang Dong. *Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning, China
Corresponding author: Shang Dong, Email: shangdong@medmail.com.cn

【Abstract】Objective By detecting expression changes of apoptotic gene Bcl-xL/Bax to investigate the molecular mechanisms of emodin (EMD) effect on apoptosis of polymorphonuclear neutrophil (PMN) in patients with sepsis of abdominal cavity infection. **Methods** Peripheral venous blood was collected from healthy volunteers and patients with sepsis. PMN was separated from peripheral blood and cultivated in vitro. The blood samples of healthy volunteers were recognized as control group (HC group), and the patients with sepsis were divided into sepsis group (SE group) and EMD intervention sepsis group (EMD-SE group). The changes of PMN mRNA and protein expressions of anti-/pro-apoptotic gene Bcl-xL/Bax were detected separately by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry. **Results** Compared with HC group, the mRNA [absorbance (A value)] and protein positive expression rate of anti-apoptotic gene Bcl-xL were significantly higher in SE group [Bcl-xL mRNA: 0.98 ± 0.12 vs. 0.32 ± 0.07 , Bcl-xL protein positive expression rate: 87.5% (7/8) vs. 20.0% (1/5), $P < 0.05$]; however, the mRNA and protein positive expression rate of Bax of the pro-apoptotic gene were not obviously different in SE group from those in the HC group [mRNA (A value): 1.13 ± 0.08 vs. 1.28 ± 0.13 , protein positive expression rate: 62.5% (5/8) vs. 80.0% (4/5), both $P > 0.05$]. Compared with SE group, either the expression of Bcl-xL mRNA or protein positive expression rate in EMD-SE group was significantly decreased [Bcl-xL mRNA (A value): 0.39 ± 0.06 vs. 0.98 ± 0.12 , Bcl-xL protein positive expression rate: 25.0% (2/8) vs. 87.5% (7/8), all $P < 0.05$]; however, the expression of either Bax mRNA or protein was not markedly different in EMD-SE group from either one of them in control group [Bax mRNA (A value): 1.19 ± 0.11 vs. 1.13 ± 0.08 , Bax protein positive expression rate: 87.5% (7/8) vs. 62.5% (5/8), both $P > 0.05$]. The ratio of Bcl-xL/Bax mRNA in SE group was significantly higher than that in HC group, being 0.87 ± 0.07 vs. 0.25 ± 0.04 ; the ratio of Bcl-xL/Bax mRNA in EMD-SE group was obviously lower than that in SE group (0.32 ± 0.03 vs. 0.87 ± 0.07 , both $P < 0.05$). **Conclusion** EMD can down-regulate the elevated ratio of Bcl-xL/Bax in sepsis, suggesting that in the effect of EMD in pro-apoptosis of PMN, the expression changes of anti-/pro-apoptosis regulatory gene Bcl-xL/Bax might be possibly one of the molecular mechanisms.

【Key words】 Sepsis; Systemic inflammatory response syndrome; Polymorphonuclear neutrophil; Apoptosis; Emodin; Bcl-xL/Bax

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.02.006

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(2013A007)

通讯作者: 尚东, Email: shangdong@medmail.com.cn

脓毒症是机体对感染的反应失调损伤了自身组织,从而出现的一种威胁生命的状况。机体所产生的异常失控的炎症反应是造成损害的病理基础。在机体的非特异性免疫防御反应中,中性粒细胞(PMN)是非常重要的一环,在炎症发生、扩大中起着关键的作用,同时对其转归亦产生重要影响。在生理状态下,PMN 凋亡后,其凋亡小体被吞噬细胞清除,而在炎症状态下,PMN 延迟凋亡,其作用时间增加,且细胞因子大量分泌,产生逐步扩大的“瀑布样”炎症反应。故 PMN 凋亡是炎症反应消除的一个关键因素^[1]。近年来,随着大承气汤等中药方剂在疾病治疗中作用的深入研究^[2],在研究大黄改善脓毒症中的作用也取得一些进展,证实具有抗炎、抗氧化等作用^[3-4];大黄的有效成分之一大黄素(EMD)能够促进 SIRS 患者 PMN 的凋亡^[5]。本研究通过检测脓症患者抑/促凋亡基因 Bcl-xL/Bax 的表达水平,观察 EMD 对脓症患者 PMN 凋亡影响的可能分子机制。

1 资料与方法

1.1 病例选择及分组

1.1.1 研究对象的选择:选择 2013 年 6 月至 2014 年 12 月本院急腹症外科收治的 24 h 内临床诊断为急性胆囊炎、急性阑尾炎等急腹腔感染、年龄为 18~75 岁非孕妇患者。同时符合 2008 年“国际脓毒症定义大会”提出的脓毒症诊断标准^[6]。

1.1.2 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,并经本院伦理委员会批准,治疗和检测方法取得患者或家属知情同意并签署知情同意书。

1.1.3 研究分组:将符合入选标准的脓症患者按随机数字表法分为脓毒症组(SE 组,8 例)、EMD 干预脓毒症组(EMD-SE 组,8 例)。同期本院体检健康志愿者设为对照组(HC 组)。

1.2 主要材料:EMD 为美国 Sigma 公司产品〔试剂溶于二甲基亚砜(DMSO)中,浓度 10 g/L, -20 ℃ 保存〕;反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒为日本 Takara 公司产品;Bax、Bcl-xL 单克隆抗体(鼠抗人)为美国 Santa Cruze、ZYMED 公司产品。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 PMN 的分离及培养^[7]:取肝素抗凝的外周静脉血 5 mL,注入离心管(预置 30 g/L 葡聚糖 T500)中;静置 45 min,取上清铺在等体积淋巴细胞分离液上,离心后将沉淀细胞用 1 mL 冰无菌水破除红细胞,PRMI 1640 培养液洗细胞 3 次;锥虫蓝排斥试验检测显示 PMN 存活率 >95%,纯度 >95%。将分

离的 PMN 用 RPMI 1640 培养液悬浮,镜下调整细胞浓度 5×10^9 个/L。EMD-SIRS 组患者 PMN 中加入 EMD 5 ng/L (DMSO 终浓度 <0.1%^[8]),在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下孵育 24 h。

1.3.2 RT-PCR 检测 Bax/Bcl-xL 的 mRNA 表达水平:提取总 RNA,鉴定后保存于 -80 ℃ 或用于反转录,合成 cDNA,合成体系为 20 μL;合成条件为 30 ℃ 10 min, 42 ℃ 30 min, 99 ℃ 5 min, 5 ℃ 5 min。PCR 反应:依据 Bax、Bcl-xL 两个基因的 cDNA 序列(Bax 的 GenBank 代码为 AX057142、Bcl-xL 为 Z23115)设计引物,大连宝生物公司合成引物。反应体系为 20 μL;反应条件:在 95 ℃ 温育 15 min,第 1 个循环为 94 ℃ 45 s、72 ℃ 40 s、72 ℃ 90 s,退火降温 1 ℃,8 个循环后以 94 ℃ 45 s、64 ℃ 30 s、72 ℃ 90 s 共 29 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。测定 Bax、Bcl-xL 与内参基因 β-肌动蛋白(β-actin)的吸光度(A 值)。

1.3.3 免疫细胞化学技术检测凋亡基因 Bax 和 Bcl-xL 的蛋白表达水平:调整细胞浓度为 10^{10} 个/L,经冷丙酮固定、过氧化氢(H₂O₂)室温放置,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,即用型 Max Vision™ 试剂室温孵育、PBS 冲洗后,加 3-3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,复染 10 s(苏木素)、流水冲洗 10 min;梯度乙醇干燥脱水。取 10 个高倍视野(400 倍)计数阳性反应颗粒(淡黄到棕黄色颗粒,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。阴性为阳性细胞数低于 5%,1 分为 5%~25%,2 分为 26%~50%,3 分为 51%~75%,4 分为 75% 以上;上述 2 种评分相乘后得出数值:弱阳性为 1~4 分,中等阳性为 5~8 分,强阳性为 9~12 分)。

1.4 统计学处理:使用 SPSS 12.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,用四格表确切概率法分析计数资料。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Bcl-xL 和 Bax 的 mRNA 表达水平(表 1;图 1):SE 组抑凋亡基因 Bcl-xL mRNA 表达较 HC 组显著增加(*P* < 0.05),而促凋亡基因 Bax 表达差异无统计学意义(*P* > 0.05),SE 组 Bcl-xL/Bax mRNA 表达较 HC 组明显升高(*P* < 0.05)。SE 组 Bcl-xL mRNA 表达较 EMD-SE 组明显减少(*P* < 0.05),但两组 Bax 表达差异无统计学意义(*P* > 0.05),EMD-SE 组 Bcl-xL/Bax mRNA 较 SE 组明显减少(*P* < 0.05)。

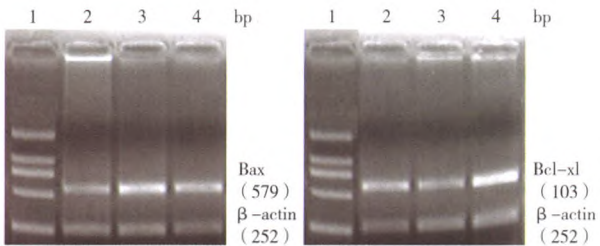
2.2 Bcl-xL/Bax 蛋白表达水平(表 2;图 2):Bax、Bcl-xL 蛋白以胞质着色为主,部分伴有胞核着色。

SE 组 PMN 抑凋亡蛋白 Bcl-xL 阳性表达率较 HC 组显著增加,而促凋亡蛋白 Bax 阳性表达率差异无统计学意义($P>0.05$)。EMD-SE 组 Bcl-xL 蛋白阳性表达率较 SE 组显著下降, Bax 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 Bcl-xL 和 Bax 的 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	Bcl-xL mRNA (A 值)	Bax mRNA (A 值)	Bcl-xL/Bax mRNA
HC 组	5	0.32±0.07	1.28±0.13	0.25±0.04
SE 组	8	0.98±0.12 ^a	1.13±0.08	0.87±0.07 ^a
EMD-SE 组	8	0.39±0.06 ^{ab}	1.19±0.11	0.32±0.03 ^{ab}

注:与 HC 组比较,^a $P<0.05$;与 SE 组比较,^b $P<0.05$

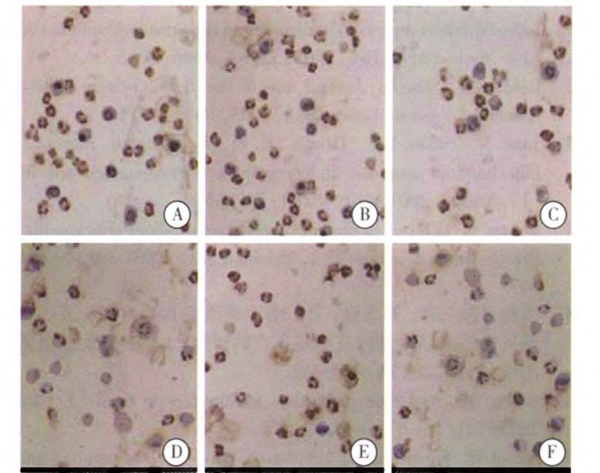


注:1 为 Marker;2 为 HC 组;3 为 SE 组;4 为 EMD-SE 组
图 1 各组 Bcl-xL 和 Bax mRNA 表达水平

表 2 各组 Bax 和 Bcl-xL 蛋白阳性表达率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	阳性表达率[%(例)]	
		Bcl-xL 蛋白	Bax 蛋白
HC 组	5	20.0(1)	80.0(4)
SE 组	8	87.5(7) ^a	62.5(5)
EMD-SE 组	8	25.0(2) ^b	87.5(7) ^a

注:与 HC 组比较,^a $P<0.05$;与 SE 组比较,^b $P<0.05$



A 为 HC 组;B 为 SIRS 组;C 为 EMD-SE 组
图 2 各组 Bax 蛋白(A~C)和 Bcl-xL 蛋白(D~F)表达比较

3 讨 论

PMN 是免疫系统中重要效应细胞,在一些常见的炎症性疾病中,PMN 与其发生发展有密切关系^[9]。研究表明,凋亡 PMN 的内在生化改变和细胞表面分子标志物改变,是吞噬细胞识别、清除的基础^[10-11]。如因细胞表面 CD16 丢失,使其表面膜联蛋白 V 的结合位点由膜内翻转至膜外,而膜联蛋白与磷脂酰丝氨酸(PS)亲和力高,巨噬细胞等在胞质膜外侧存在 PS,两者一旦接触,则吞噬细胞将吞噬 PMN,另外,吞噬了凋亡的 PMN 的吞噬细胞进一步产生细胞因子及趋化因子的水平就明显下降^[12-14],减少了组织损伤,促进了炎症的消散。故而,可以认为机体是通过凋亡的生理调节机制来清除具有潜在损害活性的 PMN^[15]。全身炎症反应时,可能是大量炎性介质的作用,PMN 的寿命将成倍延长,凋亡延迟甚至坏死,造成组织中 PMN 聚集的数目增多,而 PMN 一旦坏死,将改变细胞膜的通透性,导致溶酶体酶释放和活性氧的代谢,使周围细胞损伤并发生组织炎症,甚至损伤以及多器官功能障碍综合征(MODS)^[1,16],对 PMN 凋亡的进程进行适时适度的干预,可对脓毒症缓解有一定作用,从而减轻甚至阻止发生 MODS,使患者病程缩短,进而改善预后。

《本草经》阐述大黄有“下瘀血、破病癥瘕积聚、荡涤肠胃、推陈致新、通利水谷、调中化食”的作用。而 EMD 是大黄的主要成分之一,具有抑制过度的炎症反应、杀菌、抑制肿瘤细胞增殖及诱导凋亡、泻下、调节胃肠动力、解除奥迪括约肌痉挛及促进微循环改善、减轻缺血/再灌注(I/R)损伤、抗凝等的作用^[17-20]。本课题组前期的研究亦发现,体外培养的脓毒症患者 PMN 延迟凋亡,而这种凋亡的延迟能够为 EMD 所改善,可能正是 EMD 这种促进“异常存活”的 PMN 凋亡作用,成为通里攻下之中药得以促进炎症消除的原因之一^[5]。

细胞凋亡主要通过外源性途(死亡受体途径)或内源性途径[线粒体介导或天冬氨酸特异性半胱氨酸(caspase-9)途径]^[21]。在线粒体介导途径中发挥重要的作用是 Bcl-2 家族^[22],在 Bcl-2 家族中,决定细胞生存或者死亡命运的重要因素是在细胞质中凋亡调控基因的相对浓度^[23]。促进凋亡的调控基因包括 Bax、Bid、Bak 等,抑制凋亡的调控基因包括 Bcl-2、Mcl-1 及 Bcl-xL 等^[24]。李莉等^[25]研究认为,活性氧(ROS)通过下调 Bcl-2、上调 Bax 的表达参与热打击后人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的凋亡。研究表明 PMN 的抑制凋亡蛋白

Mcl-1、Bcl-xL 表达时间较短,但促凋亡蛋白 Bax、Bid 和 Bak 则持续表达,这是 PMN 容易凋亡的可能原因之一^[14]。当凋亡因素刺激细胞后,定位于线粒体外膜上的 Bax,开放线粒体上通透性转换(PT)孔道,明显增加了外膜的通透性,降低跨膜电位,进而细胞色素 C(Cyt-C)释放,激活 caspase-9,通过 caspase-9 途径细胞发生凋亡^[26]。相反,在 Bcl-2、Bcl-xL 的作用下,Cyt-C 则无法经外膜通过,可能的机制是与 Bax 结合,产生异源性二聚体,进而使 PT 孔道堵塞发挥作用^[27]。

本研究结果提示,无论 HC 组或 SE 组,促进凋亡的 Bax 无论 mRNA 还是蛋白表达水平均无明显差异,同时 EMD 干预亦对 Bax 表达影响不显著。但与 HC 组比较,SE 组 Bcl-xL 表达明显增加,这种变化导致 Bcl-xL/Bax 比例失衡,这可能是脓毒症中 PMN 凋亡明显延迟的机制之一。而经 EMD 干预后,使 Bcl-xL 表达减少,故而使脓毒症患者异常升高的 Bcl-xL/Bax 比值下降,这种变化在基因及蛋白水平是一致的,在 EMD 发挥促脓毒症患者 PMN 凋亡中发挥了积极的作用。

综上所述,Bcl-xL/Bax 在 EMD 促进脓毒症患者 PMN 凋亡中可能发挥了一定的作用,但由于凋亡是一个受多基因调控、众多细胞因子及其他多种因素调节的复杂过程,可能 EMD 促进脓毒症患者 PMN 凋亡的作用还存在其他凋亡调控基因或途径,试图找到一个关键凋亡基因是不现实的,为了更好地对凋亡机制进行控制需要深入研究其可能的凋亡机制为 EMD 治疗脓毒症提供理论基础,从而使 EMD 或大黄能更好地应用于脓毒症患者,改善脓毒症预后。

参考文献

- [1] 尚东,齐清会,王宝枝,等.中性粒细胞凋亡调控基因表达异常在全身炎症反应综合征中的作用[J].中华危重病急救医学,2007,19(1):11-13.
- [2] 王宏飞,王勇强,李寅,等.中医辨证治疗急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征机械通气患者胃肠功能障碍的临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,2014,21(6):416-419.
- [3] 潘永,张斌,马明远,等.大黄通腑法对严重肺挫伤患者炎症指标及肺水代谢的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2013,20(1):24-26.
- [4] 宋瑞霞,董晨明,张红松,等.复方大黄制剂治疗高原急性呼吸窘迫综合征的研究[J].中华危重病急救医学,2012,24(7):434-435.
- [5] 尚东,王宝枝,毕伟,等.大黄素对全身炎症反应综合征时中性粒细胞凋亡异常治疗的研究[J].中国急救医学,2006,26(8):581-583.
- [6] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008 [J]. Crit Care Med, 2008, 36(1): 296-327.
- [7] 朱立平,陈学清.免疫学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社,2000:165-166.
- [8] Jing X, Ueki N, Cheng J, et al. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin [J]. Jpn J Cancer Res, 2002, 93(8): 874-882.
- [9] Blagitz MG, Souza FN, Santos BP, et al. Function of milk polymorphonuclear neutrophil leukocytes in bovine mammary glands infected with *Corynebacterium bovis* [J]. J Dairy Sci, 2013, 96(6): 3750-3757.
- [10] Kang JH, Kim SS, Yang MP. Effect of parenteral l-alanyl-l-glutamine administration on phagocytic responses of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes in dogs undergoing high-dose methylprednisolone sodium succinate treatment [J]. Am J Vet Res, 2012, 73(9): 1410-1417.
- [11] Shi H, Yu HJ, Wang HY, et al. Topical administration of peroxiredoxin-6 on the cornea suppresses inflammation and neovascularization induced by ultraviolet radiation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(13): 8016-8028.
- [12] Yano J, Kolls JK, Happel KI, et al. The acute neutrophil response mediated by S100 alarmins during vaginal *Candida* infections is independent of the Th17-pathway [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46311.
- [13] Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF [J]. J Clin Invest, 1998, 101(4): 890-898.
- [14] Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis [J]. FEBS Lett, 2001, 487(3): 318-322.
- [15] Chilvers ER, Cadwallader KA, Reed BJ, et al. The function and fate of neutrophils at the inflamed site: prospects for therapeutic intervention [J]. J R Coll Physicians Lond, 2000, 34(1): 68-74.
- [16] Kino T, De Martino MU, Charmandari E, et al. Tissue glucocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 85(2-5): 457-467.
- [17] 黄兆胜,王宗伟.大黄素基原及药理作用研究[J].国际中医中药杂志,1997,19(5):9-12.
- [18] 祁蕾,苑博,傅强.缺氧/再复氧与脂多糖激活肠上皮细胞核转录因子-κB 和低氧诱导因子-1α 信号通路以及大黄素对其的干预作用[J].中华危重病急救医学,2014,26(6):409-414.
- [19] 吴建新,徐家裕.大黄素与善得定对重症胰腺炎缺血的影响及机制[J].中国中西医结合杂志,1997,17(6):356-359.
- [20] 李鑫,韩奕,杜施霖.大黄治疗重症急性胰腺炎的机制与作用研究进展[J].中国中西医结合急救杂志,2014,21(2):141-143.
- [21] Morton JP, Kantidakis T, White RJ. RNA polymerase III transcription is repressed in response to the tumour suppressor ARF [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(9): 3046-3052.
- [22] Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(2): 115-123.
- [23] Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death [J]. Nature, 2001, 410(6828): 549-554.
- [24] Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions [J]. Mol Immunol, 2003, 39(11): 615-647.
- [25] 李莉,古正涛,刘志锋,等.活性氧调控 Bcl-2、Bax 表达参与热打击后人脐静脉内皮细胞凋亡的研究[J].中华危重病急救医学,2014,26(7):458-463.
- [26] Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead [J]. Cell, 2005, 121(5): 671-674.
- [27] Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, et al. Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death [J]. J Neurosci, 1998, 18(4): 1363-1373.

(收稿日期:2015-03-11)

(本文编辑:邱美仙 李银平)