

三叶青黄酮诱导髓系白血病 NB-4 细胞凋亡及信号通路的研究*

吴海英, 吴元庭, 陈优优, 骆惠丽, 蒋慧芳[△]

(浙江省立同德医院血液科, 浙江 杭州 310012)

[摘要] **目的:** 研究三叶青黄酮(RTHF)对人急性早幼粒细胞白血病 NB-4 细胞活力、凋亡及 MAPK 信号通路的影响。**方法:** 采用 CCK-8 法及 BrdU 实验分别检测 RTHF 对 NB-4 细胞活力及增殖的影响; 流式细胞术检测 RTHF 诱导细胞凋亡及阻滞细胞周期的作用。Western blot 分析 RTHF 对细胞凋亡及 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响。**结果:** RTHF 有效地抑制 NB-4 细胞的活力及增殖, 呈时间和剂量依赖性, 作用 48 h 的 IC₅₀ 为 2.26 g/L。RTHF 阻滞 NB-4 细胞进入增殖周期, 停滞在 G₂ 期, 并诱导其凋亡($P < 0.01$), 呈剂量依赖性。RTHF 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 上调促凋亡蛋白 Bax、caspase-3 和 Cyt-C 的表达, 呈剂量依赖性($P < 0.05$)。RTHF 对 ERK1/2 及 JNK 的表达无明显影响, 但可降低 ERK5 蛋白表达, 提高 p38 的表达水平($P < 0.05$)。**结论:** RTHF 在体外有效地抑制白血病 NB-4 细胞活力及增殖, 并诱导凋亡, 其机制可能通过 p38 MAPK 信号通路及凋亡蛋白途径。

[关键词] 三叶青黄酮; 白血病; NB-4 细胞; 细胞凋亡; MAPK 信号通路

[中图分类号] R733.7; R363.2

[文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.08.016

Effect of *Radix Tetrastigma hemsleyani* flavone on apoptosis and MAPK signaling pathway in myeloid leukemia NB-4 cells

WU Hai-ying, WU Yuan-ting, CHEN You-you, LUO Hui-li, JIANG Hui-fang

(Department of Hematology, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China. E-mail: jhf501@139.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effects of *Radix Tetrastigma hemsleyani* flavone (RTHF) on the viability, apoptosis and MAPK signaling pathway in human acute promyelocytic leukemia NB-4 cells. **METHODS:** The inhibitory effects of RTHF on the viability and proliferation of NB-4 cells were measured by CCK-8 assay and BrdU test. Flow cytometry was used to analyze the apoptosis of NB-4 cells induced by RTHF, and the cell cycle distribution after RTHF treatment. The levels of apoptosis- and MAPK pathway-related proteins in the NB4 cells were determined by Western blot. **RESULTS:** RTHF inhibited the viability and proliferation of NB-4 cells in a time- and dose-dependent manner, and the IC₅₀ at 48 h was 2.26 g/L. RTHF blocked NB-4 cells into the cell proliferation cycle, with stagnation in the G₂ phase. Meanwhile, RTHF induced apoptosis of the cells, down-regulated the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, and up-regulated the expression of pro-apoptotic proteins Bax, caspase-3 and Cyt-C, in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The expression of ERK5 was decreased, and p38 was increased induced after RTHF treatment. However, no obvious change of ERK1/2 and JNK after RTHF treatment was observed. **CONCLUSION:** RTHF effectively inhibits the viability and proliferation, and induces apoptosis of leukemic NB-4 cells *in vitro*. Its mechanism may be related to signaling pathways of p38 MAPK and apoptosis proteins.

[KEY WORDS] *Radix Tetrastigma hemsleyani* flavone; Leukemia; NB-4 cells; Apoptosis; MAPK signaling pathway

急性白血病(acute leukemia, AL)是早期造血前体细胞突变导致的造血系统恶性肿瘤。我国急性白血病发病率约为 6~7 人/10 万人口, 约占肿瘤总发病率的 5%。近年来, 对白血病的治疗取得了很大的

进展, 在传统化疗基础上, 高危患者选择骨髓移植, 另外靶向治疗、细胞免疫治疗以及 CAR-T 等疗法在急性白血病领域得到飞跃性发展^[1-3]。尽管如此, 因疾病的异质性、化疗或靶向治疗所致的毒副反应及

[收稿日期] 2018-07-09 [修回日期] 2019-05-24

* [基金项目] 浙江省中医药科技计划项目(No. 2015ZA021); 浙江省自然科学基金资助项目(No. LQY19H080001)

△通讯作者 Tel: 0571-89972416; E-mail: jhf501@139.com

其耐药性等仍是尚未解决的难题,许多患者在确诊后的生存期仅数月。因此,急性白血病的治疗对每一个临床医生来说仍是一个任重道远的任务,需要我们进一步探讨新的治疗手段。

中医学是我国的宝贵资源,如来自中药的砷剂在急性早幼粒白血病中运用和高三尖杉酯碱治疗急性髓系白血病都是极为成功的例子,说明研究抗白血病的中药具有重要意义。三叶青为葡萄科崖爬藤属植物三叶崖爬藤(*Tetrastigma hemsleyanum*, TH),现代研究表明黄酮类化合物是中药三叶青抗肿瘤主要成分之一。国内外研究发现三叶青黄酮(*Radix Tetrastigma hemsleyani* flavone, RTHF)主要通过提高机体免疫力及调控细胞的增殖、分化和凋亡等途径达到抗肿瘤作用。RTHF对急性白血病细胞的研究目前尚未见报道。本文观察RTHF对白血病NB-4细胞株的活力及凋亡的影响,并通过对丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路的调控,来揭示RTHF抑制白血病细胞活力及诱导凋亡的机制,为今后使之成为抗白血病的中药新药提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 细胞株

人急性早幼粒细胞白血病NB-4细胞购自上海拜力生物科技有限公司。先把DMSO溶解成高浓度的母液4.5 g/mL,然后用PBS稀释100倍,再进行细胞加药处理,保证细胞里的终浓度DMSO < 0.1%。

2 主要试剂与仪器

RTHF购自西安金绿生物公司;CCK-8检测试剂盒购自碧云天公司;BrdU试剂盒购自BioVision;周期检测试剂盒购自北京嘉美生物公司;Annexin V-FITC/PI试剂盒购自南京凯基生物公司;抗Bcl-2、细胞色素C(cytochrome C, Cyt-C)、caspase-3、磷酸化的细胞外信号调节激酶1/2(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2, p-ERK1/2)、p-p38、磷酸化的c-Jun氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK)和p-ERK5等多种抗体均购自Affinity;ERK5抑制剂购自Sigma;HRP标记的II抗购自碧云天公司。CO₂细胞培养箱和酶标仪(Thermo Scientific);电泳仪和电转仪(Bio-Rad);流式细胞仪(Becton Dickinson)。

3 主要方法

3.1 细胞培养 将冻存的NB-4细胞复苏后,加入DMEM培养基重悬细胞,放入37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中孵育,当NB-4细胞长至80%~90%融合度时,传代培养。

3.2 实验分组 实验分4组:(1)空白对照(control)组:加入等体积的DMSO;(2)RTHF低剂量(0.25 g/L)组;(3)RTHF中剂量(0.5 g/L)组;(4)RTHF高剂量(1 g/L)组。上述不同浓度的RTHF分别处理24、48和72 h。

3.3 CCK-8法检测细胞活力 取对数生长期的细胞,加入上述各组RTHF处理24、48和72 h,对照组加等体积DMSO。向每孔加入10 μL CCK-8反应液,将培养板在培养箱内孵育2 h用酶标仪测定在450 nm处的吸光度(A)值。

3.4 流式细胞术检测细胞周期分布 分别将低、中和高剂量RTHF加入NB-4细胞,对照组加等体积DMSO,48 h后,1 500 r/min离心5 min,洗涤细胞,弃上清。细胞固定加入5 mL预冷的70%乙醇,混匀后4℃固定4 h或过夜。取出固定好的细胞,1 500 r/min离心5 min,洗涤细胞,弃上清。样品中加入0.5 mL细胞周期染色液,轻轻混匀吹散细胞,37℃避光染色20 min,即可用流式细胞仪检测红光通道荧光信号,采用分析软件进行周期拟合分析。

3.5 流式细胞术检测细胞凋亡 低、中和高剂量RTHF处理NB-4细胞48 h,1 500 r/min离心5 min,洗涤细胞,弃上清。加入300 μL的binding buffer悬浮细胞;annexin V-FITC标记(加入5 μL的annexin V-FITC混匀)后,避光,室温孵育15 min;PI标记(再加入10 μL的PI染色),轻轻混匀细胞,于避光条件下室温孵育10 min,上机检测。

3.6 BrdU掺入法检测细胞增殖 对照组合低、中和高剂量RTHF处理NB-4的细胞,同时各孔加入30 μmol/L BrdU,细胞培养48 h,1 500 r/min离心5 min,洗涤细胞,弃上清。加入0.5 mL的2 mol/L HCl/0.5% Triton X-100,室温孵育30 min;用50 μL的0.5% Tween 20/1% BSA/PBS重悬,加入10~20 μL(1 μg/10⁶ cells) α-BrdU(mAb)结合掺入的BrdU,室温孵育1 h;重悬后,加入II抗5 μL(1 μg/10⁶ cells),室温、避光孵育30 min。离心弃上清,加入10 μL PI工作液,室温、避光孵育30 min;流式细胞仪检测。

3.7 Western blot检测蛋白水平 收获各组药物处理后细胞离心,弃上清。每孔加入100 μL RIPA(含PMSF)细胞裂解液,涡旋混匀;12 000 r/min离心15 min,取上清为细胞总蛋白。采用SDS-PAGE分离蛋白,配制10%分离胶10 mL及6%浓缩胶5 mL,将凝胶置于电泳槽中,加入电泳缓冲液,每孔加上样液15 μL。先用80 V恒压电泳,约20 min,当指示剂溴酚蓝进入分离胶后改用110 V恒压电泳。电泳结束后将目的蛋白转到PVDF膜,100V恒压转膜1 h。10%脱脂

奶粉封闭, 孵育 I 抗 Bax、Bcl-2、Cyt-C、caspase-3 (1:1 000)、p-ERK1/2、p-p38、p-JNK、p-ERK5 (1:1 000) 和 GAPDH(1:5 000), 4 °C 孵育过夜, 洗膜, HRP 标记的 II 抗(1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次。暗室中用 X 胶片显影和定影。

4 统计学处理

采用 SPSS 17 统计处理软件分析。计量资料实验数据以均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。组间均数的比较采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 RTHF 对急性髓系白血病 NB-4 细胞活力及增殖的影响

低、中和高剂量 RTHF 分别处理 NB-4 细胞 24、48 和 72 h, 采用 CCK-8 法检测, 结果显示, NB-4 细胞活力均受到明显抑制 ($P < 0.01$), IC_{50} 分别为 4.74、2.26 和 1.34 g/L, 见图 1A。BrdU 实验结果显示, 与对照组相比, 低、中和高剂量的 RTHF 处理 48 h 后, NB-4 细胞的增殖率均明显下降 ($P < 0.01$), 见图 1B。这提示 RTHF 可抑制 NB-4 细胞的活力和增殖。

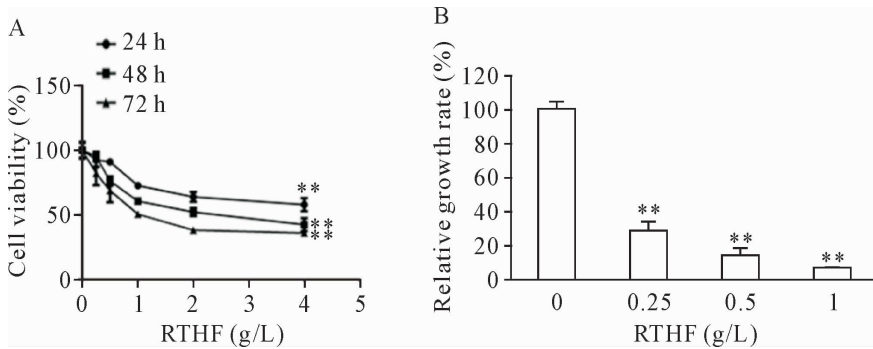


Figure 1. Effects of RTHF on the viability (A) and proliferation (B) of NB-4 cells detected by CCK-8 assay and BrdU test. Mean ± SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs 0 g/L group.

图 1 RTHF 对 NB-4 细胞活力和增殖的影响

2 RTHF 阻滞细胞增殖周期的作用

采用流式细胞术分析 RTHF 对细胞周期的影响, 与对照组比较, 低、中和高剂量 RTHF 处理 NB-4 细胞 48 h, 结果显示, G_2 期细胞比例均明显增多

($P < 0.05$), 而 S 期细胞比例则显著下降 ($P < 0.05$), 见图 2。这提示 RTHF 能够阻滞 NB-4 细胞进入增殖周期, 停滞在 G_2 期。

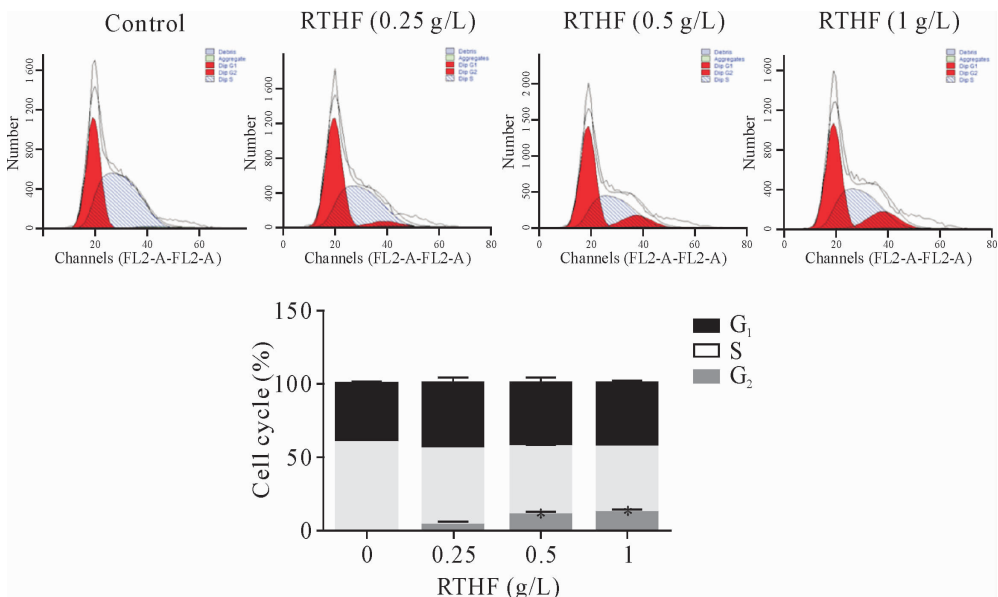


Figure 2. The effect of RTHF on the cell cycle distribution of NB-4 cells analyzed by flow cytometry. Mean ± SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs 0 g/L group.

图 2 流式细胞术检测不同剂量 RTHF 对 NB-4 细胞周期分布的影响

3 RTHF 诱导白血病细胞凋亡的影响

Annexin V/PI 染色检测早期凋亡细胞的比例,结果显示,与对照组比较,低、中和高剂量 RTHF 处

理细胞后,细胞凋亡率均显著增加 ($P < 0.01$),见图 3。

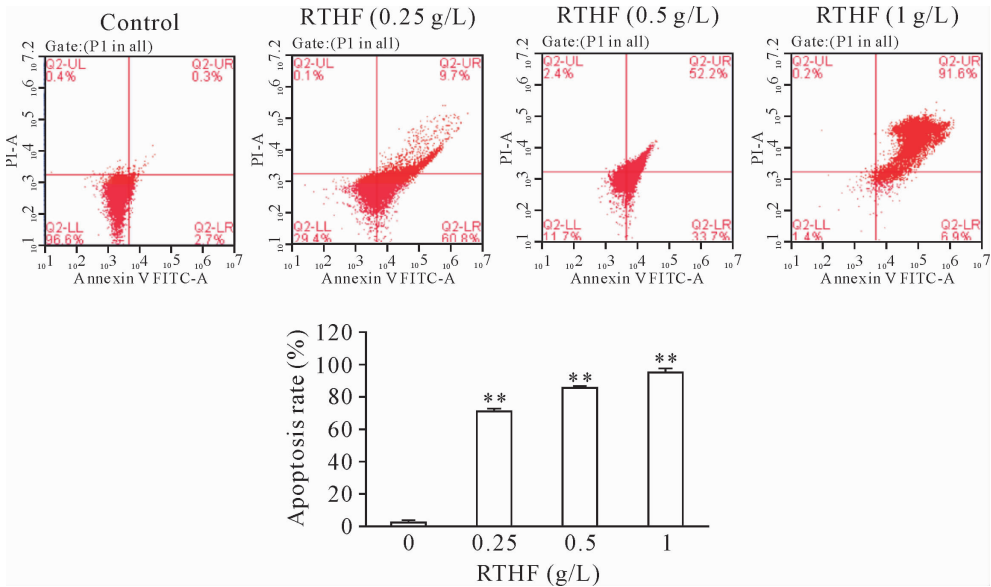


Figure 3. The effect of RTHF on the apoptosis of NB-4 cells analyzed by flow cytometry. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs 0 g/L group.

图 3 Annexin V 检测 RTHF 诱导 NB-4 细胞凋亡的作用

4 Western blot 分析 RTHF 对凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与对照组比较,低、中和高剂量 RTHF 处理的 NB-4 细胞, Bcl-2 蛋白表达明

显下调,而 Bax、caspase-3 和 Cyt-C 蛋白表达则明显升高,呈浓度依赖性 ($P < 0.01$),见图 4。提示 RTHF 能够促进 NB-4 细胞凋亡,且浓度越高,促进作用越明显。

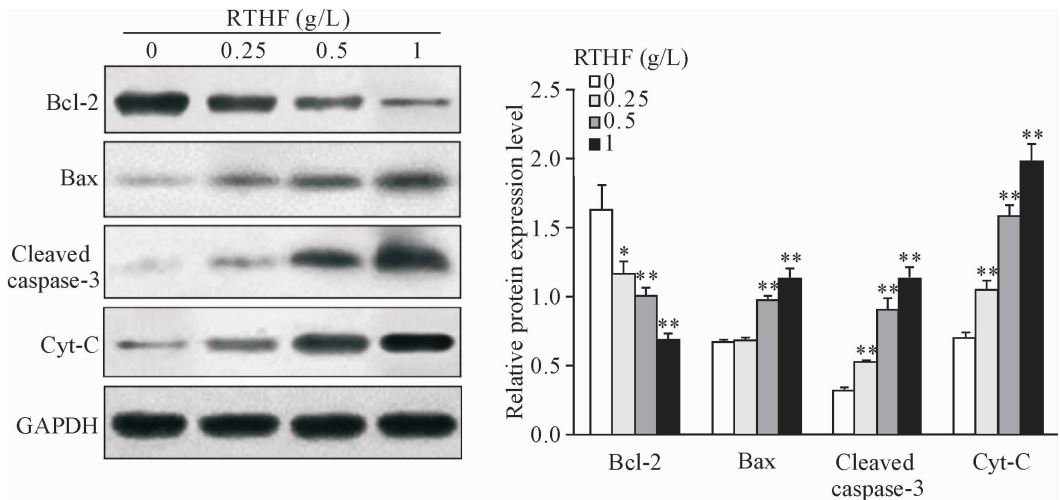


Figure 4. The effect of RTHF on apoptosis-related protein levels determined by Western blot. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 g/L group.

图 4 Western blot 分析 RTHF 对凋亡相关蛋白水平的影响

5 RTHF 对 NB-4 细胞 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与对照组相比,低、中和高剂量 RTHF 值 NB-4 细胞中 p-p38 的蛋白水平明显

升高,且随着浓度升高,作用更为明显;而 p-ERK5 蛋白水平则明显降低,并呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。此外, p-ERK1/2 和 p-JNK 的蛋白水平均无明显变化,见图 5。这提示 RTHF 可通过提高 p38 的磷酸化,进

而促进其功能活性,并通过降低 ERK5 的磷酸化而抑制其功能活性;但对 ERK1/2 和 JNK 的磷酸化状

态无明显影响。

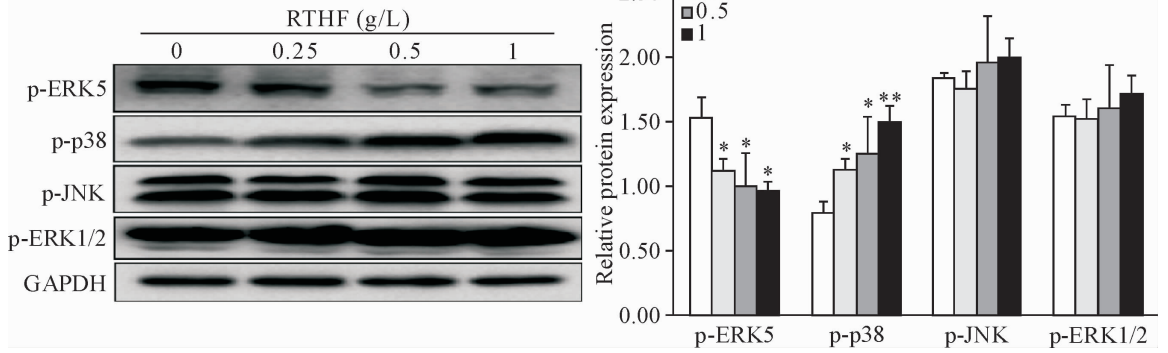


Figure 5. The protein levels of MAPK signaling pathway-related molecules in the NB-4 cells determined by Western blot. Mean ± SD. *n* = 3. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs 0 g/L group.

图5 Western blot 检测不同剂量组对 NB-4 细胞 MAPK 通路相关蛋白水平的影响

讨 论

急性白血病在化疗、造血干细胞移植和细胞免疫等治疗手段下,其死亡率仍然较高^[4]。因此,很有必要寻找新的综合治疗方式。黄酮类化合物是由苯丙氨酸合成的植物色素,在绿色植物细胞中普遍存在,其能够抑制特定的酶,模拟一些激素和神经递质以及清除自由基。有研究表明黄酮类化合物能够诱导肿瘤细胞凋亡、抑制增殖,因此它具有抗肿瘤活性^[5],但是其抗肿瘤机制还未完全阐明^[6-7]。

近年来 RTHF 的抗肿瘤作用越来越受关注,我们课题组观察 RTHF 对肝癌细胞 HepG-2 及原代大鼠肝细胞体外毒性作用研究,证实其毒性很低,即对肿瘤细胞抑制效应明显,而对大鼠正常肝细胞无明显损伤作用。同时,探讨了 RTHF 抗实体瘤的量-效关系,揭示其抗肿瘤的作用机制与诱导癌细胞凋亡相关。本研究其结果提示:(1) RTHF 能够有效地抑制 NB4 细胞的活力,其作用通过阻滞细胞增殖周期而阻滞于 G₂ 期,呈时间剂量依赖性;(2) RTHF 能够诱导 NB4 细胞凋亡,annexin V 检测早期凋亡细胞比例明显增高;并下调抗凋亡相关蛋白 Bcl-2,上调促凋亡相关蛋白 Bax, caspase-3 和 Cyt-C 的表达,均呈剂量依赖性;(3) RTHF 抑制磷酸化的 ERK5 蛋白激酶,促进 p38 蛋白激酶的磷酸化,但对 ERK1 和 JNK 单磷酸酶的磷酸化无明显影响。

人 MAPK 级联有 4 个主要的 MAPKs,包括 ERK1/2、JNK、p38 和大 MAP 激酶 1 (BMK1/ERK5)。MAPK 信号转导通路参与多种细胞功能的调控,尤其是在细胞增殖、分化和凋亡中起着关键作用,且其中很多 MAPK 成员与血液系统肿瘤的关系密切。例

如,在急性白血病中,ERK 通路中 MAPK 信号级联反应是 Raf/Mek/ERK 信号级联反应,利妥昔单抗诱导 CLL 细胞凋亡是 p38 依赖性的,发现 p38 及其下游效应子 MAPKAPK-2 在用抗 CD20 分离的 CLL 细胞培养过程中被激活,而用 p38 药理学抑制剂 SB203580 处理导致诱导恶性淋巴细胞凋亡。

本文结果提示通过 RTHF 能够降低磷酸化的 ERK5 而抑制其功能活性。ERK5 蛋白与细胞存活、抗凋亡信号、血管生成、细胞运动、分化和细胞增殖有关^[8],如在体外实验中,高表达 ERK5 的前列腺癌 PC3 细胞增殖和侵袭能力增强,在体内更有效地形成肿瘤,反之亦然^[9]。ERK5 对于表达 bcr/abl 融合基因的白血病细胞的生长也是必需的^[10]。Wang 等^[11]发现 ERK5 蛋白具有调控单核细胞分化的作用,在髓系白血病这种分化调控受阻,导致白血病细胞分化障碍。抑制 ERK5 本身的磷酸化功能激活状态,则抑制 AML 细胞增殖,阻滞细胞进入增殖周期,停滞在 G₂ 期^[12],本文结果提示 RTHF 可具有抑制 ERK5 蛋白及其磷酸化的作用。

p38 MAPK 家族成员是由 4 组分子量为 38 kD 蛋白组成,可分为 α、β、γ 和 δ。这四者之间大概有 60% 相同的氨基酸序列,基于此,p38 MAPK 家族成员有重叠的底物特异性,虽然有些差异已经被报道,例如对于特定的底物 p38α 和 p38β 比 p38γ 和 p38δ 能更好地磷酸化,反之亦然。p38 是一个促炎因子,但同时也能够调节细胞的增殖与存活^[13]。p38 MAPK 通路在细胞凋亡过程中对 caspase 的上游和下游均起作用,因此既参与细胞增殖、分化,也参与细胞凋亡。本文结果显示,RTHF 能够上调磷酸化的 P38 蛋白表达,提示 RTHF 可通过提高 p38 的磷酸化

状态,进而促进其功能活性,推测可能与 RTHF 诱导白血病细胞凋亡相关,但具体调控机制尚有待进一步实验。

第 1 个 JNK 也被称为应激激活蛋白激酶(stress-activated protein kinase,SAPK),有 1~3 种不同亚型,每种亚型分布不同,主要参与细胞增殖与生长的调控。ERK1/2 蛋白激酶在细胞增殖、分化及存活等起重要作用,在癌症中常可见到 ERK1/2 蛋白的异常,ERKs 的活性取决于 RAS 和 RAF 激酶的突变。本文实验未见 RTHF 对磷酸化 JNK 和 ERK1/2 蛋白激酶的影响。由此,我们推测,RTHF 抑制急性早幼粒细胞白血病 NB-4 细胞增殖的作用,与 JNK 和 ERK1/2 蛋白的磷酸化及其信号传递的关系不大^[14-15]。

最近的研究表明^[16],全反式维甲酸通过作用于 JNK/p38 MAPK 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注引起的血脑屏障损伤,而全反式维甲酸正是诱导早幼粒细胞分化的重要药物。由此,我们推测,三叶青黄酮在进行 MAPKs 通路信号转导时能起到相似的作用,当然,这还需要我们进一步的研究。

综上所述,RTHF 对白血病 NB-4 细胞有抑制生长、加速凋亡的作用,其机制可能是通过可通过凋亡蛋白途径,并由 MAPKs 信号传导通路中的 ERK5 及 p38 途径起信号传导作用。

[参 考 文 献]

[1] Rotol A, Karadimitris A, Ruella M. Buliding upon the success of CART19: chimeric antigen receptor T cells for hematologic malignancies[J]. *Leuk Lymphoma*, 2018, 59(9):2040-2055.

[2] Kenderian SS, Ruella M, Shestova O, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*,2015, 29(8):1637-1647

[3] Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(10):3814-3826.

[4] Szer J. The prevalent predicament of relapsed acute myeloid leukemia [J]. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 2012(1):43-48.

[5] Babu BV, Konduru NK, Nakanishi W, et al. Experimental and theoretical advances in functional understanding of

flavonoids as anti-tumor agents [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(2):307-332.

[6] Wei A, Wu G, Xiong C, et al. Flavonoids with special B-ring from *Macrothelypteris viridifrons* and their anti-proliferative effects on tumor cell [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2011, 36(5):582-584

[7] Kim YA, Kim H, Seo Y. Antiproliferative effect of flavonoids from the halophyte *Vitex rotundifolia* on human cancer cells[J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8(10):1405-1408.

[8] Hayashi M, Fearn C, Eliceiri B, et al. Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7699-7706.

[9] Ramsay AK, McCracken SR, Soofi M, et al. ERK5 signalling in prostate cancer promotes an invasive phenotype [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(4):664-672.

[10] Buschbeck M, Hofbauer S, Di Croce L, et al. Abl-kinase-sensitive levels of ERK5 and its intrinsic basal activity contribute to leukaemia cell survival [J]. *EMBO Rep*, 2014, 6(1):63-69.

[11] Wang X, Pesakhov S, Harrison JS, et al. ERK5 pathway regulates transcription factors important for monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(7): 856-867.

[12] Wang X, Pesakhov S, Weng A, et al. ERK 5/MAPK pathway has a major role in 1 α ,25-(OH)₂ vitamin D₃-induced terminal differentiation of myeloid leukemia cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 144 (Pt A): 223-227.

[13] Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling [J]. *Biochem J*, 2010, 429(3): 403-417.

[14] Cienas J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma [J]. *Med Oncol*, 2017, 34(2):26.

[15] Cienas J, Kvederaviciute K, Meskinyte I, et al. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 mutation sinpancreatic cancer [J]. *Cancers*, 2017, 9(5):E42.

[16] 李明航,田晓翠,安瑞娣,等. 全反式维甲酸通过作用于 JNK/P38 MAPK 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注引起的血脑屏障损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(1):112-118.

(责任编辑:陈妙玲,罗 森)