

兔脊髓缺血再灌注损伤后线粒体凋亡途径的变化及灯盏细辛预处理的干预作用

程斌¹, 王鑫², 王磊¹, 曹凯¹, 端磊³, 李锋涛¹

1. 西安交通大学医学院第二附属医院骨二科, 陕西 西安 710004

2. 河南职工医学院附属医院骨科, 河南 新郑 451191

3. 上海中医药大学岳阳中西医结合医院骨科, 上海 200437

目的:探讨兔脊髓缺血再灌注损伤后线粒体凋亡途径机制及灯盏细辛(*Herba Erigerontis Breviscapii*)注射液预处理的干预作用。

方法:日本大耳白兔 60 只随机分为假手术组、缺血组、再灌注组(1、6、24、48 h)和灯盏细辛组(1、6、24、48 h)。采用腹主动脉阻断法复制兔脊髓缺血再灌注损伤模型,缺血组缺血 50 min,再灌注组缺血 50 min 后分别再灌注 1、6、24、48 h。灯盏细辛组在缺血前 30 min 应用灯盏细辛 9 mg/kg。用流式细胞仪检测细胞凋亡率,用酶联免疫吸附测定法检测脊髓神经细胞细胞质及血清的半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 9(caspase-9)和凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)的含量。

结果:与假手术组和缺血组比较,再灌注组脊髓细胞凋亡率和细胞质中 AIF 和 caspase-9 含量增加,血清 AIF 和 caspase-9 含量于再灌注 1 h 和 6 h 下降,但于 24 h 和 48 h 升高。与缺血再灌注组比较,灯盏细辛可以降低脊髓细胞的凋亡率及血清和脊髓神经细胞细胞质中 AIF 与 caspase-9 的含量。

结论:脊髓缺血再灌注后神经细胞的凋亡与线粒体途径有关,灯盏细辛可通过此途径抑制脊髓神经细胞凋亡。

关键词:线粒体; 灯盏细辛; 凋亡; 缺血再灌注损伤; 兔

Cheng B, Wang X, Wang L, Cao K, Duan L, Li FT. *J Chin Integr Med.* 2009; 7(9): 842-847.

Received April 20, 2009; accepted July 6, 2009; published online September 15, 2009.

Indexed/abstracted in and full text link-out at PubMed. Journal title in PubMed: *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.*

Free full text (HTML and PDF) is available at www.jcimjournal.com.

Forward linking and reference linking via CrossRef.

DOI: 10.3736/jcim20090909

Changes of mitochondrial apoptosis in spinal cord ischemia-reperfusion injury and the effects of *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection preconditioning intervention in rabbits

Bin CHENG¹, Xin WANG², Lei WANG¹, Kai CAO¹, Lei DUAN³, Feng-tao LI¹

1. Third Department of Orthopaedics, Second Hospital of Xi'an Jiao Tong University School of Medicine, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

2. Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital, Employee Medical College, Xinzheng 451191, Henan Province, China

3. Department of Orthopaedics, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

Objective: To investigate the mechanisms of mitochondrial apoptosis in spinal cord ischemia-reperfusion injury and the effects of *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection preconditioning intervention.

Methods: Sixty Japanese rabbits were divided into sham-operated group, ischemia group, ischemia-reperfusion group (1, 6, 24 and 48 h), and *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection group (1, 6, 24 and 48 h).

基金项目: 陕西省科技社发攻关项目基金资助(No. 2007k01-41)

Correspondence: Prof. Bin CHENG; Tel: 029-87679622; E-mail: drcheng2006@sina.com

Clamping the abdominal aorta was used to construct the rabbit model of spinal cord ischemia-reperfusion injury. The rabbits in the ischemia-reperfusion group and the *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection group underwent reperfusion for 1, 6, 24, 48 h respectively after fifty-minute ischemia. The rabbits in the *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection group were administered with *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection at 9 mg/kg 30 minutes before ischemia. Rate of apoptotic cells was measured by flow cytometry; contents of caspase-9 and apoptosis-inducing factor (AIF) in cytoplasm and serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Compared with the sham-operated group and the ischemia group, the rates of apoptotic cells, the contents of caspase-9 and AIF in cytoplasm were increased at all time points after reperfusion, and the contents of caspase-9 and AIF in serum were decreased after 1 h and 6 h reperfusion, and increased after 24 h and 48 h reperfusion in the ischemia-reperfusion group. *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection intervention could decrease the rate of apoptotic cells and the contents of caspase-9 and AIF in cytoplasm and serum as compared with those in the ischemia-reperfusion group, and the effects appeared after 1 h reperfusion.

Conclusion: The apoptosis of nerve cells after spinal cord ischemia-reperfusion is related to the mitochondrial pathways. *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection can inhibit nerve cell apoptosis by decreasing the contents of caspase-9 and AIF in cytoplasm and serum.

Keywords: mitochondria; *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection; apoptosis; ischemia-reperfusion injury; rabbits

许多研究表明,脊髓缺血再灌注损伤与神经细胞凋亡有关^[1]。细胞凋亡途径有死亡受体通路、线粒体通路和内质网通路^[1],三条通路间相互联系,其中线粒体途径在缺血再灌注损伤方面起关键作用^[2]。线粒体在缺血再灌注后释放多种促凋亡蛋白,包括酶依赖性和非酶依赖性促凋亡蛋白^[3,4]。局部缺血再灌注可影响到远隔脏器的功能,并且局部器官预处理对远隔器官有保护作用^[5-7]。我们推测,脊髓缺血再灌注可引起局部和全身线粒体蛋白的变化。灯盏细辛是我国传统中药,有效成分为野黄芩苷和总咖啡酸酯,具有提高血脂屏障通透性,改善微循环,对抗垂体后叶素,抗凋亡等多种功效。我们于缺血前全身应用灯盏细辛来观察脊髓缺血再灌注损伤神经细胞凋亡的变化情况。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 成年日本大耳白兔 60 只(西安交通大学医学院实验动物中心提供),体质量 2.5~3.0 kg,雌雄不限。将动物随机分为 4 组:假手术组,只暴露腹主动脉不阻断血流;缺血组,阻断腹主动脉 50 min;缺血再灌注组,阻断腹主动脉 50 min 后分别再灌注,根据再灌注时间不同,又分为再灌注 1、6、24、48 h 4 个亚组;治疗组,在缺血前 30 min 耳缘静脉滴注灯盏细辛 9 mg/kg,然后分别行缺血再灌注,根据再灌注时间不同,又分为再灌注 1、6、24、48 h 4 个亚组。

1.2 主要仪器及试剂 流式细胞仪、单细胞悬液制备仪(美国 Becton Dickinson 公司),酶标仪(美国 Amersham Biosciences 公司)。灯盏细辛注射液

(45 mg/支,每支含野黄芩苷 5 mg,总咖啡酸酯 25 mg,其他成分 15 mg,批准文号为国药准字 Z53021569,云南生物谷灯盏花药业有限公司),凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(QRCT-3013300132211EIA/UTL,美国 ADL 公司),半胱氨酸蛋白酶 9(caspase-9)ELISA 检测试剂盒(QRCT-301330122011EIA/UTL,美国 ADL 公司),Annexin V/异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)凋亡检测试剂盒(LHK601-100,北京市晶美基因谷科技有限公司)。

1.3 模型制备 采用 Zivin 等^[8]的方法(腹主动脉阻断)制作兔脊髓梗死模型。用 10% 水合氯醛 2 mL/kg 耳缘静脉麻醉,腹部剃毛仰卧固定于手术台上。常规消毒,腹部正中偏左 2 cm 纵行切开,寻找并分离腹主动脉,于左肾动脉下用动脉夹夹闭腹主动脉,夹闭前耳缘静脉注入肝素 1 mg/kg,缝合切口,50 min 后重新打开切口,松开动脉夹,进行再灌注,再次缝合切口并肌肉注射头孢唑啉钠 0.2 g/kg。假手术组在分离腹主动脉时因出血死亡 1 只,其余 59 只均纳入实验。

1.4 检测指标

1.4.1 流式细胞仪检测细胞凋亡 将兔麻醉,在腰椎用咬骨钳咬开椎管。小心分离腰骶段脊髓,取出腰骶段脊髓,剥去表面脊膜和血管,立即放入 4 ℃ PBS 液中,将组织用细胞悬液制备仪制成匀浆,在 300 目尼龙网上过滤,用 PBS 洗细胞两次,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL。取 0.5 mL 细胞匀浆,按照凋亡检测试剂盒操作说明将细胞染色,上流式细胞仪

测试。测试结果用 Cell Quest 软件进行分析。流式细胞仪检测输出图中右上方为坏死细胞,右下方为早期凋亡细胞,左下方为正常细胞。

1.4.2 ELISA 法检测 AIF 和 caspase-9 含量 将上述细胞悬液部分在超声破碎仪上把细胞于冰块中降温破碎,用差速离心(1 500 × g, 10 min 和 20 000 × g, 10 min)除去细胞碎片和线粒体,得到细胞质液;兔心脏采血 3 mL,室温下放置 2 h 后于 1 000 × g 离心 10 min 取上清。所得标本置于 4 ℃ 冰箱待测。用 ELISA 法分别检测样本中 AIF 和 caspase-9 含量。严格按照说明书操作步骤进行,于酶标仪上选择 450 nm 波长检测各孔的光密度(optical density, OD)值。用 CurveExpert 1.3 分析软件,以 OD 值为纵坐标,标准品浓度为横坐标绘制标准曲线,根据样本的 OD 值在标准曲线上读出样本

中所测物质的量。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验采用析因设计的方差分析;脊髓神经细胞凋亡的结果用构成比(%)表示,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞凋亡情况 与假手术组比较,缺血组正常细胞百分比明显降低($P < 0.05$)。再灌注组正常细胞百分比随再灌注时间延长逐渐降低,与缺血组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);细胞凋亡率明显增加,以再灌注 24 h 最高。灯盏细辛组正常细胞百分比于缺血再灌注后较缺血再灌注组增加($P < 0.05$),细胞凋亡率减少($P < 0.05$)。见图 1 和表 1。

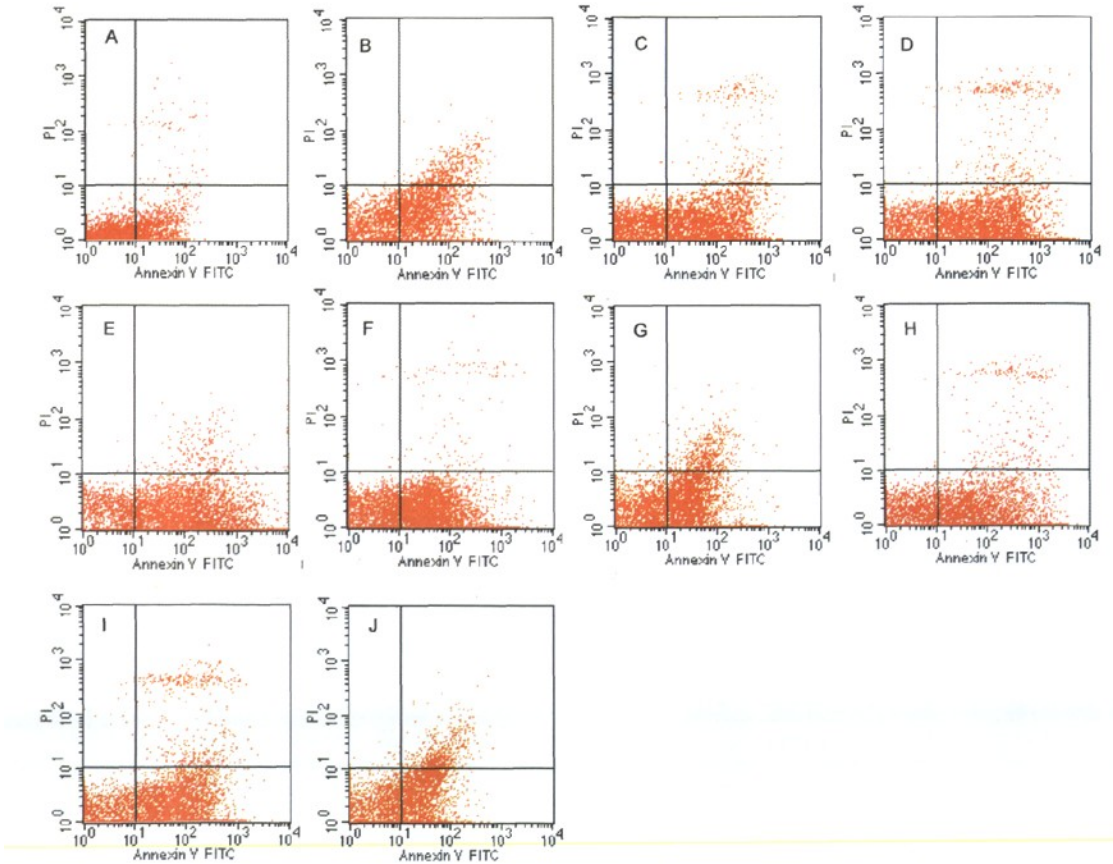


图 1 流式细胞仪检测脊髓神经细胞的凋亡情况

Figure 1 Rates of apoptosis of nerve cells in spinal cord measured by flow cytometry

A: Sham-operated group; B: Ischemia group; C: Ischemia-reperfusion group, 1 h reperfusion; D: Ischemia-reperfusion group, 6 h reperfusion; E: Ischemia-reperfusion group, 24 h reperfusion; F: Ischemia-reperfusion group, 48 h reperfusion; G: *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection group, 1 h reperfusion; H: *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection group, 6 h reperfusion; I: *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection group, 24 h reperfusion; J: *Herba Erigerontis Breviscapii* Injection group, 48 h reperfusion.

表 1 脊髓神经细胞的凋亡情况
Table 1 Rates of apoptosis of nerve cells in spinal cord

($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	Time	n	Normal cells	Apoptotic cells
Sham-operated		5	81.72±1.51	17.24±1.30
Ischemia	50 min	6	48.60±1.92*	42.82±1.44*
Ischemia-reperfusion	1 h	6	38.53±2.18*△	57.34±1.95*△
	6 h	6	23.41±1.64*△	70.52±1.93*△
	24 h	6	14.97±0.53*△	81.03±0.47*△
	48 h	6	32.87±1.18*△	64.04±1.69*△
<i>Herba Erigerontis Breviscapii</i> Injection	1 h	6	45.38±0.96▲	45.85±1.14▲
	6 h	6	30.50±0.74▲	65.32±1.44▲
	24 h	6	27.89±1.85▲	64.33±0.50▲
	48 h	6	46.67±1.30▲	41.47±1.19▲

* $P < 0.05$, vs sham-operated group; △ $P < 0.05$, vs ischemia group; ▲ $P < 0.05$, vs ischemia-reperfusion group.

2.2 细胞质和血清中 AIF 与 caspase-9 水平 缺血组细胞质中 AIF 和 caspase-9 水平与假手术组比较,差异无统计学意义。再灌注后,缺血再灌注组细胞质中 AIF 和 caspase-9 水平升高,于再灌注 6 h 后达最高。灯盏细辛组与再灌注组相比,再灌注后细胞质 AIF 和 caspase-9 水平下降,6、24 和 48 h 时比

较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。再灌注组血清中 AIF 和 caspase-9 水平于再灌注 1 h 和 6 h 较缺血组下降($P < 0.05$),于再灌注 24 h 明显升高,于 48 h 时下降。与再灌注组相比,灯盏细辛组血清中 AIF 和 caspase-9 水平下降($P < 0.05$),分别在 24 及 48 h 下降幅度最为明显。见表 2。

表 2 脊髓细胞质和血清中 AIF 与 caspase-9 的含量
Table 2 Contents of AIF and caspase-9 in cytoplasm of spinal cord and serum

($\bar{x} \pm s$)

Group	Time	n	Cytoplasm		Serum	
			AIF (ng/L)	Caspase-9 (μ g/L)	AIF (ng/L)	Caspase-9 (μ g/L)
Sham-operated		5	211.21±10.84	1.92±0.16	788.52±23.87	3.95±0.20
Ischemia	50 min	6	242.11±16.49	2.38±0.36	1 057.85±58.85*	8.40±0.15*
Ischemia-reperfusion	1 h	6	350.93±16.86*△	4.30±0.29*△	863.29±15.83△	5.69±0.34*△
	6 h	6	731.72±15.50*△	5.57±0.28*△	931.16±19.21*△	6.38±0.39*△
	24 h	6	540.38±8.64*△	5.31±0.37*△	1 606.99±40.92*△	9.31±0.18*△
	48 h	6	344.76±20.65*△	4.05±0.25*△	1 157.64±28.88*△	8.41±0.15*
<i>Herba Erigerontis Breviscapii</i> Injection	1 h	6	339.50±20.54	3.35±0.14▲	802.24±17.62	4.77±0.11▲
	6 h	6	449.01±23.75▲	3.81±0.21▲	800.08±18.63▲	5.01±0.27▲
	24 h	6	392.94±14.47▲	3.51±0.28▲	920.19±29.94▲	6.33±0.39▲
	48 h	6	296.91±8.18▲	3.06±0.24▲	809.06±24.02▲	5.36±0.17▲

* $P < 0.05$, vs sham-operated group; △ $P < 0.05$, vs ischemia group; ▲ $P < 0.05$, vs ischemia-reperfusion group.

3 讨论

脊髓缺血到一定程度和时间后可导致神经细胞损伤,在一定条件下恢复血供后有加重损伤的倾向,有时还相当严重,这种再灌注损伤与神经细胞凋亡有关。

线粒体是凋亡的枢纽,细胞受到凋亡信号的刺激后,线粒体即做出反应,线粒体膜电位降低,发生去极化,致通透性转换通道开放,线粒体膜通透性增大,通过释放膜间蛋白[有的是 caspase 依赖性的,如细胞色素 C(cytochrome C, CytC),第 2 种线粒

体来源的激活剂/低等电点 IAP 直接结合蛋白(second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low PI, Smac/DIABLO);有的是非 caspase 依赖性的,如 AIF、核酸内切酶 G(endonuclease G, EndoG);有的兼有 caspase 依赖和非依赖性,如丝氨酸蛋白酶(OMI/HtrA2)]诱导凋亡的发生。CytC 和 Smac/DIABLO^[9]通过激活 caspase-9 进而激活 caspase-3,最后通过 DNA 的降解导致凋亡,AIF 和 EndoG 则直接进入细胞核导致凋亡,而 OMI/HtrA2 通过 caspase 依赖和非 caspase 依赖双重途径诱导凋亡。

CytC 释放到细胞质后与凋亡蛋白酶激活因子 1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 的羧基端结合, Apaf-1 通过其氨基端和前半胱氨酸蛋白酶 9 (procaspase-9) 的功能前区结合, 从而形成凋亡复合体, 酶解并激活 caspase-3, 进而启动 caspase 级联反应, 导致凋亡^[9]。可见, caspase-9 是介导线粒体途径的关键酶。在 CytC/Apaf-1 介导的线粒体途径中, X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白 (X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP) 通过其杆状病毒 IAP 重复序列 3 (baculovirus IAP repeat 3, BIR3) 结构域参与 caspase-9 酶原激活的抑制, 而 Smac/DIABLO 稳定地与 XIAP 的 BIR2、BIR3 作用, 即解除了 XIAP 对 caspase-9 的抑制效应, 促进了 caspase-9 的激活及以后的 caspase-3 激活和凋亡^[10]。AIF 锚定于线粒体内膜, 在凋亡诱导因素刺激下, 多聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶 1 过度激活能引起线粒体损伤和 AIF 的释放^[11], AIF 从线粒体释放并转位于细胞核, 作为 DNA 内切酶与 EndoG 协同诱发染色质凝集和 DNA 断裂, 引起不依赖 caspase 的细胞凋亡^[12]。OMI/HtrA2 由线粒体释放入细胞质后可通过两种机制促进凋亡^[13]: 其一, 通过其氨基端的 reaper 样基序与 XIAP 的 BIR2、BIR3 结构域结合并将其催化裂解, 从而解除 XIAP 对 caspase-3、-7、-9 的抑制, 促进凋亡发生; 其二, 通过其自身的丝氨酸蛋白酶水解途径促凋亡。

本实验发现, 缺血后神经细胞凋亡率有所增加, 再灌注后尤甚。缺血后血清中 AIF 和 caspase-9 亦增加, 再灌注后 1 h 即见其量较缺血组有所减少而后继续增加, 24 h 后有一高峰。缺血后细胞质中 AIF 和 caspase-9 变化不大, 再灌注后增加, 6 h 达高峰, 且凋亡率与 AIF 和 caspase-9 的变化有时间相关性。说明脊髓缺血再灌注与线粒体凋亡途径有一定的关系且至少持续 48 h。

目前, 缺血再灌注损伤凋亡的机制, 预处理保护的机制, 远距离脏器在缺血再灌注损伤中的联系, 神经细胞的保护和再生等等我们仍知之甚少, 在实际应用中对神经细胞的再灌注损伤尚无特效治疗, 甲基强的松龙有保护作用, 但其冲击疗法副作用较大。灯盏细辛是含有多种有效成分的中药, 其主要活性成分是野黄芩苷和总咖啡酸酯, 它可以改善神经组织的缺血缺氧状况和再灌注带来的损伤, 对缺血再灌注损伤有保护作用^[14,15]。本实验亦发现缺血前应用灯盏细辛可以减少细胞凋亡率, 1 h 内即起作用, 也可以减少细胞质中和血清中 AIF 和 caspase-9 的量, 在 6 h 内就有作用。说明灯盏细辛可通过抑制其线粒体途径来抑制凋亡。

总之, 脊髓缺血再灌注损伤与神经细胞凋亡的线粒体途径有关, 受酶依赖途径和非酶依赖途径共同作用, 这种作用可引起全身和局部的变化。灯盏细辛通过减少 AIF 和 caspase-9 的浓度而起到对脊髓的保护作用。

REFERENCES

- 1 Dasmahapatra G, Almenara JA, Grant S. Flavopiridol and histone deacetylase inhibitors promote mitochondrial injury and cell death in human leukemia cells that overexpress Bcl-2. *Mol Pharmacol*. 2006; 69(1): 288-298.
- 2 Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res*. 2006; 70(2): 191-199.
- 3 Ratha J, Majumdar KN, Dhara K, Singh SK, Saha KD, Bhadra R. Attenuated Leishmanial sphingolipid induces apoptosis in A375 human melanoma cell via both caspase-dependent and -independent pathways. *Mol Cell Biochem*. 2007; 304(1-2): 143-154.
- 4 Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Martinuzzi A, Carelli V, Rugolo M. Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and endonuclease G. *Apoptosis*. 2005; 10(5): 997-1007.
- 5 Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993; 87(3): 893-899.
- 6 Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res*. 2008; 79(3): 377-386.
- 7 Zhao LJ, Men XL, Dong SY, Duan GX, Kong XY, Zhang LY. Remote protective effect of skeletal muscle ischemic preconditioning on myocardium during limb ischemia-reperfusion. *Zhongguo Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2008; 37(2): 168-170. Chinese with abstract in English.
- 8 赵利军, 门秀丽, 董淑云, 段国贤, 孔小燕, 张连元. 骨骼肌缺血预适应对肢体缺血再灌注后心肌的远端保护作用. *中国医科大学学报*. 2008; 37(2): 168-170.
- 9 Zivin JA, DeGirolami U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model. *Stroke*. 1980; 11(2): 200-202.
- 10 Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem*. 2000; 275(9): 6067-6070.
- 11 Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ,

- Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000; 102(1): 43-53.
- 11 Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, Hurn PD, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. Poly (ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(48): 18308-18313.
- 12 Varecha M, Amrichová J, Zimmermann M, Ulman V, Lukášová E, Kozubek M. Bioinformatic and image analyses of the cellular localization of the apoptotic proteins endonuclease G, AIF, and AMID during apoptosis in human cells. *Apoptosis*. 2007; 12(7): 1155-1171.
- 13 Park HJ, Choi JY, Seong YM, Han C, Yoon SJ, Kang S, Rhim H. Antigenicity of the region encoded by exon8 of the human serine protease, HtrA2/Omi, is associated with its protein solubility. *Biotechnol Lett*. 2003; 25(19): 1597-1603.
- 14 Tang SS. Breviscapine for the intervention of apoptosis-related protein in rats following cerebral ischemia-reperfusion. *Zhongguo Lin Chuang Kang Fu*. 2005; 9(17): 130-131. Chinese with abstract in English. 唐省三. 灯盏花素对兔脑缺血再灌注后凋亡相关蛋白的干预. *中国临床康复*. 2005; 9(17): 130-131.
- 15 Zhou QD, Yang WQ. Study on protective mechanism of fleabane on PC12 cells impaired by hypoxia-reoxygenation. *Lin Chuang Shen Jing Bing Xue Za Zhi*. 2007; 20(3): 230-231. Chinese with abstract in English. 周启棣, 杨文琼. 灯盏细辛对缺氧复氧损伤的 PC12 细胞保护机制的研究. *临床神经病学杂志*. 2007; 20(3): 230-231.