

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.04.001

• 基础研究 •

抑制或激活泛素-蛋白酶体途径对大鼠肺泡巨噬细胞内质网应激的影响*

范涛 耿庆[△] 张博友 徐瑶 汪巍 潘世泽 胡浩

(武汉大学人民医院 湖北 武汉 430060)

摘要 目的:研究肺泡巨噬细胞(NR8383)不同蛋白酶体激活程度对内质网应激的影响。**方法:**构建 UbG76V-GFP 融合蛋白,将含有 UbG76V-GFP 的质粒导入 NR8383 细胞,筛选出可稳定表达 UbG76V-GFP 的细胞系,通过蛋白酶体抑制剂(MG132)、蛋白酶体激活剂(阿霉素)干预蛋白酶体活性。荧光显微镜观察不同蛋白酶体活性下大鼠肺泡巨噬细胞在缺氧复氧 2 h、4 h、6 h 时蛋白酶体活性,Western blot 及 PCR 技术检测不同蛋白酶体活性下大鼠肺泡巨噬细胞在缺氧复氧 2 h、4 h、6 h 时泛素化蛋白及内质网应激相关基因的表达。**结果:**在缺氧复氧 2 h、4 h、6 h 这 3 个时间点,加入 MG132 组大鼠肺泡巨噬细胞绿色荧光及泛素化蛋白(Ubiquitin)表达明显降低($P < 0.05$),而 PCR 及 Western blot 示内质网应激基因 BIP(免疫球蛋白结合蛋白)、XBP-1(X-盒结合蛋白)和 CHOP(C/EBP 同源蛋白)平均扩增量及蛋白表达量明显增加($P < 0.05$);加入阿霉素组大鼠肺泡巨噬细胞在缺氧复氧 2 h、4 h、6 h 表现出相反的实验结果,绿色荧光及 Ubiquitin 蛋白相对表达均明显增加($P < 0.05$),而 PCR 及 Western blot 示内质网应激基因 BIP、XBP-1 和 CHOP 平均扩增量及蛋白表达量明显增加($P < 0.05$)。**结论:**本实验结果表明活细胞泛素-蛋白酶体活性程度与内质网应激存在紧密联系,外源性增强泛素蛋白酶体活性会抑制内质网应激,外源性减弱泛素蛋白酶体活性会增强内质网应激。

关键词:缺血缺氧;蛋白酶体系统;内质网应激

中图分类号:R-33; Q813.3; Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)04-601-05

The Impact of Inhibited or Activated Protease in Rat Alveolar Macrophage to Endoplasmic Reticulum Stress*

FAN Tao, GENG Qing[△], ZHANG Bo-you, XU Yao, WANG Wei, PAN Shi-ze, HU Hao

(Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: To study the impact of different protease activated degree to endoplasmic reticulum stress in alveolar macrophage (NR8383). **Methods:** After conducting ubiquitin-conjugated variant of the green fluorescent protein (UbG76V-GFP), the plasmid contained UbG76V-GFP was imported into NR8383 cells. The stable expression cell lines were screened to further study. The protease activity was regulated by proteasome inhibitors (MG132), protease activator (adriamycin). Fluorescence microscope was used to analyze the expression of UbG76V-GFP. By Western blot and PCR technology, observing the different protease activated degree and endoplasmic reticulum stress in the time of hypoxia-reoxygenation (H/R) 2 hours, 4 hours, 6 hours after giving the process of proteasome inhibitors (MG132), protease activator (adriamycin). **Results:** MG132 pretreatment led to lower green fluorescent protein expression (UbG76V-GFP) and decreased ubiquitin, but increased protein expression or gene transcription of BIP (binding immunoglobulin protein), XBP-1(X-Box Binding Protein 1) and CHOP (C/EBP homologous protein) by Western blot or PCR method following H/R treatment at 2 h, 4 h and 6 h ($P < 0.05$). On the contrary, green fluorescent protein expression (UbG76V-GFP) and ubiquitin protein were enhanced, and protein expression or gene transcription of BIP, XBP-1 and CHOP were decreased by treated with adriamycin following H/R treatment at 2 h, 4 h and 6 h ($P < 0.05$). **Conclusion:** A close relationship between the degree of ubiquitin proteasome activity and endoplasmic reticulum stress was showed that exogenous enhanced ubiquitin proteasome activity inhibited the endoplasmic reticulum stress, exogenous abate ubiquitin proteasome activity enhanced the endoplasmic reticulum stress.

Key words: Hypoxia-reoxygenation; Ubiquitin-proteasome system; Endoplasmic reticulum stress

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q813.3; Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)04-601-05

前言

蛋白酶体是真核细胞胞内重要的具有多种催化功能的多亚基分子复合物,其主要作用是选择性降解细胞内的各种蛋白

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81170076)

作者简介:范涛(1989-),硕士研究生,主要研究方向:肺缺血再灌注损伤, E-mail: szftao@126.com

[△] 通讯作者:耿庆(1972-),硕士生导师,教授,主要研究方向:肺缺血再灌注损伤, E-mail: szgqing@126.com, 电话:88041911-82240

(收稿日期:2016-07-19 接受日期:2016-08-10)

质^[1-6]。真核细胞内 70%~90% 的蛋白质通过泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome system, UPS)降解,该通路在维持细胞内环境稳态方面起重要作用^[7-9]。内质网应激(ERS)是内质网内氧化应激、缺氧、DNA 损伤、病毒感染等因素引起内质网功能障碍时内质网腔内出现错误折叠、未折叠蛋白聚集和钙离子平衡紊乱等一系列反应^[10,11]。细胞在缺氧条件下表现出一定程度的内质网应激,并激活蛋白酶体降解系统。本实验通过蛋白酶体抑制剂(MG132)、蛋白酶体激活剂(阿霉素)控制蛋白酶体活性,比较缺氧复氧 2 h、4 h、6 h 三个时间点不同蛋白酶体活性时内质网应激基因 BIP、XBP-1、CHOP 的表达情况,进一步阐明蛋白酶体活性程度对内质网应激的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

肺泡巨噬细胞购自上海拜利生物科技有限公司,蛋白酶体抑制剂(MG132)、蛋白酶体激活剂(阿霉素)、10%的胎牛血清的培养基、cDNA 第一链合成试剂盒;合成引物购自金斯瑞生物科技有限公司,DL2000 DNA 分子标记、Ex Taq™ 均购自 TAKARA;Trizol 购自 Invitrogen。微量移液器购自德国 Eppendorf,PCR 仪购自东胜创新生物科技有限公司,紫外分析仪、水平电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司,1 mL RNase 袋装吸头、1 mL 无 RNase 袋装吸头、10 μ L 无 RNase 袋装吸头均购自 EXTRAGENE,电子天平购自北京赛多利斯仪器系统有限公司,Aquapro 超级纯水仪购自艾科浦,微波炉购自 LG,电热恒温水浴锅购自北京市长风仪器仪表有限公司,实时荧光定量 PCR 仪购自 ABI7900/illumina eco,荧光定量 PCR 管购自 EXTRAGENE/illumina,电热恒温鼓风干燥箱购自上海精宏实验设备有限公司。

1.2 质粒转染和细胞的筛选

采用 lipo2000 介导方法将 UbG76V-GFP 质粒转染 NR8383 细胞,按照 lipo2000 说明书进行操作。培养 2 周后,转染细胞系中有抗药克隆细胞长出,对照组细胞全部死亡。进一步将转染细胞稀释,并置于 96 孔板克隆进行培养 5 天,荧光显微镜下观察单克隆细胞孔,绿色荧光的细胞增殖至约 50%融合度时,进行扩大培养,培养后的细胞命名为 NR8383-UbG76V-GFP 转染细胞系。

1.3 激光共聚焦显微镜观察泛素化蛋白形成

实验前一天,按每孔 5×10^5 的细胞数,将生长良好的 NR8383-UbG76V-GFP 细胞接种于六孔板中,培养 24 h 后分为对照组、蛋白酶体抑制剂组、蛋白酶体激活剂组,各种细胞分别在缺氧复氧 0 h、2 h、4 h、6 h 时观察绿色荧光蛋白的表达。根据明暗视野记录各组细胞绿色荧光表达率。

1.4 Western blot 检测 NR8383-UbG76V-GFP 转染细胞系中泛素化蛋白表达

匀浆器匀浆各组细胞,检测蛋白浓度,各组取 50 μ g 总样品蛋白做电泳。根据预染 marker 显示,目的蛋白被充分分离后,即停止电泳。切下目的条带并放入转膜仪内进行转膜。用含 5%脱脂奶粉 TBST 进行封闭,依次按 1:200 稀释后加入一抗、1:50000 稀释后加入二抗,最后显色曝光并用 BandScan 分析胶片灰度值。

1.5 PCR 分析检测 NR8383-UbG76V-GFP 转染细胞系内质网应激基因表达

加入 1 mL Trizol 后匀浆器匀浆个组细胞液,再加入 200 μ L 氯仿,颠倒数次混匀。室温静置 5 分钟后以 12000 rpm 4℃ 条件下离心 15 min,取上层水相并加入 400 μ L 异丙醇,混匀后室温静置 10 min,同样条件再次离心 10 min,取沉淀用 70%无水乙醇漂洗 3 次。测定 RNA 浓度并做逆转录。将 5 μ g RNA、2 μ L Oligo(dT)15(10 μ mol/L)、2 μ L dNTP(2.5 mmol/L)混合,另加少量 ddH₂O,然后短暂离心后冰冻。将 4 μ L 5 $\times$ RT buffer、0.5 μ L HRP (RRI)/RNase Inhibitor、1 μ L MLV 与上离心液混合,42℃ 恒温下反应 60 min,95℃ 恒温下反应 5 min。以 β -actin 为内参,分别加入 β -actin、BIP、XBP-1、CHOP 相应引物及其他相关试剂,按条件进行 PCR 合成反应,将 PCR 结果行统计学分析。

1.6 Western blot 检测 NR8383-UbG76V-GFP 转染细胞系中内质网应激相关基因表达

取各实验组细胞匀浆液,测定蛋白浓度后将样品蛋白上样电泳,对照预染 marker 条带显示结果,判断目的蛋白完全分离后停止电泳。获取目的条带,分别以转膜条件:(XBP-1、CHOP) 200 mA,70 min;(BIP)200 mA,80 min 放入转膜仪内进行转膜。

1.7 统计学方法

本文相关数据采用 GraphPad Prism 5 及 SPSS21 软件分析;自噬及内质网应激相关蛋白表达量用 BandScan 分析三次电泳后胶片灰度值表示,用两独立样本 t 检验方法比较试验组细胞与对照细胞内各指标表达量。

2 结果

2.1 稳定转染细胞的筛选

用剂量-反应分析法对转染细胞进行分析,确定 G418 筛选的适宜浓度(600 ng/ μ L)。G418 筛选后大部分细胞形态发生改变,培养液中部分细胞死亡。培养 2 周后转染组细胞出现散在的细胞克隆,而未经转染的细胞已经全部死亡。选取存活的细胞克隆至 96 孔板进一步培养,3 周后形成细胞集落。在 100 ng/ μ L G418 条件下,转染细胞可反复传代。选取部分可稳定传代的 CCL149 细胞冻存,以备后用。

2.2 激光共聚焦显微镜观察泛素化蛋白形成

生长良好的 NR8383-UbG76V-GFP 细胞,生长 24 h 后将其分为三组,分别为对照组、蛋白酶体抑制剂组、蛋白酶体激活剂组,观察各组细胞分别在缺氧复氧 0 h、2 h、4 h、6 h 时绿色荧光蛋白的表达强度(图 1A),明暗视野对比记录绿色荧光表达率并做统计学分析(图 1B),加入阿霉素组荧光表达率较对照高,加入 MG132 组荧光表达率较对照组低。

2.3 Western blot 检测泛素化蛋白表达结果

将分离提纯电泳(图 2A)后的条带取出,转膜洗涤,用 BandScan 分析胶片灰度值。以 β -actin 作为内参,三次电泳后 BandScan 分析胶片灰度值,加入蛋白酶体抑制剂组 Ubiquitin 表达明显降低($P<0.05$)(图 2B),加入蛋白酶体激活剂组 Ubiquitin 表达明显增强($P<0.05$)(图 2B)。

2.4 PCR 检测内质网应激基因表达结果

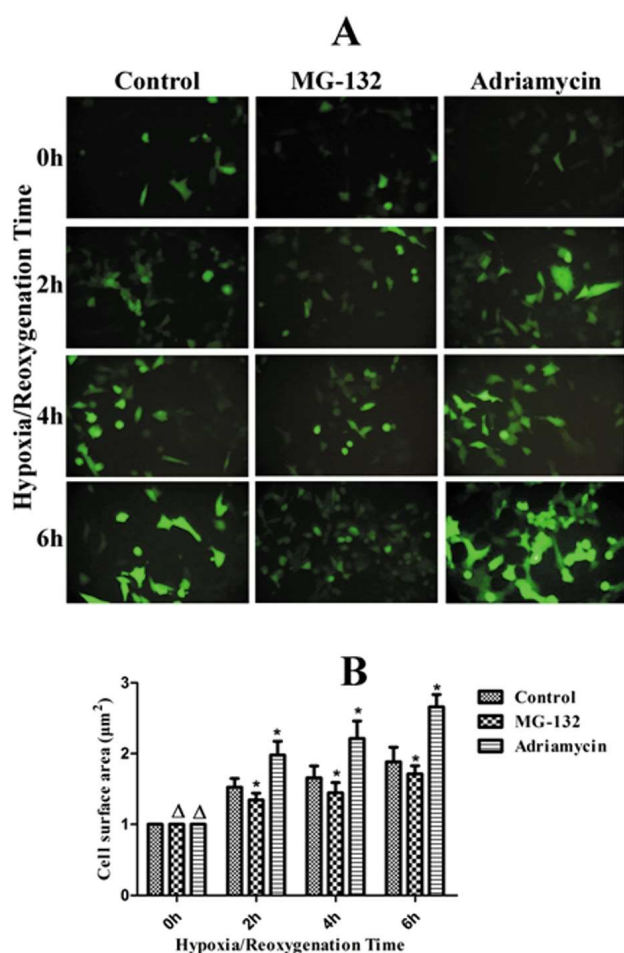


图 1A: 荧光显微镜观察 MG132、阿霉素处理下大鼠肺泡巨噬细胞在缺氧复氧 2 小时、4 小时、6 小时绿色荧光表达率情况。1B: 测量绿色荧光表达面积, 并做统计学分析。

Fig.1A: Representative pictures of green fluorescence expression of NR8383-UbG76V-GFP cells pretreated with MG132 and adriamycin following hypoxia-reoxygenation (H/R) 2 hours, 4 hours, 6 hours. 1B: Morphometric analysis of figure 1A.

Note: "Δ" $P > 0.1$ compared to control; "*" $P < 0.05$ compared to control.

收集各个实验组细胞的 RNA, 分别取等量做逆转录成 cDNA, 按一定的比例加入相应的酶和引物, 以 94°C 4 min; 94°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 25 sec; 30 个循环, 72°C 4 min, 4°C 4 min 为条件进行 PCR。结果提示加入蛋白酶体激活剂(阿霉素)实验组 BIP、XBP-1、CHOP 扩增量在缺血缺氧 2 小时、4 小时、6 小时时比对照组低 ($P < 0.05$) (图 3), 而加入蛋白酶体抑制剂 (MG132) 实验组 BIP、XBP-1、CHOP 扩增量高于对照组 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.5 Western blot 检测内质网应激基因表达结果

将分离提纯电泳 (图 4A) 后的条带取出, 转膜洗涤, 用 BandScan 分析胶片灰度值。以 β -actin 作为内参, 三次电泳后 BandScan 分析胶片灰度值, 结果提示加入蛋白酶体激活剂(阿霉素)实验组 BIP、XBP-1、CHOP 表达量在缺血缺氧 2 小时、4 小时、6 小时时比对照组低 ($P < 0.05$) (图 4), 而加入蛋白酶体抑制剂 (MG132) 实验组 BIP、XBP-1、CHOP 表达量高于对照组 ($P < 0.05$) (图 4)。

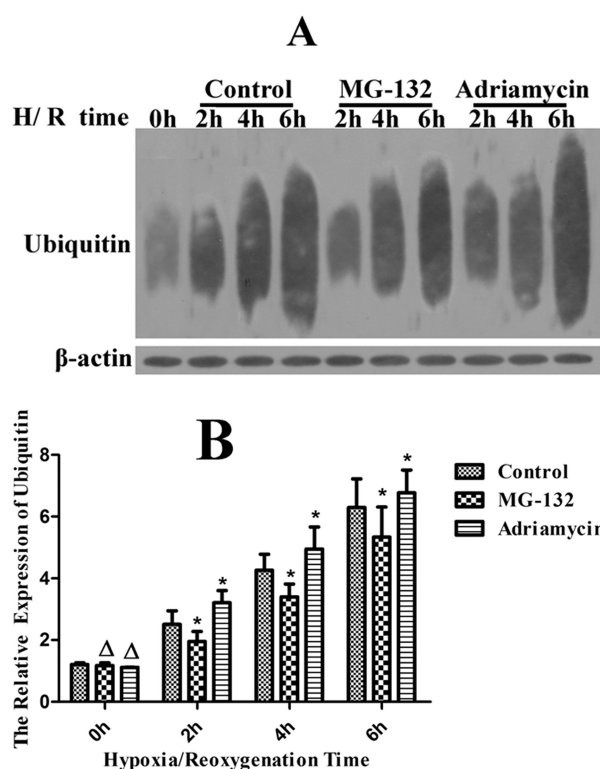


图 2A Western blot 检测 MG132、阿霉素处理下大鼠肺泡巨噬细胞在缺氧复氧 2 小时、4 小时、6 小时 ubiquitin 的表达。1B: BandScan 分析 2A 中灰度值, 并做统计学分析。

Fig.2A: Representative pictures of ubiquitin protein expression of NR8383-UbG76V-GFP cells pretreated with MG132 and adriamycin following hypoxia-reoxygenation (H/R) 2 hours, 4 hours, 6 hours. 2B: The analysis of grey value in fig.2A by BandScan.

Note: "Δ" $P > 0.1$ compared to control; "*" $P < 0.05$ compared to control.

3 讨论

细胞内蛋白质的合成和降解平衡是细胞生存的重要条件, 任何原因打破细胞内这种平衡将引起细胞死亡甚至癌变。目前发现的真核生物细胞内的蛋白质降解通路主要有蛋白酶体途径和溶酶体途径, 前者即泛素-蛋白酶体通路 (UPS), 后者为近年来研究较多的自噬通路。过去人们认为, UPS 需要 ATP 的参与, 泛素的 C-端半胱氨酸在泛素激活酶 E1 的作用下增加一个高能硫酯键, 载体蛋白 E2 与高能硫酯键结合; 泛素在泛素连接酶 E3 的介导下被转运至活化赖氨酸残基的 ϵ -氨基上, 形成多聚泛素链; 26S 蛋白酶体复合物识别并降解泛素分子, 同时释放游离、可重新利用的泛素蛋白^[12-15]。UPS 不仅清除损伤、变性或陈旧蛋白质, 而且还通过其蛋白降解作用参与信号转导、细胞周期、转录调控、抗原提呈等生物学过程的调控, 在炎症、肿瘤等各种病理生理过程中发挥关键作用^[16], 参与维持细胞稳态。细胞缺氧、氧化应激等条件下, 内质网腔内出现未折叠蛋白反应, 诱发内质网应激。

目前研究显示, 细胞在缺氧条件下表现出一定程度的内质网应激, 并激活蛋白酶体降解系统。本实验通过蛋白酶体抑制剂 (MG132)、蛋白酶体激活剂 (阿霉素) 控制蛋白酶体活性, 比较缺氧复氧 2 h、4 h、6 h 三个时间点不同蛋白酶体活性时内质网应激基因 BIP、XBP-1、CHOP 的表达情况, 进一步阐明蛋白

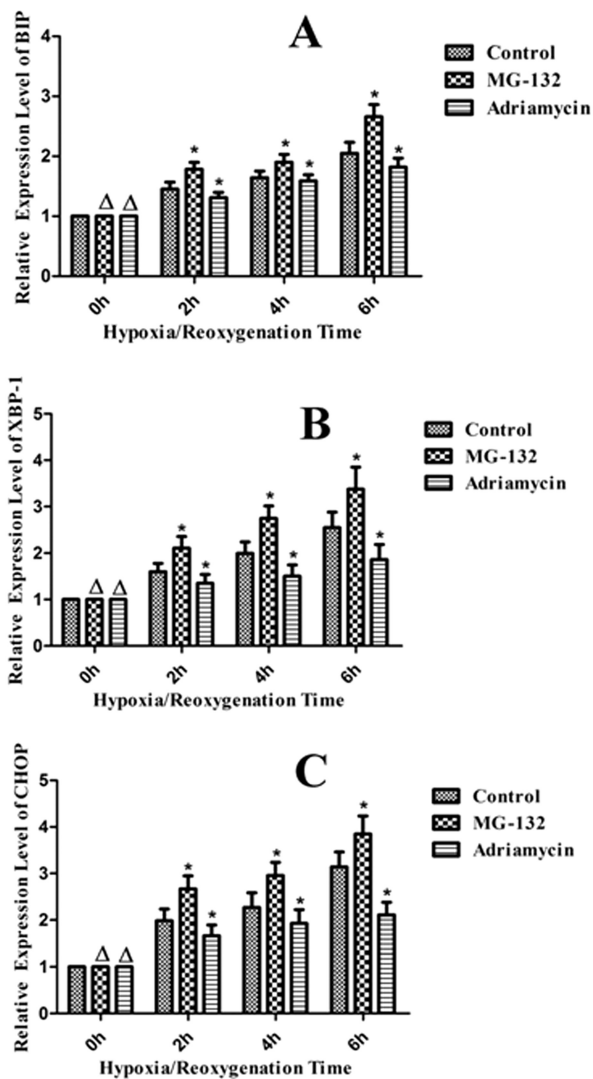


图3 GraphPad Prism 5 分析 MG132、阿霉素处理下大鼠肺泡巨噬细胞在缺氧复氧 2 小时、4 小时、6 小时通过 PCR 扩增 BIP、XBP-1、CHOP 的结果。

Fig.3: The analysis of PCR result of BIP, XBP-1 and CHOP of NR8383-UbG76V-GFP cells pretreated with MG132 and adriamycin following hypoxia-reoxygenation (H/R) 2 hours, 4 hours, 6 hours by BandScan

Note: "Δ" P>0.1 compared to control; "*" P<0.05 compared to control.

酶活性程度对内质网应激的影响。

在非 ERS 条件下,免疫球蛋白结合蛋白(immunoglobulin-binding protein, BIP)能结合内质网应激时三条信号通路的重要分子(PERK, IRE-1, ATF6),使信号转导因子处于失活状态。在 ERS 条件下,核酸内切酶 Ireα 被激活,并从 X 盒结合蛋白 1 (X box-binding protein-1, XBP-1)mRNA 中特异性剪切含 26 个碱基的内含子,改变后的 XBP-1mRNA 产物能促进 ERS 反应元件的 UPR 靶分子 BIP/GRP78 表达,以减轻或终止 ERS 反应,因此 BIP、XBP-1 表达上调被作为 ERS 的标志;CHOP 参与 ERS 诱导的促凋亡过程,内质网应激下,CHOP 表达上调。BIP、XBP-1、CHOP 被认为是 ERS 的标记蛋白^[17-20]。

本实验说明 UPS 与内质网应激密切相关,在缺血缺氧早期,肺泡巨噬细胞蛋白酶系统激活,并表现出一定程度的内

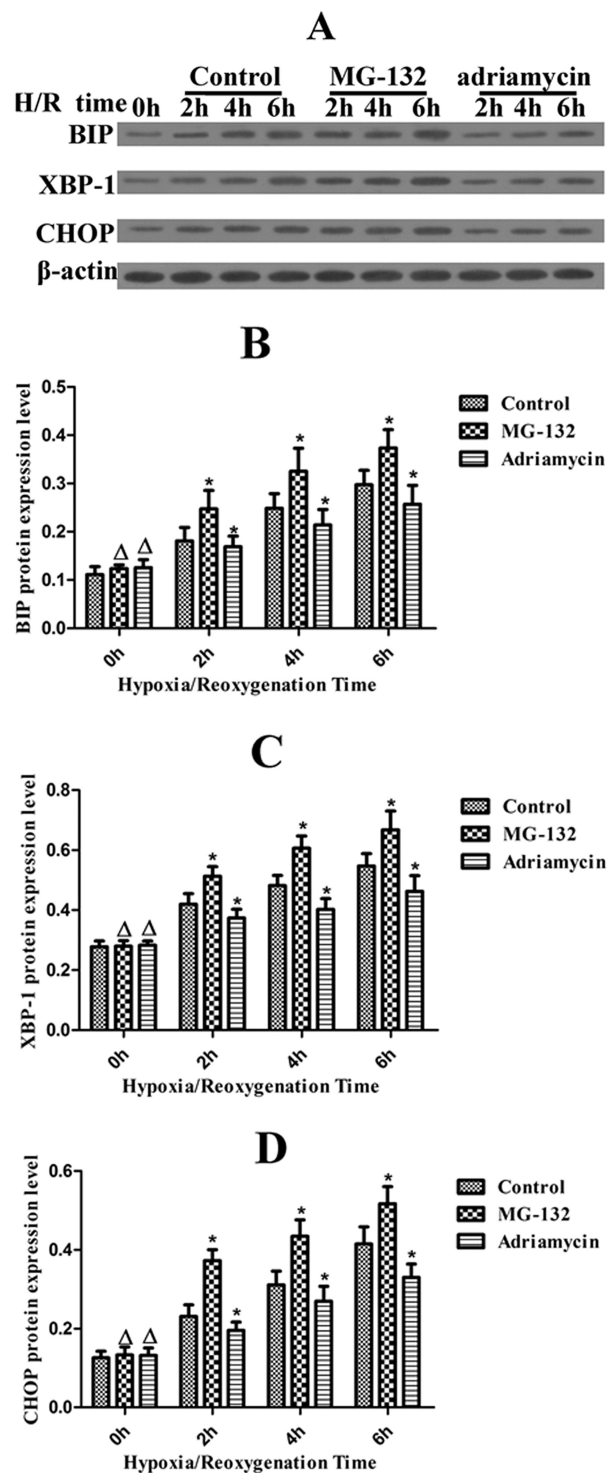


图 4A: Western blot 检测 MG132、阿霉素处理下大鼠肺泡巨噬细胞在缺氧复氧 2 小时、4 小时、6 小时 BIP、XBP-1、CHOP 的表达。4B、4C、4D: BandScan 分析 4A 中灰度值,并做统计学分析。

Fig.4A: Representative pictures of BIP, XBP-1 and CHOP protein expression of NR8383-UbG76V-GFP cells pretreated with MG132 and adriamycin following hypoxia-reoxygenation (H/R) 2 hours, 4 hours, 6 hours by Western blot. 4B, 4C, 4D: The analysis of grey value in fig.4A by BandScan.

Note: "Δ" P>0.1 compared to control; "*" P<0.05 compared to control.

质网应激。我们通过加入蛋白酶体抑制剂(MG132)、蛋白酶体激活剂(阿霉素)控制蛋白酶体活性程度,并检测内质网应激基

因 BIP、XBP-1、CHOP 的表达, 研究泛素蛋白酶体系统对内质网应激的影响。实验组中 MG132 抑制了泛素化蛋白 Ubiquitin 的表达($P<0.05$), 且增强了 BIP、XBP-1 和 CHOP 的表达($P<0.05$); 而阿霉素增强了泛素化蛋白 Ubiquitin 的表达($P<0.05$), 抑制了 BIP、XBP-1 和 CHOP 的表达($P<0.05$); 结果表明泛素蛋白酶体系统与内质网应激不是两个独立的过程, 而是相互影响的, 在缺氧复氧早期外源性增强细胞泛素蛋白酶体活性可以减弱内质网应激, 其机制很可能是通过泛素蛋白酶体途径降解因缺氧而沉积在细胞内的异常蛋白或细胞器等, 从而缓解内质网应激。

近年来, 对细胞内蛋白质降解通路的研究已经取得巨大的成就, 部分研究成果已经应用于临床疾病的防治。本实验虽从细胞水平上研究蛋白酶体活性与内质网应激的关系, 但其作用的分子机制仍尚不清楚, 有待进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Chondrogianni N, Voutetakis K, Kapetanou M, et al. Proteasome activation: An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases [J]. Ageing Res Rev, 2015, 23 (Pt A): 37-55
- [2] Jung T, Grune T. Structure of the proteasome[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012, 109: 1-39
- [3] Stein M L, Groll M. Applied techniques for mining natural proteasome inhibitors[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(1): 26-38
- [4] Da F P, He J, Morris E P. Molecular model of the human 26S proteasome[J]. Mol Cell, 2012, 46(1): 54-66
- [5] Sommer T, Wolf D H. The ubiquitin-proteasome-system [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(1): 1
- [6] Marastoni M, Scotti A, Trapella C, et al. Synthesis and activity of isoxazoline vinyl ester pseudopeptides as proteasome inhibitors [J]. J Pept Sci, 2014, 20(4): 258-265
- [7] Su H, Wang X. The ubiquitin-proteasome system in cardiac proteinopathy: a quality control perspective[J]. Cardiovasc Res, 2010, 85(2): 253-262
- [8] Kraus W E, Muoio D M, Stevens R, et al. Metabolomic Quantitative Trait Loci (mQTL) Mapping Implicates the Ubiquitin Proteasome System in Cardiovascular Disease Pathogenesis [J]. PLoS Genet, 2015, 11(11): e1005553
- [9] Komander D, Rape M. The ubiquitin code [J]. Annu Rev Biochem, 2012, 81: 203-229
- [10] Pluquet O, Pourtier A, Abbadie C. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2015, 308(6): C415-C425
- [11] Diaz-Villanueva J F, Diaz-Molina R, Garcia-Gonzalez V. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16 (8): 17193-17230
- [12] Adams B, Mapanga R F, Essop M F. Partial inhibition of the ubiquitin-proteasome system ameliorates cardiac dysfunction following ischemia-reperfusion in the presence of high glucose [J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14: 94
- [13] Powell S R, Divald A. The ubiquitin-proteasome system in myocardial ischaemia and preconditioning [J]. Cardiovasc Res, 2010, 85(2): 303-311
- [14] Schulman B A, Harper J W. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(5): 319-331
- [15] Jin J, Li X, Gygi S P, et al. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging [J]. Nature, 2007, 447 (7148): 1135-1138
- [16] Spratt D E, Walden H, Shaw G S. RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions [J]. Biochem J, 2014, 458(3): 421-437
- [17] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4): 381-389
- [18] Wang Y, Shen J, Arenzana N, et al. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response [J]. J Biol Chem, 2000, 275(35): 27013-27020
- [19] Osowski C M, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system [J]. Methods Enzymol, 2011, 490: 71-92
- [20] Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, et al. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor[J]. Cell, 2001, 107(7): 881-891

(上接第 776 页)

- Chen Jing-xia, Chen Shuang-bai. Discussion on Efficiency of Cinnamom Twig in Treatise on Febrile Diseases [J]. Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 30(4): 279-280
- [27] Ohno H, Araho D, Uesawa Y, et al. Evaluation of cytotoxicity and tumor-specificity of licorice flavonoids based on chemical structure [J]. Anticancer Res, 2013, 33(8): 3061-3068
 - [28] Fu Y, Chen J, Li YJ, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice [J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 1063-1071
 - [29] 卞尧尧, 张静远, 周春祥, 等. 大黄黄连泻心汤治痞机理新识[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2013, (1): 151-154
 - Bian Yao-yao, Zhang Jing-yuan, Zhou Chun-xiang, et al. New Thoughts on the Mechanism of Dahuang Huanglian Xiexin Decoction in the Syndrome Treatment of Feeling Fullness and Distension in the Upper Abdomen[J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2013, (1): 151-154
 - [30] 梁华龙. 伤寒论评话第 27 章大黄黄连泻心汤治痞证 -- 痞证的辨证论治[J]. 中医学报, 2014, 29(3): 345-348
 - Liang Hua-long. Discussion of Shanghan Lun: Dahuang Huanglian Namely Xiexin, Stagnation of Qi Activity Leading to Pi Syndrome--Diagnosis and Treatment of Pi Syndrome [J]. China Journal of Chinese Medicine, 2014, 29(3): 345-348