

DOI: 10.13432/j.cnki.jgsau.2021.01.005

藏药佐太和甲基汞对神经细胞 Neuro-2a 毒性的差异比较

夏政华^{1,2,3}, 李岑^{1,3}, 毕宏涛^{1,3}, 耿卢婧^{1,2,3}, 杜玉枝^{1,3}, 魏立新^{1,3}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 青海省藏药药理学与安全性评价重点实验室, 青海 西宁 810008)

摘要:【目的】探索藏药佐太和甲基汞对神经细胞 Neuro-2a 凋亡情况的影响差异。【方法】用磺基罗丹明 B 法测定细胞存活率, HE 染色观察细胞形态变化, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 实时荧光定量 PCR 检测凋亡相关基因表达量的变化。【结果】与空白组相比, 随着孵育时间的增加(6、12、24 h), 佐太组(1.83 mg/L, 含汞 1 mg/L)的细胞存活率和细胞形态无显著变化, 孵育 12 h 时细胞凋亡率显著增加, 孵育 24 h 时炎症因子基因 *IL-6* 的表达显著增加, 对 Caspase 家族基因和线粒体相关基因的表达影响无显著影响; 而甲基汞组(1.25 mg/L, 含汞 1 mg/L)的细胞存活率由(97.1±0.082)% 降至(26.3±0.069)%, 细胞形态被破坏程度逐渐加剧, 细胞凋亡率随孵育时间的增加而显著增加, 且均高于佐太组, 炎症因子基因 *IL-6*、*IL-1β*、*TNF-α* 的表达显著增加, 线粒体凋亡相关基因 *Bcl-2* 和 *Bax* 的比值表达降低, *Caspase-3* 和 *Caspase-9* 基因的表达增加。【结论】汞含量相同时藏药佐太对神经细胞 Neuro-2a 的毒性远小于甲基汞。

关键词: 佐太; 甲基汞; 神经细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R29

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1003-4315(2021)01-0029-08



Differences between Tibetan medicine Zuotai and methyl mercury on Neuro-2a cell apoptosis

XIA Zhenghua^{1,2,3}, LI Cen^{1,3}, BI Hongtao^{1,3}, GENG Lujing^{1,2,3}, DU Yuzhi^{1,3}, WEI Lixin^{1,3}

(1. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Pharmacology and Safety Evaluation, Xining 810008, China)

Abstract:【Objective】To explore the differences between Tibetan medicine Zuotai and methyl mercury on the apoptosis of Neuro-2a cells. 【Method】The cell activity was determined by SRB method. The haematoxylin and eosin (HE) was used to observe the morphology of Neuro-2a cells. The apoptosis rate was detected by Amnis Flow Sight System. Real-time PCR was used to examine the expressions of the apoptosis-related genes. 【Result】Compared with the control group, with the increase of incubation time (6, 12,

第一作者: 夏政华, 博士研究生, 研究方向为药理学研究. E-mail: xiazhenghua1991@163.com

通信作者: 魏立新, 博士, 研究员, 从事藏药药理学与毒理学研究. E-mail: lxwei@nwipb.cas.cn

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1708006); 青海省重点实验室专项(2017-ZJ-Y08); 中国科学院国际合作局对外合作重点项目(153631KYB20160004).

收稿日期: 2020-03-20; 修回日期: 2020-05-14

24 h), no significant changes in cell viability and cell morphology were found in Zuotai group (1.83 mg/L, the mercury content was 1 mg/L), the apoptosis rate increased significantly after incubation for 12 h, the expression of inflammatory factor IL-6 was significantly increased in Zuotai group after incubation for 24 h, and there were no significant differences in the expression of Caspase family genes and mitochondria-related genes. The cell viability of MeHgCl group (1.25 mg/L, the mercury content was 1 mg/L) was decreased from $(97.1 \pm 0.082)\%$ to $(26.3 \pm 0.069)\%$, the morphology was gradually seriously damaged, and the apoptosis rate of MeHgCl group was increased with the increase of incubation time, which were higher than that of Zuotai group. The expression of inflammatory cytokine genes IL-6, IL-1 β and TNF- α was significantly increased in MeHgCl group, the ratio of mitochondrial apoptosis-related genes between Bcl-2 and Bax was decreased, and increased the expression of Caspase family genes Caspase-3 and Caspase-9.

【Conclusion】 The toxicity of Tibetan Zuotai to Neuro-2a is much less than that of methyl mercury at same mercury content.

Key words: Zuotai; MeHg; nerve cell; apoptosis

佐太是水银等原料经炮制后制成的矿物药^[1-2], 藏医认为将其加入到药物中具有“减毒增效”的功能^[3], 在治疗中风、神经系统疾病、肝胆胃肠疾病和肿瘤等方面具有独特的功效^[4], 然而, 由于近年来环境中的汞污染受到人们的持续关注, 尤其是甲基汞极易透过血脑屏障对神经系统造成不可逆转损伤^[5], 造成“汞化合物等于神经毒物”的认知, 引起人们对含汞藏药的恐慌, 极大限制了含佐太藏药的临床应用。

尽管现代理化分析表明佐太中约含 54.5% 的 β -HgS, 这些 β -HgS 是微粒直径约为 200~700 nm 的纳米药物^[6-7], 并且通过对含佐太药物使用的临床监测和动物试验, 已初步证实该药对人体肝肾功能是安全的, 肝肾等代谢器官中的汞蓄积对试验动物无明显毒副作用^[8-10]。此外, 临床应用表明, 含佐太的药物能治疗神经系统类疾病, 如阿尔茨海默症^[11], 而且前期研究发现佐太对抑郁模型小鼠的抑郁状态具有良好的改善作用^[12], 这些研究结果均提示佐太的药理活性作用部位可能是神经系统。但是, 目前对佐太和甲基汞的毒性差异研究主要集中在肝肾毒性、药物代谢酶、药物转运体基因的表达等方面^[13-15], 缺乏在神经毒性差异方面的研究, 无法消除人们对含佐太藏药治疗神经系统类疾病的质疑。

为了探究佐太和甲基汞对神经细胞的毒性区别, 进一步提供佐太用药的安全性依据, 本研究选用小鼠神经瘤母细胞 Neuro-2a, 通过测定用药后细胞存活率、细胞形态、细胞凋亡率、凋亡基因的表达等

指标, 以期能系统地评价佐太和甲基汞对神经细胞 Neuro-2a 凋亡的影响差异。

1 仪器与材料

1.1 药物

佐太(西藏藏医院藏药厂); MeHg(美国 Sigma 公司); 小鼠神经瘤母细胞 Neuro-2a(中国科学院细胞库)。

1.2 仪器

奥林巴斯荧光倒置显微镜(奥林巴斯公司); 多功能酶标仪(珀金埃尔默企业管理上海有限公司); FlowSight 流式细胞仪(美国默克公司); ETC811 基因扩增仪(苏州东胜兴业科学仪器有限公司); Vi-iATM7 实时荧光定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技中国有限公司)。

1.3 主要试剂

磺基罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)(美国 Sigma 公司); 苏木素伊红染色试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司); 细胞凋亡检测试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司); 逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒(大连 Takara 公司)。

2 试验方法

2.1 细胞培养

将 Neuro-2a 细胞培养于含 10% 胎牛血清和

1%青霉素-链霉素溶液(100×)的 MEM 培养液中,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,取对数生长期的 Neuro-2a 细胞用 0.25% 胰酶-EDTA 消化传代,胰酶消化 2~3 min 后收集细胞,8 000 个/孔接种于 96 孔板或 25 万/孔接种于 6 孔板,培养 24 h 后进行后续试验步骤。

2.2 分组和给药

试验分组为:空白对照组(Control),佐太组(Zuotai,1.83 mg/L,含汞 1 mg/L),甲基汞组(Me-HgCl,1.25 mg/L,含汞 1 mg/L),给药后培养时间分别为 6、12、24 h,培养结束后进行细胞存活率、细胞形态、凋亡率、凋亡基因表达的检测。试验药物的配制液均为 PBS,佐太组为悬浮液给药^[16]。

2.3 细胞存活率

采用磺基罗丹明 B 法(sulforhodamine B, SRB)法检测细胞存活率,相比于传统的 MTT 法,SRB 法不仅具有操作简便、灵敏的特点,而且测量结果不受时间影响^[17]。按照 2.1 方法在细胞培养结束后,倒掉细胞培养液后每孔加入 100 μL 预冷的 10% TCA,4 ℃ 固定后纯水清洗 5 次,每孔加入 100 μL SRB 作用 20 min,1% 冰乙酸冲洗 5 次后干燥,加入 150 μL/孔 Tris-HCl(10 mmol/L),置于振荡器 20 min,酶标仪 560 nm 测定 OD 值。按照下式

计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{给药组 OD 值} / \text{空白对照组 OD 值}) \times 100\%$$

2.4 细胞形态

按照 2.1 方法在细胞培养结束后,6 孔板中取出细胞爬片,PBS 漂洗 3 次,95% 的乙醇固定 20 min 后苏木素染色 10 min,自来水冲洗 10 min 去除多余染色液,伊红染色 30~120 s,70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、无水乙醇梯度脱水,中性树脂封片后进行细胞形态观察。

2.5 细胞凋亡率

使用 Annexin V-FITC 和 PI 双染法检测药物细胞孵育后的凋亡情况^[18-19]。按照 2.1 方法在细胞培养结束后,PBS 洗涤细胞一次,消化后收集细胞于 1 000 g 离心 5 min,弃上清 PBS 重悬后计数,取 10 万细胞 1 000 g 离心 5 min,弃上清后加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC、0 μL 碘化丙啶(PI)混匀,室温避光孵育 15 min 后流式细胞仪检测凋亡情况。

2.6 凋亡基因、炎症因子基因检测

按照 2.1 方法在细胞培养结束后弃去培养液,1 mL/孔的 TRIzol 提取 RNA,使用逆转录试剂盒合成 cDNA,使用目标引物扩增 cDNA 后检测凋亡基因、炎症因子基因的表达情况。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物列表

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

Gene	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Access
β-actin	TGTCACCAACTGGGACGATA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA	B661302 (Sangon, China)
Caspase-3	TGGTGATGAAGGGGTCATTT	GAGTTTCGGCTTTCCAGTCA	NM_001284409.1
Caspase-7	ATTTTAGGGGAGACCGATGC	CCGTGGAGTAAGCAAAGAGG	NM_007611.2
Caspase-9	CCACTGCCTCATCATCAACA	TCGTTCTTCACCTCCACCAT	NM_001277932.1
Bak	TCTCCTGGGCTTTGGCTA	ATCTGGCGATGTAATGATGC	NM_007523.3
Bax	ATGCGTCCACCAAGAAGC	CAGTTGAAGTTGCCATCAGC	NM_007527.3
Bcl-2	AGCCTGAGAGCAACCCAAT	AGCGACGAGAGAAGTCATCC	NM_009741.5
p53	GCGTAAACGCTTCGAGATGT	AAGCTTGGAAAGGCTCTAGG	NM_001127233.1
TNF-α	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	GTGGGTGAGGAGCACGTAGT	NM_001278601.1
IL-6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	CAGAATTGCCATTGCACAAC	NM_001314054.1
IL-1β	GCTGCTTCCAAACCTTTGAC	AGCTTCTCCACAGCCACAAT	NM_008361.4

2.7 统计分析

使用软件 SPSS 21.0 对数据进行统计分析,数据表示方式为 $\bar{x} \pm s$,数据采用非参数检验 Kruskal-Wallis H test 进行分析后使用 Mann Whitney U test 成对比较,显著水平为 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果与分析

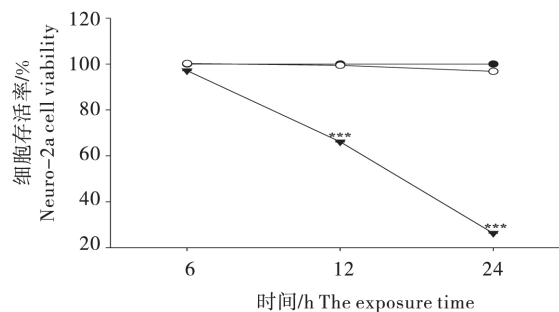
3.1 细胞存活率检测

与空白组相比,随着孵育时间的增加(6、12、

24 h), 佐太组的细胞存活率分别为 $(100 \pm 0.032)\%$ 、 $(99.4 \pm 0.033)\%$ 、 $(96.8 \pm 0.102)\%$, 甲基汞组的细胞存活率分别为 $(97.1 \pm 0.082)\%$ 、 $(66.1 \pm 0.147)\%$ 、 $(26.3 \pm 0.069)\%$ (图 1), 甲基汞对于 Neuro-2a 细胞存活率的影响远大于佐太。

3.2 细胞形态观察

HE 染色表明, 3 个孵育时间下(6、12、24 h), 空白组的 Neuro-2a 细胞呈不规则多边形, 细胞边界清晰, 形态良好(图 2-A、2-D、2-G)。与空白组相比, 佐太组的细胞形态未有明显变化(图 2-B、2-E、2-H), 而甲基汞组的细胞逐渐固缩且出现絮状物, 细胞形态受破坏程度逐渐加剧(图 2-C、2-F、2-I), 佐太和甲基汞对细胞形态的破坏性与细胞存活率的检测结果一致。



与空白组相比, $***P < 0.001$, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$.

Compared with the control group, $***P < 0.001$, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$.

图 1 佐太和甲基汞对 Neuro-2a 细胞存活率的影响 ($n=6$)

Figure 1 Effect of Zuotai and MeHgCl on the cell viability of Neuro-2a ($n=6$)

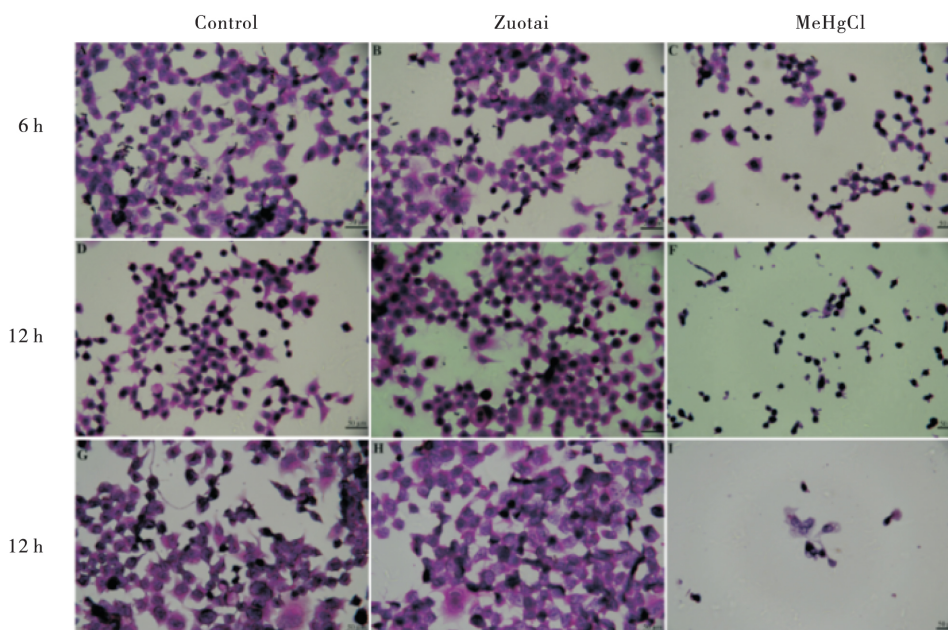


图 2 佐太和甲基汞对 Neuro-2a 细胞形态的影响(HE 染色, 400 \times)

Figure 2 Effect of Zuotai and MeHgCl on Neuro-2a cell morphology (HE staining, 400 \times)

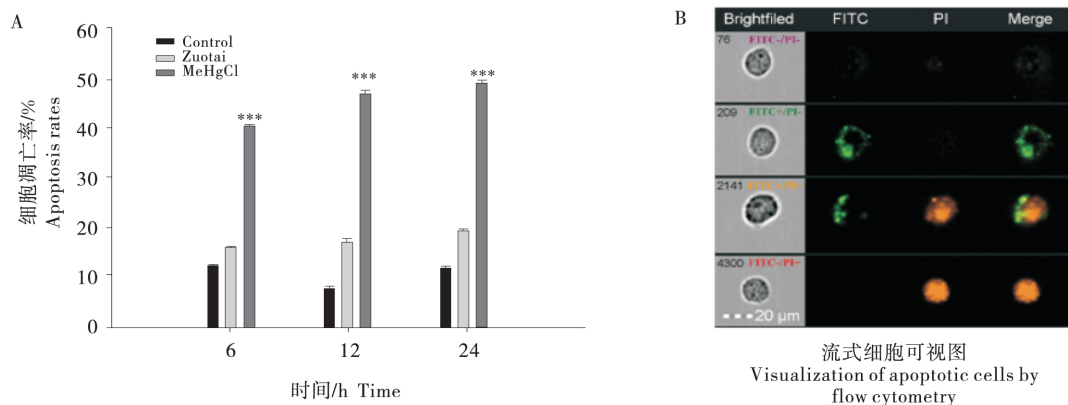
3.3 流式法检测细胞凋亡率

AnnexinV-FITC 和 PI 双染表明, 与空白组相比, 佐太组的细胞凋亡率在 12 h 和 24 h 显著增加, 而甲基汞组的细胞凋亡率随孵育时间的增加均极显著增加, 且均远高于佐太组。孵育 6 h 时甲基汞组的凋亡率比佐太组高 24.5%; 孵育 12 h 时甲基汞组的凋亡率为 46.9%, 佐太组为 17.4%; 孵育 24 h 时甲基汞组的凋亡率是佐太组的 2.52 倍(图 3-A)。结果与细胞存活率、细胞形态结果一致。图 3-B 是细胞仪检测细胞凋亡的可视化图, 图 4 是 Annexin V-

FITC/PI 法检测佐太和甲基汞对 Neuro-2a 细胞凋亡率影响的流式图。

3.4 Caspase 家族基因表达

RT-PCR 检测表明, 孵育时间为 24 h 时, 甲基汞组 *Caspase-3* 基因表达量比空白组和佐太组分别高 21.9%、22.3%, *Caspase-9* 基因表达量比空白组和佐太组分别高 239%、232%(图 5)。Caspase 家族基因表达结果与细胞凋亡率并不完全一致, 可能是由于基因表达与表型的差异性所致, 还需要 Western blot 等方法进一步的检测。



与空白组相比,*** $P < 0.001$,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$.

Compared with the Control group,*** $P < 0.001$,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$.

图 3 佐太和甲基汞对 Neuro-2a 细胞凋亡率的影响 (n=3)

Figure 3 Effect of Zuotai and MeHgCl on the apoptosis rates in Neuro-2a (n=3)

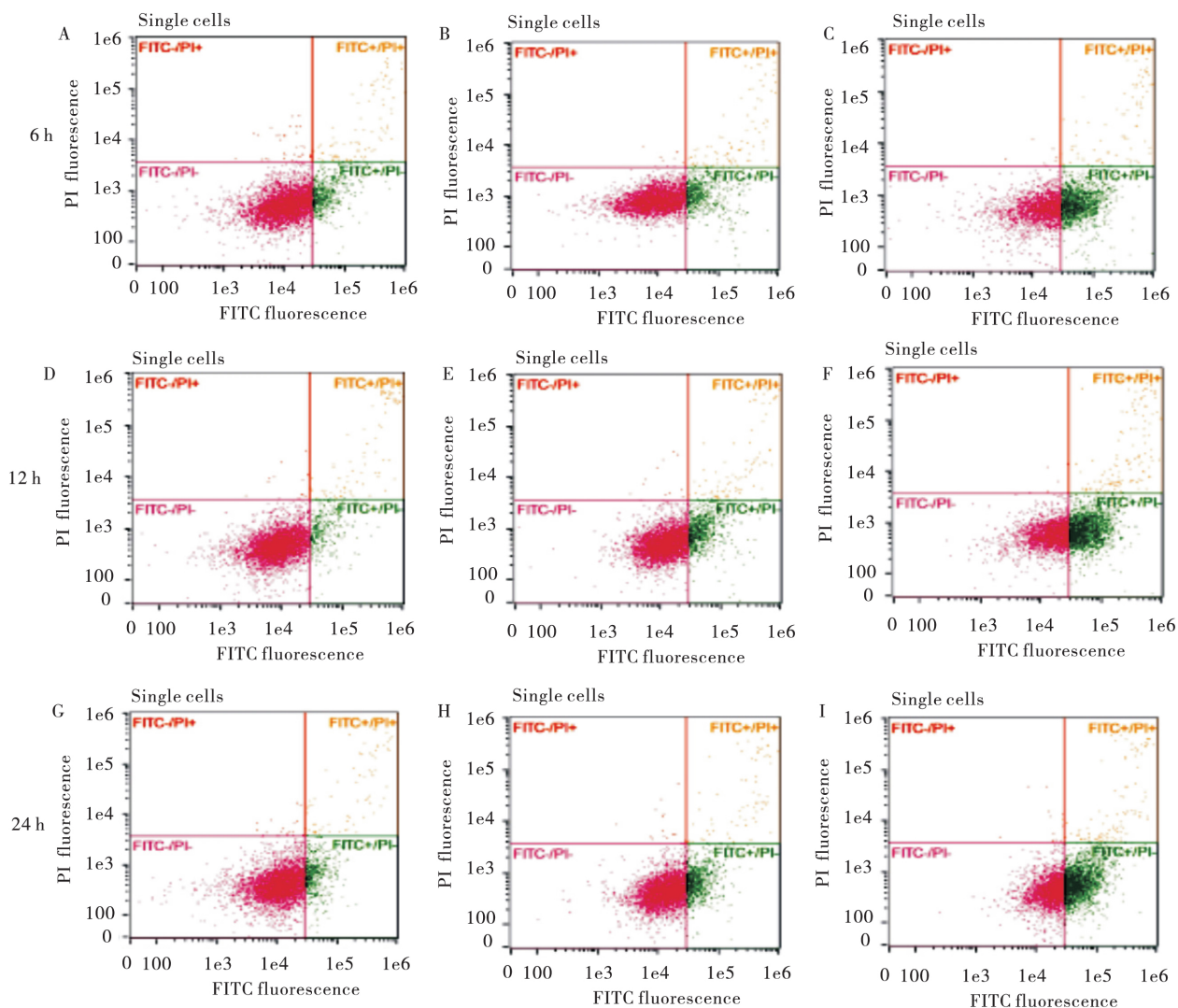
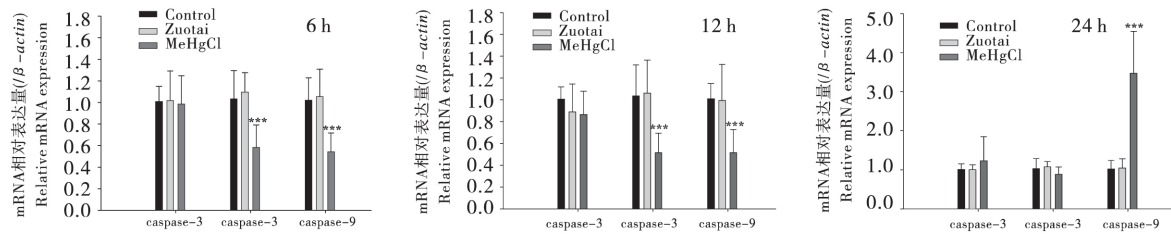


图 4 佐太和甲基汞对 Neuro-2a 细胞凋亡率影响的流式图 (Annexin V-FITC/PI 法)

Figure 4 Flow cytometric analysis of the effects of Zuotai and MeHgCl on neuro-2a cell apoptosis(Annexin V-FITC/PI)



与空白组相比, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Compared with the control group, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

图 5 佐太和甲基汞对 Neuro-2a 细胞 Caspase 家族基因表达的影响 ($n=9$)

Figure 5 Effect of Zuotai and MeHgCl on the expressions of Caspase-related genes in Neuro-2a ($n=9$)

3.5 线粒体相关凋亡基因表达

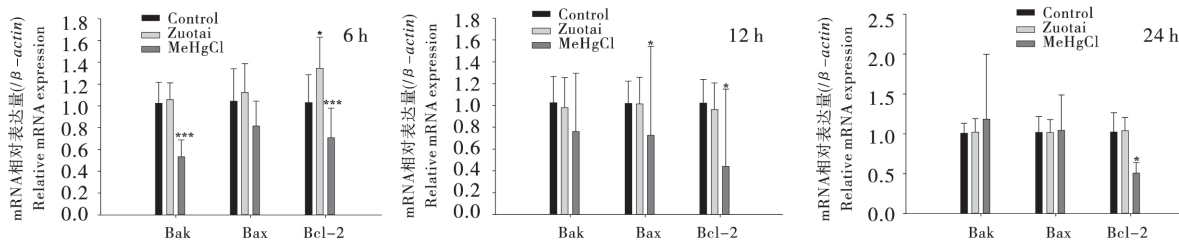
Bcl-2/Bax 的比值分别为 86.9% (6 h)、60.8%

RT-PCR 检测表明,随着孵育时间的增加,佐太

(12 h)、48.5% (24 h),说明细胞趋于凋亡状态

组 Bcl-2/Bax 的比值并未有明显变化,而甲基汞组

(图 6).



与空白组相比, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Compared with the control group, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

图 6 佐太和甲基汞对 Neuro-2a 细胞线粒体凋亡相关基因表达的影响 ($n=9$)

Figure 6 Effect of Zuotai and MeHgCl on the expressions of mitochondrial apoptosis-related genes

in Neuro-2a ($n=9$)

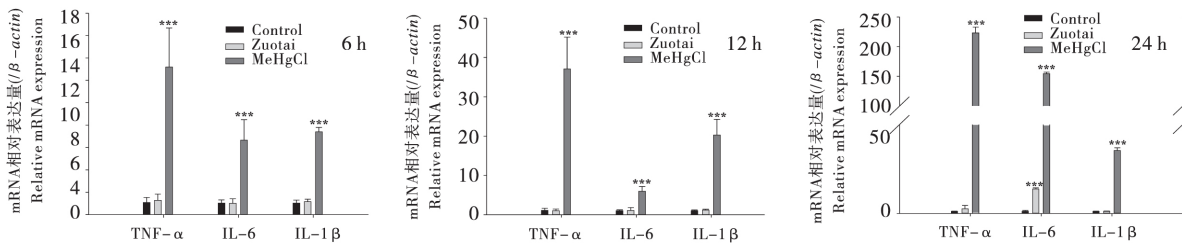
3.6 炎症因子相关基因表达

RT-PCR 检测表明,与空白组相比,佐太组在孵育时间为 6 h 和 12 h 时炎症因子的表达并未有明显变化,但是随着孵育时间增加至 24 h, IL-6 和 TNF- α 分别增加了 11.3 倍和 1.61 倍. 甲基汞组在孵育的 3 个时间点, IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的表达均显著增加,如在 2 h 时 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的表达分别增加了 138 倍、33.5 倍、218 倍. 虽然甲基汞和

佐太均能引起炎症因子基因表达的增加,但是甲基汞的影响远远大于佐太组.

4 讨论

为了探究藏药佐太和甲基汞对神经细胞 Neuro-2a 凋亡情况的影响差异,采用 SRB 法测定细胞存活率、HE 染色观察细胞形态、流式细胞术检测细胞凋亡率,实时荧光定量 PCR 检测 Caspase 家族基



与空白组相比, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Compared with the Control group, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

图 7 佐太和甲基汞对 Neuro-2a 细胞炎症因子基因表达的影响 ($n=9$)

Figure 7 Effect of Zuotai and MeHgCl on the expressions of inflammatory cytokines genes in Neuro-2a ($n=9$)

因、线粒体凋亡相关基因、炎症因子基因的表达,结果发现在含汞量相同时,甲基汞对神经细胞 Neuro-2a 的凋亡影响远大于佐太。

通过测定细胞存活率,同时结合细胞形态学观察和细胞凋亡率的检测,发现随着孵育时间的增加,甲基汞组的细胞存活率逐渐降低,细胞形态受到严重破坏,而佐太组细胞的存活率并无明显变化,形态也未产生明显改变。甲基汞组的细胞凋亡率随孵育时间的增加而显著增加,且均高于佐太组,细胞凋亡率的变化与细胞存活率和细胞形态学的差异性一致。

Caspase 家族在细胞凋亡的分子网络中处于核心地位^[20],是多条凋亡通路的汇聚点,是执行凋亡的最终途径,检测 Caspase 家族基因的表达可以进一步表明细胞的凋亡状态^[21]。RT-PCR 检测结果显示,甲基汞组的 Caspase 家族基因 *Caspase-3* 和 *Caspase-9* 基因表达增加,佐太对 Caspase 家族基因的表达无显著影响。细胞的凋亡通路还会受到多种基因和蛋白的调控,如线粒体凋亡通路,而线粒体凋亡通路中的 Bcl-2 家族的基因表达和调节是影响细胞凋亡的重要因素之一^[22],Bcl-2 家族中的促凋亡成员(如 Bax、Bak)和抑凋亡成员(如 Bcl-2)通过相互作用影响细胞的凋亡状态,其中 Bcl-2 与 Bax 的比值变化是调节细胞凋亡状态的关键因素^[23]。RT-PCR 结果表明甲基汞组的 Bcl-2/Bax 比值随孵育时间的增加而降低,表明细胞趋于凋亡状态,而佐太组的 Bcl-2/Bax 比值并未有明显变化。前期研究发现佐太和甲基汞结合蛋白能够分别影响肥大细胞和神经细胞炎症因子的释放^[24-25],因此检测炎症因子相关基因 *IL-6*、*IL-1 β* 、*TNF- α* 的表达,RT-PCR 结果显示甲基汞组在孵育的 3 个时间点,*IL-6*、*IL-1 β* 、*TNF- α* 的表达均极显著增加,佐太虽然也能引起炎症因子基因表达的增加,但远低于甲基汞。

以上试验结果表明不同孵育时间下,甲基汞均可以通过增加 Caspase 家族基因和炎症因子基因表达,改变线粒体凋亡基因的表达比例来加剧神经细胞 Neuro-2a 的凋亡状态,使得细胞存活率降低,细胞凋亡率增加,改变细胞的正常形态,而等汞含量的佐太对神经细胞 Neuro-2a 的凋亡状态并无显著影响,说明汞含量相同时藏药佐太对神经细胞 Neuro-

2a 的毒性远小于甲基汞。推测造成这种影响差异的决定性因素在于汞形态的不同,传统含汞药物中汞的形态均为硫化汞,例如中药朱砂、印度药 Kajjali,佐太中汞的形态为 β -HgS,与甲基汞相比在溶解度和肠道吸率等方面有显著差异^[26]。已有研究表明含汞药物中汞的形态可能是决定其药效和毒性的关键因素^[27],而佐太中经过特殊炮制后存在的汞可能是其药效学的基础^[28]。此外,由于佐太的颗粒性,在通过体外细胞系培养探索其毒性和药理时,均采用悬浮液给药方式^[16,25],本文中采用的是 PBS 配制佐太悬浮液,未考察汞溶出情况,在后续研究中应结合汞溶出情况进一步深入探索。

通过以上探究证实藏药佐太对神经细胞 Neuro-2a 凋亡的影响远小于甲基汞,提示藏药佐太对神经系统的毒性不能只考虑汞元素而应该充分考虑汞的形态。本研究比较了藏药佐太和甲基汞在神经细胞毒性方面的差异性,为佐太安全性用药和药效学评价提供了新的依据。

参考文献

- [1] 宇妥·元丹贡布,马世林,罗达尚. 四部医典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [2] 看召本. 透视藏医珍宝类药品中的“佐太”[J]. 中国中药杂志,2013,38(10):1621-1623.
- [3] 王章. 再述藏药精华“佐塔”[J]. 健康天地(学术版),2010,4(9):84-85.
- [4] 索郎. 佐塔的炮制[J]. 中国民族医药杂志,2007,13(5):40-40.
- [5] 王瑜,颜崇淮. 甲基汞对脑发育的影响及机制研究进展[J]. 中国儿童保健杂志,2005(4):339-341.
- [6] 夏振江,魏立新,王东平,等. 藏药炮制品“佐太”的质量标准研究[J]. 中药材,2010,33(5):688-690.
- [7] 阎立峰. 藏药“佐太”的微结构与成分分析[J]. 中国藏学,2007(3):150-152.
- [8] 杨红霞,于明杰,魏立新,等. 当佐与安置精华散对人体肝肾功能的影响[J]. 华西药理学杂志,2016,31(5):548-551.
- [9] 赵静,杜玉枝,魏立新,等. 藏药佐太中汞在鼠体内的蓄积[J]. 中成药,2017,39(7):1351-1355.
- [10] 张国英,王东平,李岑,等. 藏药佐太中汞的长期蓄积性实验研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(9):2146-2147.

- [11] 才让吉. 应用藏药七十味珍珠丸改善阿尔茨海默病患者认知功能, 氧化应激状态[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(69): 13613-13613.
- [12] Zhao J, Niu C Y, Wang J, et al. The depressive-like behaviors of chronic unpredictable mild stress-treated mice, ameliorated by Tibetan medicine Zuotai; involvement in the hypothalamic pituitary adrenal (hPa) axis pathway[J]. *Neuropsychiatric Disease & Treatment*, 2018, 14: 129.
- [13] Wu Q, Li W K, Zhou Z P, et al. The Tibetan medicine Zuotai differs from HgCl₂ and MeHg in producing liver injury in mice[J]. *Regulatory Toxicology & Pharmacology*, 2016, 78: 1-7.
- [14] Xu S, Wu Q, Zhang B, et al. Comparison of mercury sulfides with mercury chloride and methylmercury on hepatic P450, phase-2 and transporter gene expression in mice[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology*, 2016, 37: 37-43.
- [15] Zhang B B, Liu Y M, Hu A L, et al. HgS and Zuotai differ from HgCl₂ and methyl mercury in intestinal Hg absorption, transporter expression and gut microbiome in mice[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 379: 114615.
- [16] 耿卢婧, 李岑, 夏政华, 等. 佐太、β-HgS、HgCl₂ 对 PC12 细胞活性和凋亡相关基因表达影响的比较[J]. *中成药*, 2019, 41(3): 543-548.
- [17] 周思朗, 屈艳妮, 张健, 等. SRB 法与 MTT 法细胞计数应用比较[J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(17): 2615-2617.
- [18] 陈朱波, 曹雪涛. 流式细胞术: 原理, 操作及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [19] Mondal S, Giri A, Zhang Y, et al. Caspase mediated beclin-1 dependent autophagy tuning activity and apoptosis promotion by surface modified hausmannite nanoparticle[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2017, 105(5): 1299-1310.
- [20] 王琰, 马兴铭, 苏韞. 黄芪多糖对脑缺血再灌注大鼠脑组织 Caspase-3 表达及形态学的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2015, 50(3): 49-53.
- [21] Choudhary G S, Alharbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. *Methods in Molecular Biology*. 2018, 1219(414): 1.
- [22] Harder J M, Ding Q, Fernandes K A, et al. BCL2L1 (BCL-X) promotes survival of adult and developing retinal ganglion cells[J]. *Molecular & Cellular Neuroscience*, 2012, 51(1/2): 53-59.
- [23] Cheng B, Yang X, Hou Z, et al. D-β-hydroxybutyrate inhibits the apoptosis of PC12 cells induced by 6-OH-DA in relation to up-regulating the ratio of Bcl-2/Bax mRNA[J]. *Autonomic Neuroscience Basic & Clinical*, 2007, 134(1/2): 38-44.
- [24] Tan Q Z, Zhang M, Geng L J, et al. Hormesis of methylmercury-human serum albumin conjugate on N9 microglia via ERK/MAPKs and STAT3 signaling pathways[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 362: 59-66.
- [25] Xia Z, Wei L, Du Y, et al. Effect of the Tibetan Medicine Zuotai on Degranulation and Inflammatory Mediator Release in RBL-2H3 Cells [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2018, 66(8): 818-821.
- [26] Zheng Z Y, Zhang M, Xiao Y C, et al. Effect of Cys, GSH, and pH on Mercury Release from Tibetan Medicine Zuotai, β-HgS, and α-HgS in Artificial Gastrointestinal Juices[J]. *Biological Trace Element Research*, 2018, 184(2): 536-545.
- [27] Wu Q, Lu Y F, Shi J Z, et al. Chemical form of metals in traditional medicines underlines potential toxicity in cell cultures[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 134(3): 839-843.
- [28] Sallon S, Dory Y, Barghouthy Y, et al. Is mercury in Tibetan Medicine toxic Clinical, neurocognitive and biochemical results of an initial cross-sectional study [J]. *Experimental Biology & Medicine*, 2017, 242(3): 316-332.

(责任编辑 胡文忠)