doi:10.11659/jjssx.06E022054

·基础研究·

芍药苷减轻布比卡因诱导背根神经节细胞神经毒性的机制研究

赵红雷[1],赵翠党[2],任 杰[3] (1.河北省邯郸市第一医院东区麻醉科,河北 邯郸 056000;2.河北省邯郸市第三医院麻醉科,河北 邯郸 056000;3.河北省邯郸市第一医院东区综合外科,河北 邯郸 056000)

[摘 要] **目的** 基于细胞凋亡和氧化应激途径探讨芍药苷减轻布比卡因(BV)麻醉诱导背根神经节(DRG)原代神经细胞神经毒性的作用。**方法** 将DRG原代神经细胞随机分成空白对照组、芍药苷组、BV组及芍药苷+BV组。MTT法检测细胞的增殖率;Annexin V-FITC/PI双染色检测细胞凋亡率;Western blot检测凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2和活性caspase-3的表达水平;DCFH-DA法检测细胞内活性氧(ROS)水平;ELISA法检测细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和丙二醛(MDA)水平。**结果** 与空白对照组比较,BV组、芍药苷+BV组中DRG原代神经细胞的增殖率、Bcl-2表达及SOD和GPx含量显著降低,而细胞凋亡率、Bax和活性caspase-3表达、平均荧光强度、MDA含量显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);芍药苷组DRG原代神经细胞的增殖率、凋亡率、Bax、Bcl-2、活性caspase-3表达无显著变化($P>0.05$),但平均荧光强度、MDA含量显著降低,SOD、GPx含量显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与BV组比较,芍药苷组、芍药苷+BV组中DRG原代神经细胞的增殖率、Bcl-2表达、SOD和GPx含量显著增加,细胞凋亡率、Bax和活性caspase-3表达、平均荧光强度、MDA含量显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 芍药苷可通过抑制细胞凋亡和氧化应激减轻BV诱导的DRG原代神经细胞神经毒性作用,有望成为治疗BV诱导的神经毒性的潜在药物。

[关键词] 细胞凋亡;氧化应激;芍药苷;布比卡因;背根神经节;神经毒性

[中图分类号] R614.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-06-19

Mechanism of paeoniflorin reducing the neurotoxicity of dorsal root ganglion cells induced by bupivacaine

ZHAO Hong-lei[1], ZHAO Cui-dang[2], REN Jie[3] (1.Department of Anesthesiology, East District of Handan First Hospital of Hebei Province, Handan Hebei 056000, China; 2.Department of Anesthesiology, Handan Third Hospital of Hebei Province, Handan Hebei 056000, China; 3.Department of General Surgery, East District of Handan First Hospital of Hebei Province, Handan Hebei 056000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of paeoniflorin on alleviating the neurotoxicity of primary dorsal root ganglion (DRG) neurons induced by bupivacaine (BV) anesthesia based on the apoptosis and oxidative stress pathways. **Methods** The primary neurons of DRG were randomly divided into the blank control group, the paeoniflorin group, the BV group and the paeoniflorin+BV group. The cell proliferation rate was detected by MTT assay, the apoptosis rate was detected by Annexin V-FITC/PI double staining, the expression levels of apoptosis related proteins including Bax, Bcl-2 and active caspase-3 were detected by Western blot, the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA assay, and the levels of intracellular superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA) were detected by ELISA. **Results** Compared with the blank control group, the proliferation rates, expression of Bcl-2 and contents of SOD and GPx of DRG primary neurons in the BV group and the paeoniflorin+BV group were significantly reduced, while the apoptosis rates, expression of Bax and active caspase-3, average fluorescence intensities and MDA contents were significantly increased, with statistically significant differences ($P<0.05$); the DRG primary neurons of the paeoniflorin group had no obvious change in the proliferation rate, apoptosis rate, expression of Bax, Bcl-2 or active caspase-3 ($P>0.05$), while with lower average fluorescence intensity and MDA content, and higher contents of SOD and GPx, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with the BV group, the proliferation rates, expression of Bcl-2, contents of SOD and GPx of DRG primary neurons in the paeoniflorin group and the paeoniflorin+BV group were significantly increased, and the apoptosis rates, expression of Bax and active caspase-3, average fluorescence intensities, and MDA contents were significantly reduced, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** Paeoniflorin can alleviate the neurotoxicity of primary DRG neurons induced by BV through inhibiting apoptosis and oxidative stress, which is expected to be a potential drug for the treatment of BV-induced neurotoxicity.

Keywords: apoptosis; oxidative stress; paeoniflorin; bupivacaine; dorsal root ganglion; neurotoxicity

[基金项目] 河北省2020年度医学科学研究课题计划(202001188)

局部麻醉药作为一种可以阻断痛觉感受传导和传递的药物,在减轻术中疼痛及术后疼痛管理中具有重要作用,在临床上广泛应用[1]。然而,研究表明所有的局部麻醉药物都具有潜在的神经毒性[2],即使按照临床推荐的剂量使用,患者也易出现一定程度的神经毒性损伤,尤其对于幼儿,长期多次接触局部麻醉药物会影响大脑的发育和功能[3]。布比卡因(bupivacaine,BV)是目前临床上较常使用的一种局部麻醉药,通过作用于多种神经信号通路减轻疼痛,但同时也可诱导细胞凋亡、增加活性氧(reactive oxygen species,ROS)和自噬作用,从而诱发严重的神经毒性损伤[4]。局部麻醉药在临床应用中具有重要作用,因此,研究有效预防其神经毒性的方法至关重要。芍药苷是中药白芍的主要活性成分之一,具有抗炎、抗氧化等作用,可作为神经损伤模型中潜在的神经保护剂[5-6]。然而,芍药苷在缓解BV引起的神经毒性中的具体机制尚不清楚。因此,本研究从细胞凋亡和氧化应激途径,探讨芍药苷减轻BV麻醉诱导的背根神经节(dorsal root ganglion,DRG)原代神经细胞神经毒性的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

芍药苷(纯度≥99%)、BV(纯度≥99%)购自成都瑞芬思生物科技有限公司。DRG原代神经细胞株购自中国科学院上海典型培养物保藏中心。MTT试剂盒,Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒,DCFH-DA试剂盒,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GPx)检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。PVDF膜、聚丙烯酰胺凝胶均购于上海赛默飞世尔科技公司。兔抗人Bax、兔抗人Bcl-2、兔抗人活性caspase-3、小鼠抗人β-actin、兔抗人LC3 Ⅰ/Ⅱ、P62、Beclin-1一抗和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记山羊抗兔二抗均购于赛信通(上海)生物试剂有限公司。DMSO、PBS、DMEM和胎牛血清均购于上海信裕生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

将芍药苷用0.1%的DMSO溶解,并稀释成5、10、20 μmol/mL。将BV用0.1%的DMSO溶解,并稀释成10 μmol/mL。将DRG原代神经细胞随机分成空白对照组、芍药苷组、BV组及芍药苷+BV组,其中芍药苷组加入5、10、20 μmol/mL的芍药苷,BV组加入10 μmol/mL的BV,芍药苷+BV组中加入5、10、20 μmol/mL的芍药苷和10 μmol/mL的BV,空白对照组不做处理。

1.3 细胞增殖毒性实验

将各组DRG原代神经细胞以5×10^{5}个/孔的密度接种于96孔板,每组均设置3个复孔(包括实验孔、对照孔、空白孔),每孔加入100 μL含10%胎牛血清的DMEM,实验孔均加入10 μL MTT试剂,轻微振动混合后,在37 ℃、5% CO_2、95%湿度的培养箱中培养24 h。多功能酶标仪在450 nm波长处测量吸光度,计算DRG原代神经细胞的增殖率。细胞增殖率=(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度)×100%。实验进行3次,结果取平均值。

1.4 细胞凋亡检测

收集各组DRG原代神经细胞,用2~8 ℃的PBS清洗,并重悬于PBS中。然后严格根据Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书要求,加入10 μL Annexin V-FITC/PI(20 μg/mL),于室温、黑暗条件下染色30 min。然后将过滤后的细胞加入200 μL PBS中,流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.5 凋亡相关蛋白检测

将各组DRG原代神经细胞以5×10^{5}个/孔的密度接种于6孔板。采用蛋白检测试剂盒定量测定上清液中可溶性蛋白的浓度。蛋白样品(30 μg)用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,将蛋白转移至PVDF膜,室温(24~26 ℃)下加入caspase-3、β-actin、Bax、Bcl-2、LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、Beclin-1、P62一抗(稀释比1∶10 000)后放置过夜。第2天室温(24~26 ℃)下加入HRP标记的山羊抗兔二抗(稀释比1∶10 000)处理PVDF膜1 h,然后用ECL试剂孵育PVDF膜,以β-actin为标准参照。

1.6 ROS水平检测

将各组DRG原代神经细胞接种于12孔板中,然后加入1 μmol/L DCFH-DA,每孔加入100 μL含10%胎牛血清的DMEM继续培养30 min,PBS清洗3次,然后倒置荧光显微镜成像,每组随机选取5个视野,采集的图片使用Image J软件计算平均荧光强度,以反映细胞内ROS水平。平均荧光强度=区域荧光强度总和/区域面积×100%。以空白对照组为标准参照。

1.7 SOD、GPx和MDA水平检测

严格按照试剂盒说明书采用ELISA法检测各组DRG原代神经细胞内SOD、GPx和MDA水平,多功能酶标仪在532 nm处检测吸光度。以空白对照组为标准参照。

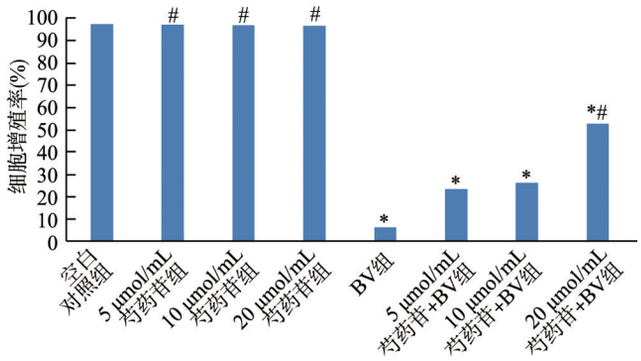
1.8 统计学分析

使用SPSS 22.0软件进行统计学分析，计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用*LSD-t*检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芍药苷减轻BV对DRG原代神经细胞的神经毒性作用

与空白对照组比较，BV组、5 μmol/mL芍药苷+BV组、10 μmol/mL芍药苷+BV组和20 μmol/mL芍药苷+BV组DRG原代神经细胞的增殖率显著降低($P<0.05$)。与BV组比较，5、10、20 μmol/mL芍药苷组和20 μmol/mL芍药苷+BV组(10 μmol/mL)中DRG原代神经细胞的增殖率显著增高($P<0.05$)，见图1。故后续采用20 μmol/mL的芍药苷进行实验。

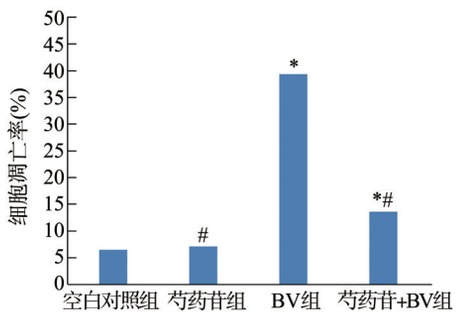


*:与空白对照组比较，$P<0.05$;#:与BV组比较，$P<0.05$

图1 各组DRG原代神经细胞增殖率

2.2 芍药苷抑制BV诱导DRG原代神经细胞凋亡

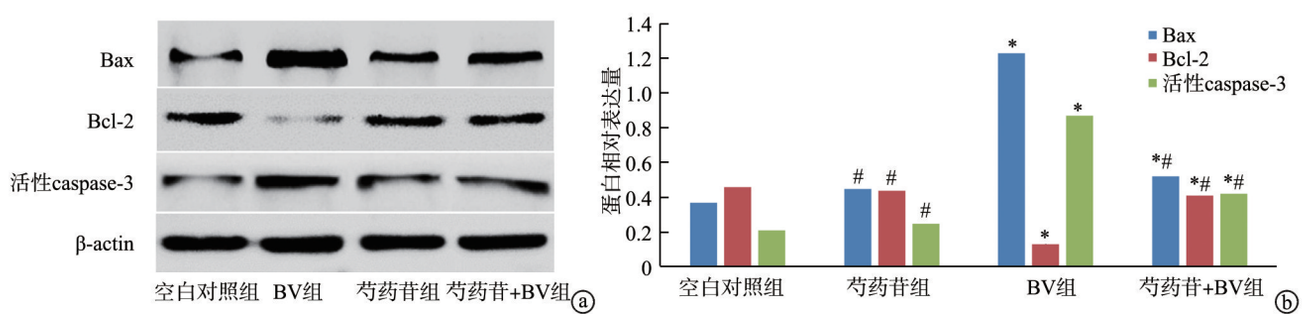
与空白对照组比较，BV组、芍药苷+BV组DRG原代神经细胞凋亡率显著增加($P<0.05$)；与BV组比较，芍药苷组、芍药苷+BV组中DRG原代神经细胞凋亡率显著降低($P<0.05$)，见图2。



*:与空白对照组比较，$P<0.05$;#:与BV组比较，$P<0.05$

图2 各组DRG原代神经细胞凋亡率

与空白对照组比较，BV组、芍药苷+BV组Bax、活性caspase-3的表达显著增加，Bcl-2的表达显著降低，差异均有统计学意义($P<0.05$)。与BV组比较，芍药苷组、芍药苷+BV组中Bax、活性caspase-3的表达显著降低，Bcl-2的表达显著增加，差异均有统计学意义($P<0.05$)，见图3。



a:蛋白灰度图;b:蛋白定量图 *:与空白对照组比较，$P<0.05$;#:与BV组比较，$P<0.05$

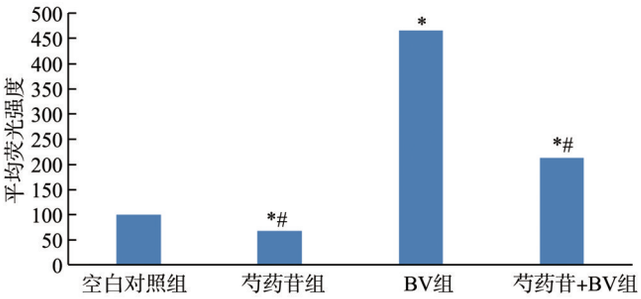
图3 各组凋亡相关蛋白的表达

2.3 芍药苷对DRG原代神经细胞ROS水平的影响

与空白对照组比较，BV组、芍药苷+BV组中DRG原代神经细胞平均荧光强度显著增强($P<0.05$)，而芍药苷组DRG原代神经细胞平均荧光强度显著降低($P<0.05$)。与BV组比较，芍药苷组、芍药苷+BV组中DRG原代神经细胞平均荧光强度显著降低($P<0.05$)，见图4。

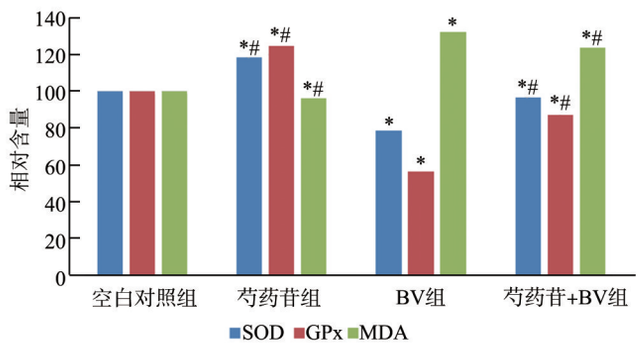
2.4 芍药苷对DRG原代神经细胞SOD、GPx和MDA的影响

与空白对照组比较，芍药苷组中SOD、GPx含量显著升高($P<0.05$)，MDA含量显著降低($P<0.05$)；而BV组、芍药苷+BV组中SOD、GPx含量显著降低($P<0.05$)，MDA含量显著升高($P<0.05$)。与BV组比较，芍药苷组、芍药苷+BV组中SOD、GPx含量显著升高($P<0.05$)，MDA含量显著降低($P<0.05$)，见图5。



*:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与BV组比较,$P<0.05$

图4 各组DRG原代神经细胞的平均荧光强度



*:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与BV组比较,$P<0.05$

图5 各组DRG原代神经细胞的SOD、GPx和MDA含量

3 讨论

局部麻醉药是手术常用药物之一,然而,当局部麻醉药浓度突然升高或持续使用的时间过长时,会诱导人类神经细胞毒性,并对人体神经系统造成不可逆的损害[7-8]。BV是目前临床中常用的局部麻醉药,主要通过诱导细胞凋亡和氧化应激产生严重的神经毒性作用[9],因此,寻求一种可以保护神经损伤的药物十分必要。芍药苷作为中药芍药和牡丹的主要有效成分,属于单萜类的水溶性糖苷,具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗氧化、调节免疫、镇静催眠等多种药理作用,可通过多种机制减少神经元损伤及抑制神经细胞凋亡,广泛用于神经系统疾病的治疗[10-11]。DRG原代神经细胞是一种广泛用于神经毒性、氧化应激和神经退行性疾病相关研究的体外模型[12-13]。本研究基于细胞凋亡和氧化应激途径探讨芍药苷减轻BV麻醉诱导DRG原代神经细胞神经毒性的作用。

张利亮等[14]研究发现,BV可以诱导DRG原代神经细胞凋亡,从而发挥神经毒性作用。本研究显示,芍药苷组中DRG原代神经细胞的增殖率与空白对照组无统计学差异,说明芍药苷对DRG原代神经细胞生长没有影响;而BV组中DRG原代神经细胞的增殖率显著低于空白对照组,说明BV对DRG原代神经细胞具有明显的细胞毒性作用;此外,芍药苷+BV组细胞增殖率显著高于BV组,说明芍药苷可以显著抑制BV诱导的神经细胞毒性。为了进一步探讨芍药苷对BV诱导的DRG原代神经细胞凋亡的作用,本研究进行了双染色流式细胞术,结果显示,BV组中DRG原代神经细胞凋亡率显著高于空白对照组;芍药苷组中DRG原代神经细胞凋亡率与空白对照组无统计学差异,说明芍药苷对DRG原代神经细胞凋亡没有影响;而芍药苷+BV组细胞凋亡率显著低于BV组,说明芍药苷显著抑制了BV诱导的DRG原代神经细胞凋亡,与李亚文等[15]的研究结果基本一致。神经元凋亡是一个非常复杂的级联过程,涉及多个过程,多种凋亡通路在其中起重要作用[16-18]。本研究基于Bcl-2/Bax/活性caspase-3凋亡通路对凋亡相关蛋白进行检测发现,与空白对照组相比,芍药苷组中Bax、Bcl-2、活性caspase-3的表达无显著变化,而BV组中Bax、活性caspase-3的表达升高,Bcl-2的表达显著降低;与BV组比较,芍药苷+BV组中Bax、活性caspase-3的表达显著降低,Bcl-2的表达显著升高,说明BV对DRG原代神经细胞凋亡具有显著诱导作用,而芍药苷抑制了BV对DRG原代神经细胞凋亡的诱导作用。以上结果说明,芍药苷主要通过减轻细胞凋亡发挥对DRG原代神经细胞神经毒性的保护作用。

既往研究显示,BV诱导的细胞凋亡可能涉及多种机制,其中BV可通过细胞内氧化应激反应造成神经细胞的DNA损伤,从而进一步诱导神经细胞凋亡甚至坏死,引起神经功能损伤[19]。而氧化应激主要源于血红蛋白和线粒体破坏产生的超氧阴离子自氧化产生的过量自由基,机体抗氧化系统未能清除时,会导致蛋白分解、脂质过氧化和DNA/RNA损伤,从而引起细胞功能紊乱[20-21]。本研究检测了DRG原代神经细胞内ROS水平,结果显示,BV组DRG原代神经细胞平均荧光强度显著高于空白对照组,说明BV显著诱导DRG原代神经细胞内ROS的堆积;进一步研究发现,芍药苷+BV组细胞平均荧光强度显著低于BV组,说明芍药苷显著抑制了BV诱导的DRG原代神经细胞ROS过量产生。SOD和GPx能够清除细胞内的过氧化物,且ROS和MDA是与脂质氧化密切相关的标志物[22]。本研究检测了各组SOD、GPx和MDA水平,结果显示,与空白对照组比较,BV组中SOD、GPx含量降低,MDA含量显著升高;与BV组相比,芍药苷+BV组中SOD、GPx含量显著升高,MDA含量显著降低。说明BV不仅降低了DRG原代神经细胞清除过氧化物的能力,而且还可引起脂质氧化水平的增加,从而导致氧化应激反应

的发生,而芍药苷能够提高DRG原代神经细胞内过氧化物的清除能力,同时抑制过氧化物的产生。研究表明,机体发生氧化应激反应,产生大量氧化自由基,可诱导细胞内源性凋亡通路的启动,导致线粒体膜电位下降以及通透性增加,而线粒体膜损伤会进一步释放细胞色素C,并与凋亡酶激活因子结合,从而启动Caspases级联反应,进而引起细胞凋亡[23]。以上结果说明,芍药苷通过抑制氧化应激反应减轻BV诱导的DRG原代神经细胞神经毒性损伤。

综上,芍药苷可通过抑制细胞凋亡、氧化损伤减轻BV诱导的DRG原代神经细胞神经毒性作用,芍药苷有望成为治疗BV诱导的神经毒性的潜在药物。

[参考文献]

[1] Barletta M, Reed R. Local anesthetics: pharmacology and special preparations[J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2019, 49(6): 1109-1125. doi: 10.1016/j.cvsm.2019.07.004.

[2] Hopman AJG, Baart JA, Brand HS. Articaine and neurotoxicity: a review[J]. Br Dent J, 2017, 223(7): 501-506. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.782.

[3] Iqbal F, Thompson AJ, Riaz S, et al. Anesthetics: from modes of action to unconsciousness and neurotoxicity[J]. J Neurophysiol, 2019, 122(2): 760-787. doi: 10.1152/jn.00210.2019.

[4] Yu XJ, Zhao W, Li YJ, et al. Neurotoxicity comparison of two types of local anaesthetics: amide-bupivacaine versus ester-procaine[J]. Sci Rep, 2017, 7: 45316. doi: 10.1038/srep45316.

[5] 冯伟科,郭 平. 芍药苷药理作用研究进展[J]. 山东中医杂志, 2019, 38(1): 105-108. doi: 10.16295/j.cnki.0257-358x.2019.01.025.

[6] Zhou D, Zhang S, Hu L, et al. Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase by paeoniflorin attenuates neuroinflammation and ameliorates neuropathic pain[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 83. doi: 10.1186/s12974-019-1476-6.

[7] Guan L, Li T, Jiang J. Bupivacaine-induced neurotoxicity is modulated by epigenetic axis of long noncoding RNA SNHG16 and Hsa-miR-132-3p[J]. Neurotox Res, 2020, 38(1): 175-183. doi: 10.1007/s12640-020-00202-3.

[8] Cherobin ACFP, Tavares GT. Safety of local anesthetics[J]. An Bras Dermatol, 2020, 95(1): 82-90. doi: 10.1016/j.abd.2019.09.025.

[9] Zhao T, Wang Q. Capillarisin protects SH-SY5Y cells against bupivacaine-induced apoptosis via ROS-mediated PI3K/PKB pathway[J]. Life Sci, 2020, 259: 118279. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118279.

[10] 张育贵,张淑娟,边甜甜,等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中草药, 2019, 50(15): 3735-3740. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.033.

[11] 郑婷婷,赵聪选,张 莉. 芍药苷对幼鼠癫痫持续状态后海马神经元的保护作用[J]. 西部医学, 2021, 33(6): 839-845. doi: 10.3969/j.issn.1672-3511.2021.06.012.

[12] 董甜甜,李世刚,唐和斌,等. 小鼠背根神经节神经细胞的原代培养新方法[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2019, 40(2): 302-304. doi: 10.7652/jdyxb201902026.

[13] 王美婷,赵 琪,张艺哲,等. 背根神经节在药物神经毒性体外评价中的应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(4): 305-311. doi: 10.3867/j.issn.1000-3002.2021.04.009.

[14] 张利亮,祁莉娜,姚泽宇. 长链非编码RNA-Paupar在局麻药致神经毒性过程中的作用研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2017, 48(6): 873-876. doi: 10.13464/j.scuxbyxb.2017.06.014.

[15] 李亚文,宋少良,陈香玲,等. TRPM7离子通道激活介导布比卡因诱导神经毒性的机制研究[J]. 重庆医学, 2020, 49(7): 1067-1071. doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2020.07.008.

[16] Dudko HV, Urban VA, Davidovskii AI, et al. Structure-based modeling of turnover of Bcl-2 family proteins bound to voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2): implications for the mechanisms of proapoptotic activation of Bak and Bax in vivo[J]. Comput Biol Chem, 2020, 85: 107203. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2020.107203.

[17] Banjara S, Suraweera CD, Hinds MG, et al. The Bcl-2 family: ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms[J]. Biomolecules, 2020, 10(1): 128. doi: 10.3390/biom10010128.

[18] Rogers C, Erkes DA, Nardone A, et al. Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1689. doi: 10.1038/s41467-019-09397-2.

[19] 骆佳铭,李 机,徐世元,等. 布比卡因介导神经细胞DNA损伤后修复通路的激活[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(9): 1667-1672. doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2020.09.019.

[20] Wang T, Xu L, Gao L, et al. Paeoniflorin attenuates early brain injury through reducing oxidative stress and neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Metab Brain Dis, 2020, 35(6): 959-970. doi: 10.1007/s11011-020-00571-w.

[21] 刘中杰,雷洪伊,许 睿,等. 线粒体钙单向转运体在布比卡因加重糖尿病大鼠脊髓神经损伤中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(1): 93-98. doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2019.01.015.

[22] 雷 昌,黄 丹,向 韵,等. 芍药苷对氯化钴诱导PC12细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中成药, 2020, 42(10): 2605-2610. doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.012.

[23] Alavi A, Mokhtari M, Hajati R, et al. Late-onset mitochondrial membrane protein-associated neurodegeneration with extensive brain iron deposition[J]. Mov Disord Clin Pract, 2019, 7(1): 120-121. doi: 10.1002/mdc3.12868.

(编辑:魏 源)