·基础研究·

虎杖苷改善氧化应激介导的肺泡上皮细胞线粒体损伤的机制

曹媛媛,李桂成,邓加雄,李云峰,段智*
(湖南省郴州市第一人民医院重症医学科,郴州 423000)

【摘 要】 **目的** 探讨虎杖苷对氧化应激介导的肺泡上皮细胞线粒体损伤的影响及其可能机制。**方法** A549细胞分为4组:对照组接受0.1%浓度的DMSO处理60 min;模型组给予同等浓度DMSO预处理30 min后以H_2O_2 250 μmol/L刺激30 min;治疗组接受虎杖苷50 μmol/L预处理30 min后予以H_2O_2 250 μmol/L刺激30 min;抑制剂组接受线粒体自噬抑制剂mdivi-1 10 μmol/L及虎杖苷50 μmol/L预处理30 min后以H_2O_2 250 μmol/L刺激30 min。Western blotting法检测线粒体膜蛋白[线粒体外膜转位酶(TOM20)和线粒体内膜转位酶(TIM23)],及线粒体生成调节因子[线粒体转录因子(mTFA)和过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子1α(PGC-1α)],同时Keima法检测细胞红色/绿色荧光面积以反映线粒体自噬水平。JC-1探针检测线粒体膜电位(MMP)。DCFH-DA荧光探针检测细胞活性氧(ROS)水平。荧光素-荧光素酶法检测细胞ATP水平。细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞活性。应用SPSS 20.0软件进行统计分析。**结果** (1)线粒体自噬水平。与对照组比较,模型组细胞TOM20及TIM23表达显著下降;与模型组比较,治疗组TOM20及TIM23表达显著下降;与治疗组比较,抑制剂组TOM20及TIM23显著增加,差异均有统计学意义($P<0.01$)。但4组细胞mTFA及PGC-1α水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。Keima法显示,4组细胞红色/绿色荧光面积比值变化趋势与TOM20及TIM23水平变化相反。(2)MMP水平。对照组、模型组、治疗组与抑制剂组MMP分别为(100.0±5.9)%、(54.2±4.8)%、(70.8±3.6)%和(56.0±6.1)%。与对照组比较,模型组细胞MMP显著下降,治疗组MMP较模型组显著增加,而抑制剂组MMP较治疗组显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。(3)ROS水平、细胞活性及ATP水平。与对照组比较,模型组细胞ROS水平显著上升,细胞活性、ATP水平显著下降;与模型组比较,治疗组ROS水平显著下降,细胞活性、ATP水平显著增加;与治疗组比较,抑制剂组细胞ROS水平显著上升,细胞活性、ATP水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 虎杖苷可以显著改善氧化应激介导的肺泡上皮细胞线粒体损伤,其机制可能与上调线粒体自噬有关。

【关键词】 线粒体;自噬;虎杖苷;氧化应激;肺泡上皮细胞
【中图分类号】 R563 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2020.02.033

Mechanism of polydatin in promoting oxidative stress-mediated mitochondrial damage in alveolar epithelial cells

CAO Yuan-Yuan, LI Gui-Cheng, DENG Jia-Xiong, LI Yun-Feng, DUAN Zhi*
(Department of Critical Care Medicine, First People's Hospital of Chenzhou in Hunan Province, Chenzhou 423000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of polydatin (PD) on oxidative stress-induced mitochondrial damage in alveolar epithelium and its possible mechanism. **Methods** A549 cells were assigned to four groups: control group in which cells were treated with 0.1% DMSO for 60 min; model group in which cells received the pretreatment of 0.1% DMSO for 30 min and exposure to H_2O_2 (250 μmol/L) for 30 min; treatment group in which cells received the pretreatment of PD (50 μmol/L) for 30 min and exposure to H_2O_2 (250 μmol/L) for 30 min; and inhibitor group in which cells received the pretreatment of PD (50 μmol/L) and mitochondrial division inhibitor 1 (mdivi-1, 10 μmol/L) for 30 min, and exposure to H_2O_2 (250 μmol/L) for 30 min. Western blotting was performed for expression of mitochondrial membrane protein [translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOM20), translocase of inner mitochondrial membrane 23 (TIM23)] and mitogen regulatory factor [mitochondrial transcription factor A (mTFA), and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1α (PGC-1α)]. At the same time, Keima method was used to detect the red/green fluorescent area of cells as a reflection of mitochondrial autophagy. ATP was measured by fluorescein-luciferase kits, mitochondrial membrane potential (MMP) was determined using the fluorescent dye JC-1, reactive oxygen species (ROS) level was evaluated by DCFH-DA,

收稿日期: 2019-06-03; **接受日期**: 2019-07-21
基金项目: 湖南省自然科学基金(2018JJ6004, 2018JJ3015, 2019JJ40010);郴州市科技计划(CZ2014018)
通信作者: 段智, E-mail: 442673642@qq.com

and cell viability was determined by cell count kit-8 (CCK-8). SPSS statistics 20.0 was used for analysis. **Results** (1) Mitochondrial autophagy level. The expression of TOM20 and TIM23 was significantly lower in the model group than in the control group, in the treatment group than in model group, but significantly higher in the inhibitor group than in the treatment group (<0.01). However, there was no significant differences in mTFA and PGC-1 α between the four groups (P>0.05). Keima method showed that the change of red/green fluorescent area ratio in the four groups trended conversely with the changes of expression level of TOM20 and TIM23. (2) MMP. MMP was (100.0±5.9)% in the control group, (54.2±4.8)% in the model group, (70.8±3.6)% in the treatment group, and (56.0±6.1)% in the inhibitor group. Compared with control group, MMP in the model group decreased significantly, MMP in the treatment group increased significantly, while MMP in the inhibitor group decreased significantly (P<0.01). (3) ROS, cell activity and ATP level. Compared with control group, ROS in the model group increased significantly, while cell activity and ATP decreased significantly. Compared with the model group, ROS in the treatment group decreased significantly, while cell activity and ATP increased significantly. Compared with the treatment group, ROS level in the inhibitor group increased significantly, while cell activity and ATP decreased significantly (P<0.01). **Conclusion** PD can significantly improve oxidative stress-induced mitochondrial damage in alveolar epithelium, and its mechanism may be related to the up-regulation of mitochondrial autophagy.

【Key words】 mitochondria; autophagy; polydatin; oxidative stress; alveolar epithelial cell

This work was supported by Natural Science Foundation of Hunan Province (2018JJ6004, 2018JJ3015, 2019JJ40010) *and Science and Technology Projects of Chenzhou* (CZ2014018).

Corresponding author: *DUAN Zhi*, *E-mail*: *442673642@qq.com*

急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是脓毒症的常见并发症,但因其缺乏有效的治疗手段,在临床上具有较高的病死率。研究证实,肺泡上皮线粒体损伤是 ALI 的重要发病机制,因此维护线粒体稳定可以显著改善 ALI[1]。线粒体自噬是指细胞通过选择性自噬清除受损或功能紊乱的线粒体以维持正常线粒体质量或功能[2,3]的现象,该作用已在心血管、神经系统等方面的疾病中被证实[4-6],但在肺泡上皮细胞损伤中的作用研究较为鲜见。在本研究中我们通过 H_2O_2 的氧化应激作用介导肺泡上皮损伤细胞模型,探讨虎杖苷是否通过上调线粒体自噬减轻肺泡上皮线粒体损伤,从而阐述线粒体自噬在 ALI 发病中的重要作用,为临床治疗 ALI 寻找可能靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

荧光素-荧光素酶试剂盒购于美国 Promega 公司;膜电位 JC-1 探针及钙黄绿素-氯化钴购自美国 Sigma 公司;DCFH-DA 活性氧(reactive oxygen species,ROS)荧光探针购自上海碧云天公司;细胞计数试剂盒(cell count kit-8, CCK-8)购自上海 Dojindo 公司;线粒体膜蛋白[线粒体外膜转位酶(translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOM20)和线粒体内膜转位酶(translocase of inner mitochondrial membrane 23,TIM23)],及线粒体生成调节因子[线粒体转录因子(mitochondrial transcription factor A,mTFA)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α(peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1α, PGC-1α)]单克隆抗体、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)及辣根过氧化物酶标记的二抗购自武汉 ABclonal 公司;mt-Keima-COX8 慢病毒滴度液购于南京 PPL 公司;A549 细胞购自广州赛库生物公司。

1.2 分组及处理

将 A549 细胞分为 4 组(n=6):对照组细胞仅接受 0.1%浓度的 DMSO 处理 60 min;模型组细胞同等浓度 DMSO 预处理 30 min 后予以 H_2O_2 250 μmol/L 刺激 30 min[7];治疗组细胞接受虎杖苷 50 μmol/L[3] 预处理 30 min 后予以 H_2O_2 250 μmol/L 刺激 30 min;抑制剂组细胞接受线粒体自噬抑制剂 mdivi-1 10 μmol/L[3] 及虎杖苷 50 μmol/L 预处理 30 min 后予以 H_2O_2 250 μmol/L 刺激 30 min。

1.3 线粒体自噬水平检测

(1)通过 Western blotting 检测 TOM20(1∶2000)、TIM23(1∶2000)、mTFA(1∶1000)、PGC-1α(1∶1000)表达水平。细胞充分裂解,凝胶电泳后转膜,免疫化学发光法曝光并进行灰度值分析。以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量。(2)参照既往研究[3],采用 Keima 法检测线粒体自噬,按照说明书操作将 mt-Keima-COX8 慢病毒滴度液与细胞共同孵育 48 h,并以 Puromycin 药物筛选后稳定传代。4 组细胞经不同处理后,置于共聚焦显微镜下观察。绿色荧光代表未发生自噬的线粒体,红色荧光代表发生自噬的线粒体,以红色/绿色荧光面积作为线粒体自噬水平。

1.4 线粒体膜电位测定

4组细胞经不同处理后经PBS洗后重悬，与JC-1（工作浓度为5 μmol/L）在37℃孵育15 min后共聚焦显微镜下观察并记录数据。以红色/绿色荧光的比值来衡量线粒体去极化的程度，并以对照组进行标准化。比值越高表明线粒体去极化降低，线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，MMP）增加，反之则去极化增加，MMP下降。

1.5 ROS检测

采用DCFH-DA ROS荧光探针检测细胞ROS水平。4组细胞经不同处理后与5 μmol/L浓度的DCFH-DA工作液在37℃下共孵育10 min，酶标仪检测荧光强度，并以对照组进行标准化，同时在荧光显微镜下观察细胞荧光。

1.6 细胞ATP含量测定

采用荧光素-荧光素酶法检测线粒体ATP水平。将细胞悬液加入96孔白板，每孔100 μl（约2×10^4个细胞）。于室温下加入等体积CellTiter-Glo检测试剂，混匀细胞，并孵育10 min，用酶标仪检测各组*A*值，并以对照组进行标准化。

1.7 细胞活性检测

在96孔板中接种200 ul的细胞悬液，根据实验分组经过不同条件处理后弃上清，加入10 μl CCK-8溶液及培养液，继续孵育2 h，酶标仪上检测*A*值，并以对照组进行标准化。

1.8 统计学处理

应用SPSS 20.0软件进行统计分析。数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较使用单因素方差分析和LSD多重比较法。$P<0.05$为差异有统计学意义。

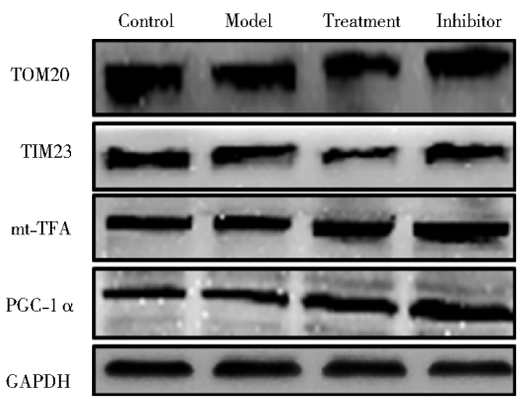
2 结 果

2.1 4组细胞线粒体自噬水平比较

与对照组比较，模型组细胞TOM20及TIM23表达显著下降，提示发生线粒体自噬；与模型组比较，治疗组TOM20及TIM23表达显著下降，提示线粒体自噬增强；与治疗组比较，抑制剂组TOM20及TIM23表达显著增加，提示mdivi-1抑制了虎杖苷上调的线粒体自噬，差异均有统计学意义（$P<0.01$）。为排除线粒体生成下降对线粒体自噬的影响，我们检测了用以反映线粒体生成的mTFA及PGC-1α。结果显示，4组细胞mTFA及PGC-1α水平比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。通过Keima法进一步检测并验证线粒体自噬水平，结果显示，与对照组比较，模型组细胞红色/绿色荧光面积比值显著增加，提示发生线粒体自噬；与模型组比较，治疗组细胞红色/绿色荧光面积比值显著增加，提示线粒体自噬增强；与治疗组比较，抑制剂组细胞红色/绿色荧光面积比值显著减小，提示线粒体自噬被抑制（图1，表1）。

2.2 4组细胞MMP比较

对照组、模型组、治疗组与抑制剂组MMP分别为（100.0±5.9）%、（54.2±4.8）%、（70.8±3.6）%和（56.0±6.1）%。与对照组比较，模型组细胞MMP显著下降，治疗组MMP较模型组显著增加，而抑制剂组MMP较治疗组显著下降，差异有统计学意义（$P<0.01$；图2）。



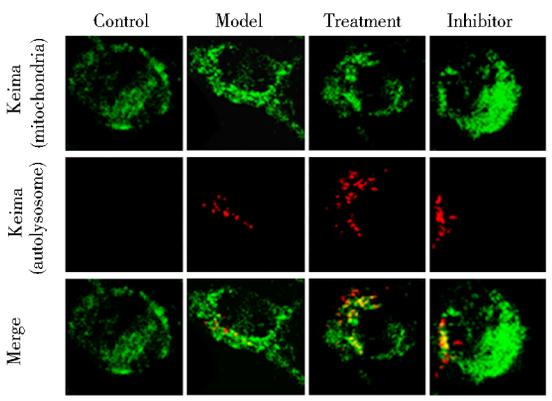


图1 4组细胞线粒体自噬结果

Figure 1 Results of mitophagy in 4 groups

A: expression of mitophagy-related proteins by Western blotting; B: mitophagy by Keima (×800). TOM20: translocase of outer mitochondrial membrane 20; TIM23: translocase of inner mitochondrial membrane 23; mt-TFA: mitochondrial transcription factor A; PGC-1α: peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1α; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

表 1 4 组细胞线粒体自噬相关蛋白比较

Table 1 Comparison of mitochondrial autophagy related proteins among four groups ($n=6$, %, $\bar{x}\pm s$)

Group	TOM20	TIM23	mTFA	PGC-1α	Keima red/green
Control	100.0±7.8	100.0±9.5	100.0±7.5	100.0±8.2	2.3±2.1
Model	84.7±5.0*	85.0±6.2*	98.0±8.5	101.0±10.1	10.7±4.0*
Treatment	66.6±5.9*#	61.3±7.1*#	133.0±12.8	147.0±12.7	29.0±4.0*#
Inhibitor	86.3±5.9△	84.6±7.6△	134.0±17.1	148.0±15.0	12.7±3.5△

TOM20: translocase of outer mitochondrial membrane 20; TIM23: translocase of inner mitochondrial membrane 23; mt-TFA: mitochondrial transcription factor A; PGC-1α: peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1α; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Compared with control group, * $P<0.05$; compared with model group, # $P<0.05$; compared with treatment group, △ $P<0.05$.

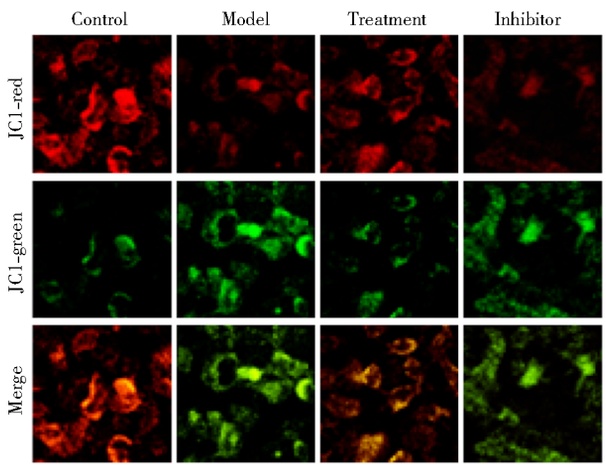


图 2 JC-1 法检测 4 组细胞 MMP 结果

Figure 2 Detection of MMP by JC-1 (×400)

MMP: mitochondrial membrane potential; JC-1: 5,5′,6,6′-Tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide.

2.3 4 组细胞 ROS 水平比较

对组组、模型组、治疗组与抑制剂组细胞 ROS 水平分别为(100.0±5.2)%、(213.0±20.1)%、(173.0±15.9)%和(201.5±17.5)%。与对照组比较,模型组细胞 ROS 水平显著上升;与模型组比较,治疗组 ROS 水平显著下降;与治疗组比较,抑制剂组细胞 ROS 水平显著上升,差异有统计学意义($P<0.01$;图 3)。

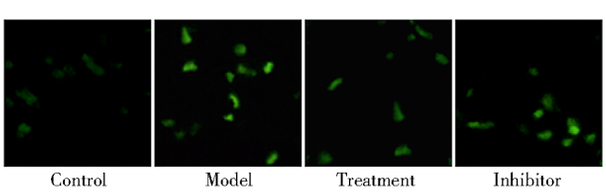


图 3 DCFH-DA 检测细胞 ROS 水平结果

Figure 3 Detection of intracellular ROS level by DCFH-DA(×100)

ROS: reactive oxygen species; DCFH-DA: 2,7-Dichlorodi-hydrofluorescein diacetate.

2.4 4 组细胞 ATP 和活性水平比较

对照组、模型组、治疗组及抑制剂组 ATP 分别为(100.0±4.3)%、(70.8±6.3)%、(82.7±4.2)%和(71.3±5.2)%;细胞活性依次是(100.0±3.8)%、(73.2±4.4)%、(82.7±6.3)%和(74.1±4.8)%。与对照组比较,模型组细胞活性、ATP 水平显著下降;与模型组比较,治疗组细胞活性、ATP 水平显著增加;与治疗组比较,抑制剂组细胞活性、ATP 水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨 论

线粒体是普遍存在于真核生物的细胞器,有细胞的"动力工厂"之称[8],在氧化应激、细胞信息传递、代谢调节及内源性凋亡途径的启动调节中发挥重要作用[1]。研究证实,肺泡上皮细胞线粒体损伤是 ALI 的重要发病机制,线粒体可以通过调节细胞凋亡及炎症反应参与 ALI[1,3]。因此,维持线粒体功能正常是可能治疗 ALI 的方法之一[9,10]。线粒体自噬指细胞线粒体发生去极化损伤,损伤线粒体被特异性包裹进自噬体中,并与溶酶体融合,从而完成损伤线粒体的降解,维持细胞内环境的稳定[3]。研究表明上调线粒体自噬可以减轻百草枯介导的肺泡上皮细胞凋亡[11]。而抑制丝裂原活化蛋白激酶 3 表达可以减轻 ALI,这可能与其上调线粒体自噬有关[12]。我们以往证实,虎杖苷可以通过抑制细胞凋亡及炎症反应减轻脂多糖介导的 ALI,但机制尚未明确[2]。基于以上研究,本研究假设并探讨了虎杖苷是通过上调线粒体自噬减轻氧化应激介导的肺泡上皮细胞线粒体损伤。

本研究发现,虎杖苷可以显著抑制氧化应激介导的细胞 ROS 水平上升及细胞活力下降。另外,TOM20 及 TIM23 是线粒体膜蛋白,只存在于线粒体中,当线粒体自噬增强时,其细胞内表达水平下降[3]。为检测虎杖苷对线粒体自噬的影响,我们检测了线粒体质量蛋白 TOM20 及 TIM23,结果显示虎

杖苷可以下调 TOM20 及 TIM23 表达,即增强了线粒体自噬水平。进一步研究发现,被广泛应用为线粒体自噬抑制剂的 mdivi-1[3] 可以显著抑制虎杖苷诱导的自噬保护作用。这些结果表明虎杖苷可能通过上调线粒体自噬水平发挥保护作用。mTFA 是线粒体转录因子,在线粒体 DNA 的复制和线粒体生成中发挥关键的调节作用;PGC-1α 是共激活转录因子成员,可调控线粒体生成相关基因的转录和表达,促进线粒体生成;在以往研究中通过检测 mTFA 及 PGC-1α 表达可以反映线粒体生成[3]。在本研究中我们发现虎杖苷不会引起 mTFA 及 PGC-1α 表达的变化,因而排除了因线粒体生成下降造成 TOM20 及 TIM23 表达下降的可能。另外我们还通过 Keima 法检测线粒体自噬变化。Keima 蛋白定位于线粒体基质,当线粒体自噬体与酸性溶酶体融合后 Keima 蛋白的荧光信号由绿色转为红色,因此通过荧光信号的转换可定量反映线粒体自噬的水平。结果显示虎杖苷可以增强氧化应激介导的线粒体自噬,而 mdivi-1 可以抑制虎杖苷对线粒体自噬的增强作用。

线粒体自噬通过清除损伤的线粒体维持线粒体正常功能,我们进一步检测了虎杖苷对线粒体功能的影响。线粒体功能不全通常是由于线粒体通透转变孔开放引起[13]。正常线粒体处于电压内负外正的极化状态,这种跨膜电位是线粒体合成 ATP 必备的电压驱动力。我们结果显示虎杖苷显著抑制了氧化应激介导的 MMP 下降,而这种保护作用可以被 mdivi-1 显著抑制。另外,线粒体是 ATP 生成的主要细胞器,我们还检测了细胞 ATP 水平以反映线粒体功能的变化。结果显示虎杖苷可以显著抑制氧化应激介导的 ATP 水平下降,同样,这种保护作用被 mdivi-1 抑制。

总之,我们的研究认为虎杖苷可能通过上调线粒体自噬水平以减轻氧化应激介导的线粒体损伤,而抑制线粒体自噬可以显著降低虎杖苷的保护作用。

【参考文献】

[1] Zhang Z, Wang X, Ma C, *et al*. Genipin protects rats against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by reinforcing autophagy[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72: 21-30. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.03.052.

[2] Li T, Liu Y, Li G, *et al*. Polydatin attenuates ipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(12): 8401-8410.

[3] Li T, Liu Y, Xu W, *et al*. Polydatin mediates Parkin-dependent mitophagy and protects against mitochondria-dependent apoptosis in acute respiratory distress syndrome [J]. Lab Invest, 2019, 99(6): 819-829. DOI: 10.1038/s41374-019-0191-3.

[4] 王培, 付宇. 线粒体自噬与疾病[J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(7): 853-857. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2018.07.027.
Wang P, Fu Y. Mitophagy and disease[J]. J Hebei Med Univ, 2018, 39(7): 853-857. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2018.07.027.

[5] 王敏, 余薇, 查文良. 自噬和线粒体自噬在糖尿病心肌病中的作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(10): 1337-1340. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2018.10.002.
Wang M, Yu W, Zha WL. Research progress of autophagy and mitochondrial autophagy in diabetic cardiomyopathy [J]. Chin Pharmacol Bull, 2018, 34(10): 1337-1340. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2018.10.002.

[6] Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(9): 1013-1022. DOI: 10.1038/s41556-018-0176-2.

[7] Zeng Z, Yang Y, Dai X, *et al*. Polydatin ameliorates injury to the small intestine induced by hemorrhagic shock *via* SIRT3 activation-mediated mitochondrial protection[J]. Exp Opin Ther Targ, 2016, 20(6): 645-652. DOI: 10.1080/14728222.2016.1177023.

[8] Hall AM, Schuh CD. Mitochondria as therapeutic targets in acute kidney injury[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016, 25(4): 355-362. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000228.

[9] 蔡朦朦, 鲍红光, 杨建平. 脓毒症肺损伤肺组织细胞线粒体损伤的研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2014, 35(2): 165-168, 192. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2014.02.17.
Cai MM, Bao HG, Yang JP. Progress of pulmonary mitochondrial dysfunction in septic lung injury[J]. Int J Anesthesiol Resusc, 2014, 35(2): 165-168, 192. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2014.02.17.

[10] 李国民, 丁东亮, 杨娇娇, 等. 线粒体靶向抗氧化剂 SS-31 肽对脓毒血症小鼠急性肺损伤的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(5): 476-479.
Li GM, Ding DL, Yang JJ, *et al*. Effect of mitochondria-targeted antioxidant SS-31 on sepsis-induced acute lung injury in a mouse model[J]. J Clin Anesthesiol, 2016, 32(5): 476-479.

[11] Sun DZ, Song CQ, Xu YM, *et al*. Involvement of PINK1/Parkin-mediated mitophagy in paraquat-induced apoptosis in human lung epithelial-like A549 cells[J]. Toxicol In Vitro, 2018, 53: 148-159. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.08.009.

[12] Mannam P, Shinn AS, Srivastava A, *et al*. MKK3 regulates mitochondrial biogenesis and mitophagy in sepsis-induced lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306(7): L604-L619. DOI: 10.1152/ajplung.00272.2013.

[13] 王兴民, 赵克森. 线粒体功能不全在重症休克发生中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(4): 757-760, 768. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2013.04.033.
Wang XM, Zhao KS. Role of mitochondrial dysfunction in genesis of severe shock[J]. Chin J Pathophysiol, 2013, 29(4): 757-760, 768. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2013.04.033.

(编辑: 张美)