

# 川芎嗪对过氧化氢引起 PC12 细胞损伤的保护作用\*

朱云凤<sup>1</sup>, 高峰<sup>2</sup>, 张春兵<sup>2△</sup> (1. 江苏省张家港市中医院检验科 215600; 2. 江苏省中医院检验科, 南京 210029)

**【摘要】 目的** 分析川芎嗪预处理大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞后过氧化氢诱导的细胞凋亡情况, 探讨川芎嗪抑制脑缺血损伤中氧自由基损伤的分子机制。**方法** 采用川芎嗪预处理 PC12 细胞后, 制备过氧化氢细胞损伤模型, 采用 CCK-8 法活细胞检测、Hoechst-33342 染色、流式细胞术、反转录聚合酶链反应分析细胞凋亡发生机制。**结果** 应用 0.0、0.1、1.0、10.0 mmol/L 浓度川芎嗪预处理后, 细胞活力分别为 (51.2±4.64)%、(58.5±7.46)%、(73.8±2.94)%、(81.0±6.06)% ( $F=146.9, P<0.05$ ), 细胞未见大量凋亡小体形成, Bax/Bcl-2 比值降低 ( $F=2.14, P<0.05$ ), 线粒体膜电位提高, Caspase 3、9 活性降低 (Caspase 3:  $F=1.59, P<0.05$ ; Caspase 9:  $F=4.98, P<0.05$ )。**结论** 川芎嗪预处理后可降低过氧化氢诱导的 PC12 细胞凋亡, 抑制氧自由基损伤。

**【关键词】** 川芎嗪; PC12 细胞; 脑缺血损伤; 凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.23.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)23-3453-03

**Study on tetramethylpyrazine protecting PC12 cells from injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>\*** ZHU Yun-feng<sup>1</sup>, GAO Feng<sup>2</sup>, ZHANG Chun-bing<sup>2△</sup> (1. Department of Laboratory Medicine, Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangjiagang, Jiangsu 215600, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

**【Abstract】 Objective** To analyze the protection of tetramethylpyrazine to PC12 cells from apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and to explore the inhibition mechanisms of oxygen free radical injury in cerebral ischemia. **Methods** After the PC12 cells were pretreated by tetramethylpyrazine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to induce the apoptosis of PC12 cells. Various methods, including CCK-8 live cell test, Hoechst-33342 staining, flow cytometry and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), were used to analyze the mechanisms involved in the process.

**Results** After the different concentrations (0.0, 0.1, 1.0, 10 mmol/L) tetramethylpyrazine pretreatment, there were no large number of apoptotic bodies formed in PC12 cells and the viability (%) of PC12 cells were (51.2±4.64)%, (58.5±7.46)%, (73.8±2.94)% and (81.0±6.06)% respectively ( $F=146.9, P<0.05$ ). Moreover, in PC12 cells, the rate of Bax/Bcl-2 dropped ( $F=2.14, P<0.05$ ), the electric potential of mitochondrial membrane enhanced, activity of Caspase 3 and Caspase 9 decreased (Caspase 3:  $F=1.59, P<0.05$ ; Caspase 9:  $F=4.98, P<0.05$ ). **Conclusion** The pretreatment with tetramethylpyrazine could reduce the apoptosis of PC12 cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and inhibit oxygen free radical injury.

**【Key words】** tetramethylpyrazine; PC12 cells; cerebral ischemia injury; apoptosis

氧自由基损伤机制是脑缺血损伤中较早提出的学说, 正常情况下体内自由基的产生与消除处于一个动态平衡状态, 当急性脑梗死时, 由于缺血造成供氧不足和三磷酸腺苷 (ATP) 合成减少, 平衡状态遭到破坏, 氧自由基积蓄而造成脑损伤<sup>[1]</sup>。前期研究及其他试验报道, 川芎嗪可以穿透血脑屏障, 降低缺血再灌注损伤区神经元的凋亡<sup>[2-4]</sup>。本研究拟以 PC12 细胞株为研究对象, 制备过氧化氢细胞损伤模型, 观察不同浓度川芎嗪对 PC12 细胞的保护作用, 探讨川芎嗪抑制氧自由基损伤的可能机制, 进而明确川芎嗪减轻脑缺血再灌注损伤的机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 试剂与仪器** 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞克隆株 PC12 购自上海中国科学院细胞库。胎牛血清、马血清、DMEM 培养基 (新西兰 Gibco 公司); 胰蛋白酶 (美国 Difco 公司); 明胶 (美国 Sigma 公司); 盐酸川芎嗪注射液: 40 mg/2 mL (江苏省无锡市第七制药厂); Hoechst-33342, CCK-8 试剂盒 (日本 Dojindo 公司); 罗丹明 (美国 Invitrogen 公司); Active Caspase 3 Staining Kit, Active Caspase 8 Staining Kit 和 Active Caspase 9

Staining Kit (美国 Biovision 公司); Primescript™ 反转录聚合酶链反应 (PCR) Kit、Trizol (大连宝生物公司); 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); FACSCanto™ II 流式细胞仪 (美国 BD 公司); IX51 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

**1.2 细胞培养及传代** 采用 0.1% 明胶预包被培养瓶, 备用。用完全培养液 (含 10% 灭活马血清和 10% 灭活胎牛血清的高糖 DMEM 培养液, 葡萄糖浓度: 4.5 g/L, pH: 7.4) 于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 环境常规培养 PC12 细胞。细胞融合率达 70% 时, 吸弃旧培养液, 加入新的完全培养液, 用移液器将细胞吹散, 以 1:4 的比例进行传代, 常规培养 2 d 后, 半量培养液换液。

**1.3 过氧化氢模型制备<sup>[5]</sup>** 采用 0.25% 胰酶消化细胞, 制备单细胞悬液, 计数, 接种至 96 孔细胞培养板中, 10<sup>5</sup> 细胞/孔, 100 μL 完全培养液, 隔天换液, 生长至单层。加入 200 mmol/L 过氧化氢, 孵育 24 h, 去除培养基; 换上不含过氧化氢的新鲜培养基, 培养 48 h, 复孔培养。

**1.4 川芎嗪保护试验** 生理盐水配制川芎嗪成 0.0、0.1、1.0、10.0 mmol/L 4 种梯度浓度, 预处理 PC12 细胞, 孵育 60

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81171659)。

作者简介: 朱云凤, 女, 本科, 副主任技师, 主要从事临床微生物检验工作。 △ 通讯作者, E-mail: 723932541@qq.com。

min 后,去除培养基;洗涤,换液,并加入 200 mmol/L 过氧化氢,孵育 24 h,去除培养基;换上不含过氧化氢的新鲜培养基培养 48 h,复孔培养。按照 CCK-8 试剂说明书测定细胞活力;选取 0.0 mmol/L 和 1.0 mmol/L 川芎嗪预处理组含有细胞单层的玻片,进行 Hoechst-33342 染色观察(荧光显微镜 400×,激发波长 350 nm)。

1.5 实时荧光定量 PCR 测定 Bax、Bcl-2 mRNA 表达

1.5.1 总 RNA 提取及逆转录反应 在 0.0、0.1、1.0、10.0 mmol/L 4 种浓度川芎嗪保护试验后,取培养细胞(10<sup>5</sup> 细胞),2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 纯度,取 A<sub>260/280</sub> 在 1.8~2.0 的标本用于后续试验。按照 Primescript™ RT-PCR 试剂说明书进行逆转录,−20 ℃ 贮存。

1.5.2 探针及引物 采用 Primer Express 3.0 跨内含子设计引物、探针,委托上海英骏合成,探针 5' 标记 FAM 发光基团,3' 标记 ECLIPSE 淬灭基团。Bcl-2(序列号为 NM\_016993,片段为 74 bp, TM 为 52 ℃)上游引物:5'-TGCCTCAGCCCTGTG-3',下游引物:5'-GGTAGCGACGAGAGAAGTCATC-3',探针:5'-CCACCTGTGGTCCACCTG-3'; Bax(序列号为 NM\_017059,片段为 74 bp, TM 为 52 ℃)上游引物:5'-CAAGAAGCTGAGCGAGTGTCT-3',下游引物:5'-CAATCATCTCTGCTGAGCTCCATATT-3',探针:5'-CCAGTTCATCTCAATTCG-3'; GAPDH(序列号为 NM\_017008,片段为 120 bp, TM 为 52 ℃)上游引物:5'-GTGCCAAAAGGGTCATCATCTC-3',下游引物:5'-GGTTCACACCCATCACAAA-CATG-3',探针:5'-TTCCGCTGATGCCCC-3'。

1.5.3 实时荧光定量 PCR PCR 反应体系 25 μL,包括 cDNA 2 μL,2×Premix EX Taq 12.5 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL,10 μmol/L 探针 1 μL,去离子水 8.5 μL;取 10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> copy/mL 4 种浓度梯度含扩增片段重组质粒为标准品。PCR 参数设置:95 ℃ 预变性 45 s;95 ℃ 变性 5 s,52 ℃ 退火、延伸 35 s,扩增 40 个循环;在 52 ℃ 退火、延伸步骤采集荧光信号,并绘制相关曲线,分析标本扩增数据。

1.6 流式细胞术

1.6.1 检测细胞线粒体膜电位 在 0.0、0.1、1.0、10.0 mmol/L 4 种浓度川芎嗪保护试验后,加入罗丹明 123 染液 5 μg/mL;37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 孵育 15 min;采用完全培养基洗涤细胞 2 次;重悬,37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 孵育 60 min;流式细胞仪检测;激发波长 488 nm,发射波长 530 nm。

1.6.2 检测细胞 Caspase 活性 在 0.0、0.1、1.0、10.0 mmol/L 4 种浓度川芎嗪保护试验后,每组取 300 μL 细胞悬液(10<sup>5</sup> 细胞/100 μL),加入 Caspase 3、8、9 底物 FITC-DEVD-FMK 1 μL,同时设立阴性对照组(加入 Caspase 抑制物 Z-VAD-FMK 1 μL)。37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 孵育 30 min,缓冲液洗涤 2 次后,进行流式细胞检测。流式细胞仪检测:激发波长 488 nm,发射波长 530 nm。

1.7 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。检测数据经 K-S 正态性检验均呈正态分布,计量资料以  $\bar{x} \pm 2s$  表示,多组数据比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 川芎嗪增强细胞活性 过氧化氢具有细胞毒性。应用 0.0、0.1、1.0、10.0 mmol/L 4 种浓度的川芎嗪处理过氧化氢(200.0 μmol/L) PC12 细胞模型,细胞活力分别为(51.2 ± 4.64) %、(58.5 ± 7.46) %、(73.8 ± 2.94) %、(81.0 ± 6.06) %,川芎嗪呈剂量依赖性提高细胞存活率,降低过氧化氢神经细胞毒性(与 0.0 mmol/L 组比较  $F = 146.9, P < 0.05$ )。

2.2 川芎嗪抑制核固缩及凋亡小体产生 过氧化氢(200.0 μmol/L)模型中,PC12 细胞的细胞核固缩,凋亡小体形成。1.0 mmol/L 川芎嗪预处理组,细胞核荧光强度均匀一致,未见大量凋亡小体(图 1)。

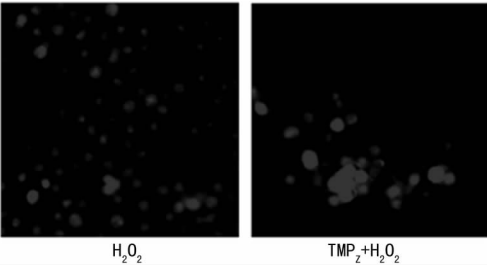


图 1 过氧化氢诱导细胞凋亡及川芎嗪保护效应-Hoechst 33342 染色(×400)

2.3 川芎嗪调控 Bax/Bcl-2 通路抑制细胞凋亡 过氧化氢模型组 Bax/Bcl-2 显著升高(与 0.0 mmol/L 组比较,  $F = 1.31, P < 0.05$ );川芎嗪预处理后,Bax/Bcl-2 呈现剂量依赖性降低(与 1.0 mmol/L 组比较,  $F = 2.14, P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 过氧化氢模型中 Bax 和 Bcl-2 拷贝数( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | n | Bax/GAPDH                    | Bcl-2/GAPDH                  |
|----|---|------------------------------|------------------------------|
| 0  | 5 | 0.006 ± 0.000 4              | 0.025 ± 0.000 2              |
| 1  | 5 | 0.020 ± 0.000 4 <sup>#</sup> | 0.015 ± 0.000 3 <sup>#</sup> |
| 2  | 5 | 0.017 ± 0.000 3 <sup>*</sup> | 0.014 ± 0.000 3 <sup>#</sup> |
| 3  | 5 | 0.009 ± 0.000 2 <sup>*</sup> | 0.019 ± 0.000 2 <sup>*</sup> |
| 4  | 5 | 0.005 ± 0.000 2 <sup>*</sup> | 0.019 ± 0.000 4 <sup>*</sup> |

注:0 组表示 0.0 mmol/L 川芎嗪+0.0 μmol/L 过氧化氢;1 组表示 0.0 mmol/L 川芎嗪+200.0 μmol/L 过氧化氢;2 组表示 0.1 mmol/L 川芎嗪+200.0 μmol/L 过氧化氢;3 组表示 1.0 mmol/L 川芎嗪+200.0 μmol/L 过氧化氢;4 组表示 10.0 mmol/L 川芎嗪+200.0 μmol/L 过氧化氢。与 0 组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$ ;与 1 组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ 。

2.4 川芎嗪拮抗过氧化氢破坏线粒体膜电位 过氧化氢模型组,可见荧光显著增强,表明线粒体膜电位下降;而经过川芎嗪预处理后,荧光强度减弱,亦可观察到剂量依赖性,表明川芎嗪可以剂量依赖性提高线粒体膜电位,抑制 PC12 细胞凋亡。

2.5 川芎嗪抑制过氧化氢诱导的细胞凋亡 过氧化氢刺激 PC12 细胞 Caspase 3 和 Casapase 9 活化(与 0 组比较,Caspase 3:  $F = 3.74, P < 0.05$ ; Casapase 9:  $F = 7.68, P < 0.05$ ),未见 Caspase 8 活化;川芎嗪预处理后,Caspase 3 和 Caspase 9 活性降低(与 1 组比较,Caspase 3:  $F = 1.59, P < 0.05$ ; Caspase 9  $F = 4.98, P < 0.05$ ),且呈剂量依赖性;Caspase 8 活性未见显著降低(表 2)。说明调控通过 Caspase 9 和 Caspase 3,而不是 Caspase 8 和 Caspase 3 途径。

表 2 川芎嗪调控过氧化氢模型组 Caspase 活性( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别 | n | Caspase 3               | Caspase 8 | Caspase 9               |
|----|---|-------------------------|-----------|-------------------------|
| 0  | 4 | 2.4 ± 0.4               | 5.3 ± 0.4 | 7.8 ± 0.6               |
| 1  | 4 | 48.6 ± 1.4 <sup>#</sup> | 6.2 ± 0.3 | 83.2 ± 2.9 <sup>#</sup> |
| 2  | 4 | 33.2 ± 1.8 <sup>*</sup> | 5.6 ± 0.4 | 66.2 ± 1.8 <sup>*</sup> |
| 3  | 4 | 27.3 ± 1.6 <sup>*</sup> | 5.7 ± 0.6 | 47.5 ± 1.6 <sup>*</sup> |
| 4  | 4 | 19.6 ± 1.1 <sup>*</sup> | 7.2 ± 0.8 | 15.3 ± 1.4 <sup>*</sup> |

注:0 组表示 0.0 mmol/L 川芎嗪+0.0 μmol/L 过氧化氢;1 组表示 0.0 mmol/L 川芎嗪+200.0 μmol/L 过氧化氢;2 组表示 0.1 mmol/L 川芎嗪+200.0 μmol/L 过氧化氢;3 组表示 1.0 mmol/L 川芎嗪+200.0 μmol/L 过氧化氢;4 组表示 10.0 mmol/L 川芎嗪+200.0 μmol/L 过氧化氢。与 0 组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$ ;与 1 组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ 。

3 讨 论

脑缺血再灌注损伤是多种机制参与的一种复杂病理生理

过程, 主要与自由基累积、兴奋性氨基酸毒性作用、细胞内钙离子超载、炎性反应等多种机制有关。自由基具有很高的化学活性, 可快速攻击其他化合物的分子并产生更多的自由基, 破坏膜结构中蛋白成分、引起膜脂质过氧化, 导致膜损伤、线粒体功能障碍、溶酶体破裂、细胞溶解和组织水肿等一系列损伤作用。大量研究表明, 自由基可以作用于大量的分子目标, 包括细胞外信号调控的蛋白激酶、有丝分裂激活蛋白激酶、核转录因子 NF- $\kappa$ B 和 Caspase 家族<sup>[6]</sup>。

Bcl-2/Bax 相对水平大致反映了细胞发生凋亡的可能性, 研究实时荧光定量 PCR 考察了 Bax/Bcl-2 水平, 发现川芎嗪预处理后, Bax/Bcl-2 可呈剂量依赖性降低, 相关蛋白主要是通过作用于线粒体来实现其促进凋亡或抑制凋亡的生物学活性<sup>[7-8]</sup>。线粒体在细胞凋亡过程中起枢纽作用。线粒体跨膜电位降低是细胞凋亡早期的不可逆事件, 线粒体是多种促细胞凋亡信号转导分子的靶点, 同时也是细胞死亡通路的整合元件。本研究观察到过氧化氢模型组, 线粒体膜电位下降, 而川芎嗪可抑制钙超载, 提高线粒体膜电位, 抑制细胞凋亡。Bax 可活化同源半胱氨酸酶 Caspase, 促进细胞凋亡<sup>[9]</sup>。活化的 Caspase 可以次序激活其他 Caspase 形成 Caspase 级联反应, 促进细胞凋亡。Caspase3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, Caspase8 和 Caspase9 则分别参与死亡受体介导的外源性途径和线粒体损伤的内源性途径, 是凋亡发生的启动者。本研究结果显示, 过氧化氢主要通过内源性途径诱发细胞凋亡, 川芎嗪可以抑制 Caspase3 和 Caspase9 的活化, 从而缓解凋亡进程。

本研究表明, 过量氧自由基可诱导 PC12 细胞凋亡, 在合适浓度川芎嗪干预下, 可呈剂量依赖性抑制细胞凋亡, 其可能途径为通过调节 Bax/Bcl-2 平衡, 进而抑制 Caspase3 和 Caspase9 活化, 提升线粒体膜电位发挥作用。

## 参考文献

[1] Zaghoul N, Nasim M, Patel H, et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase has a protective role against hyperoxia-induced brain injury in neonatal mice

[J]. FEBS J, 2012, 279(5): 871-881.

- [2] Tang Q, Han R, Xiao H, et al. Neuroprotective effects of tanshinone IIA and/or tetramethylpyrazine in cerebral ischemic injury in vivo and in vitro[J]. Brain Res, 2012, 1488(11): 81-91.
- [3] Sun Y, Yu P, Zhang G, et al. Therapeutic effects of tetramethylpyrazine nitron in rat ischemic stroke models[J]. J Neurosci Res, 2012, 90(8): 1662-1669.
- [4] 张春兵, 丁兴, 詹臻. 盐酸川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 江苏中医药, 2008, 53(4): 77-79.
- [5] 李锦吉, 狄留庆, 李俊松, 等. 通塞脉制剂对过氧化氢致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 56(2): 146-149.
- [6] Takabe W, Li R, Ai L, et al. Oxidized low-density lipoprotein-activated c-Jun NH2-terminal kinase regulates manganese superoxide dismutase ubiquitination: implication for mitochondrial redox status and apoptosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(3): 436-441.
- [7] Mehmeti I, Lenzen S, Lortz S. Modulation of Bcl-2-related protein expression in pancreatic beta cells by pro-inflammatory cytokines and its dependence on the antioxidative defense status[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 332(12): 88-96.
- [8] El MS, Faletti L, Berg B, et al. A novel mitochondrial MAVS/Caspase-8 platform links RNA virus-induced innate antiviral signaling to Bax/Bak-independent apoptosis [J]. J Immunol, 2014, 192(3): 1171-1183.
- [9] Mei JM, Niu CS. Effects of CDNF on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation[J]. Neurol Sci, 2014, 35(8): 1275-1280.

(收稿日期: 2015-03-20 修回日期: 2015-06-18)

(上接第 3452 页)

如相关实验室没有开展抑制物检测项目, 而临床大夫有此怀疑时, 可考虑加做预测抑制物有无。

随着社会对罕见病的关注及医保政策的倾斜, 越来越多的患者得到了因子替代治疗。针对血友病 A 患儿预防治疗的普及, 临床医生已逐步体会到抑制物问题的严峻性。抑制物定性及定量监测, 将有助于医生判断患者临床风险, 影响临床治疗决策。尝试利用 APTT 这一常规出血检测项目对 FⅧ抑制物筛查, 是对现阶段无法开展抑制物定量监测医疗单位的补充, 为血友病 A 患儿早期诊断及制订合理的治疗方案提供依据, 可作为抑制物监测的前期预试验常规开展<sup>[10]</sup>。另外, 本研究为回顾性横断面研究, 非动态的长期纵向观察结果, 研究数据仅局限于本实验室, 未经过多中心研究证实。对于血友病 A 患儿 APTT 差值与抑制物滴度关系只能作初步探讨, 具体有待将来进一步深入研究。

## 参考文献

[1] 魏琪琪, 李刚, 唐凌, 等. 儿童血友病 A 抑制物产生相关因素横断面分析[J]. 中华儿科杂志, 2014, 52(2): 99-102.

[2] Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, et al. Guidelines for the management of hemophilia [J]. Haemophilia, 2013, 19(1): e1-e47.

[3] Chambost H. Assessing risk factors; prevention of inhibi-

tors in haemophilia[J]. Haemophilia, 2010, 16(Suppl 2): 10-15.

- [4] 世界血友病联盟. 血友病处理指南[M]. 蒙特利尔: 世界血友病联盟, 2013: 45-46.
- [5] 范连凯, 王志伟, 华宝来, 等. 改进 Bethesda 方法和 Nijmegen 方法检测凝血因子Ⅷ抑制物的比较[J]. 中国医学科学院学报, 2009, 31(11): 551-553.
- [6] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组, 中国血友病协作组. 血友病诊断与治疗中国专家共识(2013 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(5): 461-463.
- [7] Schwarz J, Aetermark J, Menius ED, et al. F8 haplotype and inhibitor risk: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study(HIGS) Combined Cohort[J]. Haemophilia, 2013, 19(1): 113-118.
- [8] 吴润辉. FⅧ抑制物: 50 年纵览[J]. 血栓与止血学, 2012, 18(6): 285-288.
- [9] 丛玉隆. 国内凝血实验常规检查的热点话题与思考[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(1): 18-21.
- [10] 王建中. 出血与血栓性疾病的实验诊断应该与临床达成共识[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(3): 161-165.

(收稿日期: 2015-03-02 修回日期: 2015-06-28)