

补骨脂素对 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞损伤的保护作用

管宇航, 海 舰

同济大学附属同济医院, 上海 200065

摘要: **目的** 探讨补骨脂素对 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞氧化损伤的保护作用, 并考察其作用机制。**方法** PC-12 细胞分为对照组、模型组、Tempol 组和补骨脂素组。对照组中未加入补骨脂素和 H₂O₂; 模型组中加入 400 μmol/L H₂O₂; Tempol 组中加入 100 μmol/L Tempol 及 400 μmol/L H₂O₂; 补骨脂素组中加入 400 μmol/L H₂O₂ 及 1、5、10、20 μmol/L 补骨脂素。CCK-8 法测定 PC-12 细胞的存活率, 考察对 PC-12 细胞形态的影响, PI/Annexin-V、Hoechst 染色检测细胞凋亡率, 蛋白质印迹法检测凋亡蛋白表达。**结果** 5、10、20 μmol/L 补骨脂素均可以显著提高 PC-12 细胞内的吸光度值 ($P < 0.01$), 细胞存活率提高较明显, 与模型组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。补骨脂素 1、5、10、20 μmol/L 组凋亡率明显低于模型组 ($P < 0.05$), 并且随着补骨脂素浓度的增加, PC-12 细胞的凋亡率逐渐下降。随着补骨脂素作用时间的增加, 各组 PC-12 细胞凋亡率的增加幅度相近, 但明显低于模型组 ($P < 0.05$)。随着补骨脂素浓度的增加, 对磷酸化 Bad、Bcl-XL 水平的上调作用越明显。**结论** 补骨脂素对 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞损伤具有保护作用, 其作用机制是通过上调磷酸化 Bad 和 Bcl-XL 表达来抑制细胞凋亡。

关键词: 补骨脂素; PC-12 细胞; 保护作用; 氧化应激; 凋亡

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)05-0577-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.05.003

Protection of psoralen on PC-12 cell damage induced by H₂O₂

GUAN Yu-hang, HAI Jian

Tongji Hospital, Tongji University, 200065, Shanghai, China

Abstract: **Objective** To discuss the protective effect of psoralen on PC-12 cell damage induced by H₂O₂, and investigate its mechanism. **Methods** PC-12 cells were divided into control model, Tempol, and psoralen groups. Cells in the control group did not receive damage or treatments, the model group was established by 400 μmol/L H₂O₂-damage, Tempol group was cultured by 100 μmol/L Tempol and 400 μmol/L H₂O₂, and psoralen groups were cultured by 400 μmol/L H₂O₂ and 1, 5, 10, and 20 μmol/L psoralen. Cell survival rates in four groups were detected by CCK-8 method, apoptosis rates were detected by PI/Annexin and Hoechst methods, and protein expression were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, psoralen (1, 5, 10, and 20 μmol/L) could significantly improve absorbance values ($P < 0.01$) and cell survival rates ($P < 0.05$) of PC-12 cells. Apoptosis rates of psoralen (1, 5, 10, and 20 μmol/L) groups were significantly lower than those of model group ($P < 0.05$). And with increase of psoralen concentration, apoptosis rates of PC-12 cells were gradually decreased. With longer action time, the increase amplitudes of PC-12 cells apoptosis rates among groups were similar, and obviously lower than those of model group ($P < 0.05$). Psoralen could significantly up-regulate levels of p-Bad and Bcl-XL with increase of concentrations. **Conclusion** Psoralen has protective effect on PC-12 cell damage induced by H₂O₂, which is related to up-regulation of p-Bad and Bcl-XL to inhibit the apoptosis of PC-12 cell.

Key words: psoralen; PC-12 cells; protective effect; oxidative stress; apoptosis

神经元脑缺血再灌注损伤后, 早期的凋亡是一个可逆的过程, 而细胞的坏死是一个不可逆的过程。因此, 阻断缺血神经元的凋亡、逆转神经元的损伤已成为缺血再灌注脑损伤的研究热点。近年来天然

药物以毒性低、安全范围广、药源丰富越来越受到人们的关注, 从天然药物中寻找高效低毒的抗神经凋亡活性成分已成为脑损伤药物研制和开发的热点之一。补骨脂素是从补骨脂中分离提取的有效成分,

收稿日期: 2016-03-24

作者简介: 管宇航, 男, 硕士, 主要从事神经外科研究。Tel: (021)6611109 E-mail: guanyuhang@aliyun.com

为呋喃香豆素类化合物, 具有广泛的生物学活性和药理作用, 如光敏、保护心血管、抗组胺、抗肿瘤、促进粒细胞生长、抗生育和雌激素样作用等^[1-2]。但是, 补骨脂素在抗神经损伤中的作用一直未受到重视。本研究考察了补骨脂素对 H_2O_2 诱导的 PC-12 细胞损伤的保护作用, 为其治疗脑缺血神经损伤提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

PC-12 细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 试剂

p-Bad¹¹²、Bad、Bcl-XL 购自 Santa Cruz 公司; β -actin 购自沈阳万类生物科技有限公司; DMSO 购自 Sigma 公司; H_2O_2 购自重庆川东化工有限公司; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自赛业(广州)生物科技有限公司, 补骨脂素购自 Sigma 公司, 质量分数 >99.0%; Tempol 购自上海浩然生物科技有限公司, 质量分数 >99.0%。

1.3 仪器

电热恒温水浴槽(上海精宏实验设备有限公司); 蛋白质电泳槽(伯乐生命医学产品有限公司); 电子分析天平(Mettler Toledo 公司); PCR 仪、实时定量 PCR 仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]; NanoDrop 2000 超微量分光光度计(赛默飞世尔科技公司); BIO-RAD 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); 二氧化碳恒温培养箱(日本 ASTEC); 倒置生物显微镜(OPTEC 公司); MoFlo XDP 流式细胞仪(Beckman Coulter 有限公司)。

2 方法

2.1 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞氧化应激损伤模型的建立

96 孔板内细胞生长良好, 铺满孔板内 90% 左右时, 弃培养基, 加入 200 μ L H_2O_2 浓度分别为 100、200、300、400、500 μ mol/L 的 DMEM 培养液, 培养 4 h。每孔加入 CCK-8 试剂 8 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h 后采用酶标仪测定全波长 450 nm 处的吸光度(A)值, 计算细胞存活率。对照组细胞的存活率记为 100%。细胞存活率约为 50% 左右时的 H_2O_2 浓度为合适的浓度。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 实验分组

PC-12 细胞常规培养, 使细胞数量达到 $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$, 分为对照组、模型组、Tempol 组和补骨脂

素组。对照组中未加入补骨脂素和 H_2O_2 ; 模型组中加入 400 μ mol/L H_2O_2 ; Tempol 组中加入 100 μ mol/L Tempol 及 400 μ mol/L H_2O_2 ; 补骨脂素组中加入 400 μ mol/L H_2O_2 及 1、5、10、20 μ mol/L 补骨脂素。培养基每 3 天更换 1 次, DMSO 的浓度为 0.1%, 不影响细胞活性。孵育 48 h 后倒置显微镜下观察细胞形态变化, 收集细胞检测各项指标, 实验重复 3 次。

2.3 CCK-8 法测定细胞存活情况

将对照组、模型组、Tempol 组和补骨脂素组细胞均匀地接种到 96 孔板中, 加入 100 μ L 新的培养基, 每组实验 3 个复孔, 3 次独立重复; 给予相应的药物处理 24 h 后, 每孔加入 CCK-8 试剂 8 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h; 将孵育后的培养基移到酶标板中, 450 nm 处采用酶标仪测定 A 值; 每 24 小时重复前面步骤; 使用 MS Office Excel 软件分析结果。

2.4 PI/Annexin-V、Hoechst 染色检测细胞凋亡情况

将模型组、Tempol 组和补骨脂素组的 PC-12 悬浮细胞 ($1 \times 10^6 / \text{mL}$) 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用 PBS 洗 2 次, 加入 Binding Buffer 100 μ L 和 FITC 标记的 Annexin-V (20 μ g/mL) 10 μ L, 室温避光 30 min, 再加入 PI (50 μ g/mL) 5 μ L, 避光反应 5 min 后, 加入 Binding Buffer 400 μ L, 立即用 FACSscan 进行流式细胞术定量检测, 同时以不加 AnnexinV-FITC、PI 的一管作为对照, 计算 PC-12 细胞凋亡率。

模型组、Tempol 组和补骨脂素组吸尽培养液后, 加入 0.5 mL 固定液, 固定 10 min 后去固定液, 用 PBS 洗涤 2 次, 吸尽 PBS, 后加入 Hoechst 33258 染色液 0.5 mL, 染色 5 min, 用 PBS 洗 2 次, 滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片, 盖上贴有细胞的盖玻片, 采用荧光显微镜观察, 计算 PC-12 细胞凋亡率。

2.5 蛋白质印迹(Western blotting)法检测凋亡蛋白表达

模型组、Tempol 组和补骨脂素组收集待提蛋白的细胞, 六孔板每个孔加入 RIPA 裂解液 100 μ L, 冰上振荡 30 min 后离心 15 min, 12 000 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C。取上清即得蛋白溶液。将 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液与蛋白溶液按体积比 1:4 混合并煮沸 5 min, 使得蛋白充分变性后, 电泳并转 PVDF 膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h 后, 分别使用 Bcl-2、Bax、Caspase-3、P53 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗 3 次, 二抗室温下孵育 1 h, PBS 洗 3 次, ECL 化学发光法进行显影。内参采用 β -actin。

2.6 统计方法

采用 SPSS 18.0 软件对数据进行分析, 计数资料分析采用 χ^2 检验, 计量资料分析采用 t 检验。

3 结果

3.1 不同浓度 H_2O_2 对 PC-12 细胞存活率的影响

100、200、300、400、500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用于 PC-12 细胞后, 细胞存活率不同程度的下降, 见表 1。当 H_2O_2 浓度增加至 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率下降幅度显著, 仅有略多于半数的细胞存活; 当 H_2O_2 浓度达到 500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活数量太少, 不适合进行后续实验。参照该实验结果可初步判定 H_2O_2 诱导 PC-12 低氧损伤模型建立的理想浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 不同浓度 H_2O_2 对 PC-12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effect of various concentration of H_2O_2 on cell survival rates of PC-12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A 值	存活率/%
对照	—	0.87 ± 0.04	100.0
H_2O_2	100	0.67 ± 0.03	77.0
	200	0.58 ± 0.05	66.7
	300	0.57 ± 0.04	65.5
	400	0.48 ± 0.02	55.2
	500	0.21 ± 0.01	24.1

3.2 不同浓度补骨脂素对 PC-12 细胞存活率的影响

PC-12 细胞在 1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 补骨脂素培养液培养 48 h 均能够保持较好的生长, 未发现明显的促增殖或促凋亡现象, 表明补骨脂素对于正常生长的 PC-12 的存活率无显著影响, 见表 2。

表 2 不同浓度补骨脂素对 PC-12 细胞存活率影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of various concentration of psoralen on cell survival rates of PC-12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A 值	存活率/%
对照	—	0.91 ± 0.04	100.0
补骨脂素	1	0.89 ± 0.05	97.8
	5	0.88 ± 0.04	96.7
	10	0.92 ± 0.05	101.1
	20	0.87 ± 0.05	95.6

3.3 不同浓度补骨脂素对 H_2O_2 诱导凋亡的 PC-12 细胞存活率的影响

5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 补骨脂素均可以显著提高 PC-12 细胞内的 A 值 ($P < 0.01$), 细胞存活率提高明显, 与模型组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。当补骨脂素的浓度达到 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其恢复受损细胞活力的效果接近 Tempol 组, 见表 3。

表 3 补骨脂素对 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of psoralen on cell survival rates of PC-12 cells induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A 值	存活率/%
对照	—	0.89 ± 0.04	100.0
模型	—	$0.51 \pm 0.03^{\Delta}$	57.3 [▲]
Tempol	100	$0.90 \pm 0.03^{**}$	101.1 [*]
补骨脂素	1	0.63 ± 0.05	70.7 [*]
	5	$0.71 \pm 0.05^{**}$	79.8 [*]
	10	$0.81 \pm 0.04^{**}$	91.0 [*]
	20	$0.85 \pm 0.04^{**}$	95.5 [*]

与对照组组比较: [▲] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[▲] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.4 补骨脂素对 PC-12 细胞形态的影响

对照组的 PC-12 细胞培养 2 h 后开始贴壁生长, 培养 48 h 后, 神经元胞体呈现椭圆形或三角形, 胞体周围光晕明显, 神经元胞体周围有较多分支, 神经元与神经元之间联系多; Tempol 处理的细胞形态与对照组相似; 模型组单纯 H_2O_2 处理后, 细胞胞体偏小, 胞体周围光晕缩小, 神经元细胞数量稀疏, 胞体分支萎缩; 与对照组和模型组比较, 补骨脂素 1 $\mu\text{mol/L}$ 组神经细胞数量仍明显减少, 突触较少, 镜下形态与模型组相近; 但与对照组、模型组比较, 补骨脂素 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组的细胞形态相似, 神经元细胞数量较模型组增多, 胞体及凸起分支较完整。提示补骨脂素 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 对神经细胞保护作用强于补骨脂素 1 $\mu\text{mol/L}$, 见图 1。

3.5 补骨脂素对 PC-12 细胞凋亡的影响

采用 PI/Annexin V 双染模型组、Tempol 组和补骨脂素组, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。补骨脂素 1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组的凋亡率明显低于模型组 ($P < 0.05$), 并且随着补骨脂素浓度的增加, PC-12 细胞的凋亡率逐渐下降, 补骨脂素 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组与 Tempol 组凋亡率相近, 结果见表 4。

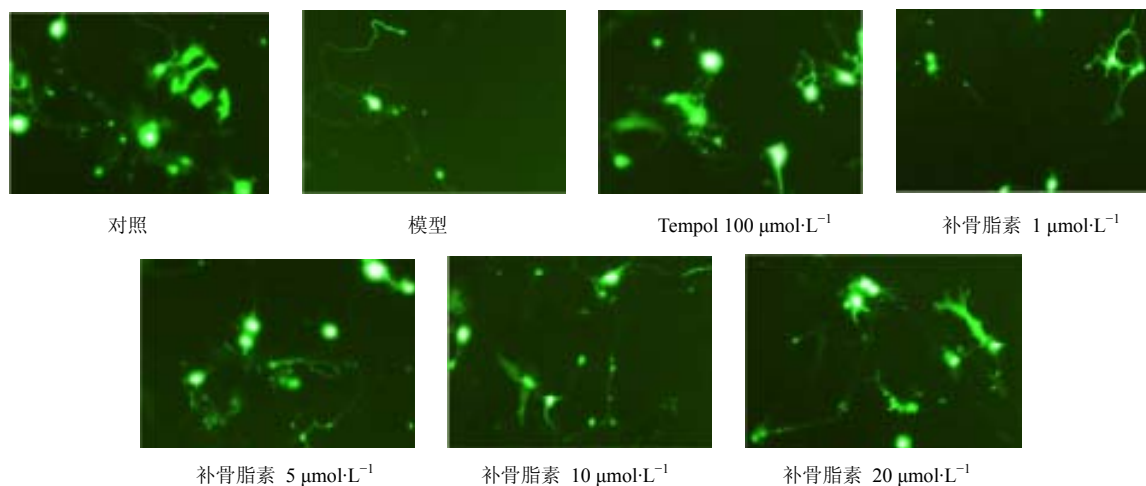


图1 PC-12 细胞镜下形态变化

Fig. 1 Morphological changes of PC-12 cell under microscope

采用 Hoechst 染色检测模型组、Tempol 组和补骨脂素组细胞凋亡情况, 结果也提示, 加入 1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 补骨脂素后, PC-12 细胞的细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.05$), 并随着补骨脂素浓度的增加, PC-12 细胞的凋亡率逐渐下降。补骨脂素 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组与 Tempol 组凋亡率相近或更低, 结果见表 4。

表4 不同浓度补骨脂素对 PC-12 细胞凋亡率影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 4 Effect of various concentration of psoralen on cell apoptosis rates of PC-12 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率/%	
		PI/Annexin V 双染	Hoechst 染色
模型	—	42.6 ± 2.4	45.9 ± 5.1
Tempol	100	$18.9 \pm 4.1^*$	$18.0 \pm 2.5^*$
补骨脂素	1	$32.9 \pm 2.9^*$	$36.4 \pm 2.7^*$
	5	$25.9 \pm 3.0^*$	$26.2 \pm 3.7^*$
	10	$19.8 \pm 1.5^*$	$18.4 \pm 1.5^*$
	20	$19.2 \pm 2.5^*$	$13.1 \pm 1.8^*$

与模型组比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs model group

实验考察了补骨脂素作用 24、48、72 h 对 PC-12 细胞凋亡的影响, 结果表明随着作用时间的增加, 各组 PC-12 细胞凋亡率的增加幅度相近, 但明显低于模型组 ($P < 0.05$)。模型组、Tempol 组和补骨脂素 1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组 72 h 凋亡率较 48 h 增加 1.67、1.15、1.23、1.22、1.09、1.17 倍。Tempol 组 PC-12 细胞 72 h 凋亡率较 48 h 的增加倍数与补骨脂素 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组的增加倍数相近, 结果见表 5。

表5 补骨脂素在不同作用时间对 PC-12 细胞凋亡率的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of various actuation durations of psoralen on cell apoptosis rates of PC-12 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率/%		
		24 h	48 h	72 h
模型	—	30.7 ± 5.6	40.3 ± 7.8	66.9 ± 9.7
Tempol	100	$11.8 \pm 3.7^*$	$19.1 \pm 4.0^*$	$21.9 \pm 4.0^*$
补骨脂素	1	$21.9 \pm 2.6^*$	$33.8 \pm 3.1^*$	$41.5 \pm 5.6^*$
	5	$19.9 \pm 2.6^*$	$25.8 \pm 2.1^*$	$31.5 \pm 3.6^*$
	10	$13.9 \pm 2.8^*$	$19.8 \pm 3.7^*$	$21.5 \pm 5.6^*$
	20	$12.8 \pm 1.6^*$	$19.2 \pm 2.9^*$	$22.6 \pm 2.7^*$

与模型组比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs model group

3.6 补骨脂素对 PC-12 细胞蛋白表达的影响

加入不同浓度的补骨脂素可上调磷酸化 Bad、Bcl-XL 水平, 而对总 Bad 没有影响, 但补骨脂素 1 $\mu\text{mol/L}$ 对 Bad、Bcl-XL 水平的影响程度要小于补骨脂素其他浓度组, 总体趋势为随着补骨脂素浓度的增加, 对磷酸化 Bad、Bcl-XL 水平的上调作用越明显, 与 Tempol 调节作用相似。见图 2。结果提示, 补骨脂素通过上调磷酸化 Bad 和 Bcl-XL 表达来抑制细胞凋亡。

4 讨论

补骨脂是豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 药理作用广泛, 包括抗菌、抗氧化、抗炎、保肝、抗抑郁、抗肿瘤等^[3]。从补骨脂中分离出来的化合物约 50 多种, 主要为香豆素

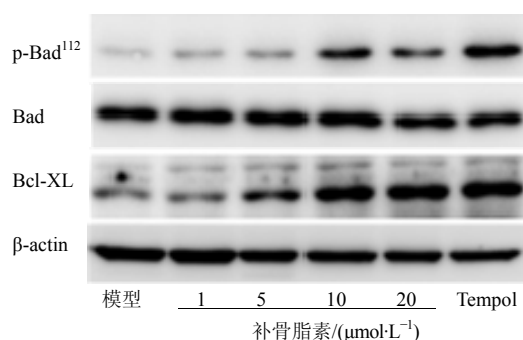


图2 补骨脂素对PC-12细胞蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of psoralen on protein expression of PC-12 cell

类、黄酮类、单萜酚类成分,其中补骨脂素是从补骨脂中提取的一种重要香豆素类化合物。近年来,补骨脂素的研究主要集中在抗肿瘤方面,研究表明补骨脂素对人乳腺癌、胃癌、宫颈癌、舌癌、黏液表皮样癌及白血病等细胞株均有体外生长抑制及细胞毒作用^[4-6]。另有研究发现,补骨脂素对多种小鼠肉瘤、艾氏腹水瘤、肝癌等也有生长抑制和体外细胞毒作用^[7]。另外补骨脂中分离出来一系列成分都具有抗氧化作用,如补骨脂定、补骨脂酚、异补骨脂素、补骨脂素等均可通过保护生物膜的完整性达到抗氧化的作用^[3]。本研究中,主要关注补骨脂素对H₂O₂诱导的PC-12细胞的保护作用。

氧自由基在正常生理下也广泛存在于机体,生成和清除处于平衡状态,但是在脑缺血的时候,这种平衡被打破,大量的氧自由基会攻击细胞膜脂、蛋白质、DNA和RNA等,造成一系列的损伤,使神经元膜和血管遭受破坏^[8]。在本研究中,采用H₂O₂处理细胞来模拟这一损伤。PC-12细胞是从大鼠肾上腺嗜络细胞瘤克隆的细胞株,膜上有NGF受体,受到生理水平NGF诱导后,可以长出神经突起,分化为交感神经元特性的细胞,常被用于神经元的研究。因此挑选PC-12细胞株作为研究对象。研究中,采用H₂O₂处理的PC-12细胞与对照组比较,细胞胞体偏小,胞体周围光晕缩小,神经元细胞数量稀疏,胞体分支萎缩。加入补骨脂素50 μmol/L处理,神经元形态与数量与对照组相似;用H₂O₂处理的PC-12细胞细胞存活率下降,凋亡增

加,明显高于补骨脂素组,并且存在剂量相关性。10、20 μmol/L补骨脂素对PC-12细胞的保护作用明显高于1 μmol/L补骨脂素,并且随着作用时间的延长,补骨脂素组对H₂O₂处理PC-12细胞的保护作用越明显。结果提示补骨脂素能够抑制H₂O₂诱导的PC-12细胞损伤。进一步的实验考察了补骨脂素对凋亡相关的分子变化情况,发现除1 μmol/L补骨脂素组外,5、10、20 μmol/L补骨脂素均能显著上调磷酸化Bad和Bcl-XL水平。

补骨脂素近年来的研究主要集中在肿瘤治疗。本研究在此基础上发现补骨脂素对H₂O₂诱导的PC-12细胞损伤具有保护作用,这种保护作用是通过上调磷酸化Bad和Bcl-XL起作用的,为扩展补骨脂素在脑损伤中的应用提供了实验参考。

参考文献

- [1] 陈楠楠,黄世林,张德杰,等.补骨脂素加长波紫外线对白血病细胞株NB4、HL-60、K562作用的研究[J].中国中医急症,2007,16(4):444-446.
- [2] 曹金一,刘京晶,黄文华.补骨脂药理作用与临床应用研究进展[J].中药药理与临床,2008,24(6):89-92.
- [3] 辛丹,颜冬梅,王跃飞,等.补骨脂及其相关化学成分的药理与毒理研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(7):70-73.
- [4] Wu C, Sun Z, Ye Y, et al. Psoralen inhibits bone metastasis of breast cancer in mice [J]. *Fitoterapia*. 2013, 91(12): 205-210.
- [5] Hsieh M J, Chen M K, Yu Y Y, et al. Psoralen reverses docetaxel-induced multidrug resistance in A549/D16 human lung cancer cells lines [J]. *Phytomedicine*. 2014, 21(7): 970-977.
- [6] Stern R S. The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: a 30-year prospective study [J]. *J Am Acad Dermatol*. 2012, 66(4): 553-562.
- [7] Scaffidi J P, Gregas M K, Lauly B, et al. Activity of psoralen-functionalized nanoscintillators against cancer cells upon X-ray excitation [J]. *ACS Nano*. 2011, 5(6): 4679-4687.
- [8] 肖天祯,王培福,李继来,等.自由基清除剂联合亚低温对急性脑缺血大鼠氧自由基的影响[J].北京医学,2012,34(1):41-43.