

姜黄素的抗氧化及抗肿瘤活性研究

陈建平, 李琳, 苏健裕

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文采用分光光度法测定姜黄素对 ABTS 和 DPPH 自由基的清除能力; 运用 AAPH 诱导红细胞氧化性溶血考察姜黄素对 AAPH 诱导人血红细胞损伤的抑制作用。通过 MTT 方法考察姜黄素对 A375 恶性黑色素瘤生长状态的影响, 并用流式细胞仪检测细胞凋亡数量; 运用 Western blot 测定姜黄素对 JNK 和 Akt 蛋白表达的影响。结果表明, 姜黄素对 DPPH 和 ABTS 自由基具有较好的清除能力, 呈浓度和时间依赖性; 同时, 姜黄素能有效抑制 AAPH 诱导红细胞溶血, 当姜黄素为 40 μM 时, 溶血抑制率达到 52.78 \pm 1.03%。MTT 结果表明, 随着姜黄素浓度的升高, A375 细胞存活率逐渐下降, 当姜黄素为 40 μM 时, A375 的细胞存活率仅为 21.50 \pm 1.60%。流式分析发现, 随着姜黄素浓度的提高, 细胞凋亡峰 (SubG1) 的含量逐渐增加。当姜黄素为 40 μM 时, 细胞内 SubG1 峰的含量达到了 63.30%。进一步 Western blot 分析发现姜黄素诱导 A375 细胞凋亡与上调 JNK 磷酸化的水平和下调 Akt 磷酸化的水平有关。

关键词: 姜黄素; 抗氧化; 抗肿瘤

文章编号: 1673-9078(2014)12-11-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.003

Antioxidant and Antitumor Activities of Curcumin

CHEN Jian-ping, LI Lin, SU Jian-yu

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this paper, spectrophotometric method was employed to determine the ability of curcumin to scavenge 2,2-azobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, and the oxidative hemolysis of erythrocytes induced by 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was used to investigate the inhibitory effect of curcumin on AAPH-induced damage to human erythrocytes. The effect of curcumin on the viability of A375 malignant melanoma cells was measured by MTT assay, and the population of the apoptotic cells was detected by a flow cytometer. The effect of curcumin on the expression levels phosphorylated JNK and Akt was analyzed via Western blot assay. These results showed that curcumin exhibited strong scavenging effects on ABTS and DPPH free radicals in a dose- and time-dependent manner. Meanwhile, curcumin also effectively inhibited the AAPH-induced hemolysis of erythrocytes. The hemolysis inhibition rate of curcumin increased to 52.78 \pm 1.03% at a concentration of 40 μM . The MTT assay showed that an increasing concentration of curcumin decreased the viability of A375 cells gradually. The cell viability after treatment with curcumin (40 μM) was only 21.50 \pm 1.60%. Further flow cytometric studies showed that the SubG1 peak (apoptotic cells) increased in response to increasing curcumin concentrations. The SubG1 peak (apoptotic cells) reached 63.30% when the curcumin concentration was 40 μM . Further studies by Western blot assay demonstrated that the curcumin-induced apoptosis in A375 cells was related to upregulation of JNK phosphorylation and downregulation of Akt phosphorylation.

Key words: curcumin; antioxidant activity; antitumor activity

近年来, 越来越多的研究表明, 细胞内自由基产生的损伤可以导致癌症、动脉粥样硬化、心血管疾病、

收稿日期: 2014-05-31

基金项目: 高等学校博士点基金新教师项目 (20110172120033), 国家自然科学基金青年基金项目 (31101278), 广东省产学研结合项目 (2012B091100075), “扬帆计划”引进创新创业团队专项资助 (201312 H05), 华南理工大学中央高校基本科研业务费 (2013ZZ0069) 资助

作者简介: 陈建平 (1986-), 男, 博士研究生, 研究方向为糖类物质及其药物制备与生物利用

通讯作者: 苏健裕 (1979-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为糖类物质及其药物制备与生物利用

免疫系统衰退和细胞衰老等多种疾病^[1,2], 摄入外源性的抗氧化剂能有效地预防或抑制这些疾病的发生。目前由于人工合成的抗氧化剂有一定的毒副作用, 可能会导致癌症或损伤肝脏, 因此寻找天然有效的抗氧化剂成为目前研究的热点问题^[3-4]。姜黄素 (curcumin) 是从姜科姜黄属植物姜黄根茎中提取的一种脂溶性酚类物质^[5]。研究表明, 姜黄素的结构中含有酚羟基, 在细胞膜发生脂质过氧化反应时, 其酚羟基可以发生氧化反应, 能有效终止自由基反应, 因而其表现出诸多生理活性, 比如抗氧化、抗肿瘤、防止衰老等诸多功效^[6], 成为近年来天然药物中的研究热点。尤其是姜黄

素的抗氧化和抗癌功能受到越来越多的关注。

从本世纪80年代开始,国际上对姜黄属中药及姜黄素的药理学作用已有概述,而抗癌则是姜黄素的主要药理活性之一,其抑制肿瘤的作用已在许多动物实验中得到反复证实,其具体抗癌机制已成为近期研究热点。目前,美国国立肿瘤研究所将其列为第3代肿瘤治疗药^[7]。然而,目前国内采用溶血实验和ABTS、DPPH法研究姜黄素的抗氧化活性还未见报道,且暂未见对A375黑色素瘤细胞生长状态影响的相关研究报告。因此,本文通过分光光度法考察姜黄素对ABTS自由基和DPPH自由基的清除能力及其对红细胞溶血的抑制能力,并对其抗肿瘤活性进行分析。从而探讨姜黄素的抗氧化和抗肿瘤性能,以期产业化开发姜黄素成为天然的抗氧化剂和潜在的化疗预防剂提供数据参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

姜黄素,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT),2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷)二盐酸盐(AAPH),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS),均购自Sigma公司;DMEM,胎牛血清,青霉素和链霉素,均购于美国Hyclone公司;红细胞取自正常成人静脉血;人黑色素瘤A375细胞购自美国ATCC公司。

1.2 仪器与设备

BP301S 电子天平,德国Sartorius公司;VERSAmax 酶标仪,美国Molecular Devices公司;TS100倒置显微镜,日本Nikon公司。

1.3 ABTS 自由基清除能力的测定

参考Chen等^[8]方法。用pH 7.4的PBS配制5 mM ABTS储备液,与过量的二氧化锰(MnO₂)反应后经0.2 μm的PVDF微孔滤膜,再用pH 7.4的PBS稀释到734 nm处吸光值为0.70±0.02,得到ABTS工作液。在96孔板的200 μL反应体系中,加入20 μL不同浓度的姜黄素溶液,然后加入180 μL的ABTS工作液,震荡混合后在734 nm处用酶标仪(SpectraMax 250)测定,每隔5 min测一次,持续30 min。以上操作均在室温下避光进行。反应体系中混合液在734 nm处的吸光值代表ABTS自由基的含量。

1.4 DPPH 自由基清除能力的测定

参考Chen等^[8]方法。取一定量的DPPH粉末,用甲醇溶解,配成6 mM的DPPH储备液。将DPPH储备液用甲醇稀释为60 μM的DPPH工作液。在96孔板中200 μL反应体系中,加入20 μL不同浓度的姜黄素溶液,然后加入180 μL的DPPH工作液,震荡混合后在515 nm处用酶标仪(SpectraMax 250)进行测定,每隔5 min测一次,持续30 min。以上操作均在室温下避光进行。反应体系中混合液在515 nm处的吸光值代表DPPH自由基的含量。

1.5 AAPH 诱导红细胞氧化性溶血^[9]

1.5.1 20%红细胞悬液的制备

将添加有肝素抗凝剂的新鲜健康成人血用离心机在4℃,1500 g下离心10 min,将血红细胞和血浆分离,血红细胞用PBS(pH=7.4)反复清洗2~3次,直至上清不显红色为止,吸取0.2 mL分离出的红细胞倒于EP管中,加入0.98 mL的PBS,配成浓度为20%红细胞悬液;血浆则置于4℃冰箱中备用。

1.5.2 姜黄素对AAPH诱导红细胞损伤的抑制

将配置好的20%血红细胞分成4组:(1)阳性对照组:加0.1 mL 20%血红细胞和0.3 mL的超纯水;(2)阴性对照组:加0.1 mL 20%血红细胞和0.3 mL的PBS;(3)氧化损伤模型组:加0.1 mL 20%血红细胞和0.1 mL 200 mM AAPH;(4)样品待测组:加入0.1 mL 20%血红细胞,然后分别加入0.2 mL不同浓度的姜黄素溶液,金属浴中孵育15 min后,再加入0.1 mL 200 mM AAPH。将上述四组放入金属浴中孵育3 h后1500 g离心10 min,然后每孔加200 μL于96孔板中,在540 nm处用酶标仪(SpectraMax 250)进行测定,按照下列公式计算溶血抑制率:

$$\text{溶血抑制率} = (1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{阳}}) \times 100\%$$

其中A_{样品}表示样品待测组的吸光值,A_阳表示阳性对照组的吸光值。

1.6 细胞培养

细胞复苏后培养在含10%胎牛血清,100 U/mL青霉素和50 U/mL链霉素的DMEM完全培养液中。细胞置于培养箱中培养(37℃,5% CO₂),根据细胞的生长状态传代,取对数生长期细胞用于以下的各个实验。

1.7 MTT 测定细胞存活率

将A375细胞以1.5×10⁴个细胞/孔接种于96孔培养板,置于培养箱中(37℃,5% CO₂)培养24 h后,加入含有不同浓度的姜黄素培养基100 μL/孔,继续培养72 h。往培养板加入MTT(5 mg/mL)20 μL/孔,37℃

孵育 4 h 后弃上清, 加入 DMSO 150 μL /孔, 振荡 10 min, 紫色结晶物充分溶解后, 在 570 nm 处用酶标仪 (SpectaMax 250) 测定各孔吸光度值。以对照组吸光度为 100%, 计算药物处理组细胞存活率, 同时作图求得半数抑制浓度 (IC_{50})。细胞存活率的计算公式如下:

$$\text{细胞存活率}(\%) = A_i/A_0 \times 100\%$$

其中, A_i 表示加入药物后在 570 nm 处的吸光度; A_0 表示空白对照组在 570 nm 处的吸光度。

1.8 流式细胞仪检测其细胞凋亡情况^[9]

以 1.5×10^4 个细胞/皿接种 A375 细胞到 6 cm 培养皿, 预培养 24 h 后, 加入不同浓度姜黄素, 继续培养 72 h 后, 去掉培养液, 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 培养液吹打后收集, 1600 r/min 离心 5 min, 倒掉上清, 加入 1 mL 预冷的 70% 乙醇, -20°C 固定放置过夜; 次日, 离心 (1600 r/min, 5 min) 收集细胞, PBS 洗 2 次, 加 PI 工作液 500 μL , 避光染色 15 min。上机前, 细胞用 300 目 (孔径 40~50 μm) 尼龙网过滤, 上机检测。利用 Beckman 流式细胞分析仪测定细胞 DNA 含量, 每个样品分析 10000 个细胞, 应用软件 Multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA) 记录各时相细胞的 DNA 的含量, 凋亡细胞含有亚二倍体 DNA, 细胞比例通过定量图中 Sub-G1 凋亡峰计算。

1.9 Western blotting 检测 JNK 和 Akt 磷酸化的水平

的水平

姜黄素 (终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$) 处理 A375 细胞 72 h 后, 收集细胞并用 RIPA 裂解液来裂解细胞后提取蛋白, 通过 BCA 试剂盒测定对照组和姜黄素组的蛋白浓度。以不加药为对照组。样品经 SDS-PAGE 电泳分离, 电转至硝酸纤维素膜 (110 V, 1 h), 膜在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入 p-JNK、T-JNK、p-Akt、T-Akt 和 β -actin 一抗后 4°C 过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min 后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温振荡 2 h。用 ECL 试剂盒进行化学发光, 在 X 光片上显影, 放入洗片机洗片, 观察结果。以 β -actin 作为内参照。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度姜黄素清除 ABTS 和 DPPH 自由基的能力

体外测定物质抗氧化能力的方法有比色法, 化学发光法, 荧光法, 和电子自旋共振等^[10]。然而, 这些

方法大多数是针对清除某一种自由基而言, 并不能反映出其总抗氧化能力。目前, 测定物质体外总抗氧化能力的方法有很多, 其中 ABTS 法和 DPPH 法被普遍采用。ABTS 法最先由 Miller 等人用于测定生物样品的抗氧化能力^[11]。该方法主要原理是 ABTS 经活性氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 ABTS^+ , 其在 734 nm 处有最大吸收峰, 若加入物质具有抗氧化性, 则能与 ABTS^+ 发生反应从而使反应体系褪色, 使得其在 734 nm 处的吸光度发生变化^[10]。如图 1a 所示, 在 ABTS 自由基溶液中分别加入不同浓度的姜黄素 (终浓度为 5、10、20、40 μM) 后, 体系的特征吸收峰 A_{734} 在 1 min 内显著下降, 在 10 min 后, 体系基本趋于平衡, 达到稳定状态。并且, 随着姜黄素浓度的提高, 体系的特征吸收峰 A_{734} 下降得越快。上述结果表明, 姜黄素对 ABTS 的清除能力呈现出明显的时间和浓度效应。

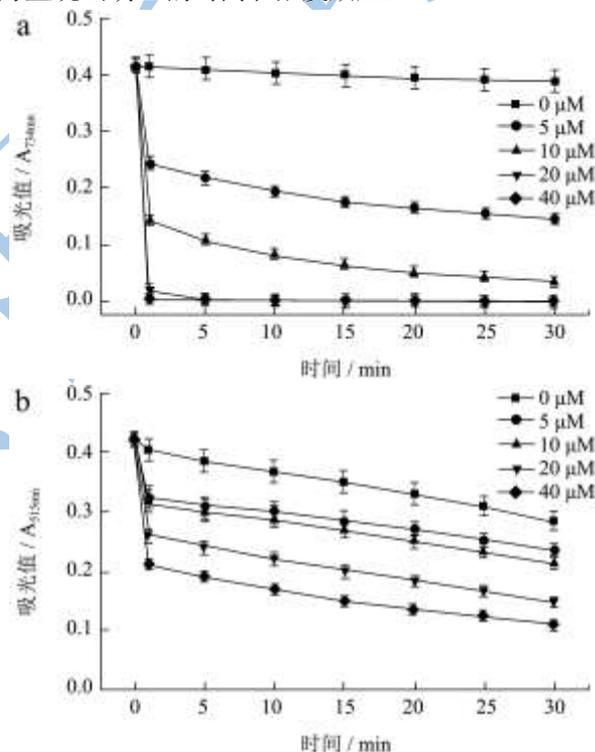


图 1 不同浓度的姜黄素对 ABTS (a) 和 DPPH (b) 自由基清除率的影响

Fig.1 Scavenging effects of different concentrations of curcumin on ABTS (a) and DPPH (b)

而对于 DPPH 法, 其主要原理是 DPPH 在溶液中生成一个稳定的含氮自由基且该溶液呈典型的紫色, 在紫外-可见 (UV-Vis) 光区具有较强的吸收光谱。当 DPPH 溶液中加入抗氧化剂时, 由于其自由基清除作用使 DPPH 紫色消退导致吸收光谱强度随加入的抗氧化剂的量的增加而减^[12]。如图 1B 所示, 在 DPPH 甲醇溶液中分别加入不同浓度的姜黄素 (终浓度为 5、10、20、40 μM) 后, 体系的特征吸收峰 A_{734} 随着作用时间和姜黄素浓度

的增加而呈现出明显下降趋势,表明姜黄素对DPPH的清除能力也表现出时间和浓度效应。综上所述,姜黄素对ABTS和DPPH均具有较好的清除能力,并呈现出浓度和时间依赖性。

2.2 姜黄素对 AAPH 诱导红细胞溶血的抑制作用

表 1 不同浓度的姜黄素对 AAPH 诱导血红细胞损伤的保护

Table 1 Concentration-dependent attenuation of AAPH-induced damages in erythrocytes by curcumin

组别	溶血抑制率/%
AAPH 损伤模型组	5.07±0.78 ^a
阴性对照组	92.47±0.78
5μM Curcumin+AAPH	30.56±1.25 ^{b**}
10μM Curcumin+AAPH	38.49±1.47 ^{c**}
20μM Curcumin+AAPH	32.51±1.62 ^{d**}
40μM Curcumin+AAPH	52.78±1.03 ^{e**}

注:组间比较 $P<0.05$ 用不同字母表示;与阴性对照组相比, $P<0.01$ 用**表示。

红细胞膜富含不饱和脂肪酸,AAPH是常见的水溶性自由基,其在生理温度下通过热分解产生的自由基能够进攻红细胞膜上的不饱和脂肪酸引发脂质过氧化最终导致溶血。由于AAPH产生自由基的速率容易监测,因而被认为是研究体内抗氧化的理想模型。故本实验采用AAPH自由基攻击血红细胞膜,考察姜黄素对AAPH诱导红细胞溶血的抑制作用。从表1可以看出,随着姜黄素浓度的升高,溶血抑制率呈逐渐上升趋势,从30.56±1.25%提高到52.78±1.03%,表现出明显的剂量依赖关系。实验结果表明,姜黄素能有效的抑制AAPH诱导红细胞溶血,具有较好的保护血红细胞的功效,可以明显的缓解溶血现象。

2.3 不同浓度姜黄素对 A375 黑色素瘤细胞存

活率的影响

在抗肿瘤药物的体外筛选中,MTT法被广泛用来测定细胞的存活率。MTT,化学名为3-(4,5)-2-噻唑-(2,5)-二苯基溴化四氢唑蓝,其有效成分四唑蓝能与活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶作用而被还原为不溶于水的蓝色结晶-甲瓚(formazan)并沉淀在细胞中,而死细胞则无此功能。利用MTT这一特性,经其染色后生成的甲瓚用DMSO溶解后在570 nm处有最大吸收峰,通过其吸光度来计算出细胞的存活率^[3]。由图2所示,随着姜黄素浓度的提高,A375的存活率呈逐渐下降的趋势,且当姜黄素浓度为40 μM时,其细胞存活率达到最低为21.50±1.60%,与对照组相比,差异显著($P<0.01$)。表明,姜黄素对A375细胞具有较好抑制其细胞生长的活性。

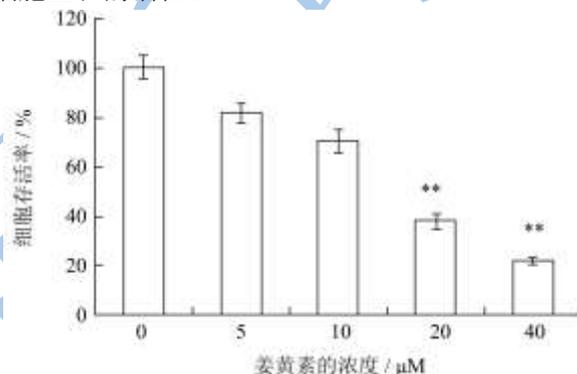


图 2 不同浓度的姜黄素对 A375 细胞存活率的影响

Fig.2 Concentration-dependent effects of curcumin on the viability of A375 cells

注:与空白对照组相比, $P<0.01$ 用**表示。

2.4 流式细胞仪分析姜黄素对 A375 黑色素瘤细胞的凋亡情况

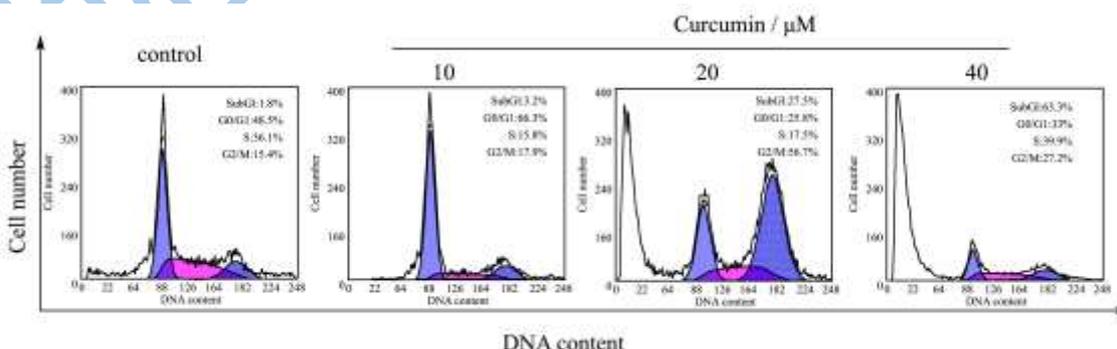


图 3 不同浓度的姜黄素对 A375 细胞周期的影响

Fig.3 Concentration-dependent effects of curcumin on cell cycle progression of A375 cells

流式细胞仪检测细胞凋亡是通过检查其光射特征及荧光参数进行的^[4]。细胞凋亡过程中核酸内切酶在DNA分子核小体间的降解,导致小分子DNA漏出,核DNA含量下降,细胞荧光染色后作流式细胞仪分析,可以发现在DNA直方图上正常二倍体细胞的Go/G1峰前出现一个亚二倍体峰(Sub-G1峰,即AP峰- apoptotic peak),代表凋亡细胞。根据此亚二倍体峰可以计算凋亡细胞的百分率。从图3可知,随着姜黄素浓度的升高,凋亡细胞的百分率(SubG1)从对照组的1.8%升高到63.3%。表明,姜黄素主要是通过诱导细胞凋亡来抑制A375黑色素瘤细胞的增殖。

2.5 姜黄素对 JNK 和 Akt 蛋白磷酸化的影响

细胞凋亡,又称程序性死亡,是指机体细胞在生理条件下发生的一种自杀性行为,它的发生受到机体的严密调控。JNK又称为c-Jun氨基末端激酶,是促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)超家族的成员之一。JNK信号通路可被细胞因子、生长因子、应激等多种因素激活,在促进细胞凋亡、抑制细胞增殖等方面起着关键作用。而PI3K-Akt信号通路也是细胞内重要信号转导通路之一,在抑制细胞凋亡、促进细胞增殖等方面发挥着重要作用。因此,本文运用Western blotting检测A375黑色素瘤细胞经姜黄素处理72 h后,细胞内JNK和Akt蛋白表达水平的影响。实验结果表明,相比对照组,姜黄素处理组中的JNK磷酸化表达水平明显升高(图a),而Akt磷酸化表达水平明显下降(图b)。

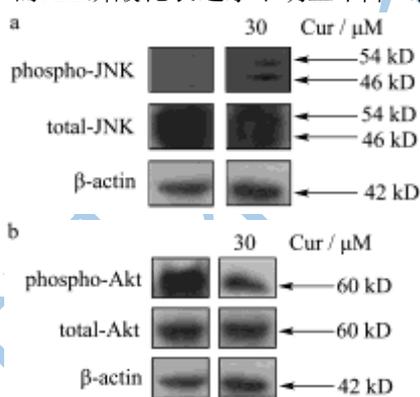


图4 姜黄素对 A375 细胞内 JNK (a) 和 Akt (b) 磷酸化表达水平的影响

Fig.4 Effect of curcumin on the expression levels of phosphorylated JNK (a) and Akt (b) in A375 cells

3 结论

3.1 本实验采用ABTS法和DPPH法考察了姜黄素清除自由基的能力,结果表明,姜黄素对ABTS和DPPH自由基的清除能力均表现出浓度和时间剂量效应。以

人血红细胞为研究对象,建立了AAPH诱导红细胞氧化损伤模型,证明了姜黄素对红细胞溶血的抑制作用,为姜黄素抗氧化活性检测提供了一种行之有效的模拟体内环境的方法。本研究将为开发新的天然无害抗氧化剂提供了新的思路和资源。

3.2 通过MTT实验考察了姜黄素对A375细胞的存活率,并用流式细胞仪和Western blot进行分析。结果表明,姜黄素主要是通过上调JNK磷酸化的表达水平和下调Akt磷酸化的表达水平来诱导A375细胞凋亡。本研究对姜黄素在膳食预防、化学预防治疗癌症等方面的运用提供了广阔前景。

参考文献

- [1] Jiang SH, Wang C L, Chen ZQ, et al. Antioxidant properties of the extract and subfractions from old leaves of toona sinensis roem (meliaceae) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2009, 33(3): 425-441
- [2] Mark A. Trying to unlock the mysteries of free radicals and antioxidants [J]. The Scientist, 1996, 9(30): 113-16
- [3] Marina C, Simone B, Riccardo M, et al. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (Corylus avellana L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature [J]. Food Chemistry, 2008, 110: 659
- [4] Gioti EM, Fiamegos YC, Skalkos DC, et al. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of Hypericum perforatum L from Epirus, Greece [J]. Food Chemistry, 2009, 117(3): 398-404
- [5] Ammon HPT, Wahl MA. Pharmacology of curcuma longa [J]. Planta Medica, 1991, 57(1): 1
- [6] Surh Y J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals [J]. Nature Reviews Cancer, 2003, 3: 768-780
- [7] 崔淑香,金东庆,周玲,等.姜黄素抗肿瘤实验观察[J].肿瘤防治杂志,2002,9(1):50-52
Cui SX, Jin DQ, Zhou L, et al. Study on antitumor effects of curcumin [J]. China Journal of Cancer Prevention and Treatment. 2002, 9(1): 50-52
- [8] Chen TF, Wong YS. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched spirulina platensis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56, 4352-4358
- [9] Zhao L, Chen JP, Su JY, et al. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of 5-Hydroxymethylfurfural [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(44): 10604-10611
- [10] 朱玉昌,焦必宁.ABTS法体外测定果蔬类总抗氧化能力的研

- 究进展[J].食品工业与发酵,2005,31(8):77-80
- ZHU Yu-Chang, JIAO Bi-ning. Research progress on ABTS assay in determination of TAA in fruits and vegetables in vitro [J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(8): 77-80
- [11] Miller N J, Rice-Evans C A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates [J]. Clinical Science, 1993, 84: 407-412
- [12] 李铨军,崔胜云.抗坏血酸清除DPPH自由基的作用机理[J].食品科学,2011,32(1):86-90
- LI Xuan-jun, CUI Sheng-yun. DPPH radical scavenging mechanism of ascorbic acid [J]. Food Science, 2011, 32(1): 86-90
- [13] 冯春琼,马文丽,宋艳斌,等.细胞凋亡的MTT染色法检测[J].第一军医大学学报,2002,22(3):262-266
- Feng YQ, Ma WL, Song YB, et al. Detection of cell apoptosis by MTT assay [J]. Journal of First Military Medical University, 2002, 22(3): 262-266
- [14] 史玉荣,魏熙胤,杨毅,等.流式细胞仪检测甘草多糖对小鼠S-180肉瘤的凋亡诱导作用[J].现代仪器,2005,4:30-32
- SHI Yu-rong, WEI Xi-yi, YANG Yi, et al. Detecting induced apoptosis effect of the glycyrrhizia ployaccharide with flow cytometer (FCM) [J]. Modern Instruments, 2005, 4: 30-32