地榆水煎液对辐照所致血小板减少症的治疗作用

曹 娅， 杨 馨， 陈 旺， 张 丹， 吴建明， 杨 靖*
（西南医科大学药学院，四川 泸州 646000）

摘要：目的 研究地榆水煎液对辐照（X 射线）所致血小板减少症的治疗作用。**方法** 采用 4 Gy X 射线全身照射小鼠。除正常组小鼠外，所有辐照小鼠分为模型组，地榆水煎液低、中、高剂量组，rhTPO 组。给药期间，检测小鼠外周血血小板计数及骨髓单核细胞计数，HE 染色观察小鼠骨髓病理改变，免疫组化法和 Western blot 法检测小鼠骨髓细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达。**结果** 与模型组比较，地榆水煎液能对抗 X 射线诱导小鼠血小板降低，提高骨髓单核细胞水平，改善骨髓损伤，降低骨髓细胞 Bax 蛋白表达，并增加 Bcl-2 蛋白表达。**结论** 地榆水煎液可促进辐照小鼠血小板恢复，其作用机制可能与抑制骨髓细胞凋亡，发挥骨髓保护作用有关。

关键词：地榆；血小板减少症；辐照；凋亡
中图分类号：R285.5 **文献标志码**：B **文章编号**：1001-1528(2023)05-1634-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.05.042

近年来，癌症的发生率持续上涨，放射治疗（即放疗）作为癌症的一种常规治疗方法，在杀死癌细胞的同时，也不可避免地损伤正常细胞[1]。骨髓作为造血的主要部位，对电离辐射极为敏感[2-3]，剂量大于 1 Gy 的 X 射线即可诱导骨髓细胞损伤[4]。因此，骨髓抑制被认为是癌症患者接受放疗时常见不良反应之一[5]。严重的骨髓抑制可导致患者外周血细胞水平降低，进而出现贫血、失血、感染等症状[6]。其中，血小板减少症即为癌症放疗患者预后不良的一个重要因素[7-8]。

目前，药物治疗仍然是血小板减少症的首选治疗方法，一线治疗药物包括糖皮质激素[9]、人免疫球蛋白[10]、利妥昔单抗[11]、重组人血小板生成素[12]等。这些药物在临床应用中显示出一定的疗效，短期内能有效控制病情，但用药时间长、停药复发、不良反应显著、药物耐受、价格昂贵等问题始终困扰临床[13]。鉴于此，寻找长效、低毒、价廉的促血小板生成药物依然是重要的研究方向。

中药具有应用时间长、疗效肯定、不良作用少、相对低廉的特点，为本病的临床治疗与基础研究提供新的思路[14-15]。地榆具有凉血止血、解毒敛疮之功效，广泛用于治疗烧烫伤、出血、腹泻、十二指肠溃疡、慢性肠道感染等病症[16]，基于地榆“止血”的传统认识，本研究评价地榆水煎液对辐照所致血小板减少症的治疗效应，并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 *动物* SPF 级昆明小鼠，雌雄各半，体质量 18~22 g，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（辽）2015-0001。动物饲养于西南医科大学实验动物中心，实验动物使用许可证号 SYXK（川）2018-213，温度 25~26 ℃，相对湿度 45%~70%，12 h/12 h 明暗交替，自由饮水进食。所有动物实验过程均经西南医科大学伦理委员会批准（伦理号 20170341）。

1.2 *试剂与药物* 地榆饮片购自成都仁济宏药业有限公司，批号 190701，经西南医科大学药学院税丕先教授鉴定为蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 的干燥根。重组人血小板生成素（rhTPO）注射液（沈阳三生制药有限责任公司，批号 202008048）；血细胞分析仪试剂配套［上海希森美康医用电子（上海）有限公司，批号 G00006］；Bcl-2、Bax 抗体（美国 Proteintech 公司，批号 00093692、10005017）；β-actin 抗体、小鼠抗兔 IgG 单抗（美国 CST 公司）；SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（上海雅酶生物医药科技有限公司，批号 03553300）；蛋白浓度快速测定液（美国 Bio-Rad 公司，批号 64343608）；ECL 电化学发光试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，批号 7E412E0）；HE 染液套装、组化试剂盒（武汉赛维尔生物科技有限公司，批号 CR2107043、CR2108087）。

1.3 *仪器* XT-1800i 型全自动血液分析仪［希森美康医用

收稿日期：2021-09-10
基金项目：国家自然科学基金项目（81774013，81804221）；四川省科技厅项目（2019YJ0473）；四川省教育厅项目（18ZA0525）；四川省中医药管理局项目（2018JC013，2018JC038）；泸州市科技计划项目［2017-S-39（3/5）］；西南医科大学校级基金项目（2017-ZRZD-017，2017-ZRQN-081）
作者简介：曹 娅（1996—），女，硕士生，研究方向中药药理学。Tel：18715838013，E-mail：944148677@qq.com
*通信作者：杨 靖（1986—），男，博士，讲师，研究方向中药药理学。Tel：18783011238，E-mail：yangjing0617@swmu.edu.cn
网络出版日期：2022-03-28
网络出版地址：https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220325.1750.010.html

电子（上海）有限公司]；Powerpac HC 型电泳及转膜仪、ChemiDocXRS 型凝胶成像仪（美国 Bio-Rad 公司）；SHZ-D（Ⅲ）型循环水真空泵（浙江黄岩求精真空泵厂）；EYEL4 型旋转蒸发仪（上海爱郎仪器有限公司）；Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜（日本尼康公司）；JJ-12J 型脱水机、JB-P5 型包埋机（武汉俊杰电子有限公司）；RM2016 型病理切片机（上海徕卡仪器有限公司）；KF-PRO-002 型数字病理切片扫描仪（宁波江丰生物信息技术有限公司）。

2 方法

2.1 地榆水煎液制备 取地榆饮片 120 g，加 8 倍量水浸泡 30 min，煮沸 40 min，过滤，滤渣加水复煎 2 次，分别煎 25、15 min，合并 3 次滤液，旋转蒸发浓缩至 150 mL，得地榆水煎液（生药量 0.8 g/mL），分装于 2 mL EP 管中，置于-80 ℃冰箱中保存备用。

2.2 动物建模、分组与给药 48 只昆明小鼠随机分为 2 组，正常组 8 只，造模组 40 只，造模组小鼠给予 X 射线单 4 Gy 全身照射。辐照后依据小鼠外周血血小板计数将辐照小鼠随机分为模型组（灌胃给予等体积生理盐水），地榆水煎液低、中、高剂量组（灌胃给予地榆水煎液 0.25、0.5、1 g/kg），rhTPO 组（腹腔注射 rhTPO 注射液 3 000 U/kg），每组 8 只，各组小鼠分别给予对应的药物或生理盐水，每天 1 次，连续 11 d。

2.3 外周血血小板检测 给药第 4、7、11 天眼底静脉丛采血 40 μL，用 160 μL 血细胞稀释液稀释并混匀，2 h 内通过全自动血细胞分析仪检测外周血血小板计数。

2.4 骨髓单核细胞计数及脏器指数检测 给药第 11 天，小鼠脱颈椎处死。剥离小鼠双侧股骨，用 2 mL 生理盐水冲洗股骨内部至发白，冲出的骨髓液经 200 目尼龙网过滤，即得小鼠骨髓单核细胞悬液。通过全自动血细胞分析仪测定小鼠骨髓单核细胞数目，剥离小鼠肝脏、脾脏、肾脏，称定质量并计算脏器指数。

2.5 骨髓病理形态观察 参考文献［17］报道，剥离小鼠双侧股骨，用 10% 中性福尔马林固定液固定后，依次脱钙、脱水浸蜡、包埋并切片，切片厚度为 4 μm。切片经脱蜡、苏木精染色、伊红染色、脱水封片后在光学显微镜（×200）下采集图像，并分析巨核细胞计数差异（图中黄色箭头指示巨核细胞）。

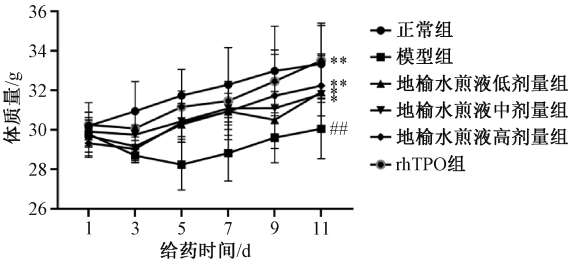
2.6 免疫组化染色检测小鼠骨髓细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达 取“2.5”项下切片，经脱蜡脱水、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭、一抗 4 ℃孵育过夜、二抗室温孵育 50 min、DAB 显色、复染细胞核、脱水封片后，在光学显微镜（×200）下采集图像。图中棕黄色区域显示阳性表达。运用 Image J 软件分析阳性总面积。

2.7 Western blot 法检测骨髓细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达 取“2.4”项下小鼠骨髓细胞悬液，提取总蛋白。经制胶、上样（30 μg）、电泳、湿法转膜、5% 脱脂奶粉封闭、一抗 4 ℃孵育过夜、二抗室温孵育 1 h 后，加入 ECL 发光液显影并获取图像。以 β-actin 为内参，Image J 软件计算灰度值。

2.8 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行数据分析并作图，数据以（$\bar{x}\pm s$）表示，若各组样本数据符合正态分布及方差齐性，则多组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析；独立的 2 组数据之间比较采用独立样本 t 检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 地榆水煎液对辐照小鼠一般情况的影响 与正常组比较，模型组小鼠接受辐照后表现为活动和进食量减少，体质量减轻（$P<0.01$），脱毛；与模型组比较，地榆水煎液各剂量组小鼠一般情况有所改善，表现为活动与进食增加，体质量恢复（$P<0.05$，$P<0.01$），见图 1。



注：与正常组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 1 各组小鼠体质量（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

3.2 地榆水煎液对辐照小鼠脾脏、肝脏、肾脏指数的影响 与正常组比较，模型组小鼠肝脏指数升高（$P<0.01$），脾脏指数降低（$P<0.01$），肾脏指数无明显变化（$P>0.05$）；与模型组比较，地榆水煎液各剂量组与 rhTPO 组小鼠脾脏和肝脏指数均有恢复的趋势，但差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 1。

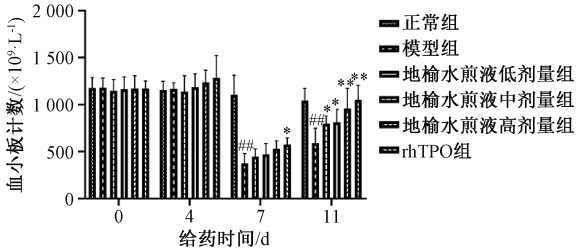
表 1 地榆水煎液对辐照小鼠脾脏、肝脏、肾脏指数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	脏器指数/(mg·g^{-1})		
	脾脏指数	肝脏指数	肾脏指数
正常组	3.55±0.49	42.51±1.83	13.10±1.26
模型组	2.76±0.46$^{\#\#}$	47.11±1.75$^{\#\#}$	14.30±1.01
地榆水煎液低剂量组	3.02±0.23	46.72±2.53	13.90±0.73
地榆水煎液中剂量组	3.16±0.33	44.50±1.28	13.80±0.96
地榆水煎液高剂量组	3.10±0.39	44.70±1.56	13.43±0.84
rhTPO 组	2.99±0.58	43.61±4.38*	14.10±1.14

注：与正常组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$。

3.3 地榆水煎液对辐照小鼠外周血血小板计数的影响 与正常组比较，在给药第 7、11 天时，模型组小鼠外周血血

小板计数减少（$P<0.01$）；与模型组比较，在给药第 11 天时，地榆水煎液各剂量组与 rhTPO 组小鼠外周血血小板计数增加（$P<0.05$，$P<0.01$），见图 2。



注：与正常组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 2 各组小鼠外周血血小板计数（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

3.4 地榆水煎液对辐照小鼠骨髓单核细胞的影响 与正常组比较，模型组小鼠骨髓单核细胞数减少（$P<0.01$）；与模型组比较，地榆水煎液高剂量组骨髓单核细胞数增加（$P<0.05$），见表 2。由于地榆水煎液高剂量组小鼠治疗效果优于中、低剂量组，故后续实验选用地榆水煎液高剂量组。

表 2 地榆水煎液对辐照小鼠骨髓单核细胞的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	骨髓单核细胞数/($\times10^7\cdot L^{-1}$)
正常组	2.19±0.25
模型组	1.40±0.39$^{\#\#}$
地榆水煎液低剂量组	1.72±0.55
地榆水煎液中剂量组	1.80±0.20
地榆水煎液高剂量组	1.98±0.44*
rhTPO 组	1.77±0.30

注：与正常组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$。

3.5 地榆水煎液对辐照小鼠骨髓病理形态的影响 与正常组比较，模型组小鼠骨髓组织结构松散，有核细胞（包括巨核细胞，黄色箭头示）减少，脂肪细胞（无染色区域）数量增加，血窦结构不清晰并伴有出血；地榆水煎液高剂量组和 rhTPO 组小鼠上述病理改变减轻，骨髓组织密度增加，见图 3。与正常组比较，模型组小鼠骨髓巨核细胞计数减少（$P<0.01$）；与模型组比较，地榆水煎液高剂量组与 rhTPO 组小鼠骨髓巨核细胞计数增加（$P<0.05$，$P<0.01$），见表 3。

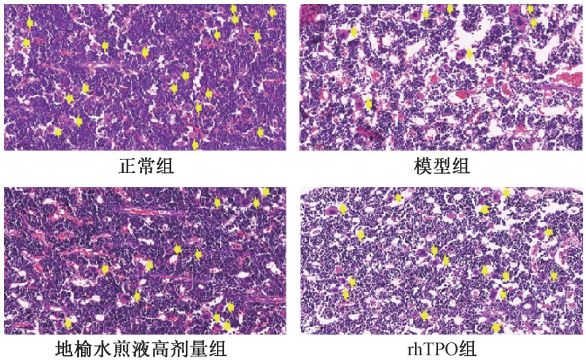


图 3 各组小鼠骨髓巨核细胞 HE 染色图（×200）

表 3 地榆水煎液对辐照小鼠骨髓巨核细胞计数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	骨髓巨核细胞计数/个
正常组	22.33±0.58
模型组	6.00±1.00$^{\#\#}$
地榆水煎液高剂量组	15.67±3.51*
rhTPO 组	22.33±6.43**

注：与正常组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

3.6 地榆水煎液对辐照小鼠骨髓细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 与正常模型组比较，模型组小鼠骨髓细胞 Bax 蛋白表达阳性总面积、灰度值升高（$P<0.01$），Bcl-2 蛋白表达阳性总面积、灰度值降低（$P<0.01$）；与模型组比较，地榆水煎液高剂量组小鼠骨髓细胞 Bax 蛋白表达阳性总面积、灰度值降低（$P<0.01$），Bcl-2 蛋白表达阳性总面积、灰度值升高（$P<0.01$），见图 4、表 4。与正常组比较，模型组小鼠骨髓细胞 Bax/Bcl-2 比值升高（$P<0.01$）；与模型组比较，地榆水煎液各剂量组与 rhTPO 组辐照小鼠骨髓 Bax/Bcl-2 比值降低（$P<0.01$），见图 5。

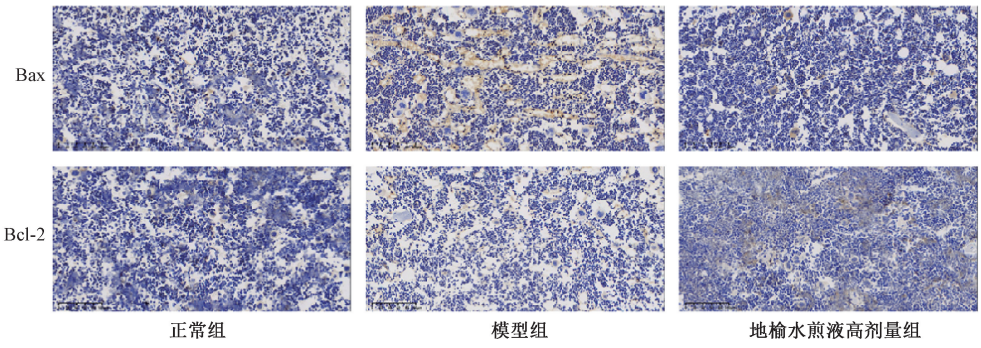
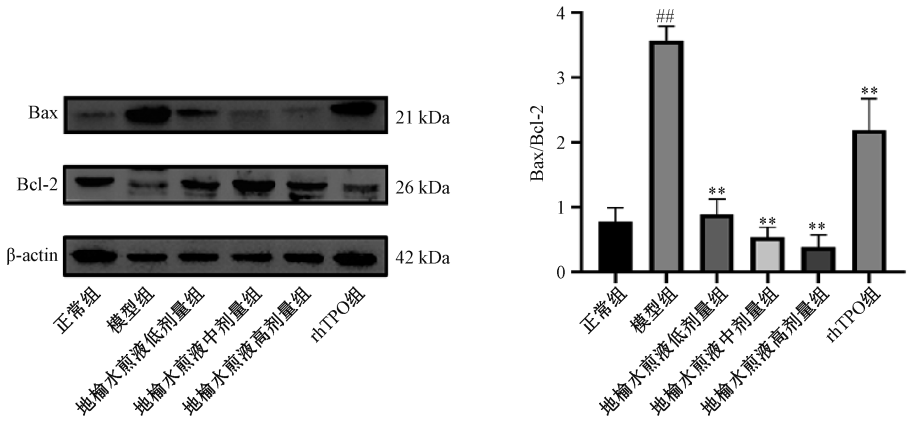


图 4 各组小鼠骨髓细胞 Bax、Bcl-2 蛋白免疫组化图（×200）

4 讨论

骨髓抑制，又称骨髓毒性，是放疗的主要不良反应[18]，是引起外周血细胞异常的重要原因之一[19-22]，严重的骨髓抑制甚至威胁患者生命。目前，传统中药已广泛用于肿瘤相关并发症的治疗，尤其在减少放疗不良反应、促进机体恢复方面表现出巨大潜力[18,23-24]。本研究基于 X 射线诱导的血小板减少症小鼠模型评价地榆水煎液对放疗所致血小板减少症的治疗效应，结果提示，地榆水煎液能促



注：与正常组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$。

图 5 地榆水煎液对辐照小鼠骨髓细胞 Bax/Bcl-2 比值的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

表 4 地榆水煎液对辐照小鼠骨髓细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Bax	Bcl-2
正常组	212.33±79.83	1 033.33±29.14
模型组	2 688.67±101.32$^{\#\#}$	137.00±35.54$^{\#\#}$
地榆水煎液高剂量组	203.67±95.57**	2 791.33±39.11**

注：与正常组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$。

进辐照小鼠血小板生成，而且对外周血细胞水平均有不同程度的恢复作用。另外，骨髓是主要造血器官，辐照可诱导骨髓细胞凋亡，进而抑制造血功能，使外周血细胞数减少。因此，骨髓细胞数量一定程度上能反映骨髓造血功能。本研究发现，辐照小鼠骨髓单核细胞数减少，而在高剂量地榆水煎液干预后，辐照小鼠骨髓单核细胞数减少的趋势被抑制，提示地榆水煎液具有骨髓保护作用，该结果亦经骨髓细胞 HE 染色证实。

骨髓组织受到电离辐射损伤时，脾脏、肝脏、肾脏等髓外造血器官同样受到不同程度的损害[25-26]。本研究结果显示，与正常小鼠比较，辐照小鼠肝脏指数升高，脾脏指数降低，提示辐照可能引起肝脾损伤；经地榆水煎液干预后，肝脏和脾脏指数有恢复正常的趋势。由此推测，地榆水煎液除具有骨髓保护作用外，对辐照所致髓外造血器官损伤亦具有一定的保护作用。

辐照诱导骨髓细胞凋亡还体现在凋亡信号分子的过度活化。原癌基因 Bcl-2 家族（包括 Bax、Bcl-2 等）参与调控细胞凋亡信号活性。Bax 和 Bcl-2 分别是促凋亡和抗凋亡调节蛋白，功能上彼此拮抗，共同调节细胞凋亡进程，Bax/Bcl-2 比值体现 Bax 和 Bcl-2 的定量调控关系[27-28]。本研究通过免疫组化法和 Western blot 分析发现，辐照所致骨髓细胞凋亡表现出 Bax 蛋白表达升高以及 Bcl-2 蛋白表达降低的特点，而地榆水煎液干预则逆转上述趋势，故推测 Bax/Bcl-2 比值是地榆水煎液发挥骨髓保护作用的重要调控环节之一。

综上所述，本研究以 X 射线致血小板减少症小鼠模型为基础，发现地榆水煎液通过抑制骨髓细胞凋亡发挥骨髓保护作用，进而改善辐照所致血小板减少症，该结果一定程度上印证了地榆“止血”的传统功用，初步阐释了地榆“止血”功效的科学内涵，同时为癌症放疗所致血小板减少症的治疗提供新的思路。

参考文献：

[1] Lo W J, Lin C L, Chang Y C, *et al*. Total body irradiation tremendously impair the proliferation, differentiation and chromosomal integrity of bone marrow-derived mesenchymal stromal stem cells[J]. *Ann Hematol*, 2018, 97(4): 697-707.

[2] Du J C, Cheng Y, Dong S H, *et al*. Zymosan-a protects the hematopoietic system from radiation-induced damage by targeting TLR2 signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(2): 457-464.

[3] Akeem S, Lukman O, Eltahir K, *et al*. Bone marrow and peripheral blood cells toxicity of a single 2.0 Gy Cobalt^{60} ionizing radiation: an animal model[J]. *Ethiop J Health Sci*, 2019, 29(2): 195-202.

[4] Hendry J H, Otsuka K. The role of gene mutations and gene products in intestinal tissue reactions from ionising radiation[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2016, 770(Pt B): 328-339.

[5] Liu F, Wang Z Z, Li W J, *et al*. The mechanisms for the radioprotective effect of beta-d-glucan on high linear-energy-transfer carbon ion irradiated mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 131: 282-292.

[6] He M J, Wang N, Zheng W X, *et al*. Ameliorative effects of ginsenosides on myelosuppression induced by chemotherapy or radiotherapy[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113581.

[7] Hofman M S, Violet J, Hicks R J, *et al*. [^{177}Lu]-PSMA-617 radionuclide treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (LuPSMA trial): a single-centre, single-arm, phase 2 study[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(6): 825-833.

[8] Lee A Y, Golden D W, Bazan J G, *et al*. Hematologic nadirs during chemoradiation for anal cancer: temporal characterization and dosimetric predictors[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2017, 97(2): 306-312.

[9] Kado R, McCune W J. Treatment of primary and secondary

immune thrombocytopenia[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2019, 31(3): 213-222.

[10] Samson M, Fraser W, Lebowitz D. Treatments for primary immune thrombocytopenia: a review[J]. *Cureus*, 2019, 11(10): e5849.

[11] Salama A. Emerging drugs for immune thrombocytopenia (ITP)[J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2017, 22(1): 27-38.

[12] Castaman G, Pieri L. Management of thrombocytopenia in cancer[J]. *Thromb Res*, 2018, 164 Suppl 1: S89-S93.

[13] Depré F, Aboud N, Mayer B, *et al*. Efficacy and tolerability of old and new drugs used in the treatment of immune thrombocytopenia: results from a long-term observation in clinical practice[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198184.

[14] Wang R Y, Wang M, Zhou J H, *et al*. Saponins in Chinese herbal medicine exerts protection in myocardial ischemia-reperfusion injury: possible mechanism and target analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 570867.

[15] Chang J R, Xavier H W, Chen D F, *et al*. Potential role of traditional Chinese medicines by Wnt/β-Catenin pathway compared with targeted small molecules in colorectal cancer therapy[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 690501.

[16] Jang E, Inn K S, Jang Y P, *et al*. Phytotherapeutic activities of sanguisorba officinalis and its chemical constituents: a review[J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(2): 299-318.

[17] Guo L, Kapur R, Aslam R, *et al*. Antiplatelet antibody-induced thrombocytopenia does not correlate with megakaryocyte abnormalities in murine immune thrombocytopenia[J]. *Scand J Immunol*, 2018, 88(1): e12678.

[18] Hou B N, Liu R, Qin Z, *et al*. Oral Chinese herbal medicine as an adjuvant treatment for chemotherapy, or radiotherapy, induced myelosuppression: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 3432750.

[19] Kotzin J J, Spencer S P, McCright S J, *et al*. The long non-coding RNA Morrbid regulates Bim and short-lived myeloid cell lifespan[J]. *Nature*, 2016, 537(7619): 239-243.

[20] Tikhonova A N, Dolgalev I, Hu H, *et al*. The bone marrow microenvironment at single-cell resolution[J]. *Nature*, 2019, 569(7755): 222-228.

[21] Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, *et al*. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(1): 38-48.

[22] Liu Z L, Zhang H D. Abnormally short erythrocyte lifespan in three patients with primary myelofibrosis despite successful control of splenomegaly[J]. *Am J Med Sci*, 2021, 361(2): 274-277.

[23] Wang Z X, Qi F H, Cui Y G, *et al*. An update on Chinese herbal medicines as adjuvant treatment of anticancer therapeutics[J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(3): 220-239.

[24] Liu Y Q, Wang X L, He D H, *et al*. Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals[J]. *Phytomedicine*, 2021, 80: 153402.

[25] Han N K, Jung M G, Jeong Y J, *et al*. Plasma fibrinogen-like 1 as a potential biomarker for radiation-induced liver injury[J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1042.

[26] Tiwari V, Kamran M Z, Ranjan A, *et al*. Akt1/NFκB signaling pathway activation by a small molecule DMA confers radioprotection to intestinal epithelium in xenograft model[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 564-574.

[27] Warren C F A, Wong-Brown M W, Bowden N A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 177.

[28] Singh L, Pushker N, Saini N, *et al*. Expression of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 proteins in human retinoblastoma[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 43(3): 259-267.