

乙酰半胱氨酸抗非酒精性脂肪性肝炎的体外活性研究

邵益丹, 史婷婷, 赵艳梅, 潘旭旺, 琚立萍, 张晶, 庄让笑* (杭州市西溪医院, 杭州 310023)

摘要: 目的 研究乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)诱导的 L02 细胞的非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)模型的炎症反应和胰岛素抵抗的活性。方法 用 FFA 处理 L02 细胞, 建立 NASH 细胞模型; MTT 法检测 NAC 对细胞生长抑制率的影响, 并依此优选 3 个安全给药浓度; 油红染色法观察细胞内的脂质沉积情况; Elisa 法检测细胞的 IL-8、TNF- α 和葡萄糖转运蛋白-4(glucose transporter, GLUT-4)含量; Western blot 及 Elisa 法检测细胞的胰岛素受体(insulin receptor, IR)含量。结果 NAC 在 10 600.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的最大给药浓度时其细胞生长抑制率仅为 34.10%, 因此设定 100, 150 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 个给药浓度; NAC 各给药组较模型组 82.45% 的细胞脂变率, 分别下降至 61.77%, 68.08% 和 79.28%, 差异具有统计学意义($P<0.01$)且呈浓度依赖性; NAC 各给药组的 GLUT-4 和 IR 含量较模型组均显著提高($P<0.01$); NAC 各给药组的 TNF- α 和 IL-8 含量较模型组均显著下降($P<0.01$)。结论 NAC 的细胞毒性极小, 可不同程度地降低 NASH 细胞的脂变率, 尤其可改善模型细胞的胰岛素抵抗及炎症反应水平, 表现出在治疗 NASH 方面的潜在价值。

关键词: 乙酰半胱氨酸; 非酒精性脂肪性肝炎; 胰岛素抵抗; 炎症反应

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)02-0200-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.011

Study of N-acetylcysteine's Anti-Nonalcoholic Steatohepatitis Activity *in Vitro*

SHAO Yidan, SHI Tingting, ZHAO Yanmei, PAN Xuwang, JU Liping, ZHANG Jing, ZHUANG Rangxiao* (Hangzhou Xixi Hospital, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of N-acetylcysteine(NAC) on the inflammatory response and insulin resistance in the model of nonalcoholic steatohepatitis(NASH) induced by free fatty acid(FFA) in L02 cells. **METHODS** L02 cells were treated with FFA to establish NASH cell model; The growth inhibition ratio of NAC was measured by MTT to select the safe drug concentration. The fat deposition in cells was observed by oil-red staining method. The content of IL-8, TNF- α and glucose transporter-4(GLUT-4) were tested by Elisa; And the content of cells' insulin receptor(IR) were tested by Western blot and Elisa. **RESULTS** The growth inhibition ratio was only 34.10% under the NAC's maximum concentration of 10 600.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, so 3 treatment groups were seted with the NAC concentration of 100, 150 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The steatosis ratio of the model group was up to 82.45%, but the treatment groups' ratio felled to 61.77%, 68.08% and 79.28% significantly($P<0.01$) with a concentration dependence; The treatment groups' concentration of GLUT-4 and IR was increased significantly($P<0.01$) compared with the model group, but significant concentration decreases of IL-8 and TNF- α were observed($P<0.01$). **CONCLUSION** NAC has a tinny cytotoxicity. It can decrease NASH cells' steatosis ratio and especially improve their insulin resistant and inflammatory response level, showing potential value on NASH treatment.

KEY WORDS: N-acetylcysteine; nonalcoholic steatohepatitis; insulin resistance; inflammatory response

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种代谢综合症相关的肝脏疾病, 其中的非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)的患病率逐渐超过酒精性肝病和病毒性肝炎而受到研究者的重视。NASH 病例中可切除性胆管癌的比例高达 20%, 而儿童患 NAFLD 的比例亦高达 2.6%~9.6%^[1-2]。NASH 的病理变化包括肝细胞脂肪变及炎性反应^[3], 且后者可导致不可逆的肝损伤。因此, 炎性反应的触发作为非酒精性脂肪性肝病进展过程中的关键点, 对整个

疾病的进程起到至关重要的作用。“二次打击”学说认为, 过量脂质沉积导致的肝脂肪变和氧化应激/脂质过氧化损伤是 NASH 发生发展的主要机制^[4]。有研究表明, 氧化应激可引起胰岛 β 细胞功能衰退及胰岛素抵抗^[5]。肝细胞过量脂质沉积和脂质过氧化与产生胰岛素抵抗密切相关^[4], 而抗氧化治疗可以改善这一过程^[6]。

乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)为人体内合成谷胱甘肽(GSH)的前体物质, 具有很强的清除氧自由基作用, 对肝脏的脂质过氧化损伤和炎症

基金项目: 杭州市科技发展计划项目(20130633B10, 20142013A60)

作者简介: 邵益丹, 男, 硕士生 Tel: (0571)86481960 E-mail: 40773425@qq.com

*通信作者: 庄让笑, 男, 主任药师 Tel:

(0571)86481960 E-mail: zhuangrangxiao@sina.com

反应具有保护作用,进而减缓肝纤维化过程^[7-8];有研究显示,NAC能够对活性氧(ROS)产生应答反应,间接通过增加细胞内GSH水平和(或)作为-SH还原剂阻止人胰淀粉酶诱发的细胞凋亡来调控细胞氧化还原反应^[9]。上述结果提示NAC具有较好的抗炎和抗氧化应激作用,在治疗NASH方面具有潜在价值。

NASH的发生和发展过程中伴随着胰岛素抵抗、炎症因子上调等现象,致使肝实质细胞脂肪变性、炎症细胞浸润和肝细胞坏死等^[10-12]。目前多数有关NAC治疗NASH的研究建立于大鼠体内模型之上,给药时NAC在消化道和肝脏中易受首过效应和复杂的体内环境干扰,从而降低其生物利用度和药理活性;而利用NASH细胞模型观察NAC在炎症和胰岛素抵抗方面的体外活性,仍鲜有报道。本研究利用FFA诱导的人体正常肝脏L-02细胞的NASH模型^[13]来研究NAC对该模型脂质沉积、葡萄糖转运蛋白-4(glucose transporter, GLUT-4)、TNF- α 、IL-8和胰岛素受体(insulin receptor, IR)含量的影响,探讨其在抗NASH方面的作用,可为该领域的研究提供一定的基础。

1 材料

1.1 试剂

NAC(武汉远大弘元药业股份有限公司,批号:20141001);DMEM培养基(Hyclone公司);胎牛血清(FBS)(BI公司);二甲基亚砜(DMSO)(Invitrogen公司);十二烷基磺酸钠(SDS)(Biosharp公司);噻唑蓝(MTT)、油红、棕榈油、油酸(Sigma公司);BCA蛋白定量试剂盒(批号:4A500150)、RIPA裂解液、PMSF(北京鼎国生物技术有限公司);L02细胞系(上海诺辰生物技术有限公司);胰岛素受体试剂盒(E-EL-H0452,批号:AK0014AUG01001)、葡萄糖转运蛋白-4试剂盒(E-EL-H1825,批号:AK00140EC27006)、TNF- α 试剂盒(E-EL-H0109,批号:AK0014JUL21010)、IL-8试剂盒(E-EL-H0048,批号:AK0014JUL21003)(Elabscience公司);IR抗体(ab137747)(Abcam公司)。

1.2 仪器

Thermo Scientific 8000 细胞培养箱(美国 Thermo 公司)、MK3 型酶标检测仪(Thermo Scientific 公司)、BOXUN X-25 超净工作台(上海博迅实业有限公司)、TDZ4B-WS 低速离心机(上海卢湘仪)、XDS-1A 光学显微镜(上海精密科学仪器有限公司)、DMI3000B 倒置拍照显微镜(莱卡)、垂直

电泳仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

取冻存的 L02 细胞株 37 °C 快速解冻,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,用 DMEM 培养液清洗 2 次,加入 DMEM 基础培养基重悬、离心后加入 DMEM 完全培养基,于 37 °C,5%CO₂ 条件下进行培养并观察细胞模型生长状况,备用。

2.2 NASH 模型

细胞浓度 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,每孔 100 μL 接种于 96 孔板,37 °C,5%CO₂ 条件培养 24 h,待 80% 细胞黏连,加入 FFA(按棕榈酸:油酸=1:2 制成 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度)作用 24 h,建立 NASH 细胞模型。

2.3 MTT 法测试化合物对细胞生长抑制率的影响

设空白组、模型组(FFA 组)和给药组(10 600,3 533.3,1 177.8,392.6,130.9,43.6,14.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每孔 200 μL 的 NAC 溶液,DMSO:DMEM=0.1:9.9),空白组、模型组和给药组每个浓度设 3 个复孔;给药 48 h 后,每孔加入 15 μL MTT,于 37 °C,5%CO₂ 条件避光孵育 3 h;离心后吸净孔内液体,每孔加 200 μL DMSO,摇床室温震荡 10 min,用酶标仪测定 492 nm 处吸光度(OD 值),据此计算细胞生长抑制率。

2.4 油红染色法测试化合物对细胞脂变率的影响

建立模型,按 3 个浓度给药,每个浓度 3 个复孔;72 h 后进行油红染色:PBS 溶液清洗细胞 3 次,4%多聚甲醛固定 10 min;再用 PBS 溶液清洗细胞 2 次,60%异丙醇漂洗 1 min;室温下油红染色 10 min,加入蒸馏水终止;光镜下可见细胞内红色中性脂滴。

2.5 Elisa 法测试细胞上清液 GLUT-4、TNF- α 和 IL-8 含量

给药方法同上,NAC 分别作用 24 和 48 h 后,3 000 r·min⁻¹ 低温离心培养液,取上清液,检测 GLUT-4、TNF- α 和 IL-8 含量。

2.6 Western-blot 和 Elisa 法测试细胞 IR 含量

给药方法同上,NAC 作用 48 h 后,3 000 r·min⁻¹ 低温离心细胞裂解液,取上清液,检测 IR 含量。

2.7 数据处理

用 Image J 软件处理油红染色结果并计算细胞脂变率;用 Curve Expert1.34 软件处理 MTT 和 Elisa

结果;用 SPSS 19.0 的“配对样本 *t* 检验”对数据进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 NAC 对细胞生长抑制率的影响

结果显示, NAC 作用 48 h 后, 最高给药浓度下的细胞生长抑制率为 34.10%。为使受试化合物发挥较为显著的疗效, 并最大限度避免细胞毒性对实验结果的影响, 本文选择 250, 150, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个给药浓度进行后续试验。结果见图 1。

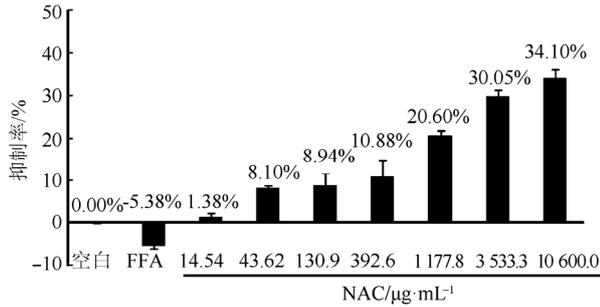


图 1 细胞生长抑制率

Fig. 1 Ratio of cell growth inhibition

3.2 NAC 对 NASH 细胞模型脂质沉积情况的影响

结果显示, 各给药组细胞脂变率均较模型组低, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 高、中浓度组之间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 中、低浓度组之间, 高、低浓度组之间脂变率的差异同样具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见图 2。

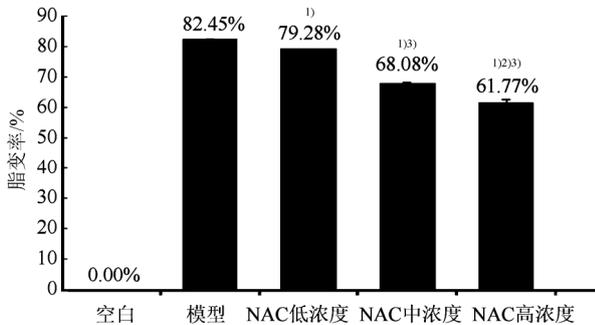


图 2 细胞脂变率

与模型组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与中浓度组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与低浓度组比较, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Ratio of steatosis

Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with medium concentration group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with low concentration group, ³⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 NAC 对 NASH 细胞模型 GLUT-4、TNF- α 和 IL-8 含量的影响

结果显示, 模型组与空白组的 GLUT-4、TNF- α 和 IL-8 含量差异明显, 具有统计学意义 ($P < 0.01$);

与模型组相比, 各浓度组对各指标的改善较明显, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

24 h 时, 与模型组比较, 高、中、低浓度组 GLUT-4、TNF- α 、IL-8 均有统计学差异 ($P < 0.01$); 高浓度组 GLUT-4 和 IL-8 的含量相比中浓度组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 高、中浓度组 GLUT-4、TNF- α 和 IL-8 的含量与低浓度组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

48 h 时, 与模型组比较, 高、中、低浓度组 GLUT-4、TNF- α 、IL-8 均有统计学差异 ($P < 0.01$); NAC 对 IL-8 含量的影响在高、中浓度组之间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 高、中浓度组 GLUT-4、TNF- α 和 IL-8 的含量与低浓度组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见表 1~2。

表 1 Elisa 法检测 GLUT-4、TNF- α 和 IL-8 含量 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, 24 h)

Tab. 1 Content of GLUT-4、TNF- α and IL-8 measured by Elisa ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, 24 h)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	GLUT-4/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	TNF- α / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-8/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白组	-	6.37 \pm 0.04	106.34 \pm 0.46	125.46 \pm 2.51
模型组	-	1.48 \pm 0.04 ¹⁾	323.21 \pm 1.18 ¹⁾	359.66 \pm 4.96 ¹⁾
NAC 低浓度组	100	2.84 \pm 0.05 ²⁾	287.71 \pm 5.09 ²⁾	304.36 \pm 2.77 ²⁾
NAC 中浓度组	150	4.08 \pm 0.05 ²⁾⁴⁾	205.02 \pm 2.05 ²⁾⁴⁾	271.69 \pm 3.50 ²⁾⁴⁾
NAC 高浓度组	250	4.30 \pm 0.08 ²⁾³⁾⁴⁾	203.68 \pm 1.95 ²⁾⁴⁾	256.63 \pm 1.81 ²⁾³⁾⁴⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$; 与中浓度组比较, ³⁾ $P < 0.05$; 与低浓度组比较, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$; compared with medium concentration group, ³⁾ $P < 0.05$; compared with low concentration group, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 Elisa 法检测 GLUT-4、TNF- α 和 IL-8 含量 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, 48 h)

Tab. 2 Content of GLUT-4、TNF- α and IL-8 measured by Elisa ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, 48 h)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	GLUT-4/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	TNF- α / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-8/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白组	-	6.08 \pm 0.12	137.23 \pm 0.48	130.90 \pm 3.01
模型组	-	1.32 \pm 0.07 ¹⁾	369.58 \pm 1.28 ¹⁾	392.30 \pm 10.31 ¹⁾
NAC 低浓度组	100	2.98 \pm 0.04 ²⁾	256.46 \pm 1.62 ²⁾	325.66 \pm 3.69 ²⁾
NAC 中浓度组	150	4.11 \pm 0.04 ²⁾⁴⁾	203.68 \pm 1.95 ²⁾⁴⁾	273.16 \pm 2.43 ²⁾⁴⁾
NAC 高浓度组	250	4.17 \pm 0.03 ²⁾⁴⁾	204.46 \pm 7.20 ²⁾⁴⁾	259.83 \pm 1.75 ²⁾³⁾⁴⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$; 与中浓度组比较, ³⁾ $P < 0.05$; 与低浓度组比较, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$; compared with medium concentration group, ³⁾ $P < 0.05$; compared with low concentration group, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 NAC 对 NASH 细胞模型 IR 含量的影响

IR 的 Western blot 检测结果见图 3, 由于其组间差异不明显, 故进一步开展了 Elisa 检测。结果

显示, 模型组与空白组的 IR 含量差异明显, 具有统计学意义($P<0.01$); 各浓度组对 IR 含量的改善均较为明显, 相比模型组的差异具有统计学意义($P<0.01$); 高、中浓度组之间差异具有统计学意义($P<0.05$); 高、中浓度组相比低浓度组差异较明显($P<0.01$)。结果见表 3。

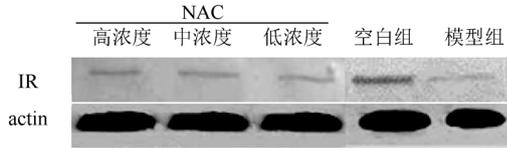


图 3 Western blot 检测 IR 结果

Fig. 3 Content of IR measured by Western blot

表 3 Elisa 法测定 IR 含量($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Content of IR measured by Elisa($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	IR/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白组	-	11.94 \pm 0.05
模型组	-	4.74 \pm 0.18 ¹⁾
NAC 低浓度组	100	6.42 \pm 0.13 ²⁾
NAC 中浓度组	150	11.17 \pm 0.27 ²⁾⁴⁾
NAC 高浓度组	250	12.71 \pm 0.35 ²⁾³⁾⁴⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与中浓度组比较, ³⁾ $P<0.05$; 与低浓度组比较, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$; compared with medium concentration group, ³⁾ $P<0.05$; compared with low concentration group, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

MTT 试验结果显示, NAC 对 L02 NASH 细胞模型的生长抑制率较低, 即使在接近饱和浓度 $10\ 600.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时也仅为 34.0%, 且呈浓度依赖性, 提示该化合物细胞毒性较小。为确保该化合物的给药浓度产生较为显著的疗效和较小的细胞毒性, 本研究选择 100, 150 和 $250\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个安全给药浓度进行后续试验。

NAC 对细胞内脂质沉积影响试验结果表明, 该化合物对 NASH 细胞模型显著升高的脂变率具有一定程度的改善作用, 且呈浓度依赖性。

ELISA 和 Western blot 检测结果显示, 模型组细胞的 GLUT-4 和 IR 含量下降, TNF- α 和 IL-8 的含量显著升高, 提示在 FFA 诱导下细胞出现了胰岛素抵抗和炎症水平升高现象; 而模型细胞在 NAC 的作用下, 上述症状得到了不同程度的改善, 表现为 GLUT-4 和 IR 含量的增加, 以及 TNF- α 和 IL-8 含量的下降; 同时, 通过不同浓度给药组之间的比较发现, 化合物对以上指标的改善作用呈一定程度的浓度依赖性, 且化合物对 TNF- α 和 IR

的改善作用尤为明显。

综上所述, NAC 可在一定程度上改善 FFA 诱导的 L02 细胞 NASH 模型的脂肪变和胰岛素抵抗状况, 减轻模型细胞的炎症反应水平, 保护细胞免受进一步的氧化应激和炎症损伤, 从而发挥其在抗 NASH 方面的潜在作用。该研究结果可能对发挥 NAC 在治疗 NAFLD 和 NASH 方面的价值提供参考。

REFERENCES

- [1] REDDY S K, HYDER O, MARSH J W, et al. Prevalence of nonalcoholic steatohepatitis among patients with resectable intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17(4): 748-755.
- [2] TAKAHASHI Y, FUKUSATO T, INUI A, et al. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Nihon Rinsho*, 2012, 70(10): 1827-1834.
- [3] BIEGHS V, WOUTERS K, PATRICK J, et al. Role of scavenger receptor A and CD36 in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(7): 2477-2486.
- [4] TSOCHATZIS E A, MANOLAKOPOULOS S, PAPTAEODORIDIS G V, et al. Insulin resistance and metabolic syndrome in chronic liver diseases: old entities with new implications [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2009, 44(1): 6-14.
- [5] LEAHY J L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus [J]. *Arch Med Res*, 2005, 36(3): 197-209.
- [6] DREWS G, KRIPPEIT-DREWS P, DÜFER M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction [J]. *Pflugers Arch*, 2010, 460(4): 703-718.
- [7] GALICIA M M, RODRÍGUEZ R A, REYES G K, et al. N-acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor -beta and oxidative stress [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(80): 908-914.
- [8] ZHOU T, CHEN Y, LIU C H, et al. Effects of N-acetylcysteine on liver fibrosis and lipid peroxidation in cirrhotic rats [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*(中国新药与临床杂志), 2007, 4(26): 259-263.
- [9] KONARKOWSKA B, AITKEN J F, KISTLER J, et al. Thiol reducing compounds prevent human amylin-evoked cytotoxicity [J]. *FEBS J*, 2005, 272(19): 4949-4959.
- [10] POLYZOS S A, KOUNTOURAS J, ZAVOS C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines [J]. *Curr Mol Med*, 2009, 9(3): 299-314.
- [11] SERVIDDIO G, BELLANTI F, TAMBORRA R, et al. Uncoupling protein-2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia-reperfusion injury [J]. *Gut*, 2008, 57(7): 957-965.
- [12] TSOCHATZIS E A, PAPTAEODORIDIS G V, ARCHIMANDRITIS A J. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy [J]. *Mediators Inflamm*, 2009, 2009: 831670. Doi: 10.1155/2009/831670.
- [13] PAN X F, WEN C X, XU J H. Comparison of two cell lines for cell model of hepatocytic steatosis *in vitro* [J]. *J Guangdong Pharm Coll*(广东药学院学报), 2010, 26(1): 85-89.

收稿日期: 2016-07-26