

# 荷瘤裸鼠按时辰给予吉非替尼的药效学研究

刘亮<sup>1\*</sup>, 李明春<sup>2#</sup>, 林萍萍<sup>1</sup>, 刘宁<sup>1</sup>, 王乐<sup>1</sup>(1.青岛大学医学院, 山东青岛 266021; 2.解放军第401医院药剂科, 山东青岛 266071)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2205-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.15

**摘要** 目的:研究荷瘤裸鼠按时辰给予吉非替尼的药效学。方法:取BALB/c-nu裸鼠复制非小细胞肺癌模型后,随机分为不同时间给药的吉非替尼(4:00、8:00、12:00、16:00、20:00、24:00)组和模型组,每组10只。吉非替尼组裸鼠分别按相应时间ig给药1 mg/kg,模型组裸鼠ig给予等量的1%聚山梨酯80溶液,连续给药21 d。检测20 d内各组裸鼠的瘤体积及第21天时的瘤质量,计算抑瘤率;检测各组裸鼠肿瘤组织中表皮生长因子受体(EGFR)和细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)的mRNA及蛋白表达情况。结果:与模型组比较,各吉非替尼组裸鼠第18天时肿瘤体积均增加缓慢,除20:00组外其余各吉非替尼组裸鼠瘤质量降低、抑瘤率增加,其中4:00、8:00组裸鼠肿瘤组织中EGFR mRNA表达减弱,4:00、8:00、12:00组裸鼠肿瘤组织中ERK1/2 mRNA表达减弱,4:00、8:00、12:00、24:00组裸鼠肿瘤组织中p-EGFR蛋白表达减弱,4:00、8:00、24:00组裸鼠肿瘤组织中p-ERK1/2蛋白表达减弱,以上差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。与20:00组比较,4:00、8:00、12:00组裸鼠瘤质量降低,4:00、8:00组裸鼠肿瘤组织中p-EGFR蛋白表达减弱,8:00组裸鼠肿瘤组织中p-ERK1/2蛋白表达减弱,以上差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:吉非替尼对荷瘤裸鼠具有瘤抑制作用,并呈现时辰节律性,其中8:00给药肿瘤抑制效果最好,20:00给药抑制效果最差;其机制可能与EGFR、ERK1/2介导的传导通路有关。

**关键词** 吉非替尼;时辰药理学;药效学;作用机制;荷瘤裸鼠

## Study on the Pharmacodynamics of Gefitinib in Tumor-bearing Nude Mice According to Time

LIU Liang<sup>1</sup>, LI Ming-chun<sup>2</sup>, LIN Ping-ping<sup>1</sup>, LIU Ning<sup>1</sup>, WANG Le<sup>1</sup>(1.College of Medicine, Qingdao University, Shandong Qingdao 266021, China; 2.Dept. of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Shandong Qingdao 266071, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the pharmacodynamics of gefitinib in tumor-bearing nude mice according to time. **METHODS:** Non-small cell lung cancer models were replicated on BALB/c-nu nude mice and then randomly divided into gefitinib groups (4:00, 8:00, 12:00, 16:00, 20:00 and 24:00) and model group, 10 for each. Nude mice in gefitinib groups were respectively given 1 mg/kg at the appropriate time for 21 d, ig; nude mice in model group were given the same volume of 1% tween-80 solution for 21 d, ig. The tumor volume within 20 d and the tumor weight in the 21st day were determined and the anti-tumor rate was calculated; the mRNA and protein expressions of epidermal growth factor receptor (EGFR) and extracellular regulated protein kinase (ERK1/2) in tumor tissue were determined. **RESULTS:** Compared with model group, the tumor volume of nude mice in gefitinib groups showed slower growth in the 18th day. Except for 20:00 group, the tumor weight of nude mice was decreased and anti-tumor rate was increased in all other gefitinib groups; among these, the mRNA expression of EGFR in tumor tissue in 4:00 and 8:00 groups was decreased, the mRNA expression of ERK1/2 in tumor tissue in 4:00, 8:00 and 12:00 groups was decreased, the protein expression of p-EGFR in tumor tissue in 4:00, 8:00, 12:00 and 24:00 groups was decreased and the protein expression of p-ERK1/2 in tumor tissue in 4:00, 8:00 and 24:00 groups was decreased, all with significant differences ( $P<0.05$ ). Compared with 20:00 group, the tumor weight in 4:00, 8:00 and 12:00 groups was decreased, the protein expression of p-EGFR in tumor tissue in 4:00 and 8:00 groups was decreased and the protein expression of p-ERK1/2 in tumor tissue in 8:00 group was decreased, with significant differences ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Gefitinib can inhibit the tumor of tumor-bearing nude mice with time rhythm. The best time of inhibitory effect is 8:00 and the worst is 20:00. The mechanism may be related to EGFR and ERK1/2 apoptosis pathway.

**KEYWORDS** Gefitinib; Chronopharmacology; Pharmacodynamics; Mechanism; Tumor-bearing nude mice

肺癌已成为发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一,严重地威胁着人类健康,其中非小细胞肺癌(NSCLC)患者约占80%<sup>[1]</sup>。随着分子生物学的发展,肿瘤发生发展的机制正在逐

\* 硕士。研究方向:临床药理学。电话:0532-51872904。E-mail: darkhorse24@163.com

# 通信作者:主任药师。研究方向:临床药理学。电话:0532-51872904。E-mail:lmc401y@163.com

渐阐明,有效的抗肿瘤作用靶点正逐渐被发现。表皮生长因子受体(EGFR)是具有酪氨酸激酶活性的一种重要的跨膜受体<sup>[2]</sup>。研究表明,EGFR基因的异常表达,可激活与肿瘤增殖、分化相关的基因,在肿瘤的形成和发展过程中占据了重要的地位<sup>[3]</sup>。而吉非替尼是作用于EGFR的一类酪氨酸激酶抑制剂,可在细胞水平上抑制EGFR介导的细胞内蛋白酪氨酸磷酸化,阻断其下游的信号转导途径,进而抑制肿瘤细胞的增殖和

转移并促进其凋亡,达到抑制肿瘤的目的<sup>[4]</sup>。细胞外调节蛋白激酶(ERK)包括ERK1和ERK2,活化后可作用于其他蛋白激酶,调节相关基因的转录,进而参与细胞生长发育。EGFR/ERK1/2途径在肿瘤侵袭和转移过程中起中介和放大信号的作用,是与肿瘤发生发展相关的重要传导通路。研究此信号传导通路上相关蛋白和基因的表达情况将有助于研究吉非替尼作用与EGFR上的信号传导情况。

时辰药理学是基于人体的时辰节律性的变化,通过系统的研究而找到药物疗效高并且毒副作用小的时辰点<sup>[5]</sup>。研究表明,人体的生物节律性对体内酶的代谢、激素的调节以及药物在体内的代谢等都有很大的影响<sup>[6]</sup>。以这些结果为基础进行时辰药理学研究,将有助于为吉非替尼口服给药找到一个最佳时间点,达到高效低毒的效果。本文旨在研究荷瘤裸鼠按时辰给予吉非替尼的药效学,以期找到一个吉非替尼给药的最佳时间点,为临床合理用药提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

CB150型CO<sub>2</sub>培养箱(德国Binder公司);TGL16型台式高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司,离心半径:5.677 cm,下同);DW-86WHO型86℃低温保存箱(中国澳柯玛公司);TL988型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(西安天隆科技有限公司);XDS-1B型倒置显微镜(上海光学仪器厂);SC500型化学发光成像系统(上海山富科学仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

吉非替尼片(商品名:易瑞沙,阿斯利康制药有限公司,批号:KN058,规格:每片250 mg);RPMI-1640培养基(批号:NYL1029)、胰蛋白酶(批号:J130049)、类胎牛血清(批号:NYE0873)、青霉素/链霉素双抗(批号:J130043)均购于美国HyClone公司;mRNA提取试剂盒(批号:AK7806)、cDNA提取试剂盒(批号:AK2501)、RNA扩增试剂盒(批号:AK5305)均购自大连Takara公司;实时定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];蛋白质预染Marker[天根生化科技(北京)有限公司,目录号:MP206];一抗、二抗抗体(美国Cell Signaling Technology公司)。

### 1.3 动物

裸鼠,BALB/c-nu,♀,SPF级,体质量(10±2)g,4周龄,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,使用许可证号:SCXK(京)2012-0001,已通过解放军第401医院伦理委员会批准。实验前2周至实验结束,将裸鼠置于标准的明-暗周期下饲养(明期7:00-19:00,光照500 lx;暗期19:00-7:00,光照0),自由进水进食,维持室温为(21±2)℃,湿度为30%~70%。

### 1.4 细胞

人源非小细胞肺癌HCC827细胞购自中国科学院细胞库,货号:31800022。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养和NSCLC裸鼠模型的复制

取HCC827细胞用含15%胎牛血清和1%双抗的RPMI-1640培养基置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养,待细胞贴壁率为85%~95%时用0.25%胰蛋白酶进行消化、传代。取对数生长期细胞,调整细胞浓度至1×10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup>。于裸鼠左前肢内侧皮下注射约0.2 ml细胞悬液,接种3 d后肉眼可见

肿瘤生长,即NSCLC裸鼠模型复制成功。筛选出移植瘤体积为300~600 mm<sup>3</sup>范围内的裸鼠,进行随机分组实验。

### 2.2 分组与给药

取70只模型复制成功的荷瘤裸鼠,随机分为不同时间给药的吉非替尼(4:00、8:00、12:00、16:00、20:00、24:00)组和模型组,每组10只。吉非替尼组荷瘤裸鼠ig给予吉非替尼混悬液(质量浓度为0.1 mg/ml,由1%聚山梨酯80为助悬剂)21 d,根据前期实验结果设定给药剂量为1 mg/kg,每日给药1次。模型组荷瘤裸鼠给予等量的1%聚山梨酯80溶液。

### 2.3 药效学指标检测

给药期间每3 d测量1次各组裸鼠肿瘤的长径和短径,计算瘤体积,瘤体积=短径<sup>2</sup>×长径/2,绘制肿瘤体积的生长曲线。各组裸鼠末次给药后3 h颈椎脱臼处死,剥离肿瘤,称取瘤质量,计算抑瘤率[抑瘤率=(模型组瘤质量-吉非替尼组瘤质量)/模型组瘤质量×100%],将肿瘤组织立即放入液氮中保存,备用。

### 2.4 肿瘤组织中EGFR和ERK1/2基因表达检测

2.4.1 组织样品的RNA提取 称取冻存的肿瘤组织100 mg,迅速转移至用液氮预冷的研钵中,用研杵充分研磨组织。不断加入液氮,直至研磨成粉末状后倒入匀浆器充分匀浆,按试剂盒说明书操作提取总RNA。取每个样品4 μl进行逆转录试验,逆转录条件为:37℃ 15 min;98℃ 5 s。逆转录后样品置于-80℃保存,备用。

2.4.2 RT-PCR试验 按RT-PCR检测试剂盒说明书要求,以GAPDH为内参,分别检测肿瘤组织中EGFR和ERK1/2的mRNA水平。用于RT-PCR扩增的所有引物均由宝生物工程(大连)有限公司设计合成。相关基因引物序列见表1。

表1 相关基因引物序列

Tab 1 Primer sequences of related genes

基因	上游引物	下游引物
GAPDH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	5'-TGTTGAAGACGCCAGTGA-3'
EGFR	5'-CATCCAGGCCCAACTGTGAG-3'	5'-CAGTGAAGCCTTGAAGCAGAA-3'
ERK1/2	5'-CGTGTGTACAGGGCTCCAGAA-3'	5'-CTGCAGAATGCAGCCTACAGA-3'

反应参数:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,共40个循环。每个样品重复测定3次,根据溶解度曲线判断PCR扩增基因的特异性。反应结束后得到各个样品的c<sub>v</sub>值,最终各组基因表达的相对变化情况采用公式2<sup>-ΔΔc<sub>v</sub></sup>计算,其中ΔΔc<sub>v</sub>计算公式为ΔΔc<sub>v</sub>=(吉非替尼组目的基因c<sub>v</sub>值-内参c<sub>v</sub>值)-(模型组目的基因c<sub>v</sub>值-内参c<sub>v</sub>值)。

### 2.5 肿瘤组织中EGFR、ERK1/2及其磷酸化(p-EGFR、p-ERK1/2)蛋白表达检测

2.5.1 组织样品总蛋白提取 取冻存的肿瘤组织100 mg置于预冷研钵中,一边研磨一边不断加入液氮,直至将组织研磨成粉末状。加入1 ml裂解液,转移至玻璃匀浆器中匀浆,4℃离心收集上清液即为蛋白液。按比例加入上样缓冲液,恒温器95℃变性10 min,静置至室温后-20℃保存,备用。

2.5.2 蛋白印迹法检测蛋白表达 使用10%分离胶和5%浓缩胶加样后以恒压进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后应用湿法以300 mA恒流转膜60 min。转膜结束,取出膜摇床洗膜,加封闭液封闭2 h后加入一抗于4℃低温孵育过夜,次日加入二抗孵育1 h。加入DAB显影剂与定影剂各150 ml约

1 min,置于化学发光凝胶成像仪中显影拍照。以 $\beta$ -actin为内参用凝胶分析软件对肿瘤组织中EGFR、p-EGFR和ERK1/2、p-ERK1/2蛋白灰度进行分析。

### 2.6 数据处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 19.0软件进行统计分析,组间比较选择单因素方差分析和最小显著性差异(LSD)法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 瘤体积变化

各组裸鼠瘤体积变化曲线见图1。

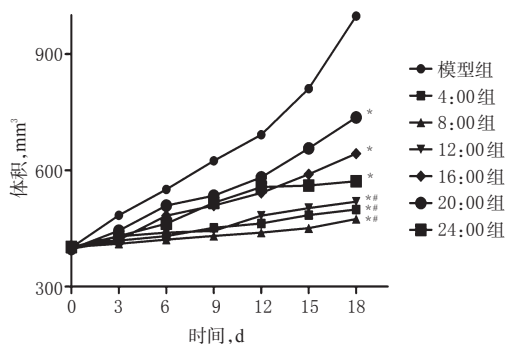


图1 各组裸鼠瘤体积变化曲线

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与20:00组比较,# $P < 0.05$

Fig 1 Curves of tumor volume changes of nude mice

Note: vs. model group, \* $P < 0.05$ ; vs. 20:00 group, # $P < 0.05$

由图1可见,随着实验的进行,各组肿瘤体积逐渐增大,其中模型组的裸鼠肿瘤体积增长最为迅速。与模型组比较,各吉非替尼组裸鼠第18天时肿瘤体积均增加缓慢,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中8:00组裸鼠肿瘤增长最慢,20:00组裸鼠肿瘤增长最快。

### 3.2 瘤质量与抑瘤率比较

各组裸鼠肿瘤质量和抑瘤率见表2。

表2 各组裸鼠瘤质量和抑瘤率比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 2 Comparison of tumor weight and anti-tumor rate of nude mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	瘤质量,g	抑瘤率,%
模型组	0.88 ± 0.21	
4:00组	0.44 ± 0.05**	49.94
8:00组	0.39 ± 0.08**	56.17
12:00组	0.46 ± 0.17**	48.47
16:00组	0.55 ± 0.07*	37.59
20:00组	0.73 ± 0.18	17.32
24:00组	0.50 ± 0.12*	42.92

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与20:00组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. model group, \* $P < 0.05$ ; vs. 20:00 group, # $P < 0.05$

由表2可见,与模型组比较,除20:00组外其余各吉非替尼组裸鼠瘤质量降低、抑瘤率增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与20:00组比较,4:00、8:00、12:00组裸鼠瘤质量降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中8:00组抑瘤率最高,20:00组抑瘤率最低。

### 3.3 肿瘤组织中基因表达比较

各组裸鼠瘤组织中EGFR、ERK1/2 mRNA表达比较见图2。

由图2可知,与模型组比较,4:00组和8:00组裸鼠瘤组织

中EGFR和ERK1/2 mRNA表达均降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

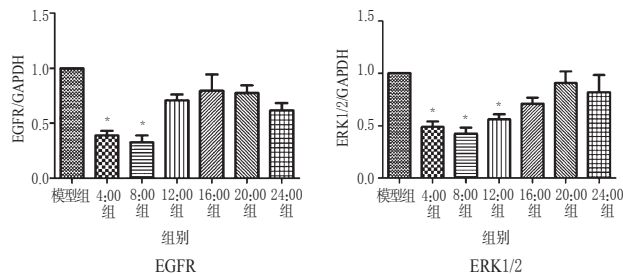


图2 各组裸鼠瘤组织中EGFR、ERK1/2 mRNA表达比较

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$

Fig 2 Comparison of EGFR and ERK1/2 mRNA expressions in tumor tissue of nude mice

Note: vs. model group, \* $P < 0.05$

### 3.4 肿瘤组织中蛋白表达结果

各组裸鼠瘤组织中EGFR、p-EGFR和ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达比较见图3,电泳图见图4。

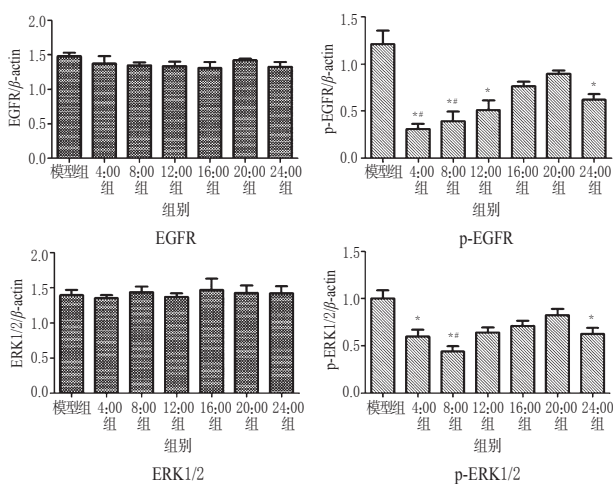


图3 各组裸鼠瘤组织中EGFR、p-EGFR和ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达比较

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与20:00组比较,# $P < 0.05$

Fig 3 Comparison of EGFR, p-EGFR, ERK1/2 and p-ERK1/2 protein expressions in tumor tissue of nude mice

Note: vs. model group, \* $P < 0.05$ ; vs. 20:00 group, # $P < 0.05$



图4 各组裸鼠瘤组织中EGFR、p-EGFR和ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达的电泳图

Fig 4 Electrophoretograms of EGFR, p-EGFR, ERK1/2 and p-ERK1/2 protein expressions in tumor tissue of nude mice

由图3和图4可知,与模型组比较,4:00、8:00、12:00、24:00组裸鼠瘤组织中p-EGFR蛋白表达减弱,4:00、8:00、



24:00组裸鼠肿瘤组织中p-ERK1/2蛋白表达减弱,以上差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与20:00组比较,4:00、8:00组裸鼠肿瘤组织中p-EGFR蛋白表达减弱,8:00组裸鼠肿瘤组织中p-ERK1/2蛋白表达减弱,以上差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

吉非替尼是第一个上市的作用于EGFR的表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂,能够抑制肿瘤的生长、转移和血管生成,并增强肿瘤细胞的凋亡作用,适用于EGFR基因突变的局部晚期或转移性NSCLC患者的一线治疗<sup>[7]</sup>。EGFR作为一种与肿瘤增殖、分化相关的重要受体,在肿瘤的形成和发展过程中占据了重要的地位<sup>[8]</sup>。吉非替尼作用于酪氨酸激酶结构域的三磷酸腺苷(ATP)结合位点,干扰ATP结合,能通过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT)和ERK1/2途径阻断EGFR信号转导通路,阻滞表达EGFR的肿瘤细胞生长;可在细胞水平上抑制EGFR介导的细胞内蛋白酪氨酸磷酸化,阻断其下游的信号转导途径,进而抑制肿瘤细胞的增殖和转移并促进其凋亡,达到抑制肿瘤的目的<sup>[9-11]</sup>。

本课题组之前的研究结果已初步证明,吉非替尼按时辰给药对荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用及毒副作用呈明显的时辰节律性,但其产生时辰作用的机制尚未阐明<sup>[2]</sup>。本研究创新地采用人源肿瘤细胞系复制模型,并通过探讨肿瘤组织中不同时辰点相关基因和蛋白表达的差异,从药效学和作用机制两方面入手,进一步证明了其药效学影响,并且探讨了其抑制肿瘤生长可能的作用机制。

研究结果表明,8:00组与其他组相比瘤体体积增长缓慢、瘤质量低、抑瘤率高,4:00组次之。相对应地,20:00组与其他组相比瘤体体积增长较快、瘤质量高、抑瘤率低。通过药效学的数据可以得出吉非替尼对荷瘤裸鼠的肿瘤具有抑制作用,并且呈明显的时辰节律性。通过实验结果还可以得出其抑制作用的周期性:药物抑制效果最好与最差的时辰点相隔12 h,次好与次差的也表现出此规律,因此推测其时辰节律性是以12 h为一个周期。

通过检测EGFR和ERK1/2 mRNA相对表达量的结果可以看出其表达呈明显的时辰节律性,并且与药效学的结果基本对应。而其相应的p-EGFR和p-ERK1/2蛋白的表达结果也呈现出与mRNA表达规律基本一致的时辰节律性。由此可以推测,产生其时辰作用的机制可能与EGFR/ERK1/2介导的信号传导通路有关。

综上所述,吉非替尼按时辰给药对荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用呈明显的时辰节律性,并且此节律性的周期是12 h;其作用机制可能与EGFR/ERK1/2信号传导通路有关。本实验的研究结果可以为临床选择最佳给药时间提供依据,以期使同等剂量的药物在发挥最大治疗作用的同时也使药物的毒副作用降至最低,并为进一步的临床研究提供参考。但时辰药理学的作用机制尚未完全清楚,还有可能是与体内相关酶的代谢以及DNA的合成有关<sup>[12]</sup>,故有待进一步研究证实。

#### 参考文献

- [1] Furrugh M, Burney IA, Kumar S, et al. Improving outcomes in advanced lung cancer[J]. *Sultan Qaboos Univ Med*, 2013, 13(1): 3.
- [2] Vivanco I, Robins HI, Rohle D, et al. Differential sensitivity of glioma-versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors[J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(5): 458.
- [3] Wu J, Chen W, Xia G, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel conformationally constrained inhibitors targeting EGFR[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4(10): 974.
- [4] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2 380.
- [5] Ramgopal S, Thome-Souza S, Loddikenper T. Chronopharmacology of anti-convulsive therapy[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2013, 13(4): 339.
- [6] Boom M, Grefkens J, van Dorp E, et al. Opioid chronopharmacology: influence of timing of infusion on fentanyl's analgesic efficacy in healthy human volunteers[J]. *J Pain Res*, 2010, doi: 10.2147/JPR.S13616.
- [7] Argiris A, Ghebremichael M, Gilbert J, et al. Phase III randomized, placebo-controlled trial of docetaxel with or without gefitinib in recurrent or metastatic head and neck cancer: an eastern cooperative oncology group trial[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(11): 1 405.
- [8] 贾守薇, 刘韬, 黄红兵. 治疗非小细胞肺癌的分子靶向药物的研究进展[J]. *中国药房*, 2013, 24(32): 3 064.
- [9] Dragowska WH, Wepler SA, Wang JC, et al. Induction of autophagy is an early response to gefitinib and a potential therapeutic target in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76 503.
- [10] Irwin ME, Mueller KL, Bohin N, et al. Lipid raft localization of EGFR alters the response of cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(9): 2 316.
- [11] Tiseo M, Bartolotti M, Gelsomino F, et al. Emerging role of gefitinib in the treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2010, 4: 81.
- [12] 张彬, 李明春, 王培培. 吉非替尼时辰给药Lewis肺癌荷瘤小鼠的药效学研究[J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(6): 583.
- [13] Erkekoglu P, Baydar T. Chronopharmacodynamics of drugs in toxicological aspects: a short review for clinical pharmacists and pharmacy practitioners[J]. *J Res Pharm Pract*, 2012, 1(2): 41.

(收稿日期:2014-11-11 修回日期:2015-02-04)

(编辑:邹丽娟)