

丹皮酚致兔膝骨性关节炎软骨细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax mRNA 表达的时间与剂量效应研究^Δ

吴 琪*,何敢想#,胡燕芬,唐玉琼,宋 玉,蔡 青,李 丹(湖北中医药大学临床技能实训中心,武汉 430061)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1337-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.12

摘 要 目的:研究丹皮酚致兔膝骨性关节炎(OA)软骨细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax mRNA 表达的时间与剂量效应。方法:将 60 只大耳白兔随机分为正常(生理盐水)组,模型(生理盐水)组,丹皮酚高、中、低剂量组和曲安奈德(阳性药物)组,每组 10 只。除正常组外,其余各组白兔采用右膝前交叉韧带切断及内侧半月板前 1/3 切除复制 OA 模型,模型建立后各组白兔右膝关节内注射不同剂量丹皮酚(分别是 0.8、0.4、0.2 mg/kg)、曲安奈德 0.2 mg/kg,每周 2 次。分别于给药后的 4、8 周分批取材,电镜下观察关节软骨细胞超微病理结构变化;原位末端标记法观察软骨细胞凋亡情况,并计算凋亡指数;原位杂交技术检测各组兔关节软骨组织凋亡相关基因 Bcl-2、Bax mRNA 表达。结果:与正常组比较,4、8 周时模型组细胞分别呈凋亡早期和中晚期形态学改变,且细胞凋亡指数明显升高,细胞中 Bcl-2、Bax mRNA 表达上调($P<0.01$);给药 4、8 周时,与模型组比较,丹皮酚各剂量组细胞凋亡指数降低,细胞中 Bcl-2 mRNA 表达上调、Bax mRNA 表达下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);电镜超微病理观察显示,丹皮酚高、中剂量组细胞均处于凋亡早期形态学改变。结论:丹皮酚可呈时间与剂量依赖性地延缓 OA 模型兔的关节软骨退变和破坏,其机制可能与上调 Bcl-2 基因表达、下调 Bax 基因表达有关。

关键词 丹皮酚;软骨细胞;凋亡相关基因;Bax;膝骨性关节炎;原位末端标记法;兔

Study on Time-effect and Dose-effect of Paeonol on the Apoptosis of Knee Osteoarthritis Articular Chondrocyte in Rabbits and the mRNA Expression of Its Related Protein Bcl-2 and Bax

WU Qi, HE Ganxiang, HU Yanfen, TANG Yuqiong, SONG Yu, CAI Qing, LI Dan (Teaching and Demonstration Center of Clinical Skill, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the time-effect and dose-effect of paeonol on the apoptosis of knee osteoarthritis (OA) articular chondrocyte in rabbits and the mRNA expression of its related protein Bcl-2 and Bax. METHODS: 60 big-ear rabbits were randomly divided into normal (normal saline) group, model (normal saline) group, paeonol high-dose, medium-dose and low-dose groups and triamcinolone acetonide (positive drug) group, with 10 rabbits in each group. Except for normal group, OA model was induced by right knee anterior cruciate ligament (ACL) and the medial meniscus 1/3 resection in those groups. After modeling, different doses of paeonol (0.8, 0.4, 0.2 mg/kg), triamcinolone acetonide 0.2 mg/kg were injected into right articular cavity twice a week. 4 weeks and 8 weeks after administration, articular cartilage specimens were collected. Ultrastructural changes of articular chondrocytes were observed by electron microscope. Apoptosis of cartilage cell was observed by TUNEL and apoptotic index was calculated. mRNA expression of apoptosis related genes of Bcl-2 and Bax in articular cartilage tissue of rabbits were detected by in situ hybridization technique. RESULTS: Compared with normal group, articular chondrocyte of model group showed early and middle stage apoptosis morphology change after 4 and 8 weeks, and apoptosis index increased significantly and the mRNA expression of Bcl-2 and Bax was up-regulated ($P<0.01$); 4 and 8 weeks later after administration, compared with model group, apoptosis index decreased and mRNA expression of Bax was down-regulated in paeonol groups, while mRNA expression of Bcl-2 was up-regulated ($P<0.05$ or $P<0.01$). Electron microscopy ultrastructural observation showed articular chondrocyte of paeonol high-dose and middle-dose groups were in early stage of apoptosis. CONCLUSIONS: Paeonol can slow down articular chondrocyte degeneration and destroy in OA model rabbits in time and dose dependently. Its mechanism may be associated with expression up-regulation of Bcl-2 and expression down-regulation of Bax.

KEYWORDS Paeonol; Chondrocytes; Apoptosis related gene; Bax; Knee osteoarthritis; In situ hybridization technique; Rabbit

骨性关节炎(Osteoarthritis,简称OA)是中老年人的常见病、多发病,系关节软骨的退变和继发性骨质增生所致的慢性

^Δ 基金项目:湖北中医药大学教育教学 2015 年度重点项目(No.2015A15)

* 实验师,博士。研究方向:骨关节病的中医药防治。电话:027-68889070。E-mail:wuqi111@163.com

通信作者:主任医师,硕士。研究方向:中医外科。电话:027-68889070。E-mail:25272965@qq.com

骨关节病。由于其病因、病理尚不清楚,OA 成为临床治疗的难题之一。非甾体类镇痛消炎药(NSAIDs)是骨科治疗 OA 的常用药物,但大多数 NSAIDs 具有胃肠道和肾脏的毒副作用。因此,低毒高效的止痛抗炎骨科药物的研发具有重要临床意义。丹皮酚是萝藦科植物徐长卿干燥根或全草的主要成分,具有解热、镇痛、消炎、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等药理学作用^[1-3],且其副作用小。前期研究发现,丹皮酚能延缓 OA 模型兔的关节软骨退变和破坏^[4-5]。本研究在此基础上进一步探讨

丹皮酚对OA模型兔软骨细胞凋亡及凋亡相关基因Bcl-2、Bax mRNA表达的时间与剂量效应关系。

1 材料

1.1 仪器

LKB-V超薄切片机(瑞典Bromma公司);H-600透射电镜(日本日立高新技术公司);RM2016病理切片机(德国Leica公司);JK-6组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司);BX53荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.2 药品与试剂

丹皮酚注射液(宁波天真制药有限公司,批号:10110906,规格:2 ml:10 mg);曲安奈德注射液(香港积华生物医药控股有限公司,批号:602,规格:1 ml:40 mg);二甲苯、包埋石蜡(国药集团化学试剂有限公司);原位末端转移酶标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(瑞士罗氏公司,批号:10768100);4',6-二脒基-2-苯基吡啶无水乙醇(DAPI,上海碧云天生物技术研究);抗荧光淬灭封片剂(武汉艾美捷科技有限公司);凋亡相关基因Bcl-2、Bax原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:ba-0315、ba-0412)。

1.3 动物

清洁级成年新西兰大白兔60只,♂,体质量(2±0.1)kg,武汉大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(鄂)2008-0004]。

2 方法

2.1 动物分组、造模、给药与取材

60只大白兔随机分为6组,即正常组,模型组,丹皮酚高、中、低剂量组和曲安奈德(阳性药物)组,每组10只。除正常组外,其余各组大鼠采用右膝前交叉韧带切断(ACLT)及内侧半月板前1/3切除复制骨关节炎模型^[6]。按照Meeh-Rubner公式计算体表面积(按mg/kg折算,mg/m²的转换因子折算成等效剂量。人与兔的比值为1:3,按照50 kg体质量成人每次关节腔注射1 mg计算)。造模成功后,丹皮酚高、中、低剂量组兔分别于关节腔给药0.8、0.4、0.2 mg/kg(分别相当于成人用量的4、2、1倍),曲安奈德组关节腔给药0.2 mg/kg,正常组和模型组给予等体积生理盐水,每周2次。分别于干预后的4、8周分批取材,每批每组各选5只兔,于右膝股骨内侧髁切取软骨组织。

2.2 软骨细胞超微结构观察

取股骨内侧髁关节面约2 mm厚关节软骨标本,2.5%戊二醛前固定,0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3次,1%锇酸固定;0.1 mol/L PBS漂洗3次,梯度(50%、70%、80%、95%、100%)乙醇脱水,每个梯度乙醇通过2次,每次15 min;环氧树脂包埋,纯丙酮脱水2次(15 min),环氧树脂包埋剂(EP-ON812)-丙酮(1:1)浸透30 min,纯包埋液浸透1 h,纯包埋液固化(37℃、24 h,60℃、48 h);超薄切片机切片,轴、铅染色(醋酸双氧铀、枸橼酸铅)后,透射电镜观察软骨细胞内结构变化。

2.3 关节软骨细胞凋亡的检测

切片脱蜡后滴加蛋白酶K工作液(10~20 μg/ml),20~37℃反应15~30 min,用PBS洗涤3次,每次5 min。制备TUNEL反应混合液(50 μl末端脱氧核糖核酸转移酶溶液+450 μl荧光素标记溶液混匀),处理组滴加50 μl TUNEL反应混合液于样本上,37℃避光孵育60 min,PBS洗涤3次,每次5 min。复染核:滴加DAPI避光孵育5 min,对本标进行染核,PBST缓冲液洗去多余的DAPI(5 min×4次)。用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,荧光显微镜下观察采集图像,组织切片上调亡的细胞呈

红色荧光(即为阳性细胞)。随机移动组织切片,选取细胞分布较均匀的高倍视野计数1 000个以上^[7],选择相邻的10个视野,运用下列公式计算细胞凋亡指数:凋亡指数(AI)=各视野阳性细胞数/视野所有细胞总数×100%。

2.4 RNA原位杂交测定软骨细胞中Bcl-2、Bax mRNA的表达

利用Bcl-2和Bax的寡核苷酸探针针对兔关节软骨细胞中Bcl-2、Bax mRNA作定量分析。Bcl-2寡核苷酸探针序列为5'-GATGAAGTACATCCATTATAAGCTGTCACA-3'、5'-GC-GCTCAGCCCTGTGCCACCTGTGGTCCAC-3'、5'-GCGAGA-TGTCACCCCTGGTGGACAACATCG-3';Bax寡核苷酸探针序列为5'-CCACCAGCTCTGAGCATGAAGACAG-3'、5'-AG-GATGCGTCCACCAAGAAGTGAGCGAGT-3'和5'-AGCAA-ACGTGTGCTCAAGGCCCTGTGCAC-3'。关节软骨标本经固定、切片后,滴加3%柠檬酸稀释的胃蛋白酶溶液,37℃孵育10~30 min,暴露mRNA核酸片段;每张切片加预杂交液20 μl,38~42℃恒温箱中保持2~4 h。将20 μl杂交液加在切片上,38~42℃恒温箱中杂交过夜。揭掉盖玻片,用37℃左右2×印记转移缓冲液(SSC)洗涤5 min,共2次;37℃温度下,滴加封闭液封闭30 min;滴加生物素化鼠抗地高辛,然后滴加链霉亲和素-生物素复合物(SABC)和生物素化过氧化酶;二氨基联苯氨(DAB)显色。采用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文报告分析系统-020018作积分光密度(IOD)量化处理。每一玻片任选5个视野,棕色颗粒为阳性,20倍物镜下测定IOD值,作为Bcl-2、Bax mRNA表达的测定值。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 软骨细胞超微病理结构观察结果

正常组兔在4周和8周时关节软骨细胞结构完整、细胞器无明显损伤。模型组兔4周时软骨细胞表面突起减少,胞核不规则,核内染色体凝聚、边集,呈凋亡早期形态学改变;8周时细胞表面发泡,胞核固缩变形,染色质浓集成块,胞质萎缩严重,呈凋亡中晚期形态学改变。丹皮酚高、中剂量组兔关节软骨细胞4周和8周时均处于凋亡早期,细胞近似圆形,细胞器结构模糊,核内异染色体散在分布、部分边集;丹皮酚低剂量组4周时可见部分细胞有凋亡早期形态学改变,8周时部分细胞呈中期凋亡形态学改变。曲安奈德组与丹皮酚低剂量组细胞超微观察相似。各组兔软骨细胞超微结构观察结果见图1。

3.2 软骨细胞凋亡指数测定结果

给药4周和8周时,正常组兔软骨细胞凋亡指数均处于较低水平。与正常组比较,模型组兔软骨细胞凋亡指数明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,除曲安奈德组兔给药8周时软骨细胞凋亡指数降低不显著外,其余各组兔给药4周和8周时软骨细胞凋亡指数显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且作用效果与丹皮酚给药时间和剂量呈正相关。各组兔软骨细胞的凋亡情况检测结果见图2,凋亡指数测定结果见表1。

3.3 软骨细胞中Bcl-2、Bax mRNA表达测定结果

给药4周和8周时,与正常组比较,模型组兔软骨细胞中Bcl-2、Bax mRNA表达均增强($P < 0.01$)。与模型组比较,给药4周时,丹皮酚各剂量组和曲安奈德组兔软骨细胞中Bcl-2 mRNA表达增强、Bax mRNA表达减弱($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);给药8周时,丹皮酚高、中剂量组兔软骨细胞中Bcl-2 mRNA表

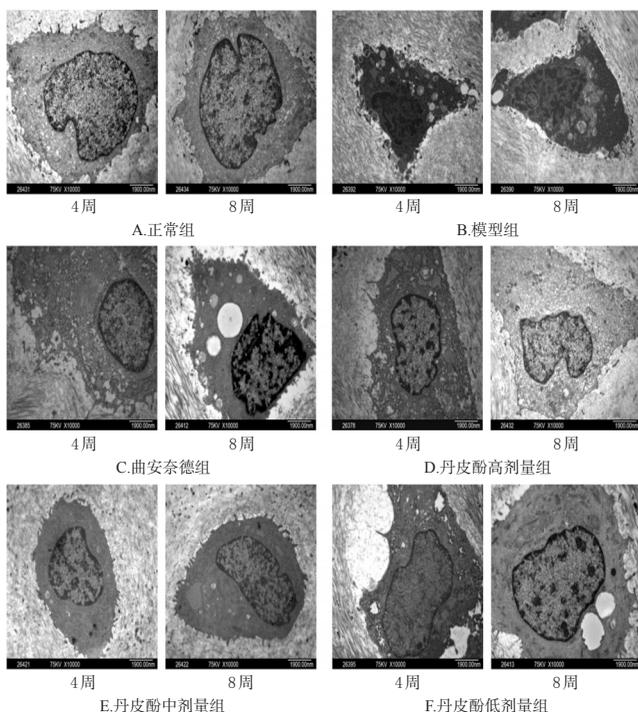


图1 各组兔软骨细胞超微结构观察结果(电镜,×10 000)

Fig 1 Results of chondrocyte ultrastructure observation of rabbits in each group (TEM, ×10 000)

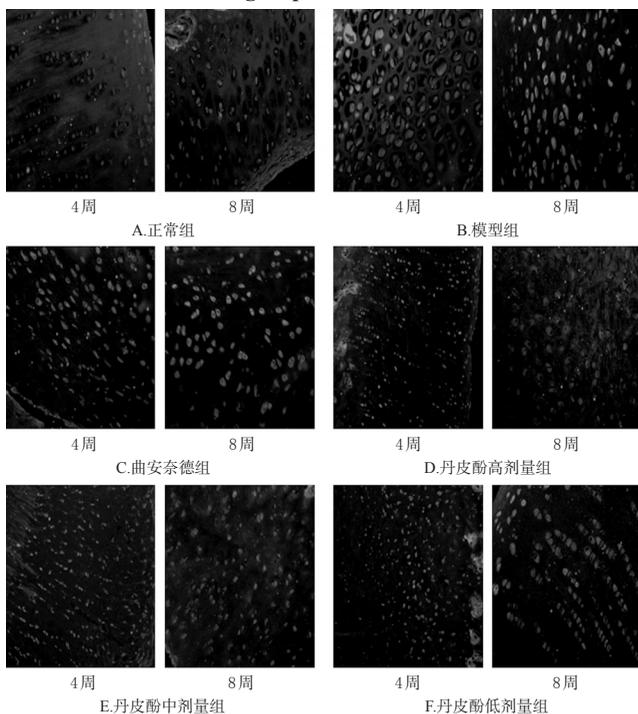


图2 各组兔软骨细胞的凋亡情况观察结果(TUNEL,×400)

Fig 2 Results of chondrocyte apoptosis observation of rabbits in each group (TUNEL, ×400)

达增强($P<0.01$),且作用效果与丹皮酚给药时间和剂量呈正相关。各组兔软骨细胞中 Bcl-2、Bax mRNA 表达的测定结果见表 2。

4 讨论

现代研究表明,OA 的发病与关节软骨的过度凋亡关系密切^[8]。Bcl-2 是一种原癌基因,具有抑制细胞凋亡、抗细胞毒素和延长细胞寿命的功能^[9]。近年的研究显示,Bcl-2 可增强细胞

表 1 各组兔软骨细胞的凋亡指数测定结果($\bar{x}\pm s,n=5,%$)

Tab 1 Apoptotic index of chondrocyte of rabbits in each group ($\bar{x}\pm s,n=5,%$)

组别	剂量,mg/kg	4周	8周
正常组		1.87±0.54	3.61±0.72
模型组		18.35±3.48*	25.64±4.31*
丹皮酚高剂量组	0.8	9.86±2.01**	12.47±2.88**
丹皮酚中剂量组	0.4	10.39±2.54**	13.11±2.41**
丹皮酚低剂量组	0.2	14.57±2.86*	16.35±3.04*
曲安奈德组	0.2	14.72±2.43*	19.42±3.66

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.05$,*** $P<0.01$

Note: vs. normal group, * $P<0.01$; vs. model group, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$

0.01

表 2 各组兔软骨细胞中 Bcl-2、Bax mRNA 表达的测定结果($\bar{x}\pm s,n=5$)

Tab 2 mRNA expression of Bcl-2 and Bax in articular cartilage of rabbits in each group ($\bar{x}\pm s,n=5$)

组别	剂量,mg/kg	Bcl-2		Bax	
		4周	8周	4周	8周
正常组		0.135±0.012	0.187±0.019	0.114±0.013	0.129±0.015
模型组		0.221±0.016*	0.305±0.018*	0.252±0.033*	0.276±0.021*
丹皮酚高剂量组	0.8	0.428±0.025**	0.518±0.027**	0.193±0.018**	0.217±0.024*
丹皮酚中剂量组	0.4	0.379±0.021**	0.496±0.023**	0.208±0.015*	0.204±0.017*
丹皮酚低剂量组	0.2	0.324±0.017*	0.421±0.021*	0.224±0.019*	0.215±0.012*
曲安奈德组	0.2	0.336±0.019*	0.332±0.014	0.213±0.022*	0.248±0.016

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.05$,*** $P<0.01$

Note: vs. normal group, * $P<0.01$; vs. model group, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$

0.01

对 DNA 损伤因子的抵抗性、抑制化学治疗药物引起的靶细胞凋亡^[10]。Bcl-2 可以与 Bax 结合形成异构二聚体,而 Bax 主要生物学作用是加速细胞凋亡、拮抗 Bcl-2 的作用^[11]。本实验通过软骨细胞凋亡指数的检测,发现模型组与正常组比较,凋亡指数变化有显著性差异($P<0.01$);且随着给药时间的延长,模型组兔软骨细胞的凋亡指数明显增加,而正常组则一直维持在较低水平,这与电镜观察到的软骨细胞损伤程度具有一致性。模型组与丹皮酚高、中剂量组的软骨细胞凋亡指数比较,差异有统计学意义($P<0.01$),这说明丹皮酚高、中剂量能有效地降低软骨细胞凋亡指数,疗效优于丹皮酚低剂量 4 周组和曲安奈德 4 周组。各组兔关节软骨细胞中 Bcl-2、Bax mRNA 表达的变化表明,模型组 Bcl-2 表达随着时间的推移和凋亡指数的增加,具有上升趋势,但并不显著,这可能与软骨细胞应激性保护机制有关。与模型组比较,丹皮酚高、中、低剂量组在用 4 周和 8 周时软骨细胞中 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);随着时间的延长,丹皮酚上调 Bcl-2 表达、下调 Bax 表达的效果更显著。

综上所述,丹皮酚可以通过剂量和时间依赖的方式上调凋亡相关调控基因 Bcl-2 的表达、下调 Bax 基因表达,抑制细胞凋亡,从而延缓 OA 模型兔的关节软骨退变和破坏。

参考文献

- [1] 孙言才,沈玉先,孙国平.丹皮酚的主要药理活性研究进展[J].中成药,2004,26(7):579.
- [2] 王学军,刘建利,王江凯.丹皮酚衍生物的合成及其抗肿瘤细胞增殖研究[J].药学学报,2012,47(1):72.
- [3] 赵阿娜,刘容欣,于秀华. RP-HPLC 法测定骨刺消痛胶囊中丹皮酚的含量[J].中国药房,2010,21(47):4 479.

柴胡注射液解热作用的谱-效关系研究[△]

苏春萌*,唐嘉熙,罗 阳,王朝霞,李婷婷[#](成都医学院药学院,成都 610083)

中图分类号 R917;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1340-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.13

摘要 目的:研究柴胡注射液解热作用的谱-效关系。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法建立柴胡注射液的指纹图谱,测定10批柴胡注射液对干酵母致热大鼠的解热作用,筛选指纹图谱主峰与不同时点(0、10、15、30、40、55、70 min)温度值。采用主成分法提取主成分,依托主成分相关系数矩阵,分析指纹图谱与降温效果间的间接关系。结果:指纹图谱共得到39个共有峰(相似度大于0.85),将峰面积较大的8、12、14、19、26、31、34、35、39号共有峰纳入研究。主成分分析法提取出4个主成分(占总变异的87%以上),第1主成分提示12号峰所代表的有效成分可能与6~13 h的降温效果有关;第2主成分提示第26号峰代表的有效成分可能与0.5~5 h的降温效果有关;第3主成分提示第34、35、39号峰可能由能产生相似效应的有效成分引起的;第4主成分提示第14号峰与31号峰可能存在某种共性。结论:柴胡注射液对发热模型大鼠有改善作用,HPLC指纹图谱与柴胡注射液解热作用有较强相关性。
关键词 柴胡注射液;指纹图谱;解热;谱-效关系;大鼠

Study on Spectrum-effect Relationship of Antipyretic Effect of Radix Bupleuri Injection

SU Chunmeng, TANG Jiayi, LUO Yang, WANG Chaoxia, LI Tingting (School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the spectrum-effect relationship of the antipyretic effect of Radix Bupleuri injection. METHODS: HPLC method was used to establish the fingerprint of Radix Bupleuri injection. The antipyretic effect of 10 batches of Radix Bupleuri injection on fever rats induced by dried yeast were determined respectively. The fingerprint peaks were screened, along with the temperature value of different time points (0, 10, 15, 30, 40, 55, 70 min). The principal components were extracted by principal component method and the indirect relationship between the fingerprint and antipyretic effect was analyzed, depending on the principal component correlation coefficient matrix. RESULTS: There were 39 common peaks in fingerprint (similarity>0.85), No. 8, 12, 14, 19, 26, 31, 34, 35 and 39 common peaks with large peak area were included in the study. Four principal components were extracted by principal component analysis (87% of total variant). First principal component showed that the active components of the 12th peak may be related to the antipyretic effect of 6 to 13 hours. The second principal component showed that the active components of the 26th peak may be related to the antipyretic effect of 0.5 to 5 hours. The third principal component showed that the similar effect of the active components could be caused by 34th, 35th and 39th peaks. The fourth principal component suggested that there were some similarities between the 14th and the 31st peaks. CONCLUSIONS: Radix Bupleuri injection have obvious improvement for fever rats. There is certain corresponding relation between HPLC fingerprint and antipyretic effect of Radix Bupleuri injection.

KEYWORDS Radix Bupleuri injection; Fingerprint; Antipyretic effect; Spectrum-effect relationship; Rat

柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC.或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzoniferolium* Willd.的干燥根,按性状不同分别习称“北柴胡”和“南柴胡”^[1]。柴胡注射液是我国首个中药

注射剂,是中药柴胡经水蒸气蒸馏法制成的灭菌水溶液^[2]。其主要成分为柴胡皂苷、甾醇、挥发油、脂肪油和多糖等,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气等作用^[3]。目前对柴胡注射液研

- [4] 吴琪,吴倩,罗勋.徐长卿丹皮酚对兔膝骨性关节炎软骨细胞凋亡的影响[J].中国药科大学学报,2015,46(3):359.
- [5] 吴琪,胡华,熊昌源.徐长卿丹皮酚对兔膝骨性关节炎关节软骨MMP-1和TIMP-1表达的研究[J].湖北中医药大学学报,2013,15(3):10.
- [6] 杨丰建,俞永林,乔健,等.兔骨关节炎模型的建立以及关节炎软骨组织中MMP-1/-13的表达[J].复旦学报:医学版,2007,34(4):563.
- [7] 欧国建,戴七一,覃学流,等.揉髌手法对兔膝关节软骨细胞凋亡及增殖细胞核抗原表达的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(50):9387.

- [8] Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, et al. Chondrocyte derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(6):3094.
- [9] Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, et al. The Bcl-2 family reunion[J]. *Mol Cell*, 2010, 37(3):299.
- [10] Liu YQ, Li Y, Qin J, et al. Matrine reduces proliferation of human lung cancer cells by inducing apoptosis and changing miRNA expression profiles[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(5):2169.
- [11] Cheng XL, Li MK. Effect of topiramate on apoptosis-related protein expression of hippocampus in model rats with Alzheimer's disease[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(6):761.

△基金项目:成都医学院2013年度科研项目(No.CY213-009)
* 学士。研究方向:药物质量评价。电话:028-62308661。E-mail:765921338@qq.com

通信作者:实验师,硕士。研究方向:药物质量评价。电话:028-62308661。E-mail:lttys-1983@163.com

(收稿时间:2015-11-25 修回时间:2016-01-12)
(编辑:林 静)