

大黄蛰虫丸对大鼠肝星状细胞活化增殖的影响

潘志恒¹, 成家茂², 李永伟¹, 何宏文³, 谢瑶³, 何义华¹

(1. 中山大学附属第三医院中医科, 广东 广州 510630; 2. 大理医学院人体解剖学教研室, 云南 大理 671000;
3. 中山大学人体解剖学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】观察大黄蛰虫丸对经旁分泌和自分泌途径激活大鼠肝星状细胞活化增殖情况的影响。【方法】采用Nycodenz分离液非连续密度梯度离心法同步分离急性CCl₄损伤模型大鼠和正常大鼠肝的枯否细胞(KC)和星状细胞(HSC)。在制备正常鼠血清和DHZCW药物血清的基础上, 将它们分别加入KC和HSC培养板内作用后制备成正常鼠KC条件培养液(NKCCM)、损伤鼠KC条件培养液(KCCM)以及正常鼠HSC条件培养液(HSCCM)。将上述条件培养液分别干预HSC 24 h、48 h和72 h, 然后采用MTT法和³H-TdR掺入法分别检测比较各组HSC细胞活化增殖情况。【结果】损伤鼠不含药组和正常KC对照组比较, HSC活化增殖情况显著性增高($P < 0.01$), 损伤鼠含药组HSC活化增殖则显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且其抑制效应随着含药血清浓度的升高逐渐增强; 而正常鼠HSC不含药组和正常鼠HSC含药组各组间比较均无显著性差异(均 $P > 0.05$)。【结论】DHZCW对经旁分泌途径激活大鼠HSC活化增殖有明显的抑制作用, 且作用效应与血清药物浓度间存在剂量依赖关系, 但对经自分泌途径激活大鼠HSC活化增殖未见明显抑制作用。

关键词: 大黄蛰虫丸; 旁分泌; 自分泌; 肝星状细胞; 增殖

中图分类号: R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)03-0250-05

Influence of Dahuang Zhechong Pill on Proliferation of Rat Hepatic Stellate Cells

PAN Zhi-heng¹, CHENG Jia-mao², LI Yong-wei¹, HE Hong-wen³, XIE Yao³, HE Yi-hua¹

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Anatomy, Dali University, Dali 671000, China; 3. Department of Anatomy, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To observe the effects of Dahuang Zhechong Pill (DHZCW) on the proliferation of rat hepatic stellate cells (HSCs) activated by paracrine and autocrine pathway. 【Methods】The CCl₄-injured and normal rat Kupffer cells (KC), hepatic stellate cells (HSC) were separated by non-continuous density gradient centrifugation of Nycodenz medium. After the common rat and DHZCW drug sera were prepared, they were added respectively into KC and HSC culture plates for normal KC conditioned medium (NKCCM), injured rat KC conditioned medium (KCCM) and HSC conditioned medium (HSCCM). After HSCs were interfered for 24, 48 and 72 h by those conditioned media, the changes of proliferative HSCs in all groups were observed and compared by the methods of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) and ³H-thymidine (³H-TdR) incorporation assay. 【Results】Compared to HSCCM group, the multiplication of HSCs increased markedly in KCCM without drug group ($P < 0.01$). The activation and proliferation of HSC decreased obviously in KCCM with drug group ($P < 0.05$) and the inhibitory effect enhanced as the concentration of sera with drug increased. There were no significant differences between HSCCM without drug group and HSCCM with drug group ($P > 0.05$). 【Conclusions】DHZCW can obviously inhibit the proliferation of rat HSCs activated by paracrine pathway, and there is a concentration-dependent relationship between the inhibition effect and the drug dose. However, there was no remarkably inhibition effect on the proliferation of rat HSCs activated by autocrine pathway.

Key words: Dahuang Zhechong pill; paracrine pathway; autocrine pathway; liver stellate cell; proliferation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(3): 250-254, 274]

收稿日期: 2008-11-28

基金项目: 国家中医药管理局基金项目(04-05JP51); 广东省中医药管理局科研基金滚动项目(2007104)

作者简介: 潘志恒, 医学硕士, 副教授, E-mail: stevenp28@21cn.com

肝纤维化发生的机制虽然十分复杂,但肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)在肝损伤过程中被激活经表型转化成肌成纤维细胞(myo-fibroblaster, MFB),产生大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM)毫无疑问是肝纤维化形成的中心环节^[1-2]。慢性肝损伤时,与HSC相邻的枯否(KC)细胞首先被激活,活化的KC吞噬毒素与大量分泌炎性细胞因子,后者以旁分泌途径刺激HSC活化增殖并转化为MFB,并通过分泌转化生长因子(TGF β 1)等重要细胞因子进一步维持自身的激活状态并激活邻近的HSC^[3]。因此研究具有抗肝纤维化作用的中药复方药物血清对大鼠经旁分泌和自分泌途径激活HSC细胞活化增殖情况的影响意义重大。本课题组以往的研究工作发现,经方大黄蛰虫丸(DHZCW)对体外培养的传代HSC活化增殖有直接的抑制作用,但具体作用机制不明^[4]。为了进一步探讨该药的抗肝纤维化作用机制,我们观察了DHZCW对大鼠旁分泌途径和旁分泌途径激活HSC细胞活化增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠, SPF 级, 体质量 400 ~ 500 g, 均由中山大学药学院实验动物中心提供, 普通饲料和普通饮水饲养。实验前禁食 12 h。

1.1.2 HSC 细胞株 由北京大学人民医院肝胆外科中心魏玉华老师惠赠。

1.1.3 药物 大黄蛰虫丸药粉为暗紫色粉末, 由广东阳江制药厂惠赠。

1.1.4 主要试剂和仪器 链霉蛋白酶 E (pronase E)、IV 型胶原酶 (type IV collagenase)、DNase I、胰蛋白酶 (trypsin)、Nycodenz 原液、噻唑蓝 (MTT) 均购自 Sigma 公司; 四氯化碳 (CCl₄)、高纯度琼脂糖、核酸染料等生化试剂购自上海生物工程有限公司; M199 培养液 (标准型)、DMEM 干粉均购自 Invitrogen 公司产品; 标准胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自杭州四季青生物制品公司; 氘-胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR) 购自中国科学院上海原子核研究所等。

OLYMPUS CX31 型倒置相差显微镜 (OLYMPUS 公司); Heraeus Biofuge 15R 型台式高速冷冻离心

机 (德国 Heraeus 公司); FJ-211G 双道液体闪烁仪 (西安二六二厂产品); Bio-Tek EL x 800 型全自动酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司产品) 等。

1.2 方法

1.2.1 含药血清及正常鼠血清的制备 参考文献 [5] 方法给予 SD 大鼠灌胃服用大黄蛰虫丸药粉 (每只每天 2.7 g)。将上述药粉用超纯水溶解, 每天分 2 次灌胃给药, 每次 4 mL, 连续给药 5 d。空白对照组为正常大鼠组, 灌胃等量超纯水。采血时间为末次灌胃后 1 h, 以乙醚麻醉大鼠, 无菌状态下打开大鼠心脏, 经右心房抽血, 2 000 r/min ($r = 13.5$ cm) 离心 15 min, 血清经 56 °C 灭活 30 min 后置于 -20 °C 冰箱内保存备用。

1.2.2 造模 采用 SD 雄性大鼠, 皮下注射 500 mL/L CCl₄ 5 mL/kg (与植物油按 1:1 比例混合), 5 d 后分离 KC。

1.2.3 KC 的分离 参考文献 [6] 并改进, 分离培养损伤模型鼠和正常鼠的 KC, 台盼蓝染色法检测细胞活性, 碳素墨汁吞噬实验鉴定细胞。正常大鼠的细胞得率为 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^7$ /肝, 损伤模型鼠的细胞得率为 $(1.0 \sim 1.5) \times 10^7$ /肝, 纯度均 > 90%。

1.2.4 HSC 细胞株的培养 以 5×10^3 cells/cm² 接种于 50 mL 培养瓶内, 加入含 100 mL/L FBS 的 M199 培养液, 每 3 d 左右铺满单层后传代。

1.2.5 条件培养液 (CM) 制备 正常鼠 KC 条件培养液 (NKCCM) 的制备参考文献 [7] 并改进。KC 以 1×10^5 cells/cm² 密度接种于 6 孔培养板, 培养 48 h 后吸弃培养液, 再加入含 200 mL/L 正常鼠血清的 DMEM 培养液 3 mL 继续培养, 24 h 后收集上清液, 记为 NKCCM。同样方法 48 h 后再收集 1 次, 两次的 NKCCM 混合, 置于 -70 °C 冰箱中保存备用。损伤鼠 KC 条件培养液 (KCCM) 的制备方法同上, 但加入的血清为药物血清, 体积分数分别为含 0% (0% 药物血清 + 20% 正常鼠血清)、5% (5% 药物血清 + 15% 正常鼠血清)、10% (10% 药物血清 + 10% 正常鼠血清) 和 20% (20% 药物血清, 无正常鼠血清), 收集的上清液分别记为 0%、5%、10% 和 20% KCCM。(3) 正常鼠 HSC 条件培养液 (HSCCM) 的制备: 与 KC 同步分离获得 HSC, 细胞以 1×10^4 cells/cm² 密度接种于含 100 mL/L 胎牛血清的 M199 培养液中贴壁培养。方法同上, 分别制备成 0%、5%、10%、20% 含药 HSC 条件培养液 (HSCCM)。

1.2.6 实验分组 ①对照组:将 HSC 细胞株接种于培养板培养 24 h 后,弃去培养液,加入 NKCCM,作用于 HSC 24 h 后即可检测。②旁分泌组:包括 0%、5%、10%、20% KCCM 组共四组。加入 CM 方法同对照组。③自分泌组:包括 0%、5%、10%、20% HSCCM 组共 4 组。同上方法接种细胞后弃培养液,分别加入不同的条件培养液制备而成,继续培养 24 h、48 h 或 72 h 后分别进行 HSC 活性的检测。

1.2.7 活化 HSC 增殖的检测 采用 MTT 法和 ^3H -TdR 掺入法检测。MTT 法:称取 125 mg MTT 放入小烧杯中,加 25 mL PBS(0.01 mol/L, pH7.4)搅拌,将铺满单层的 HSC 用 2.5 g/L 胰酶消化后,以 10^3 cells/孔密度接种于 96 孔板中。培养 24 h 后,吸弃上清,分别加入 NKCCM、0%、5%、10%、20% KCCM 和 0%、5%、10%、20% HSCCM 各 200 μL (每组设 3 个复孔,用不同批次的 CM 重复实验 3 次)。每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL ,孵育 4 h 弃上清液, PBS 洗涤,然后每孔加入 200 μL DMSO。选择 570 nm 波长,以酶标仪检测各孔 OD 值。 ^3H -TdR 掺入法:将 HSC 以 10^4 cells/孔密度接种于 24 孔板中,培养 24 h 后吸弃培养液,再加入 CM(方法同上)。培养至 20 h 后,再每孔加入 0.5 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$ 的 ^3H -TdR,胰酶消化,洗涤,超速离心过滤后将细胞收集于玻璃纤维滤膜上,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥箱内放置 30 min 烘干,移至测量管内,用液闪计数器测定每孔 HSC 的放射活性即每分钟脉冲数值(cpm 值)。

1.3 数据分析

各组数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料均数比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验。使用 SPSS 13.0 统计分析软件分析数据, $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 原代分离培养 KC、HSC 的形态和鉴定

新分离的 HSC 倒置相差显微镜下呈圆形,内含高折光性颗粒。培养 4 ~ 48 h 大部分细胞已贴壁;10 ~ 14 d 细胞渐融合,形态由星形向梭形转变,胞体变长,胞浆内脂滴减少,细胞呈局灶性簇状增殖生长,其间有大量新生细胞(图 1A)。细胞生长成单层铺满培养瓶后即可传代培养,传代后的细胞可呈成纤维细胞样改变(图 1B)。

新分离的 KC 荧光显微镜下观察,在 328 nm 波长处未见明显的细胞自发荧光现象,而 HSC 的胞浆内呈现蓝绿色荧光。KC 碳素墨汁吞噬试验 2 h 后普通显微镜下胞浆内即可见大量吞噬的墨汁颗粒(图 1C)。传代的 HSC α -SMA 免疫细胞化学染色阳性细胞几乎达 100%(图 1D)。

2.2 DHZCW 对经旁分泌途径活化 HSC 细胞 MTT 转化的影响

旁分泌组和正常对照组条件培养液对活化的 HSC 作用 24 h、48 h、72 h 后,测定各组的 OD 值(表 1)。可见,在对 HSC 作用 24 h、48 h、72 h 后,旁分泌组的 OD 值随着含药血清浓度的升高而出现明显下降。旁分泌组中含药血清作用组和无药物血清作用组相比,5% KCCM 组、10% KCCM 组与 0% KCCM 组的组间差别有统计学意义($P < 0.05$);而 20% KCCM 组与 0% KCCM 组的组间差别有显著统计学意义($P < 0.01$)。旁分泌组和正常对照组相比,OD 值均升高,除 20% KCCM 组和 48 h 的 10% KCCM 组与 NKCCM 组间无明显差别外,其余组与 NKCCM 组间的差别均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 KCCM 及 NKCCM 作用不同时间后对活化 HSC 增殖的影响

Table 1 Effect of KCCM and NKCCM on activated HSC proliferation after different time
($n = 5, \bar{x} \pm s$, OD value)

	24 h	48 h	72 h
NKCCM	0.38 ± 0.06	0.40 ± 0.08	0.45 ± 0.09
0%KCCM	$0.76 \pm 0.09^{1)}$	$0.84 \pm 0.08^{1)}$	$0.92 \pm 0.11^{1)}$
5%KCCM	$0.64 \pm 0.08^{2)}$	$0.77 \pm 0.09^{2), 3)}$	$0.82 \pm 0.13^{2), 3)}$
10%KCCM	$0.57 \pm 0.11^{2), 3), 5)}$	$0.62 \pm 0.10^{3), 5)}$	$0.72 \pm 0.11^{2), 3), 5)}$
20%KCCM	$0.49 \pm 0.12^{4), 6)}$	$0.56 \pm 0.11^{4), 6)}$	$0.64 \pm 0.19^{4), 6)}$
<i>F</i>	276.08	360.41	227.54
<i>P</i>	0	0	0

1) Compared with NKCCM group, $P < 0.01$; 2) Compared with NKCCM, $P < 0.05$; 3) Compared with 0% KCCM group, $P < 0.05$; 4) Compared with 0% KCCM, $P < 0.01$; 5) Compared with 5% KCCM group, $P < 0.05$; 6) Compared with 10% KCCM, $P < 0.05$

2.2 DHZCW 对经自分泌途径活化的 HSC 细胞 MTT 转化的影响

自分泌组条件培养液对活化的 HSC 作用 24、48、72 h 后,测定各组的 OD 值(表 2)。可见,自分泌组中无药物血清作用的 0% HSCCM 组与其它含

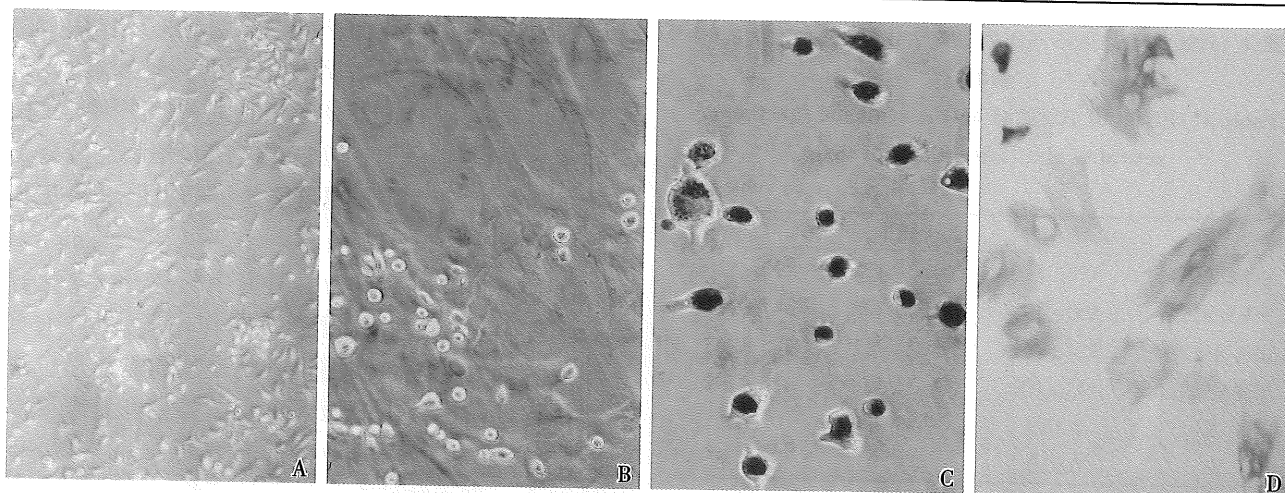


图1 原代分离培养的KC、HSC

Fig.1 Identification of the primary isolated and cultivated KCs and HSCs

A: Primary HSCs after 2 weeks cultivation. ($\times 100$); B: Passage HSCs turn into fibroblastic cell. ($\times 200$); C: KCs were identified by prepared Chinese ink phagocytosis test. The living KCs had strong phagocytosis activity. ($\times 200$); D: HSCs analyzed by Immunocytochemical staining for α -smooth muscle actin (α -SMA). And the positive α -SMA-staining cells in passage HSCs almost reached to one hundred percent.

药血清作用的5%、10%、20% HSCCM组相比,及各含药血清作用组组间比较,OD值的变化无明显差别($P > 0.05$)。

表2 HSCCM作用不同时间后对活化HSC增殖的影响

Table 2 Effect of HSCCM on activated HSC proliferation after different time ($n=4, \bar{x} \pm s$, OD value)

	24 h	48 h	72 h
0% HSCCM	0.28 ± 0.03	0.33 ± 0.06	0.38 ± 0.10
5% HSCCM	0.24 ± 0.05	0.30 ± 0.06	0.38 ± 0.12
10% HSCCM	0.23 ± 0.04	0.29 ± 0.07	0.35 ± 0.10
20% HSCCM	0.33 ± 0.11	0.36 ± 0.09	0.40 ± 0.12
F	3.736	1.922	0.284
P	0.021	0.146	0.836

Compared with different groups at 24, 48, and 72 h, $P > 0.05$

2.3 DHZCW对经旁分泌途径活化HSC细胞DNA合成的影响

旁分泌组和正常对照组条件培养液对活化的HSC作用24、48、72 h后,测定各组的cpm值(表3)。可知,对HSC分别作用24、48、72 h后,随着含药血清浓度的升高,含药血清作用的5%、10% KCCM组cpm值出现迅速升高,与无药血清作用的0% KCCM组相比有明显差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),当含药血清浓度增加到20%,cpm值出现显著下降,与10% KCCM组相比,差别有显著统计学意义($P < 0.01$)。此外,条件培养液作用48 h、72 h

后旁分泌组中各浓度组与正常对照的NKCCM组比较,cpm值的差别有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。

表3 KCCM及NKCCM作用不同时间后对活化HSC合成功能的影响

Table 3 Effect of KCCM and NKCCM on the synthetic function of activated HSC after different time

	($n=5, \bar{x} \pm s$, cpm value)		
	24 h	48 h	72 h
NKCCM	296 ± 156	1407 ± 565	825 ± 257
0% KCCM	295 ± 105	$2645 \pm 731^{1)}$	$1948 \pm 358^{1)}$
5% KCCM	279 ± 138	$4352 \pm 1033^{2),3)}$	$2101 \pm 751^{2),3)}$
10% KCCM	$381 \pm 124^{3),5)}$	$10660 \pm 2527^{2),4),6)}$	$6497 \pm 1230^{2),4),6)}$
20% KCCM	$208 \pm 135^{7)}$	$6908 \pm 2230^{2),3),7)}$	$3147 \pm 844^{2),3),7)}$
F	29.310	149.024	185.692
P	0	0	0

1) Compared with NKCCM group, $P < 0.05$; 2) Compared with NKCCM group, $P < 0.01$; 3) Compared with 0% KCCM group, $P < 0.05$; 4) Compared with 0% KCCM group, $P < 0.01$; 5) Compared with 5% KCCM group, $P < 0.05$; 6) Compared with 5% KCCM group, $P < 0.01$; 7) Compared with 10% KCCM group, $P < 0.01$

2.4 DHZCW对经自分泌途径活化HSC细胞DNA合成的影响

自分泌组条件培养液对活化的HSC作用24、48、72 h后,测定各组的cpm值(表4)。可见,对HSC分别作用24、48、72 h后,自分泌组中各浓度组之间比较cpm值均无明显差别($P > 0.05$)。

表 4 HSCCM 作用不同时间后对活化 HSC 合成功能的影响

Table 4 Effect of HSCCM on the synthetic function of activated HSC after different time

($n=4, \bar{x} \pm s$, cpm value)

	24 h	48 h	72 h
0% HSCCM	312 ± 116	482 ± 135	292 ± 126
5% HSCCM	300 ± 132	456 ± 128	347 ± 179
10% HSCCM	324 ± 152	502 ± 211	485 ± 237
20% HSCCM	333 ± 109	493 ± 174	418 ± 199
<i>F</i>	0.179	0.116	1.572
<i>P</i>	0.910	0.950	0.215

Compared with different groups at 24 h, 48 h, 72 h, $P>0.05$

3 讨 论

HSC的激活过程十分复杂,是 KC、肝细胞、窦内皮细胞、pit 细胞、炎症细胞以及 HSC 以旁分泌和/或自分泌形式分泌多种细胞因子协同作用的结果^[8]。HSC 激活至少包含两个步骤:①启动阶段:在肝损伤因子的刺激下,HSC 的邻近细胞如肝细胞、KC 等被激活,通过旁分泌方式产生大量细胞因子如转化生长因子(TGF- β)、血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素生长因子(IGF-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和炎症因子等^[9],使静止的 HSC 胞体扩大,分裂增殖,表型改变,并产生大量细胞因子,表达 α -SMA 和胶原;②持续活化阶段:启动后的 HSC 持续维持活化状态,并不断分裂增殖,产生大量保持活化状态的子代细胞,释放自分泌调节因子如 TGF- β 、PDGF 等参与自身活化的调节^[10]。

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物并沉积在细胞中,活化的、代谢旺盛的细胞比静止的、代谢弱的细胞还原作用强,MTT 比色法正是利用了这一原理被广泛地应用于细胞活性和增殖情况检测。细胞分裂之前,需要复制 DNA,脱氧胸腺嘧啶核苷(TdR)是 DNA 合成所需特有的合成原料,通过测定细胞内掺入的放射性核素(^3H)标记的 TdR(^3H -TdR)量,可反映其 DNA 合成情况,进而较为准确地反映细胞的增殖能力。本组资料的实验结果发现,DHZCW 对经旁分泌途径激活的大鼠 HSC 活化增殖有明显的抑制作用,且作用效应与血清药物浓度存在剂量依赖关系,但对经自分泌途径激

活的大鼠 HSC 活化增殖则未见明显抑制作用。由于旁分泌途径是 HSC 活化启动的关键因素,而自分泌活化是 HSC 能够持续增殖的重要原因。我们的观察结果提示, DHZCW 对 HSC 细胞经旁分泌途径活化启动的抑制很可能是该药抗肝纤维化作用的主要途径。

近年来的研究认为,复方中药抗肝纤维化具有多环节、多层次、多靶点综合作用的优势^[11],单环节的特异性阻断作用较弱既是其弱点,但也可能是其副作用较少的原因。大黄蛰虫丸是东汉名医张仲景《金匱要略》中的著名方剂,上世纪 80 年代以来,国内陆续有用该药治疗慢性肝病肝硬化取得较好临床疗效的报道。我们以往的研究工作发现,DHZCW 不但对体外培养的正常传代 HSC 细胞增殖有直接的抑制作用^[4],而且还能显著促进大鼠 MMP₁ 基因表达,从而增加对胶原的降解作用^[12]。后者的发现为以往有学者研究发现 DHZCW 可显著抑制 TIMP 生成,并推论 DHZCW 可能具有促进 MMP 活化,从而增加对胶原的降解作用的说法找到了依据^[13]。

刘成等^[14]研究中药扶正化淤方抗肝纤维化的作用机制表明,扶正化淤方对 HSC 旁分泌与自分泌活化途径有明显的抑制作用,其抑制 HSC 自分泌作用的机制可能与 HSC 分泌血管内皮细胞生长因子(VEGF)受抑有关;周正等^[15]的研究也显示,抗纤软肝冲剂能抑制 HSC 的 TGF- β 1 的基因和蛋白表达,阻断其自分泌放大活化效应。说明中药抗肝纤维化作用的途径和形式很可能具有多样性。因此,虽然本组资料的研究并未发现 DHZCW 对经自分泌途径 HSC 细胞的活化增殖有明显抑制作用,但综合以往的多个研究结果,我们仍然有理由相信,DHZCW 的抗肝纤维化作用很可能是通过包括抑制 HSC 细胞经旁分泌途径的活化启动、抑制 TIMP 的生成和促进 MMP 胶原酶的合成等多途径、多层次、多靶点综合作用的结果,值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Friedman SL. Cellular sources of collagen production in liver [J]. Semin Liver Dis, 1990, 10(1): 20-29.
- [2] 沈 雁,舒建昌,梁 蓉,等. 姜黄素和环氧合酶-2 抑制剂 NS-398 对肝星状细胞时效的双向调节体外

(下转第 274 页 to page 274)