

商陆皂苷甲致肾细胞毒性的研究

周倩 姚广涛 金若敏 谢家骏

(上海中医药大学药物安全评价研究中心, 上海, 201203)

摘要 目的: 考察商陆皂苷甲 Esculentoside A (EsA) 对人肾小管上皮细胞 (HK-2 细胞) 的毒性。方法: 1) MTT 法测细胞活力; 2) 检测细胞上清液 LDH、细胞内 SOD 及 MDA; 3) 采用倒置显微镜及电镜观察细胞形态学; 4) 采用 Hoechst-PI 染色及流式细胞仪观察细胞凋亡的情况。结果: 1) EsA 对肾细胞的活力有显著的抑制作用, 其 IC_{50} 为 $149.11 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且存在一定的时效和量效关系; 2) EsA 能升高肾细胞培养上清中的 LDH, 使肾细胞内 SOD/MDA 比值有所下降; 3) EsA 能使肾细胞及其超微结构发生变化, 出现凋亡或坏死, 有一定的量效关系。结论: 大于 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的商陆皂苷甲对 HK-2 细胞有一定的毒性, 其毒性机制与细胞氧化应激、凋亡等相关。

关键词 商陆皂苷甲; HK-2 细胞; 肾细胞毒性

Study on Renal Cell Toxicity Induced by Esculentoside A

Zhou Qian, Yao Guangtao, Jin Ruomin, Xie Jiajun

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To investigate the toxicity of Esculentoside A on HK-2 cells (Human renal tubular epithelial cells). **Methods:** 1) MTT assay was used to test the cell viability. 2) The LDH in cells supernatant, SOD and MDA in the cells were detected. 3) Morphological changes of the cells were observed through inverted phase contrast microscope and electron microscopy. 4) Cell apoptosis was detected by Hoechst33342-PI dyeing and flow cytometry. **Results:** 1) Esculentoside A could inhibit nephrocyte viability dependently on time and dose (IC_{50} was $149.11 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). 2) Esculentoside A could increase the activity of LDH in nephrocyte supernatant, reduce SOD activity and increase MDA content in nephrocytes. 3) Esculentoside A could cause damage of nephrocyte structure, cell apoptosis and necrosis. **Conclusion:** It showed that large dose of Esculentoside A (more than $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) has toxicity on HK-2 cells and the mechanisms of toxicity may include cellular oxidative damage and cell apoptosis.

Key Words Esculentoside A; HK-2 cells; Renal cell toxicity

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.02.006

商陆始载于《神农本草经》, 为商陆属植物商陆 (*Phytolacca acinosa* Roxb.) 和垂序商陆 (*Phytolacca americana* L.) 的干燥根, 为泻下逐水药, 其性寒, 味苦辛, 有毒, 归肺、肾、大肠经^[1]。现代研究显示, 商陆具有免疫调节及抗肿瘤、消炎抗菌、利尿等多种药理作用, 过量服用商陆的不良反应有神经系统和消化系统^[2-5], 课题组研究曾指出, 商陆能对大鼠的肾脏产生一定的毒性^[6]。本文选用主要成分之一商陆皂苷甲, 探讨其对肾细胞的直接毒性。

1 材料

1.1 细胞株 HK-2 细胞即人肾小管上皮细胞, 由上海中科院细胞库提供。

1.2 试剂及材料 商陆皂苷甲 (上海融禾医药科技发展有限公司, 纯度 > 98%, 批号: 120417); DMEM/F12

培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); 青霉素-链霉素抗体 (Gibco 公司); 胰蛋白酶 (Sigma 公司); MTT、PI、Hoechst 33342 (Sigma 公司); LDH (日本世诺临床诊断制品株式会社); SOD、MDA、超微量蛋白 (南京建成生物研究所); 二甲基亚砜 (国药集团化学试剂有限公司)。培养基配置: DMEM/F12 + 10% 胎牛血清 + 1% 双抗。

1.3 仪器 BioTek 全自动酶标仪; 奥林巴斯 BX51 正置显微镜、IX70 倒置系统显微镜; 日立 7080 全自动血液生化仪。

2 方法

2.1 EsA 对肾细胞活力的影响 将处于对数生长期的 HK-2 细胞经 0.25% 胰酶消化后制备成细胞悬液 (细胞浓度为 8×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 每孔加入 180 μL , 培

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (编号: 2009CB522807); 国家“十二五”科技重大专项课题“中药安全评价技术平台” (编号: 2011ZX09301-009)

作者简介: 周倩 (1988—), 女, 硕士研究生, 中药安全性评价, E-mail: 423384692@qq.com

通信作者: 姚广涛, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药新药及其安全性评价研究, Tel: (021) 51322472, E-mail: ygt1969@yahoo.com.cn

养 24 h 后分别加入 6 个不同浓度的 EsA, 每个浓度 6 孔, 另设阴性平行对照组, 置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 20 h, 避光加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL, 继续培养 4 h。弃上清, 加入二甲基亚砷(150 μL/well), 振荡混匀, 另设一调零孔(DMSO), 于酶标仪检测波长 570 nm 处测吸光度 A, 计算细胞活率。重复实验 3 次。细胞活率 = (药物组平均 A - 调零孔 A) ÷ (对照组平均 A - 调零孔 A) × 100%。

细胞同上方法处理, 培养 24 h 后加入 EsA, 使其终浓度为 150 μg · mL⁻¹, 分别于 2、4、8、12、18、24 h, 避光加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL, 继续培养 4 h。弃上清。加入二甲基亚砷(150 μL/well), 同上法测定吸光度 A, 重复实验 3 次。

2.2 EsA 对肾细胞上清液 LDH、细胞内 SOD 及 MDA 的影响

2.2.1 上清液 LDH 的检测 同 2.1 法将细胞悬液(细胞浓度为 18 × 10⁴ 个 · mL⁻¹)接种于 24 孔板。置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 分别以含 50、100、150、200 μg · mL⁻¹ 商陆皂苷甲的完全培养液处理细胞, 另设阴性平行对照组, 每组 3 孔。继续培养 24 h 后, 取细胞培养上清液, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液立即用日立 7080 全自动血液生化仪测 LDH 含量。

2.2.2 SOD 及 MDA 的检测 将处于对数生长期的 HK-2 细胞经 0.25% 胰酶消化后制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 25 × 10⁴ 个 · mL⁻¹, 接种于 6 孔板中。培养 24 h 后分别以含 25、50、100 μg · mL⁻¹ 商陆皂苷甲的完全培养液处理细胞, 另设阴性平行对照组。培养 24 h 后, 胰酶消化收集各组细胞, 用生理盐水洗涤 2 次细胞后, 用适量生理盐水超声裂解细胞, 3000 r/min 离心 5 min 后取适量上清液, 检测 SOD 及 MDA, 并对蛋白定量。

2.3 EsA 对肾细胞形态的影响

2.3.1 倒置显微镜观察细胞形态 同 2.2.1 法处理细胞后, 以倒置显微镜观察细胞形态。

2.3.2 电镜观察细胞形态 将 HK-2 细胞接种于 100 mm 培养皿中, 置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后分别以 25、50、100 μg · mL⁻¹ 商陆皂苷甲的完全培养液处理细胞, 另设阴性平行对照组。培养箱中培养 24 h 后, 弃上清, 用 PBS 溶液洗涤 2 次, 加入预冷电镜液使细胞固定 5 min, 细胞刮刀刮下细胞于 1.5 mL 离心管中, 1200 r/min 离心 5 min 后弃上清, 加入适量预冷的电镜液置 4 ℃ 冰箱保存细胞, 送基尔顿生物科技有限公司进行电镜检测。

2.4 EsA 对肾细胞凋亡的影响

2.4.1 Hoechst33342 - PI 染色观察肾细胞的凋亡/坏死 同 2.2.1 对细胞进行处理, 给药 24 h 后, 于培养液中加入终浓度为 10 μg · mL⁻¹ 的 Hoechst33342, 37 ℃ 反应 10 min 后, 继续加入终浓度为 10 μg · mL⁻¹ 的 PI, 4 ℃ 反应 20 min 后, 立即用倒置荧光显微镜观察拍照。

2.4.2 流式细胞仪测肾细胞凋亡 将处于对数生长期 HK-2 肾细胞分别经 0.25% 胰酶消化后, 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后分别以含 25、50、100、150 μg · mL⁻¹ 商陆皂苷甲的完全培养液处理细胞, 给药 24 h 后, 用胰酶消化收集各组细胞, 1200 r/min 离心 5 min 后, 弃上清, 加入新鲜培养液后收集细胞于 1.5 mL 离心管中, 交由上海中医药大学大学生化毒理室进行流式细胞检测, 采用方法: Annexin V - PI 测细胞凋亡。

2.5 统计学处理 SPSS 15.0 软件分析数据, 实验统计数据均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐时用 LSD 法, 方差不齐时用 Dunnett's 法。P < 0.01 和 P < 0.05 为有统计学意义; IC₅₀ 用 Bliss 法计算。

3 结果

3.1 EsA 对肾细胞活力的影响 与对照组相比, 50 ~ 200 μg · mL⁻¹ EsA 组 HK-2 细胞活力明显下降, 有统计学意义(P < 0.01), 且呈一定的剂量依赖性, IC₅₀ 为 149.11 μg · mL⁻¹, 见表 1。

与对照组相比, 150 μg · mL⁻¹ EsA 作用 2 h 后, 各组 HK-2 细胞活力均明显下降, 有统计学意义(P < 0.01), 且呈一定的时间依赖性, 见表 2。

表 1 EsA 对 HK-2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

Group	Dose/(μg · mL ⁻¹)	A	Cell Viability/%
Control	—	0.322 ± 0.006	100.00 ± 1.86
EsA	200	0.054 ± 0.015 **	16.77 ± 4.66 **
	150	0.157 ± 0.011 **	48.76 ± 3.42 **
	100	0.272 ± 0.009 **	84.47 ± 2.80 **
	50	0.291 ± 0.002 **	90.37 ± 0.62 **
	25	0.318 ± 0.005	98.76 ± 1.55
	12.5	0.315 ± 0.008	97.83 ± 2.48

Note: * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control

表 2 150 μg · mL⁻¹ EsA 对 HK-2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

Time(h)	Group	Control		150 μg · mL ⁻¹ EsA	
		A	Cell Viability/%	A	Cell Viability/%
2		0.629 ± 0.018	100.00 ± 2.86	0.384 ± 0.011 **	61.05 ± 1.75 **
4		0.589 ± 0.037	100.00 ± 6.28	0.280 ± 0.027 **	47.54 ± 4.58 **
8		0.587 ± 0.019	100.00 ± 3.24	0.275 ± 0.005 **	46.85 ± 0.85 **
12		0.587 ± 0.039	100.00 ± 6.64	0.236 ± 0.007 **	40.20 ± 1.19 **
18		0.490 ± 0.016	100.00 ± 3.26	0.196 ± 0.021 **	40.00 ± 4.28 **
24		0.524 ± 0.023	100.00 ± 4.39	0.189 ± 0.007 **	36.07 ± 1.34 **

Note: * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control

3.2 EsA 对肾细胞培养上清 LDH、细胞内 SOD 及

MDA 的影响 与对照组相比,150 和 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 组的 HK-2 细胞上清液中 LDH 含量明显升高,有统计学意义($P < 0.01$),见表 3。

与对照组相比,25 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 作用 24 h 后,各组的 HK-2 细胞中 SOD、MDA 分别出现相应的降低和升高现象,SOD/MDA 明显降低,见表 4。

表 3 EsA 对 HK-2 细胞上清 LDH 的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Dose/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	LDH/ $(\text{IU} \cdot \text{L}^{-1})$
Control	—	65.67 $\pm$ 1.53
EsA	200	172.33 $\pm$ 2.52 **
	150	147.00 $\pm$ 3.61 **
	100	67.33 $\pm$ 4.93
	50	64.00 $\pm$ 1.00

Note: ** $P < 0.01$ vs control

表 4 EsA 对 HK-2 细胞 SOD、MDA 的影响

Group	Dose/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	SOD/ (U/mgprot)	MDA/ $(\text{nmol}/\text{mgprot})$	SOD/MDA
Control	—	38.98	1.58	24.67
EsA	100	33.56	2.34	14.34
	50	33.78	1.78	18.98
	25	34.75	1.56	22.28

3.3 EsA 对肾细胞形态的影响

3.3.1 显微镜观察细胞形态 正常 HK-2 细胞间连接紧密,贴壁生长,形态呈鹅卵石样,200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 组的肾细胞基本死亡漂浮于培养液中,150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 组的肾细胞数量大量减少、细胞皱缩变圆、部分死亡细胞漂浮于培养液中,100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 组的肾细胞数量明显减少、少量细胞脱壁死亡,50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 组的肾细胞形态未发生明显的改变,附图 1。

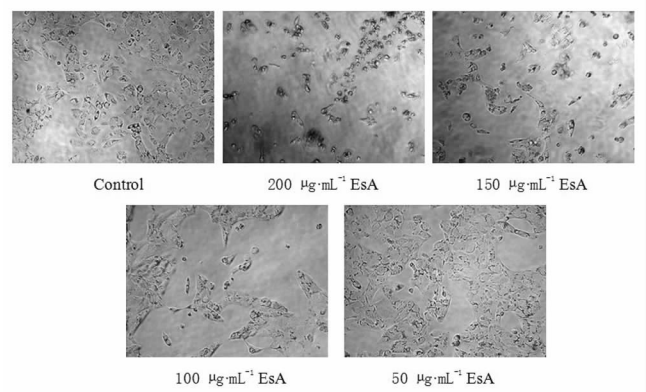


图 1 商陆皂苷甲(EsA)对 HK-2 细胞形态的影响($\times 200$)

3.3.2 超微结构细胞形态 正常对照组 HK-2 细胞结构较完整、核形态不规则,100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 组大部分线粒体被破坏、细胞核中有明显较大的圆形致密物,50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 组细胞核大、细胞膜和核膜扭曲内陷、大部分线粒体破坏及肿大,25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 组细

胞核大小不等且不规则、线粒体肿大破坏,见图 2。

3.4 EsA 对肾细胞凋亡/坏死的影响 Hoechst-PI 染色显示:正常细胞呈淡蓝色,早期凋亡细胞呈亮蓝色,晚期凋亡/坏死细胞呈橘红色。正常对照组与 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 组 HK-2 细胞基本正常,随着药物浓度增加,凋亡/坏死细胞不断增加,200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 组的肾细胞基本均处于晚期凋亡或坏死状态,呈现一定的量效关系,见图 3。

流式细胞仪检测显示:HK-2 肾细胞在 25 ~ 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA 作用 24 h 后,细胞凋亡发生的比率由 5.32% 上升到 18.46%,存在一定的量效关系,见表 5。

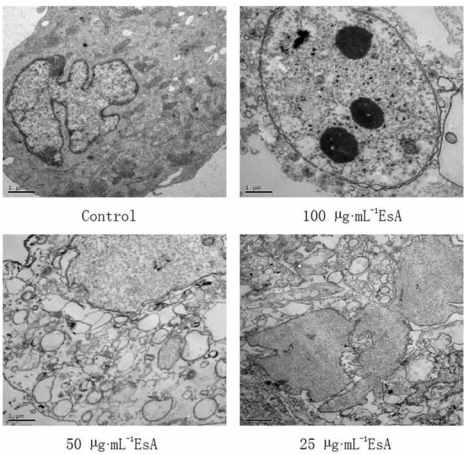


图 2 商陆皂苷甲(EsA)对 HK-2 细胞亚显微结构的影响

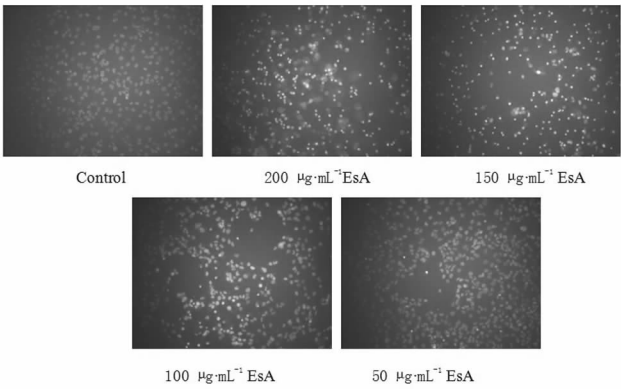


图 3 商陆皂苷甲(EsA)对 HK-2 细胞凋亡的影响($\times 200$)

表 5 商陆皂苷甲(EsA)对 HK-2 细胞凋亡的影响

Group	Early apoptosis cells/%	Mid and late apoptosis or necrosis cells/%	Normal cells/%
Control	1.47	2.84	95.70
25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA	1.57	5.32	93.21
50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA	1.48	7.06	91.46
100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA	1.39	11.17	87.44
150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EsA	1.04	18.46	80.50

4 讨论

商陆皂苷甲(EsA)在商陆中的含量约为 0.4%^[7],其既是商陆的主要及活性成分,又是其毒性成分之一。

体内研究,给予大鼠商陆水煎液 35 d 可致肾脏损伤,其病理损伤主要表现为肾小管上皮细胞变性、蛋白管型,且恢复期部分损伤可逆^[6]。文献报道,商陆皂苷甲能够引起 BXS 小鼠肾小球和肾小管细胞的凋亡,其作用机理可能与下调 BXS 小鼠肾组织中 Bcl-2 (凋亡调节蛋白)的表达和 Bcl-2/Bax 的比值从而加速细胞凋亡有关^[8]。人肾小管上皮细胞(HK-2 细胞系)是成人肾细胞,其功能接近原代培养的肾小管上皮细胞,已经成为研究各种药物肾毒性及肾小管损伤机制的重要细胞模型^[9-11]。

本研究表明,大于 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 商陆皂苷甲对 HK-2 细胞(人肾小管上皮细胞)有明显的毒性作用,提示商陆皂苷甲可能是中药商陆致肾毒性的物质基础之一,其对肾细胞毒性机制与致细胞氧化应激、凋亡相关。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社,2010.
[2] 黄国英,刘星星. 中药商陆的药理及应用研究[J]. 中国实用医药, 2013,8(15):249-250.

[3] 赵国栋,王立宽,段静,等. 商陆不同极性、根和茎提取物的抑菌性能分析[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(4):717-720.
[4] 李一飞,姚广涛. 商陆药理作用及毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(13):248-251.
[5] 陈金香. 中西医结合治疗急性商陆中毒 26 例[J]. 浙江中医药大学学报,2010,34(2):221.
[6] 李一飞,徐婷婷,姚广涛,等. 尿液 NGAL, KIM-1, IL-18 在商陆所致的大鼠肾损伤中的变化特征及其联合检测的意义[J]. 中国中药杂志,2012,37(23):3611-3617.
[7] 马杰,赖道万,孙文基. 商陆药材中商陆皂苷甲的含量测定[J]. 药物分析杂志,2010,30(1):163-165.
[8] Hu Z, Qiu L, Xiao Z et al. Effects of esculetin on autoimmune syndrome induced by Campylobacter jejuni in mice and its modulation on T-lymphocyte proliferation and apoptosis[J]. International Immunopharmacology,2010,10(1):65-71.
[9] 崔晋峰,邢凌霄,李增宁,等. 赭曲霉毒素 A 对体外培养人肾小管上皮细胞凋亡的作用[J]. 细胞生物学杂志,2008,30(2):243-246.
[10] 魏佳莉,王畅,彭佑铭,等. 黄芪对人肾小管上皮细胞细胞外基质分泌的影响及其机制探讨[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,10(8):664-667.
[11] 闫长会,吴纯启,廖明阳. 肾近端小管细胞系在药物肾毒性评价中的应用[J]. 国外医学药学分册,2003,30(4):234-237.

(2014-01-06 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 150 页)

[16] Kobayashi Y, Hoshikume K, Nakano Y, et al. The positive inotropic and chronotropic effects of evodiamine and rutaecarpine, indolquinazoline alkaloids isolated from the fruits of Evodia rutaecarpa, on the guinea pig isolated right atrial possible involvement of vanilloid receptors[J]. Planta Med,2001,67(3):2442-2481.
[17] 肖红,林强,易美华. 两种抗菌防腐剂的抑菌作用研究[J]. 海南大学学报:自然科学版,2002,20(03):231-235.
[18] 张晓凤,高南南,李飞,等. 吴茱萸炮制前后挥发油成分及毒性的比较研究[J]. 解放军药学学报,2011,27(3):229-232.
[19] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社,2010.
[20] 蔡雪映,孟楠,杨冰. 服用吴茱萸过量致中毒 1 例分析[J]. 北京中医,2006,25(3):171-172.
[21] 陈云云,袁玉芬. 浅谈吴茱萸的中毒与治疗[J]. 浙江中西医结合杂志,1999,9(4):58.
[22] 龚慕辛,王智民,张启伟,等. 茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(2):183-187.
[23] 周绮,张茜,金若敏. 吴茱萸致小鼠肝毒性时效、量效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):232-235.
[24] 张茜,周绮,金若敏. 吴茱萸次碱对肝肾毒性的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):221-225.
[25] 王会,朱兰兰,黄伟,等. 提取方式对吴茱萸“质量-毒性”综合评价模式的影响[J]. 中国药物警戒,2012,9(5):279-281.
[26] 黄伟,赵燕,孙荣. 吴茱萸不同组分对小鼠急性毒性试验比较研究[J]. 中国药物警戒,2010,7(3):129-134.
[27] Ding JS, Gao R, Li D, et al. Solid dispersion of rutaecarpine improved its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats[J]. Biopharm Drug Dispos,2008,29(9):495.

[28] Shyr M, Lin L, Lin T, et al. Determination and pharmacokinetics of evodiamine in the plasma and feces of conscious rats[J]. Anal Chim Acta, 2006,558(1-2):16.
[29] 张丽,徐世希,王婷,等. 大鼠灌胃不同纯度吴茱萸提取物后吴茱萸碱及吴茱萸次碱的药动学研究[J]. 中国药房,2012,23(21):1967-1969.
[30] Lee SK, Lee JH, Yoo HH, et al. Characterization of human liver cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of rutaecarpine[J]. J Pharmaceut Biomed,2006,41(1):304.
[31] 李莉,赵军宁,易进海,等. 吴茱萸多基原、多产地毒性效应特征研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2219-2222.
[32] 任雪松,周先建,张美,等. 川渝两地吴茱萸的有效成分测定分析[J]. 资源开发与市场,2011,27(4):292-294.
[33] 周倩,金若敏,姚广涛. 吴茱萸中 4 种单体成分致肾细胞毒性的初步研究[J]. 中国药物警戒,2013,10(1):1-5.
[34] 李慧颖,王秀坤,王玉刚,等. 不同孔径透析袋对吴茱萸汤提取物入血成分透过的影响—体外药理实验中中药提取物样品前处理的可行性[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2010,12(4):515-520.
[35] 杨秀伟. 吴茱萸水和 70% 乙醇提取物的急性毒性和遗传毒性试验[J]. 中国中药杂志,2008,33(11):1317-1321.
[36] 肖凯,李宏霞. 环磷酰胺剂量、取样时间对小鼠骨髓微核率的影响[J]. 癌变畸变突变,2005,17(6):367-369.
[37] Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, et al. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test[J]. Mutat Res,1998,410:81-116.
[38] 尤育初,糜静娟,廖青,等. 615 系小鼠血容量及红细胞比积的测定[J]. 上海畜牧兽医通讯-实验动物科学专辑,1982,2(3):125-127.

(2014-01-06 收稿 责任编辑:洪志强)