

# 中成药逆转人结肠癌细胞株对化疗药物耐药的研究

张念华, 陈高峰, 李寿杰, 武如通, 高海利

广东省第二中医院肿瘤科, 广东 广州 510095

**[摘要]** 目的: 本研究拟观察鸦胆子油乳注射液、华蟾素注射液和注射用黄芪多糖对结肠癌耐药细胞株的杀伤作用, 为临床合理、有效使用中成药提供实验依据。方法: 运用药物浓度梯度递增间歇诱导法建立人结肠癌 lovo 细胞耐 5-氟尿嘧啶细胞株, 并命名为 lovo/5-Fu。MTT 法检测 lovo/5-Fu 的耐药能力及不同浓度中成药对 lovo/5-Fu 细胞株的耐药逆转作用, 并根据相应结果计算耐药逆转倍数 (RF)。细胞迁移实验分为 4 组: 空白对照组、黄芪多糖组、鸦胆子组和华蟾素组, 检测不同中成药对 lovo/5-Fu 细胞株迁移能力的影响。结果: 5-Fu 对 lovo 细胞株的  $IC_{50}$  为 14.5 mg/L, 对 lovo/5-Fu 细胞株的  $IC_{50}$  为 115.1 mg/L, 根据上述两株细胞的  $IC_{50}$  可算出 lovo/5-Fu 细胞株对 5-Fu 的耐药指数为: 7.94。浓度为 17.3、45.3、83.8、112.5 mg/L 鸦胆子油乳注射液的耐药逆转倍数分别为 9.5、23.5、54.4、86.5 倍; 浓度为 8.2、21.2、38.6、50.1 mg/L 华蟾素注射液的耐药逆转倍数分别为 11.2、25.2、56.6、90.5 倍; 浓度为 26.3、70.9、115.2、163.4 mg/L 注射用黄芪多糖的耐药逆转倍数分别为 1.5、8.2、26.5、74.2 倍。与空白对照组比较, 黄芪多糖组、鸦胆子组和华蟾素组侵入小室的细胞数目明显减少, 迁移能力明显减弱, 其中以鸦胆子组和华蟾素组更为明显, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 鸦胆子油乳注射液、华蟾素注射液和注射用黄芪多糖这三种中成药均能不同程度的逆转 lovo/5-Fu 对 5-Fu 的耐药性, 其中以鸦胆子油乳注射液和华蟾素注射液最为明显。

**[关键词]** 人结肠癌 lovo 细胞株; 多药耐药性; 5-氟尿嘧啶 (5-Fu); lovo/5-Fu 细胞株; 鸦胆子油乳注射液; 华蟾素注射液; 注射用黄芪多糖

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 02-0011-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.02.004

## Research on Chinese Patent Medicine Reversing Chemotherapeutic Drugs Resistance of Human Colon Carcinoma Cell Line

ZHANG Nianhua, CHEN Gaofeng, LI Shoujie, WU Rutong, GAO Haili

**Abstract:** Objective: This study was to observe killing effect of Fructus bruceae emulsion, cinobufagin injection and Astragalus polysaccharides for injection on colon carcinoma drug-resistant cell line, and provide experimental basis for clinical use of Chinese patent medicine properly and effectively. Methods: Establish colon carcinoma lovo cell line which is 5-fluorouracil (5-Fu) resistance with the method of drug concentration gradient and increasing intermittent revulsion, and named it lovo/5-Fu. Detected Drug resistance ability of lovo/5-Fu and drug resistance reversal of Chinese patent medicine of different concentration in lovo/5-Fu with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, calculated drug resistance reversal fold (RF) according to the corresponding results. Cell migration experiment divided objects into four groups: blank control group, Astragalus polysaccharides group, khosam group and cinobufagin group, and detected effect of different Chinese patent medicine on transfer ability of lovo/5-Fu cell line. Results:  $IC_{50}$  (half maximal inhibitory concentration) of lovo cell line in 5-Fu was 14.5 mg/L,  $IC_{50}$  of lovo/5-Fu lovo cell line in 5-Fu was 115.1 mg/L. According to the above  $IC_{50}$  cell lines, the multidrug resistance index of lovo/5-Fu cell line in 5-Fu was 7.94. Drug resistance RF of Fructus bruceae emulsion was 9.5, 23.5, 54.4, 86.5, whose concentration was 17.3, 45.3, 83.8, 112.5 mg/L respectively; drug resistance RF of cinobufagin injection was 11.2, 25.2, 56.6, 90.5, whose concentration was 11.2, 25.2, 56.6, 90.5 mg/L respectively; drug resistance RF of Astragalus polysaccharides for injection was 1.5, 8.2, 26.5, 74.2, whose concentration was 26.3, 70.9, 115.2, 163.4 mg/L respectively. Compared with the blank control group, cell number that cut out of the small room and transfer ability of Astragalus polysaccharides group, khosam group and cinobufagin group were obviously decreased, which were more significant

[收稿日期] 2016-07-29

[基金项目] 广东省中医药局科研课题 (20151006)

[作者简介] 张念华 (1981-), 男, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤内科和微创治疗。

in the khosam group and cinobufagin group ( $P < 0.05$ ). Conclusion: Fructus bruceae emulsion, cinobufagin injection and Astragalus polysaccharides for injection can reverse drug resistance of Iovo/5-Fu in 5-Fu in different degree, among them, effect of Fructus bruceae emulsion and cinobufagin injection are more significant.

Keywords: Human colon carcinoma cell line; Multidrug resistance; 5-fluorouracil (5-Fu)Iovo/5-Fu cell line; Fructus bruceae emulsion; Cinobufagin injection; Astragalus polysaccharides for injection

结肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤,其发病率呈逐年增高的趋势,姑息化疗是治疗结肠癌既有力又常用的手段,在临床化疗过程中所产生的多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象是造成结肠癌治疗失败最常见、又最难解决的问题。在肿瘤治疗过程中,总有一小部分肿瘤细胞可以逃避抗肿瘤药物的杀伤,并且这群细胞随时都有可能形成新的肿瘤,新生肿瘤具有更高的侵袭力、更强的转移潜能,对治疗产生更强的耐受,从而导致治疗失败。肿瘤干细胞具有无限增殖、自我更新和多向分化潜能,是肿瘤发生、增殖、生长、转移和复发的根源。由于肿瘤干细胞的耐药性及大多处于休眠状态的特点,传统化疗药物只对正在分裂的肿瘤细胞有效,并不能有效杀灭肿瘤干细胞,最终导致肿瘤复发、转移和治疗失败。近年来中药因其高效、低毒、多靶点的优势在肿瘤多药耐药研究中日益受到重视。本研究拟寻找逆转结肠癌细胞对化疗药物耐药的方法,观察加入不同浓度的中成药(鸦胆子油乳注射液、华蟾素注射液和注射用黄芪多糖)后人结肠癌耐药细胞株对化疗药物敏感性的改变,分析中成药对化疗药物耐药的逆转作用。

## 1 材料与方法

1.1 实验细胞与培养 人结肠癌 Iovo 细胞株由中山大学肿瘤防治中心实验室保存。Iovo 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基,培养条件为 37 °C 恒温、5 % CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中培养,每 2 天传代 1 次。

1.2 实验材料与仪器 RPMI-1640 培养基(Gibco 公司产品),胎牛血清(杭州四季清公司),Transwell 趋化小室(美国 Millipore),Matrigel 基质胶(美国 BD 公司)。鸦胆子油乳注射液购自本院药剂科,生产厂家:江苏九旭药业有限公司,批号:国药准字 Z19993152。华蟾素注射液购自本院药剂科,生产厂家:安徽华润金蟾药业股份有限公司,批号:国药准字 Z34020273。注射用黄芪多糖购自本院药剂科,生产厂家:天津赛诺制药有限公司,批号:国药准字 Z20040086。ZHJH2C1112C 智能型垂直流超净工作台(上海智城分析仪器公司),CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Election Corporation),倒置显微镜(日本 Olympus),低温高速台式离心机(美国 Beckman)。

1.3 人结肠癌耐药细胞株的建立 运用药物浓度梯度递增间歇诱导法建立人结肠癌 Iovo 细胞耐 5-氟尿嘧啶(5-Fu)细胞株。5-Fu 浓度从 2 mg/L 开始,加药 48 h 后更换不含化疗药物的培养液继续培养,72 h 更换培养液 1 次,待细胞重新长

至对数生长期时再次加相同浓度药物进行诱导。如此重复并不断增加药物的浓度,连续培养 3 月,获得能在 50 mg/L 浓度中稳定生长的 Iovo 耐 5-Fu 细胞株,并命名为 Iovo/5-Fu。Iovo/5-Fu 在平时传代的过程中,加入 50 mg/L 的 5-Fu 以维持其耐药性。

1.4 MTT 法检测结肠癌耐药细胞株(Iovo/5-Fu)的耐药能力 取对数生长期 Iovo 细胞制成  $5 \times 10^4$  个/mL 的单细胞悬液,以每孔 200  $\mu$ L 细胞悬液接种于 96 孔板(即  $1 \times 10^4$  个/孔),37 °C,5 % CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后,吸出上层培养液,分别加入相应浓度的受试药物(5-Fu 浓度分别为 1.25  $\mu$ g/mL, 2.5  $\mu$ g/mL, 5.0  $\mu$ g/mL, 10.0  $\mu$ g/mL, 20.0  $\mu$ g/mL, 40.0  $\mu$ g/mL, 80.0  $\mu$ g/mL, 160  $\mu$ g/mL 和 320  $\mu$ g/mL),继续培养 72 h。实验终止前 4 h 加入 20  $\mu$ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续孵育 4 h 后终止培养,去除培养液后每孔加二甲基亚砜(DMSO) 200  $\mu$ L,振荡至结晶溶解后在分光光度计吸收波长 570 nm 的条件下,测定各孔 OD 值。

按下列公式计算出增殖抑制率:

肿瘤细胞相对抑制率(%) = (细胞对照组 OD 值 - 药物处理组 OD 值) / (细胞对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值)  $\times$  100%。

将药物浓度同相应浓度下的抑制率作线性回归,获得回归方程及决定系数,根据回归方程计算出 IC<sub>50</sub> 及 IC<sub>10</sub>。分别测定子代细胞及亲代细胞的 IC<sub>50</sub>,并计算耐药指数。耐药指数(resistance index, RI) = 子代细胞 IC<sub>50</sub> / 亲代细胞 IC<sub>50</sub>。

1.5 MTT 法测定中成药对化疗药物耐药的逆转作用 选择结肠癌 Iovo 细胞株及其对应的耐 5-Fu 细胞株(Iovo/5-Fu),MTT 法确定中成药对耐药细胞株 IC<sub>50</sub> 及 IC<sub>10</sub> 的药物浓度,取 IC<sub>50</sub> 及 IC<sub>10</sub> 所对应的药物浓度为中成药浓度梯度的最高及最低值,共设四个浓度。分为 5 组:5-Fu 组,5-Fu+ 中成药 IC<sub>10</sub> 浓度组,5-Fu+ 中成药 IC<sub>20</sub> 浓度组,5-Fu+ 中成药 IC<sub>30</sub> 浓度组,5-Fu+ 中成药 IC<sub>40</sub> 浓度组。MTT 法检测加用不同浓度中成药后,联合用药对结肠癌耐药细胞株(Iovo/5-Fu)的 IC<sub>50</sub> 值,计算不同浓度中成药对化疗药物耐药的逆转作用,并根据相应结果计算不同浓度中成药的逆转倍数(RF)。逆转倍数(RF) = 5-Fu 组 IC<sub>50</sub> / 联合用药组 IC<sub>50</sub>。

1.6 中成药对结肠癌耐药细胞株迁移能力的影响 细胞迁移实验采用孔径 8.0  $\mu$ m 的 24 孔 Transwell 小室,Transwell 小室杯孔直径 6.5 mm,杯底由聚碳酸酯微孔滤膜封闭(微孔孔径 8  $\mu$ m)。基质胶准备:将冻存于 -80 °C 冰箱的 matrigel 基质胶

置于4℃冰箱中过夜,变成液态,应用无血清RPMI-1640培养基稀释成浓度为1:7(matrigel基质胶和RPMI-1640培养基比例1:7),吸50μL matrigel基质胶和RPMI-1640培养基混悬液均匀铺到Transwell小室的上室底部。将对数生长期的Iovo细胞常规胰酶消化后,重悬,分别调整细胞密度至 $1 \times 10^7$ 个/L,取运用无血清培养基稀释的细胞悬液100μL加入上室。实验组中,上室细胞悬液分别加入IC<sub>50</sub>对应浓度中成药进行处理;下室加入500μL含10%胎牛血清培养基。根据上室细胞悬液是否加药,实验分4组:空白对照组、黄芪多糖组、鸦胆子组和华蟾素组。Transwell小室置于37℃恒温、5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养24h。培养结束后弃去上层培养基,取出Transwell小室用PBS缓冲液漂洗2次,4%多聚甲醛固定细胞10min,将Transwell小室倒置风干;风干后置入苏木精溶液中染色。倒置显微镜下观察侵入小室的细胞情况,并计数。取上、下、左、右、中心各2个高倍视野,随机计数10个高倍视野内( $\times 200$ )的侵入小室的细胞数目,将数据进行统计分析。

1.7 统计学方法 用SPSS13.0统计软件对数据进行分析,计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用T检验。

2 结果

2.1 不同浓度5-Fu对Iovo及Iovo/5-Fu细胞株的抑制率比较见表1。根据表1的实验结果可计算出5-Fu对Iovo细胞株的IC<sub>50</sub>为14.5mg/L,对Iovo/5-Fu细胞株的IC<sub>50</sub>为115.1mg/L,根据上述两株细胞的IC<sub>50</sub>可算出Iovo/5-Fu细胞株对

5-Fu的耐药指数为:7.94。

表1 不同浓度5-Fu对Iovo及Iovo/5-Fu细胞株的抑制率比较(%)

| 5-Fu浓度(μg/mL) | 细胞株  |           |
|---------------|------|-----------|
|               | Iovo | Iovo/5-Fu |
| 1.25          | 17.8 | -         |
| 2.5           | 25.8 | -         |
| 5.0           | 33.6 | 3.3       |
| 10.0          | 43.2 | 7.2       |
| 20.0          | 60.5 | 13.4      |
| 40.0          | 82.3 | 23.2      |
| 80.0          | 92.3 | 39.8      |
| 160.0         | 97.4 | 62.36     |
| 320.0         | 99.5 | 96.66     |

2.2 不同浓度中成药对Iovo/5-Fu细胞株的耐药逆转作用见表2。浓度为17.3、45.3、83.8、112.5mg/L鸦胆子油乳注射液的耐药逆转倍数分别为9.5、23.5、54.4、86.5倍;浓度为8.2、21.2、38.6、50.1mg/L华蟾素注射液的耐药逆转倍数分别为11.2、25.2、56.6、90.5倍;浓度为26.3、70.9、115.2、163.4mg/L注射用黄芪多糖的耐药逆转倍数分别为1.5、8.2、26.5、74.2倍。鸦胆子油乳注射液和华蟾素注射液在较低的浓度下即可出现明显的逆转作用,而注射用黄芪多糖则需要较高的浓度下才能发挥作用。

表2 不同浓度中成药对Iovo/5-Fu细胞株的耐药逆转作用

| 5-Fu+ 鸦胆子油乳注射液(mg/L) | Iovo/5-Fu               |      | 5-Fu+ 华蟾素注射液(mg/L) | Iovo/5-Fu               |      | 5-Fu+ 注射用黄芪多糖(mg/L) | Iovo/5-Fu               |      |
|----------------------|-------------------------|------|--------------------|-------------------------|------|---------------------|-------------------------|------|
|                      | IC <sub>50</sub> (mg/L) | RF   |                    | IC <sub>50</sub> (mg/L) | RF   |                     | IC <sub>50</sub> (mg/L) | RF   |
| 5-Fu                 | 115.1                   | -    | 5-Fu               | 115.1                   | -    | 5-Fu                | 115.1                   | -    |
| 5-Fu+17.3            | 12.12                   | 9.5  | 5-Fu+8.2           | 10.28                   | 11.2 | 5-Fu+26.3           | 76.73                   | 1.5  |
| 5-Fu+45.3            | 4.90                    | 23.5 | 5-Fu+21.2          | 4.57                    | 25.2 | 5-Fu+70.9           | 14.04                   | 8.2  |
| 5-Fu+83.8            | 2.12                    | 54.4 | 5-Fu+38.6          | 2.03                    | 56.6 | 5-Fu+115.2          | 4.34                    | 26.5 |
| 5-Fu+112.5           | 1.33                    | 86.5 | 5-Fu+50.1          | 1.27                    | 90.5 | 5-Fu+163.4          | 1.55                    | 74.2 |

2.3 各组侵入小室细胞数目比较 见表3。空白对照组侵入小室的细胞数目最多,迁移能力最强。与空白对照组比较,黄芪多糖组、鸦胆子组和华蟾素组侵入小室的细胞数目明显减少,迁移能力明显减弱,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表3 各组侵入小室细胞数目比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 细胞数(个)                 |
|-------|------------------------|
| 空白对照组 | 86.3± 8.2              |
| 黄芪多糖组 | 65.5± 7.4 <sup>①</sup> |
| 鸦胆子组  | 51.4± 8.5 <sup>①</sup> |
| 华蟾素组  | 43.4± 7.7 <sup>①</sup> |

与空白对照组比较, ① $P < 0.05$

3 讨论

手术治疗是目前早期结肠癌的主要治疗手段,对于不可手术切除的晚期结肠癌患者建议接受综合诊疗。晚期结肠癌姑息性化疗是治疗结肠癌既有力又常用的手段,在临床化疗过程中所产生的多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象是造成结肠癌化疗失败的最常见、又最难解决的问题。

大量的研究表明实体瘤中有一小部分肿瘤细胞具有干细胞特性,能够随时分化成增殖活跃的肿瘤细胞<sup>[1-2]</sup>。肿瘤干细胞具有无限增殖、自我更新和多向分化潜能,是肿瘤发生、增殖、生长、转移和复发的根源<sup>[3]</sup>。目前已发现大量与肿瘤干细胞相关的标志物,在这些标志物中最引人瞩目的是CD133,CD133阳性肿瘤细胞与肿瘤的自我更新、分化、信号传导调

控、药物耐受、复发和预后等密切相关<sup>[4]</sup>。有研究表明来自于结肠癌的 CD133 阳性肿瘤细胞是唯一能够在裸鼠中诱发肿瘤的细胞群<sup>[5]</sup>。Ong CW 等发现 CD133 的表达是单纯接受手术治疗的结肠癌患者独立的预后不良因素,同时也是接受 5-Fu 化疗结肠癌患者预后不良的因素<sup>[6]</sup>。

传统化疗药物并不能有效杀灭肿瘤干细胞,中药因其高效、低毒、多靶点的优势近年来在肿瘤多药耐药研究中日益受到重视<sup>[7]</sup>。鸦胆子油注射剂是近年来研发的抗肿瘤中药制剂,主要成分是油酸、亚油酸、硬脂酸、软脂酸及花生烯酸,该药一方面能够通过抑制拓扑异构酶的活性而抑制 DNA 的复制、转录和翻译;另一方面能够通过诱导体内干扰素的合成来促进癌细胞的凋亡,因此该药物对各期癌细胞均有杀伤和抑制作用,能够对常规化疗药物起到较好的辅助作用<sup>[8~9]</sup>。华蟾素注射液是我国研发的抗肿瘤中药制剂,基础研究表明,其主要的活性成分是蟾毒内酯类物质,包括蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基。华蟾素注射液能够抑制多种恶性肿瘤的增殖、转移,对化疗非敏感肿瘤,如肝癌、胰腺癌、乳腺癌也有较好疗效<sup>[10~11]</sup>。黄芪作为常用的“扶正固本,补益中气”的中药,化学成分复杂,含有多糖、皂苷、黄酮以及氨基酸、亚油酸、生物碱等。黄芪多糖是黄芪中含量最多、免疫活性最强的一类物质,具有增强免疫系统功能、抗肿瘤、保肝、降血糖、抗病毒、延缓衰老等作用<sup>[12~13]</sup>。

本研究首先运用药物浓度梯度递增间歇诱导法建立人结肠癌 Iovo 耐 5-Fu 细胞株,运用 MTT 法测定出 Iovo/5-Fu 细胞株对 5-Fu 的耐药指数为:7.94。选择结肠癌 Iovo 细胞株及其对应的耐 5-Fu 细胞株,MTT 法确定中成药对耐药细胞株 IC<sub>50</sub> 及 IC<sub>10</sub> 的药物浓度,根据 IC<sub>50</sub> 及 IC<sub>10</sub> 的药物浓度,设定四个浓度梯度进行耐药逆转实验,并计算逆转倍数(RF)。结果表明:鸦胆子油乳注射液和华蟾素注射液在较低的浓度下即可出现明显的逆转作用,而注射用黄芪多糖则需要较高的浓度下才能发挥作用。细胞迁移实验表明,在 IC<sub>30</sub> 所对应的药物浓度下,三种中成药对 Iovo 细胞迁移能力的影响也不同,鸦胆子组和华蟾素处理组的细胞迁移能力明显弱于黄芪多糖处理组,表明鸦胆子组和华蟾素处理组抑制 Iovo 细胞的迁移能力明显强于黄芪多糖。这可能与不同的作用机制有关,鸦胆子和华蟾素注射液是具有直接抗肿瘤作用的中成药,而注射用黄芪多糖的抗肿瘤作用则主要通过提高机体免疫力来实现的。

#### [参考文献]

[1] Todaro M, Francipane MG, Medema JP, et al. Colon

cancer stem cells: promise of targeted therapy [J]. Gastroenterology, 2010, 138(6): 2151-2162.

- [2] Wang K, Wu X, Wang J, et al. Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine [J]. Int J Nanomedicine, 2013, 8: 899-908.
- [3] Rao GH, Liu HM, Li BW, et al. Establishment of a human colorectal cancer cell line P6C with stem cell properties and resistance to chemotherapeutic drugs[J].Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(6): 793-804.
- [4] 江州华, 俞继卫, 姜波健. CD133/prominin-1 与胃肠道肿瘤的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(6): 467-470.
- [5] Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(4): 389-402.
- [6] Ong CW, Kim LG, Kong HH, et al. CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer [J]. Mod Pathol, 2010, 23(3): 450-457.
- [7] 李元滨, 林丽珠. 中药多靶点逆转肺癌多药耐药机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 232-236.
- [8] 谭建福, 周军, 赵云. 鸦胆子油的临床应用及研究进展[J]. 广东医学, 2013, 34(9): 1467-1468.
- [9] 宋艳丽, 薛瑞, 吴倩, 等. 鸦胆子油注射液对 H22 细胞增殖的抑制作用及其机制探讨[J]. 实用肝脏病杂志, 2014, 17(2): 180-183.
- [10] 田莉莉, 侯力, 高山, 等. 华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞增殖及 P-YAP 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 153-156.
- [11] 陶峰. 华蟾素防治大肠癌术后复发转移的效果[J]. 广东医学, 2013, 34(24): 3808-3809.
- [12] 孙舒玉, 何小鹏, 柴旺, 等. 黄芪多糖对黑色素瘤小鼠调节性 T 细胞的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 176-178.
- [13] 何文涓, 袁志坚, 何晓升. 黄芪多糖的药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5): 692-694.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)