

# 硒酸软骨多糖对 K562 细胞线粒体膜电位及凋亡的影响

朱红, 刘安军, 郑国强, 祝传望, 刘昊雨, 索佳丽, 徐晓明  
(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 本文研究了硒酸软骨多糖 (CA-Se) 对 K562 人慢性髓源白血病细胞线粒体膜电位的影响, 及对 K562 细胞的凋亡诱导作用。采用 MTT 比色法测定 CA-Se 对 K562 细胞的增殖抑制作用; Hoechst 33342/PI 染色后于显微镜下观察细胞的形态变化; 罗丹明-123 染色后用流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位的变化; 采用免疫荧光法检测 caspase-9 蛋白表达水平, 并用 RT-PCR 检测其基因的表达。结果表明: CA-Se 可显著抑制 K562 细胞的增殖, 且具有浓度依赖性和时间依赖性; 经 CA-Se 作用后, 细胞形态发生明显改变, 细胞体积变小, 细胞膜变得不规则, 染色质固缩; 对照组与 CA-Se 处理组的线粒体膜电位分别为 96.10% 和 78.07%, 膜电位下降; CA-Se 处理后, K562 细胞中 caspase-9 蛋白表达显著增加, 其基因表达水平显著上升。说明硒酸软骨多糖可通过降低细胞线粒体膜电位, 上调凋亡起始酶 caspase-9 的基因表达, 激活 caspase-9 蛋白来诱导 K562 细胞凋亡。

**关键词:** 硒酸软骨多糖; K562 细胞; 膜电位; 细胞凋亡

文章编号: 1673-9078(2015)10-35-39

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.007

## Effects of Selenic Acid Cartilage Polysaccharide on Mitochondrial Membrane Potential and Cell Apoptosis of K562 Cells

ZHU Hong, LIU An-jun, ZHENG Guo-qiang, ZHU Chuan-wang, LIU Hao-yu, SUO Jia-li, XU Xiao-ming

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The effect of selenic acid cartilage polysaccharide (CA-Se) on the mitochondrial membrane potential of K562 human chronic myeloid leukemia cells and on the induction of apoptosis of K562 cells were studied. The inhibitory effect of CA-Se on the proliferation of K562 cells was studied using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay, while the changes in the morphological characteristics after Hoechst 33342/PI staining were observed under a microscope. The changes in the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) after rhodamine-123 staining were assessed by flow cytometry (FCM), and the protein and gene expressions of caspase-9 were analyzed by immunofluorescence and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. The results showed that the proliferation of K562 cells was significantly inhibited by CA-Se in a dose- and time-dependent manner. After CA-Se treatment, the morphological characteristics of cells were dramatically changed, and a reduction in cell volume, irregularities in cell membranes, and chromatin condensation were observed. The  $\Delta\Psi_m$  values reduced after CA-Se treatment from 96.10% (the control) to 78.07% (CA-Se treatment). The protein and gene expressions of caspase-9 both increased significantly. All the results indicated that CA-Se can induce apoptosis of K562 cells by reducing the  $\Delta\Psi_m$ , upregulating the expression of the caspase-9 (initiator caspase) gene, and activating caspase-9 protein.

**Key words:** selenic acid cartilage polysaccharide; K562 cells; mitochondrial membrane potential; cell apoptosis

白血病是一种因造血干细胞异常分化引起的恶性疾病, 2002 年世界卫生组织的统计数据显示<sup>[1]</sup>, 每年约有 30 万白血病的新发患者出现在世界的各个地区, 死亡人数超过新生病例的 70%, 是十大致命恶性

收稿日期: 2014-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271975)

作者简介: 朱红 (1989-), 女, 硕士, 主要从事生物资源与功能食品研究

通讯作者: 刘安军 (1963-), 男, 博士, 教授, 主要从事天然产物提取与作用机理研究

肿瘤之一。慢性髓源白血病(Chronic Myeloid Leukemia, CML), 是第一个被阐明因获得性分子学异常而引起的疾病, 约占成人白血病的 20%。传统癌症化疗能干扰正常细胞的增殖或代谢, 且许多抗癌制剂作用不稳定, 细胞凋亡途径的变更可以改变细胞对抗癌剂的敏感性<sup>[2]</sup>。研究能够减弱 CML 抗药性的抗癌因子及天然植物药是目前医学研究的热点。

动物多糖<sup>[3]</sup>来源广泛, 通常存在于动物的组织和器官中, 如动物的内脏和软骨。目前, 应用较多的动

物多糖有肝素、软骨素、透明质酸等,已用于高血压、动脉硬化、癌症等疑难疾病的治疗。多项研究表明软骨多糖具有抗肿瘤功效,如鲑鱼软骨多糖<sup>[4]</sup>可降低小鼠黑色素瘤中上皮细胞激酶的表达,从而抑制黑色素瘤的生长。

硒是人体必需的微量元素,其存在形式包括无机硒和有机硒两种,无机硒的使用剂量不易控制,往往具有积累性毒性和致突变作用,有机硒毒性低,副作用小,具有更高的生物活性,通过人工合成方式将无机硒转化为有机硒是当前硒元素有机化的途径之一。多糖富硒后不但具有无机硒的生物活性,还具有多糖的多种功效,并且多个研究表明硒多糖的生物活性普遍高于单纯的无机硒和多糖,更容易被机体消化吸收<sup>[5]</sup>。近年研究发现,硒酸软骨多糖对肿瘤细胞具有抑制作用,可通过降低 Bcl-2、Cyclin D1 的表达,提升 p21 蛋白的表达抑制荷瘤小鼠肝癌细胞 Hca-F 的生长,但对其他细胞的具体机制仍不清楚。本文通过研究硒酸软骨多糖对 K562 慢性髓源白血病细胞线粒体膜电位及凋亡起始酶 caspase-9 表达的影响,探究其对 K562 细胞的凋亡诱导作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 药品及主要试剂

K562 人慢性髓源白血病细胞,购自中国医学科学院基础医学研究所(协和细胞库);硒酸软骨多糖,本实验室提供;RPMI 1640 培养基, GIBCO 公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程有限公司;罗丹明-123 染料,北京索莱宝生物科技有限公司;兔抗人 caspase-9 抗体, Santa Cruz; FITC 标记山羊抗兔 IgG,天津三箭生物技术有限公司; SYBR® Premix Ex Taq™ II, RNA Extraction Kit, Prime Script™ RT reagent Kit, 均购自 Takara; 引物 Primer, 上海生工生物工程有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器

MCO-18AIC(UV)CO<sub>2</sub> 培养箱,日本三洋; NikonC1 激光共聚焦显微镜,日本 Nikon; BD 流式细胞仪,美国 BD; qTOWER 高速荧光定量 PCR 仪, Analytik Jena。

#### 1.1.3 硒酸软骨多糖的制备

猪软骨经 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 70 °C 加热处理 30 min 后,用木瓜蛋白酶水解,再经过 DEAE-Sephadex 离子交换树脂吸附、NaCl 洗脱后,得到的是大分子量的软骨多糖,然后经-OH 自由基降解,得到的是小分子量的

软骨多糖,用乙醇沉淀,冷冻真空干燥后 4 °C 储存备用。

将制备好的软骨多糖在含有硒酸及强氧化剂的强氧化-还原状态下,在低于 40 °C 的低温下真空反应 10-72 h,通过离心或过滤的方法得到含有硒酸化的可溶性多糖液体,用超滤膜将分子量小于 1000 道尔顿的钠离子、氯离子、未能导入的硒酸根以及未反应的亚硒酸根过滤,经过超滤后纯化的硒酸多糖用乙醇沉淀法沉淀,沉淀物通过冷冻干燥后得到纯品硒酸多糖。密封,4 °C 储存备用。

经高效液相色谱(HPLC)法测定得硒酸软骨多糖中硫酸软骨素的含量为 95%。

### 1.2 MTT 法检测细胞增殖活性

将浓度为 5×10<sup>5</sup> 个/mL 的细胞悬液接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,每孔加入 100 μL 不同浓度的硒酸软骨多糖,使终浓度分别为 25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、400 μg/mL、800 μg/mL,每组 5 个复孔。另设不加硒酸软骨多糖的细胞作为阴性对照,同时设空白培养基参比。按相同条件重复做两个板,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内于 37 °C 条件下分别培养 24 h、48 h、72 h。MTT 法常规测定。

按如下公式计算抑制率:抑制率(%)=(1-A<sub>加药组</sub>/A<sub>对照组</sub>)×100%。

### 1.3 Hoechst 33342/PI 染色观察细胞形态变化

取对数生长期的 K562 细胞加入 100 μg/mL 的硒酸软骨多糖溶液培养 48 h,另设不加硒酸软骨多糖的对照组。培养结束后用 Hoechst 33342/PI 进行常规染色,激光共聚焦显微镜下观察细胞形态变化。

### 1.4 罗丹明-123 检测线粒体膜电位

将处于对数生长期的 K562 细胞与 100 μg/mL 的硒酸软骨多糖溶液共培养 24 h, PBS 洗涤细胞并调整为 1×10<sup>6</sup> 个/mL 的细胞悬液,取 500 μL 细胞悬液加入 5 μL 罗丹明-123,使其浓度为 10 μg/mL,37 °C 孵育 30 min。PBS 洗涤细胞,流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位的变化,结果以强荧光部分细胞数量所占比例表示。

### 1.5 免疫荧光检测 caspase-9 蛋白的表达

将处于对数生长期的 K562 细胞与 100 μg/mL 的硒酸软骨多糖溶液共培养 48 h,另设不加硒酸软骨多糖的对照组。实验结束后用 PBS 洗涤细胞调整细胞密度至 5×10<sup>6</sup> 个/mL。4% 的多聚甲醛固定细胞,采用免

疫荧光技术检测 caspase-9 蛋白的表达。

### 1.6 RT-PCR 检测 caspase-9 的基因表达

用 Takara 试剂盒裂解 K562 细胞, 提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA, 然后进行 PCR 扩增。引物序列 (5' to 3') 及主要参数如下:

表 1 引物对照表

Table 1 Primer chart

引物名称	引物序列 (5' to 3')
GADPH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
caspase-9	CTCAGACCAGAGATTTCGCAAAC GCATTTCCCTCAAACCTCTCAA

Real Time PCR 反应程序为: (1) cDNA 合成和预变性: 95 °C、30 s。(2) PCR 扩增: 95 °C、15 s, 55 °C、30 s, 72 °C、30 s, 40 个循环。(3) 62 °C~92 °C 缓慢升温, 产生熔解曲线。实验结果以 mRNA 的相对表达量表示, 计算公式为: 对照组  $\Delta Ct_1$  = 目的基因 Ct - 内参 Ct, 实验组  $\Delta Ct_2$  = 目的基因 Ct - 内参 Ct, 基因表达差异 =  $2^{\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2}$ 。

### 1.7 数据分析

采用 Excel 进行方差和显著性分析, Origin 8.5 作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MTT 法检测细胞增殖活性

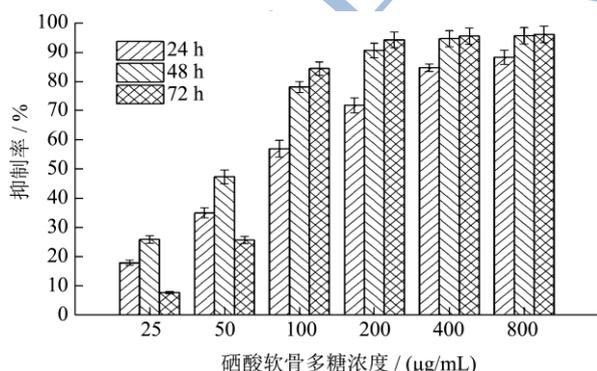


图 1 硒酸软骨多糖对 K562 细胞的增殖抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of selenic acid cartilage polysaccharide on the proliferation of K562 cells

MTT 结果表明硒酸软骨多糖可抑制 K562 细胞的生长和增殖。在相同培养时间下, 硒酸软骨多糖对 K562 细胞的抑制作用表现出浓度依赖性, 随着多糖浓度的持续增加, 对 K562 细胞的增殖抑制作用也呈现出明显的增长趋势; 同样地, 当多糖浓度大于 100

μg/mL 时, 在相同多糖浓度下, 硒酸软骨多糖对 K562 细胞的抑制作用表现出时间依赖性, 作用时间延长时, 抑制作用增强。多糖浓度在 25~50 μg/mL 时的抑制作用随着时间的延长先增强后减弱, 出现这种现象的原因可能是多糖浓度较低时, 对 K562 细胞的抑制作用较弱, 部分未被抑制的细胞继续生长, 使得细胞基数增大, 抑制率降低。如图 1 所示, 100 μg/mL 的硒酸软骨多糖作用 24 h 时, 抑制率略高于 50%, 作用 48 h 时, 抑制率达到 80%, 因此后面实验中的多糖浓度可选用 100 μg/mL。

### 2.2 Hoechst 33342/PI 染色观察细胞形态变化

Hoechst 33342 和 PI 都是亲核性荧光染料。Hoechst 33342 具有膜通透性, 可以部分通过活细胞, 使细胞呈现淡蓝色, 而细胞发生凋亡后膜的通透性会增强, 因此进入凋亡细胞的 Hoechst 染料比进入活细胞的更多, 激光共聚焦显微镜下呈现亮蓝色。染料 PI 不具备膜通透性, 具有完整细胞膜的活细胞和凋亡早期细胞不能被 PI 着色, 只有细胞膜不完整的凋亡晚期细胞和死细胞可以着色, 在激光共聚焦显微镜下呈现红色。图 2 中对照组都为正常活细胞, 因其细胞膜完整, 所以只被少量 Hoechst 染色, 呈现淡蓝色, 且细胞核呈正常结构。硒酸软骨多糖处理后细胞大部分为亮蓝色或蓝紫色, 少数为红色, 且亮蓝色不均匀, 原因是大部分细胞已处于凋亡状态, 细胞核出现固缩, 染料聚集, 且有少部分细胞的细胞膜开始破裂。实验结果表明, 硒酸软骨多糖可诱导 K562 细胞凋亡, 使细胞形态发生改变。

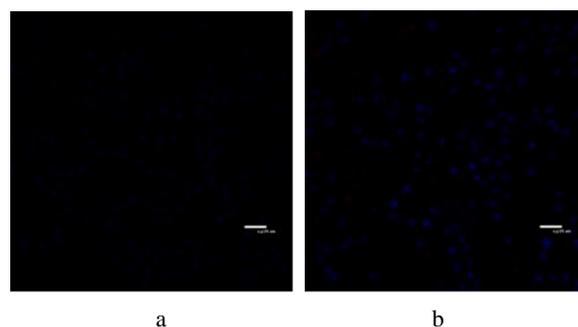


图 2 Hoechst33342/PI 双荧光染色 K562 细胞的结果

Fig.2 Results of Hoechst33342/PI double staining of K562 cells

注: a: 对照组, b: 硒酸软骨多糖处理组。

### 2.3 罗丹明-123 检测线粒体膜电位

细胞凋亡的发生包括线粒体途径、内质网途径和死亡受体途径。研究表明<sup>[6]</sup>, 线粒体的功能状态不仅关系着细胞的呼吸和氧化磷酸化, 还关系着细胞的凋亡, 线粒体通常通过释放一些促凋亡因子来调控细胞

凋亡,如细胞色素 C,它能诱导和增强 caspase 的活性。几乎所有的细胞凋亡过程中都会发生线粒体跨膜电位下降的现象, Gerauer 等<sup>[7]</sup>发现白藜芦可通过降低线粒体膜电位诱导急性淋巴白血病细胞凋亡。

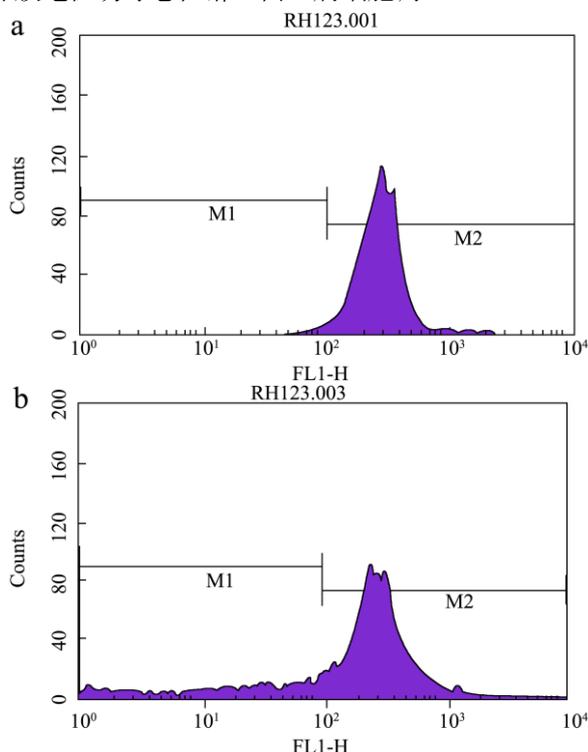


图3 硒酸软骨多糖对 K562 细胞线粒体膜电位的影响

Fig.3 Effect of selenic acid cartilage polysaccharide on the mitochondrial membrane potential of K562 cells

注: a: 对照组, b: 硒酸软骨多糖处理组。

表2 硒酸软骨多糖对 K562 细胞线粒体膜电位的影响

Table 2 Effect of selenic acid cartilage polysaccharide on the mitochondrial membrane potential of K562 cells

组别	膜电位/%
对照组	96.10±1.10
硒酸软骨多糖处理组	78.07±0.57**

注: 与对照组相比, \*\*:  $p < 0.01$ 。

罗丹明-123 是一种阳离子荧光染料,可以穿过细胞膜进入细胞,并借助线粒体膜电位进入线粒体基质。其被线粒体摄取量与线粒体膜电位成正比。因此,在正常细胞中,罗丹明-123 大量聚集在线粒体内,检测到的荧光强度高,当细胞发生凋亡时,罗丹明-123 被释放到线粒体外,从而引起荧光强度的改变,导致线粒体膜电位降低,由此可判断细胞是否发生凋亡。如图 3 所示,经硒酸软骨多糖处理的 K562 细胞的荧光强度较对照组显著减弱,强荧光部分细胞减少,弱荧光部分细胞增多,峰往左移。如表 2 所示,对照组的强荧光部分细胞比例占 96.10%,硒酸软骨多糖处理 24 h 后,强荧光部分细胞比例下降至 78.07%,与对照

组相比差异极显著( $p < 0.01$ ),由此可判断细胞线粒体膜电位下降,细胞发生凋亡。说明硒酸软骨多糖可通过降低细胞的线粒体膜电位诱导 K562 细胞凋亡。

## 2.4 免疫荧光检测 caspase-9 蛋白的表达

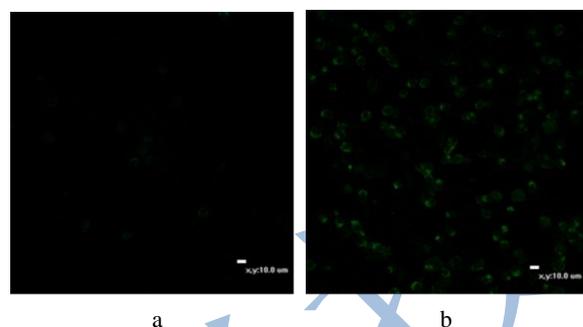


图4 caspase-9 免疫荧光检测结果

Fig.4 Immunofluorescence results of caspase-9

注: a: 对照组, b: 硒酸软骨多糖处理组。

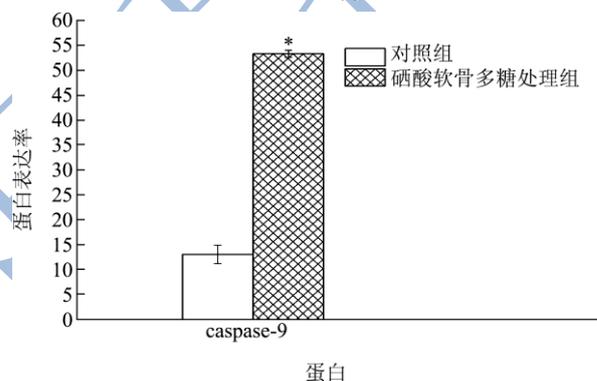


图5 caspase-9 蛋白表达率

Fig.5 Expression rate of caspase-9 protein

注: 与对照组相比, \*:  $p < 0.05$ 。

抗原-抗体反应具有特异性,当一抗与待检测的蛋白特异性的结合时,二抗即可特异识别一抗的 Fc 域,在荧光显微镜下观察时,由于二抗连接的荧光基团不同,观察到的荧光也各不相同,据此可判断目的抗原或抗体的表达情况。caspase 家族在细胞凋亡过程中起着重要的作用,其中 caspase-9 属于凋亡起始酶,可以通过线粒体途径参与细胞的凋亡。caspase-9 在受到凋亡信号的刺激后可自行激活,然后对 caspase-3 等执行酶进行加工,使其被激活并发挥作用。研究表明<sup>[8]</sup>,凋亡小体不足和 caspase-9 活性不足被证明是多种癌症模型,包括卵巢癌耐药性,恶性黑色素瘤和白血病等耐药性的关键因素。说明 caspase-9 的损坏和缺失都关系着癌症的产生和肿瘤的发展。而在许多肿瘤细胞的凋亡过程中则发现了 caspase-9 的高表达现象。Zhong 等<sup>[9]</sup>在研究灰黄霉素对 K562 白血病细胞凋亡的影响中测得,发生凋亡的细胞内 caspase-9 的表达量增加了 16.73 倍。图 4 中 (a) (b) 分别为对照组细胞和

硒酸软骨多糖处理组细胞的 caspase-9 免疫荧光图,与对照组细胞相比,硒酸软骨多糖处理后细胞荧光强度显著增强,由 13.12 上升为 53.42,说明 K562 细胞凋亡过程中 caspase-9 的表达显著增多,凋亡起始酶被激活。由此推断,硒酸软骨多糖可通过调控凋亡起始酶 caspase-9 的表达诱导 K562 细胞凋亡。

## 2.5 RT-PCR 检测 caspase-9 的基因表达

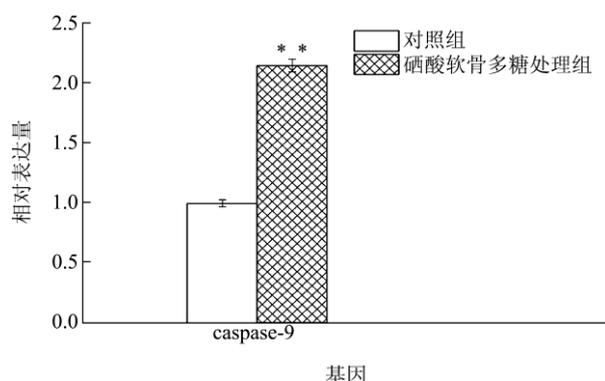


图 6 caspase-9 mRNA 的相对表达

Fig.6 Relative expression of caspase-9 mRNA

注:与对照组相比, \*\*:  $p < 0.01$ 。

PCR 反应又称聚合酶链式反应,是指在体外环境下,通过酶促反应合成特异性 DNA 片段的一种手段。该反应包括多个循环周期,每个周期包括高温变性、低温退火和适温延伸等几步反应,目的 DNA 片段经过一定的周期循环后得以迅速扩增。实时荧光定量 PCR (Real time quantitative PCR) 技术是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,使反应中的每一个循环过程都可通过荧光信号的变化来反映,从而实现 PCR 反应过程的实时监测,检测扩增产物量的变化,然后通过标准曲线和 Ct 值的分析实现对未知模板的定量分析。实验结果如图 6 所示,与对照组细胞相比,经硒酸软骨多糖处理后的 K562 细胞,其 caspase-9 mRNA 的相对表达量有极显著的增多,约为对照组的 2.16 倍。由此可知, caspase-9 mRNA 的过表达可能也是引起 K562 细胞凋亡的原因之一。说明硒酸软骨多糖不仅可在蛋白水平调控细胞凋亡,还可通过调节基因的表达影响细胞凋亡。

## 3 结论

3.1 细胞凋亡<sup>[10]</sup>,又称细胞程序性死亡,是细胞的一种程序性死亡过程。细胞凋亡受基因控制,与基因的激活、表达和调控密切相关。当细胞核受到某些特殊信号的刺激时,凋亡程序就会启动,它能维持内环境稳定,调控细胞的增殖和肿瘤的发生。细胞发生凋亡时,会发生很多独特的形态变化,如细胞核固缩,细

胞膜变得不规则,膜通透性改变,凋亡晚期甚至出现细胞核破裂,有凋亡小体的形成,但细胞膜仍是完整的,这是凋亡细胞与坏死细胞的区别。

3.2 本实验首先通过 MTT 法验证了硒酸软骨多糖对 K562 细胞的增殖抑制作用,并通过激光共聚焦显微镜观察硒酸软骨多糖作用后 K562 细胞的形态变化,发现细胞出现了体积缩小、染色质固缩、核膜破裂等典型的凋亡特征。其次,利用罗丹明-123 对线粒体进行标记,结合流式细胞术检测 K562 细胞内线粒体膜电位的变化,流式结果表明,经硒酸软骨多糖处理后,强荧光部分细胞数量显著减少,线粒体膜电位降低,细胞发生凋亡。最后,采用免疫荧光技术和 RT-PCR 技术检测细胞内凋亡起始酶 caspase-9 的蛋白表达和基因表达差异,结果表明,硒酸软骨多糖作用下, caspase-9 在蛋白水平和基因水平的表达都有显著增多。综上所述,硒酸软骨多糖不仅可以通过降低线粒体膜电位诱导 K562 细胞凋亡,还可通过影响 caspase-9 的蛋白表达和基因表达调控细胞凋亡。

## 参考文献

- [1] 曹志成.白血病的综合治疗与新进展[J].现代肿瘤医学, 2007,15(8):1051-1054  
CAO Zhi-cheng. Recent progress and integrated therapy for leukemia [J]. Journal of Modern Oncology, 2007, 15(8): 1051-1054
- [2] Lin C W, Manshour T, Jilani I, et al. Proliferation and apoptosis in acute and chronic leukemia and myelodysplastic syndrome [J]. Leukemia Research, 2002, 26: 551-559
- [3] Dumitriu, Severian. Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility [M]. CRC Press, 2012
- [4] 王冠,郭斌,孟康.鲑鱼软骨多糖对小鼠黑色素瘤上皮细胞激酶表达的影响[J].中国药房,2013,24(7):589-591  
WANG Guan, GUO Bin, MENG Kang. Effect of RCG on the expression of epha2 in melanoma of mice [J]. China Pharmacy, 2013, 24(7): 589-591
- [5] Serafin Muñoz A H, Kubachka K, Wrobel K, et al. Se-enriched mycelia of *pleurotus ostreatus*: distribution of selenium in cell walls and cell membranes/cytosol [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54 (9): 3440-3444
- [6] Green D R, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. Science, 2004, 305 (5684): 626-629
- [7] Gerauer H, Dürrie J, Wachter Y, et al. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial

- membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells [J]. *Cancer Research*, 2001, 61(12): 4731-4739
- [8] Würstle M L, Laussmann M A, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome [J]. *Experimental Cell Research*, 2012, 318(11): 1213-1220
- [9] Zhong N, Chen H K, Zhao Q L, et al. Effects of griseofulvin on apoptosis through caspase-3 and caspase-9 dependent pathways in k562 leukemia cells: an in vitro study [J]. *Current Therapeutic Research*, 2010, 71(6): 384-397
- [10] 张广智,胡长敏,陈颖钰,等.细胞凋亡的主要检测方法研究进展[J].*动物医学进展*,2011,32(8): 89-92
- ZHANG Guang-zhi, HU Chang-min, CHEN Ying-yu, et al. Recent advance on the ways to apoptosis detection [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2011, 32(8): 89-92

现代食品科技