

密蒙花黄酮对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用

曹剑锋¹, 芦静波², 滕树学³, 任朝辉⁴, 王红梅¹

(1. 贵州师范学院, 贵州贵阳 550018) (2. 皖南医学院, 安徽芜湖 241002) (3. 贵阳市乌当区人民医院, 贵州贵阳 550018) (4. 贵州师范大学, 贵州贵阳 550001)

摘要: 研究70%的乙醇浸提的密蒙花黄酮提取物对四氯化碳(CCl₄)所致小鼠肝损伤的保护作用。密蒙花黄酮50、100 mg/(kg·d)剂量能显著抑制CCl₄所致肝损伤小鼠肝脏指数、脾脏指数, 可以使CCl₄诱导的肝损伤小鼠血清中的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)、胆碱酯酶(CHE)、总胆红素(TBIL)含量下降, 同时, 密蒙花黄酮能提高肝脏抗氧化酶SOD的活性和GSH含量, 并降低肝组织中MDA的含量, 且50 mg/(kg·d)浓度密蒙花黄酮的效果更显著, 接近阳性对照药物水飞蓟的作用。组织病理切片证明密蒙花黄酮可以减轻CCl₄对肝组织的破坏, 改善肝脏组织的病理损伤。其保护机制可能与清除自由基、抑制脂质过氧化有关。

关键词: 密蒙花; 总黄酮; CCl₄肝损伤; 保护作用

文章编号: 1673-9078(2016)10-9-13

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.002

Heptoprotective Effects of Flavonoids from *Buddleja officinalis* Maxim.

(L.) DC. against CCl₄-induced Acute Hepatic Damage in Mice

CAO Jian-feng¹, LU Jing-bo², TENG Shu-xue³, REN Chao-hui⁴, WANG Hong-mei¹

(1. Guizhou Education University, Guiyang 550018, China) (2. Wannan Medical College, Wuhu 241002, China) (3. Guiyang Wudang District People's Hospital, Guiyang 550018, China) (4. Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: The hepatoprotective effects of flavonoids of *Buddleja officinalis* Maxim. (L.) DC. (BMF) on CCl₄-induced liver damage in mice were studied. The flavonoids extraction was carried out using 70% ethanol. The results showed that BMF extracts at doses 50 and 100 mg/kg/d significantly lowered the levels of serum alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), cholinesterase (ChE), lactate dehydrogenase (LDH), total bilirubin (TIBL), and hepatic malondialdehyde (MDA). In addition, the elevated values of liver index and spleen index induced by CCl₄ ($p < 0.05$) were suppressed by the BMF extracts. Moreover, the extracts enhanced superoxide dismutase (SOD) activity ($p < 0.05$) and glutathione (GSH) levels ($p < 0.05$) significantly compared to those of the model control group. Furthermore, 50 mg/kg/d BMF showed a stronger effect, which was close to that of silymarin (positive control drug). The results of the histopathological section demonstrated that BMF could mitigate the CCl₄-induced damage in the liver tissues, thereby reducing the extent of pathological damage. The protective mechanism of BMF is possibly related to the free radicals scavenging activity and the inhibition of lipid peroxidation.

Key words: *Buddleja officinalis* Maxim. (L.) DC.; flavonoid; carbon tetrachloride-induced liver damage; protective effect

密蒙花(*Buddleja officinalis* Maxim(L.) DC.)为常用中药材,《中华人民共和国药典》2000年版规定密蒙花为马钱科醉鱼草属植物*Buddleja officinalis* Maxim.的

收稿日期: 2016-02-21

基金项目: 贵州省教育厅自然科学基金项目(黔教合KY字[2015]374); 贵州省科技厅自然科学基金项目(黔科合J字[2013]2233); 贵州省应用化学特色重点学科建设项目(黔教科研发[2012]442); 贵州师范学院博士基金项目(12BS032)

作者简介: 曹剑锋(1971-),男,博士,副教授,研究方向:天然药物

干燥花蕾及其花序^[1-2]。在我国南北地区均有分布,资源广泛,传统用于治疗目赤翳障,清热养肝等。现代药理作用研究表明其具有抗炎、免疫调节、抗氧化和抗肿瘤等多种药理活性^[3-4]。在我国西南地区常用作食品染色剂(将米饭染色后色泽鲜亮清香可口)。密蒙花黄酮(flavonoids of *Buddleja officinalis* Maxim.(L.) DC., BMF)是一种天然药物,含量丰富,临床应用有较高的安全性,具有良好的应用前景。已有研究支持其成为一种新的雄激素替代物,可治疗雄激素水平下降所致

的干眼症且疗效肯定,能够避免雄激素治疗所造成的一系列副作用^[5]。BMF具有良好的抗氧化清除自由基的活性^[6]。已有的研究表明,黄酮类化合物具有抗自由基、抗氧化、抗肿瘤,促进肝细胞增殖、保肝护肝等作用。黄酮类在保肝护肝方面具有广阔的应用前景。基于氧化应激和抗炎机制,本研究采用腹腔注射1%的CCl₄ (V/V)橄榄油0.3 mL建立CCl₄诱导小鼠肝损伤模型,探讨BMF对CCl₄所致小鼠肝损伤的保护作用,为BMF肝保护方面的应用提供数据支持。

1 材料与仪器

1.1 材料

密蒙花干药材购自贵阳市药材市场;芦丁:国药集团化学试剂有限公司;谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)试剂盒、谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)、胆碱酯酶(Cholinesterase, CHE)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)、总胆红素(Total bilirubin, TB)试剂盒购自北京利德曼生化股份有限公司;总蛋白(Total protein, TP)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(Glutathion, GSH)试剂盒购自南京建成生物科技有限公司;四氯化碳、硝酸铝、二甲苯、无水乙醇等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

冷冻离心机:德国艾本德股份公司;722型可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司;旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;真空冷冻干燥系统:河南兄弟仪器有限公司。

2 试验方法

2.1 BMF的提取

参照熊勇等人提取密蒙花黄酮的方法^[7],用70%的乙醇浸提,料液比为1 g:30 mL,65 °C恒温浸提3 h,共提取2次。过滤液合并后浓缩,将浓缩液冷冻干燥成粉即为密蒙花黄酮粗提取物备用。

2.2 密蒙花提取物中黄酮含量测定

以芦丁为标准品绘制标准曲线,并根据芦丁标准曲线计算密蒙花提取物中总黄酮含量。

标准曲线的制作:精确配制浓度为0.1 mg/mL的芦丁标准溶液,分别精准吸取0、1、2、3、4、5 mL

于6只具塞试管中,加30%乙醇补齐到5 mL,然后加入5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min后,加10%硝酸铝溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min后,再加入1 mol/L氢氧化钠溶液4 mL及蒸馏水0.4 mL,摇匀,放置10~15 min后,在515 nm波长处测定上述标准溶液吸光值,制作标准曲线,得到回归方程: $Y=0.2708X-0.0015$,相关系数 $R^2=0.9901$,式中:Y表示吸光值,X表示芦丁浓度。

黄酮含量测定:取100 μL样品原液于试管中,加30%乙醇补齐到5 mL。然后加入5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min后,加10%硝酸铝溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min后,再加入1 mol/L氢氧化钠溶液4 mL及蒸馏水0.4 mL,摇匀,放置10~15 min后,在515 nm波长处测定上述标准溶液吸光值^[7]。

2.3 小鼠肝损伤模型的建立和处理

实验用SPF昆明小白鼠,由贵州医科大学实验动物中心提供(许可证号:SCXK(黔)2012-0001),室温条件下常规饲养。选取体质量(20±2) g昆明小白鼠60只,随机分成6组:正常组,在处理期间饲养10 mL/kg·d的3 mg/mL的羧甲基纤维素钠;肝损伤模型组,分别给予10 mL/(kg·d)的3 mg/mL的羧甲基纤维素钠;阳性对照组,给予100 mg/(kg·d)的水飞蓟素;BMF低、中、高剂量组,分别给予25、50、100 mg/(kg·d)的BMF。每天灌胃1次,连续7 d,末次给药2 h后,肝损伤模型组、阳性对照组及BMF各剂量组腹腔注射0.3 mL体积分数1%的CCl₄橄榄油溶液1次,禁食不禁水24 h,麻醉后眼眶取血测定生化指标;脱颈处死小鼠,立即解剖并取出肝脏和脾脏,冷的生理盐水中洗净血液,滤纸擦干称重并计算肝脏、脾脏指数。另外剪下肝右叶置于体积分数10%的甲醛中固定,待做病理学检测。其中:脏器指数=(脏器重量/小鼠体重)×100%。

2.4 生化指标的测定

将小鼠血样4 °C、3500 r/min离心10 min后取血清,检测血清ALT、ALP、AST、LDH、CHE活性和TBIL含量;取肝脏组织加入生理盐水于冰水浴中制成10%组织匀浆,离心后取上清液按试剂盒说明书方法测定SOD活性和GSH、MDA含量。

2.5 肝脏组织的病理切片观察

取小鼠肝脏右叶相同位置肝组织,用4 °C生理盐水冲洗后,浸泡于体积分数10%的中性福尔马林溶液中固定24 h,按照常规制作石蜡切片,进行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察肝组织切片的病理变化。

2.6 数据统计学处理

应用SPSS 16.0统计软件进行数据处理。采用方差分析和t检验,实验数据都采用 $x\pm s$ 表示。

3 结果与分析

3.1 密蒙花提取物中黄酮含量测定结果

以芦丁为标准品绘制标准曲线,并根据芦丁标准曲线计算,密蒙花提取物黄酮含量为70.6%。

3.2 BMF对CCl₄致小鼠急性模型脏器指数的影响

表1 各组小鼠肝脏指数和脾脏指数

Table 1 The liver and spleen indices in mice from different groups

组别	剂量/[mg/(kg·d)]	肝脏指数	脾脏指数
正常组	-	47.95±1.69**	4.12±0.17*
模型组	-	59.26±1.33	5.26±0.20
阳性对照组	100	50.47±1.53*	4.32±0.14*
密蒙花高剂量组	100	51.40±0.85*	4.33±0.18*
密蒙花中剂量组	50	50.90±2.58*	4.51±0.16*
密蒙花低剂量组	25	57.20±3.45	4.82±0.24

注:与模型组比较, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

由表1可知,小鼠肝损伤模型组肝脏指数、脾脏指

数明显分别高于正常对照组23.59% ($p<0.01$)和27.67% ($p<0.05$)。与模型组比较, BMF中、高剂量组和阳性对照药物组降低小鼠肝脏指数作用显著,阳性对照组、BMF高、中剂量组肝脏指数分别降低了14.83% ($p<0.05$)、13.26% ($p<0.05$)、和14.11% ($p<0.05$),脾脏指数明显分别降低17.87% ($p<0.05$)、17.68% ($p<0.05$)和14.26% ($p<0.05$)。表明BMF能抑制CCl₄所致小鼠的肝脏、脾脏肿大。

3.3 BMF对CCl₄致急性肝损伤模型小鼠血清中ALP、AST、ALT、CHE、LDH活性和TBIL含量的影响

ALP、ALT、AST、CHE、LDH和TBIL均是临床上检测肝病和肝损伤的重要指标,通过检测小鼠血清中的这些特定指标可以判断肝损伤程度。由表2和表3结果可知,与正常组比较,肝损伤模型组小鼠血清中的ALP、ALT、AST、CHE、LDH活力和TBIL含量显著升高 ($p<0.05$),说明CCl₄致小鼠肝损伤造模成功。与肝损伤模型组比较,阳性对照组和BMF中、高剂量组均能显著降低小鼠血清中ALP、ALT、AST、CHE、LDH活力和TBIL含量 ($p<0.05$ 或 $p<0.01$)。其中BMF组中以50 mg/(kg·d)剂量水平效果最佳,接近于药物水飞蓟,说明BMF能预防性的修复小鼠肝损伤血清酶的变化, BMF有较好的肝损伤预防效果。

表2 密蒙花黄酮对CCl₄急性肝损伤小鼠血清中ALT、AST、ALP的影响

Table 2 Effects of BMF on the serum ALT, AST, and ALP levels in mice suffering from CCl₄-induced acute hepatic injury

组别	剂量/(mg/kg·d)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	ALP/(U/L)
正常组	-	37.3±0.67*	105.0±14.17*	93.7±6.00*
模型组	-	2344.32±391.93	1961.78±280.87	156.35±9.49
阳性对照组	100	868.0±2197.39*	1005.67±212.59*	107.32±13.48*
高剂量组	100	1297.34±95.60*	1139.01±287.19*	120.67±10.41*
中剂量组	50	944.67±275.12*	973.02±231.65*	105.04±14.74*
低剂量组	25	1774.32±219.61	1761.68±96.02	144.02±12.17

注:与模型组比较, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

表3 密蒙花黄酮对CCl₄急性肝损伤小鼠血清中TBIL、CHE、LDH的影响

Table 3 Effects of BMF on the serum TBIL, CHE, and LDH levels in mice suffering from CCl₄-induced acute hepatic injury

组别	剂量/(mg/kg·d)	TBIL/(umol/L)	CHE/(U/L)	LDH/(U/L)
正常组	-	0.70±0.38**	6135.7±199.91**	819.32±64.38**
模型组	-	2.2±0.51	9223.3±304.7	6631.0±250.85
阳性对照组	100	0.84±0.28**	6485.7±527.45**	4300.02±493.81**
高剂量组	100	1.30±0.5*	8152.3±548.58	4633.34±508.27*
中剂量组	50	0.93±0.43**	7030.3±676.59*	4319.67±100.36**
低剂量组	25	1.96±0.12	8838±35.80	4976.36±557.78*

注: 与模型组比较, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

3.4 BMF对CCl₄致急性肝损伤小鼠肝组织中

SOD活力和GSH、MDA含量的影响

由表4可以看出, 与正常组对比, 肝损伤模型组小鼠肝组织中的SOD活力和GSH含量均显著降低

($p<0.05$), 而MDA含量显著升高 ($p<0.05$), 与模型组相比, BMF中、高剂量组小鼠肝组织中的SOD活力和GSH含量均显著升高 ($p<0.05$ 或 $p<0.01$), 而MDA的含量明显降低 ($p<0.05$ 或 $p<0.01$)。其中中剂量水平效果最佳。说明BMF能缓解CCl₄引起的脂质过氧化损伤, 使受损的小鼠肝脏的氧化应激状况有所改善。

表4 密蒙花黄酮对CCl₄急性肝损伤小鼠肝脏中SOD、GSH和MDA的影响

Table 4 Effects of BMF on the hepatic SOD, GSH, and MDA levels in mice suffering from CCl₄-induced acute hepatic injury

组别	剂量/(mg/kg·d)	GSH (mg/g prot)	SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
正常组	-	3.08±0.12*	298.66±10.48**	11.79±0.50**
模型组	-	1.91±0.07	164.90±9.74	14.16±0.47
阳性对照组	100	2.68±0.12**	256.56±43.98**	11.88±0.57**
密蒙花高剂量组	100	2.42±0.04*	230.16±12.3*	12.04±0.42*
密蒙花中剂量组	50	2.62±0.06	246.57±11.73**	12.98±0.38*
密蒙花低剂量组	25	2.31±0.13	199.83±14.6	13.59±0.07

注: 与模型组比较, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

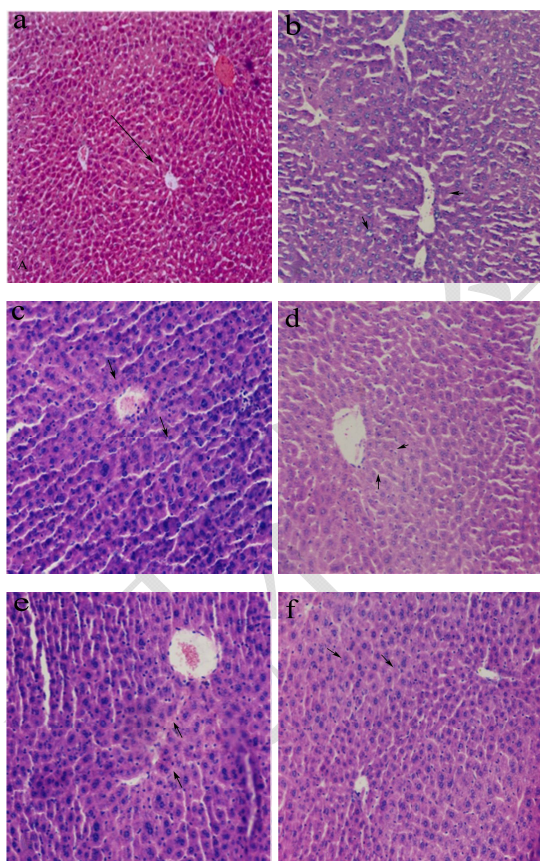


图1 BMF对CCl₄致小鼠急性肝损伤的肝组织病理切片的光镜观察结果(HE×20)

Fig.1 Histopathological observation (using light microscope) of the liver tissues of mice suffering from CCl₄-induced acute liver injury after BMF treatments at different doses (HE×20)

注: a, 正常组; b, 模型组; c, 水飞蓟组; d, BMF低剂量组; e, BMF中剂量组; f, BMF高剂量组。

3.5 BMF对CCl₄致急性肝损伤小鼠的肝组织

病理形态学的影响

如图1所示, 正常组小鼠肝脏的肝小叶结构正常, 肝细胞围绕中心静脉成辐射状排列, 肝细胞正常(图1a箭头所示); 肝损伤模型组小鼠肝小叶结构紊乱, 肝细胞出现明显的纤维化、空泡化、水肿样变性或脂肪变性, 甚至坏死等(图1b箭头所示); 阳性对照组小鼠肝小叶结构基本正常, 组织结构较完整, 但靠近肝小叶中央区有肝细胞水肿样变性或脂肪变性等(图1c箭头所示); 与肝损伤模型组比较, BMF中、高剂量组可明显不同程度地减少CCl₄诱导小鼠肝损伤中肝细胞的水肿变性和坏死等(图1e~f箭头所示)。50 mg/kg·d剂量BMF较明显缓解CCl₄对肝脏组织损害造成的肝脏纤维化、水肿和坏死程度轻, 受损面积小。

4 结论

4.1 CCl₄在肝脏代谢过程中, 经酶系统作用后, 生成三氯甲基自由基($\cdot\text{CCl}_3$), $\cdot\text{CCl}_3$ 与氧反应生成 $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ 。这些自由基进一步引发脂质过氧化, 引起肝细胞膜脂质过氧化, 导致细胞膜、细胞器结构破坏^[8], 肝细胞变性坏死或肝细胞通透性增强, 细胞质内转氨酶渗出, 使血清中酶ALT、AST、ALP、CHE、LDH的活性升高; 检测血清AST、ALT、ALP、CHE、LDH活性在一定范围内能反映肝细胞的损伤程度; 病理可见肝脏脂肪化、纤维化、水肿样变性和肝细胞坏死等^[9,10]。因此, CCl₄常被用来构建肝损伤模型以评价

药物的抗肝损伤作用。本实验小鼠灌胃BMF 7 d后,采用CCl₄诱导肝损伤,肝损伤模型组小鼠血清酶ALT、AST、ALP、CHE、LDH活性均比正常组显著提高($p<0.05$),BMF预处理后明显抑制了这些指标的升高,而且50 mg/(kg·d)剂量BMF灌胃作用最为明显,接近于水飞蓟药物组。表明BMF能预防性的修复小鼠肝损伤血清酶的变化,有较好的肝损伤预防效果。

4.2 已有的动物实验证实,自由基清除系统损伤是引起肝细胞损伤的重要环节,机体中脂质过氧化终产物MDA含量升高的同时,自由基清除剂如GSH、SOD严重减少或缺乏。GSH、SOD为机体内源抗氧化系统中关键的抗氧化物质和抗氧化酶,对维持体内氧化还原状态具有重要作用^[11]。在CCl₄处理的小鼠中,肝脏中SOD活性及GSH含量往往消耗降低,肝脏中CCl₄经酶系统作用后产生的自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸引发的脂质过氧化作用的终产物MDA含量升高^[12]。本实验结果显示,模型组小鼠肝组织MDA含量明显升高,而清除自由基作用的SOD活力和GSH水平明显降低,给予BMF处理的小鼠肝组织MDA含量较模型组明显降低,SOD活力和GSH水平明显升高,说明BMF具有缓解CCl₄引起的脂质过氧化作用。光镜下病理组织切片检测显示,CCl₄模型组小鼠肝组织损伤严重,肝小叶结构被破坏,小叶内肝细胞出现不同程度的水肿,纤维化和空泡化。而BMF中、高剂量组的肝细胞坏死程度较模型组均有明显改善,表明BMF能够有效改善化学性肝损伤小鼠的肝功能。

4.3 总之,本研究中BMF预处理后,能对CCl₄诱导的肝损伤,通过增强抗氧化酶类的活性,增加GSH含量,降低脂质过氧化物MDA的生成,抑制血清酶AST、ALT、ALP、CHE、LDH活性升高,减缓肝脏的脂肪变性起到护肝作用。其保护机制可能与清除自由基、减轻脂质过氧化、保护肝细胞膜结构和功能的完整性,增强机体抗氧化能力有关。BMF对CCl₄化学性肝损伤确切的保护机制,还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典第一部[M].北京:化学工业出版社,2005
Chinese pharmacopoeia commission. Pharmacopoeia of people's republic of China (1) [M]. Beijing: Chemistry Industry Press, 2005: 230
- [2] 邹澄,陈泗英.民间常用染饭植物密蒙花的色素[J].云南植物研究,1991,13(2):196
ZOU Cheng, CHEN Si-ying. A pigment of a folk rice dyeing plant *buddleia officinalis* [J]. Acta Botanica Yunnannic, 1991, 13(2): 196
- [3] 崔颖,张永旺.密蒙花研究进展[J].甘肃中医学院学报,2010,27(2):66-67
CUI Ying, ZHANG Yong-wang. The research progress on *Buddleja officinalis Maxim* [J]. J. Gansau College of TCM, 2010, 27(2):66-67
- [4] Lee Yun-jung, Moon Mi-kyoung, Hwang Sun-mi, et al. Anti-Inflammatory effect of *Buddleja officinalis* on vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells [J]. Am. J. Chin. Med., 201, 38(3): 585-598
- [5] 李怀凤,彭清华,姚小磊,等.密蒙花总黄酮对去势雄鼠干眼症模型角膜和泪腺组织中TNF- α 、IL-1表达的影响[J].国际眼科杂志,2009,9(7):1248-1251
LI Huai-feng, PENG Qing-hua, YAO Xiao-lei, et al. Effects of *Buddleja officinalis* flavone on dry eye syndrome and the expression of IL- β , TNF- α in castrated rats [J]. International Journal of Ophthalmology, 2009, 9(7): 1248-1251
- [6] 罗塔子,孔永强,张弘,等.密蒙花总黄酮清除自由基活性研究[J].林产化学与工业,2012,32(3):97-101
LUO Chun-zi, KONG Yong-qiang, ZHANG Hong, et al. The radical scavenging activity of flavonoids from *Buddleja officinalis Maxim* [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2012, 32(3): 97-101
- [7] 熊勇,李永春,赵春燕.正交设计优选密蒙花总黄酮提取工艺研究[J].云南民族大学学报,2010,19(2):146-149
XIONG Yong, LI Yong-chun, ZHAO Chun-yan. Study on the optimization of technology by the orthogonal test for extracting total flavonoids from *Buddleia Officinalis Maxim* [J]. Journal of Yunnan University of Nationalities, 2010, 19(2): 146-149
- [8] Zhou Da-nian, Ruan Jin-lian, Cai Ya-ling, et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanol extract of *Arachniodes exilis* (Hance) ching [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 129(2): 232-237
- [9] ZHU Wen, Fung P C W. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl₄-induced acute liver injury of mice [J]. Free Radic. Biol. Med., 2000, 29(9): 870-880
- [10] Chiang Hsiu-mei, Chang Hsiang, Yao Pei-wun et al. Sesamin reduces acute hepatic injury induced by lead coupled with lipopolysaccharide [J]. J. Chin. Med. Assoc., 2014, 77(5): 227-233
- [11] Hallwell Barry, Gutteridge John M C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview [J]. Methods in Enzymology, 1990, 186: 1-85

[12] Weber Lutz W D, Bolll Meinrad, Stampfl Andreas.
Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes:

carbon tetrachloride as a toxicological model [J]. Critical
Reviews in Toxicology, 2003, 33(2): 105-136

现代食品科技