

薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞增殖的抑制作用

梁玉琼¹, 黄庆^{2,3}, 陈梁可¹, 苏晓君¹, 孙珺¹, 刘钰珊¹

(1. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 广西南宁 530222) (2. 广西中医药大学第一附属医院药学部, 广西南宁 530023) (3. 广西壮瑶药工程技术研究中心, 广西南宁 530200)

摘要: 研究薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞增殖的抑制作用。不同浓度薯蓣皂苷干预 HepG2 肝癌细胞 24 h 后, 采用 MTT 法、Hoechst33258 染色法、JC-1 染色法和 Western blot 法检测细胞的增殖能力、线粒体膜电位水平、活性氧水平和 Bax、Bcl-2 表达。结果显示, 2.00 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷组对 HepG2 细胞的抑制率为 41.69%, 高于 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷组; 薯蓣皂苷干预 HepG2 细胞后, 细胞分布密度降低, 出现变圆脱落死亡; 升高 ROS 水平、降低 MMP、抑制 Bcl-2 和上调 Bax 的表达, 与对照组相比均有显著性差异。2.00 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷组 Bcl-2、Bax 相对表达量分别为 0.08、0.10。以上实验结果表明, 薯蓣皂苷可明显抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖能力, 诱导其发生凋亡, 其机制可能与其通过线粒体途径降低 MMP, 抑制 Bcl-2 蛋白的表达, 上调 Bax 蛋白的表达有关。

关键词: 薯蓣皂苷; 增殖; 凋亡; 线粒体膜电位

文章编号: 1673-9078(2021)08-62-66

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.0623

Inhibitory Effects of Dioscin on the Proliferation of HepG2 Cells

LIANG Yu-qiong¹, HUANG Qing^{2,3}, CHEN Liang-ke¹, SU Xiao-jun¹, SUN Jun¹, LIU Yu-shan¹

(1. Faculty of Chinese Medicine Science Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China)

(2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

(3. Guangxi Zhuang Yao Medicine Center of Engineering and Technology, Nanning 530200, China)

Abstract: The inhibitory effects of dioscin on the proliferation of HepG2 cells were investigated. HepG2 cells were first treated with dioscin at different concentrations for 24 h. The proliferation ability, mitochondrial membrane potentials (MMP), reactive oxide species, and the Bcl-2 and Bax expressions of cells were detected by MTT assay, Hoechst 33258 staining, JC-1 staining, and western blotting. Results show an inhibition rate of 41.69% on the HepG2 cells treated with dioscin at 2.00 $\mu\text{mol/L}$. This rate is higher than that noted for the group treated with 1.00 $\mu\text{mol/L}$ dioscin. After dioscin treatment, the distribution density of HepG2 cells reduces, and the cells become rounded, detached, and dead. At the same time, the ROS level increases, whereas the MMP decreases. Furthermore, the Bcl-2 protein expression is inhibited and that of Bax is enhanced. The experimental groups show significant differences from the control group. The relative expression levels of Bcl-2 and Bax in the 2.00 $\mu\text{mol/L}$ dioscin-treated group are 0.08 and 0.10, respectively. The aforementioned results indicate that dioscin can effectively inhibit the proliferation ability and induce the apoptosis of HepG2 cells. This may be realized given that dioscin can reduce the MMP through mitochondrial pathways. As such, dioscin can enhance the protein expression of Bax and inhibit that of Bcl-2.

Key words: dioscin; cell proliferation; apoptosis; mitochondrial membrane potential

引文格式:

梁玉琼, 黄庆, 陈梁可, 等. 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞增殖的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(8): 62-66, +213

LIANG Yu-qiong, HUANG Qing, CHEN Liang-ke, et al. Inhibitory effects of dioscin on the proliferation of HepG2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 62-66, +213

肝癌是世界范围内与癌症致死相关的第 3 大原因, 每年可导致 600 多万人死亡^[1]。我国是肝癌的高发地区, 每年死亡率达全球的 55%, 且呈逐年上升趋势。肝癌常以广泛转移为终点, 切除或消融后复发率高^[2]。手术和非手术策略已被用于治疗肝癌。到目前为止, 包括分子靶向治疗、免疫治疗和基因治疗在内的一些生物学方法已经显示出作为肝癌治疗的潜力。除此之外, 包括多柔比星、顺铂和 5-氟尿嘧啶在内的药物对肝癌患者的生存也有益处^[3]。然而, 这些药物的副作用如心脏毒性和神经毒性, 限制了它们的临床推广应用

收稿日期: 2020-07-16

基金项目: 广西高校中青年教师基础能力提升项目 (2018KY0863); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院大学生创新创业训练项目 (201813643044)

作者简介: 梁玉琼(1988-), 女, 讲师, 研究方向: 中药肿瘤药理学

通讯作者: 黄庆 (1989-), 男, 主管中药师, 研究方向: 中药活性成分及质量控制

用。因此,有必要开发高效低毒的肝癌治疗药物。近年来,一些药用植物的天然产物包括姜黄素、苦参碱和白藜芦醇由于其低毒、副作用少、药用价值高等特点,已被基础实验和临床证实为良好的防癌及抗肝癌药物。因此,从药用植物中寻找治疗肝癌的有效天然产物是合理的、可行的。

薯蓣皂苷(dioscin, Dio)是一种可从百合科、薯蓣科、蔷薇科等植物的根茎中提取到的天然药物,中医研究认为薯蓣皂苷具有活血舒筋,消食利水,祛痰,截疟等功效。同时,现代研究证明,薯蓣皂苷具有抗肿瘤、抗真菌、保肝等作用^[4-6],尤其在抗肿瘤方面作用突出。文献报道,Dio抗肿瘤机制可能与其调控细胞增殖、线粒体凋亡途径等通路有关。Zhao^[7]等在肝癌细胞的研究中发现,薯蓣皂苷可抑制 Huh7 肝癌细胞的增殖,并促进其凋亡。同时,本课题组前期研究证实,薯蓣皂苷可促进 SMMC7721 肝癌细胞凋亡且呈剂量相关性^[8]。但薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞增殖的影响研究较少。基于此,本研究拟通过评价薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞增殖的影响及其抗肝癌机制,为薯蓣皂苷的开发应用和临床用药安全提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

薯蓣皂苷(纯度 $\geq 98\%$)购买于上海源叶科技有限公司(批号:Y06D9Z76750);人肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂

胎牛血清、DMEM 高糖培养基,均购自美国 GIBCO 公司;胰蛋白酶-EDTA 消化液、MTT、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),购自北京 Solarbio 公司;活性氧检测试剂盒、Hoechst33258 染色液、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1),均购自碧云天生物技术研究所;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,购自武汉博士德生物技术有限公司; β -actin、BAX、BCL-2,均购自美国 proteintech 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

倒置相差荧光显微镜,日本 Nikon;电子天平(千分之一),德国赛多利斯科学仪器有限公司;高速冷冻离心机、流式细胞仪,美国 Beckman;CO₂ 培养箱、-80 °C 冰箱,美国 Thermo;酶标仪,美国 BioTek 公司;荧光分光光度计,日本岛津公司;电泳仪、半干

转膜仪及凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.4 细胞培养

HepG2 肝癌细胞培养在 DMEM 培养液(含 10% 灭活胎牛血清)中,置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中常规培养。取对数生长期细胞进行实验。

1.5 MTT 法检测细胞增殖能力

取对数生长期 HepG2 细胞,调整密度为 3×10^4 个/mL,接种在 96 孔板上,放入 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。细胞贴壁后,每孔加入 200 μ L 浓度为 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00 μ mol/L 的薯蓣皂苷,并设不加药的阴性对照组,每组 6 个复孔。置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L MTT(浓度为 5 mg/mL)。孵育 4 h 后,吸弃上清,每孔加入 200 μ L DMSO,于波长 490 nm 测定吸光度。

1.6 对细胞形态学的影响

取对数生长期的 HepG2 细胞接种在 6 孔板上,调整密度为 1.0×10^4 个/mL,孵育 24 h 后,加入薯蓣皂苷使其终浓度为 0、1、2 μ mol/L,每组 3 个复孔。37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,拍照并记录细胞形态。

1.7 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡

HepG2 细胞的培养,分组及给药方法同 1.6。按照试剂盒说明书进行染色,荧光倒置显微镜观察细胞凋亡。

1.8 检测活性氧(ROS)水平

HepG2 细胞的培养、分组及给药方法同 1.6,按照试剂盒说明书收集、悬浮、孵育、洗涤细胞,流式细胞仪检测荧光信号,采用 CXP 软件进行分析。

1.9 检测线粒体膜电位(MMP)

HepG2 细胞的分组及给药方法同 1.6。按照试剂盒说明书对细胞进行染色、洗涤,使用荧光分光光度计检测 MMP。

1.10 Western blot 法检测蛋白质表达

HepG2 细胞的分组及给药方法同 1.6,每组 6 个复孔。提取细胞蛋白,并根据 BCA 试剂盒说明书检测蛋白浓度。按照参考文献方法^[9]使用 Western blot 法检测 Bcl-2、Bax 的蛋白表达,Image J 软件计算条带灰度值。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。单因素方差分析组间差异, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞增殖能力的影响

薯蓣皂苷属于甾体皂苷, 已被证明具有抗肝癌作用^[10,11]。Zhang 等^[12]研究结果表明, 薯蓣皂苷可抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖, 1 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷对 HepG2 的抑制率分别为 8%、18%, 有剂量依赖关系。本文首先以薯蓣皂苷为研究对象, 评价在 24 h 内 0、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞的增殖抑制及凋亡作用, 实验结果如图 1 所示, 薯蓣皂苷处理 HepG2 肝癌细胞 24 h 后, 可表现出显著的细胞增殖抑制作用, 并随着浓度的增加, 抑制率不断增强, 呈剂量相关性; 其中, 1 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞的抑制率分别为 3.13%、41.69%, 说明薯蓣皂苷既可有效抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖。

经软件计算, 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞干预 24 h 的半数生长抑制浓度 (IC_{50}) 为 4.19 $\mu\text{mol/L}$ 。根据 IC_{50} , 本研究后期选择 1 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷干预 HepG2 肝癌细胞 24 h, 观察薯蓣皂苷对细胞增殖、凋亡及线粒体膜电位的影响及其可能机制。

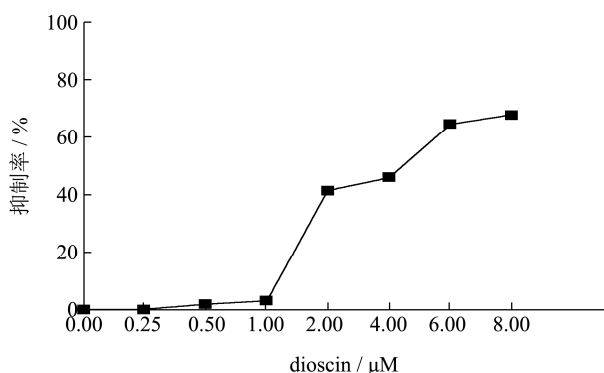


图 1 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞增殖的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect induced by dioscin in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$)

2.2 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞形态的影响

细胞凋亡时, 细胞形态会发生改变, 如细胞皱缩, 细胞分布密度减少, 细胞变圆脱落, 凋亡小体出现等^[13]。Zhang 等^[12]研究结果表明, 1~6 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷可使 HepG2 肝癌细胞细胞质收缩并分离, 细胞核凝

结。本研究采用不同浓度薯蓣皂苷 (0、1、2 $\mu\text{mol/L}$) 干预 HepG2 肝癌细胞 24 h 后, 倒置显微镜下观察细胞形态改变。结果如图 2 所示, 对照细胞分布密度较多而完整、呈不规则多边形、细胞间分界清晰; 而 1 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷组 HepG2 细胞贴附能力减弱, 分布密度稍降低, 并偶见少部分细胞变圆脱落死亡; 而在 2 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷组 HepG2 细胞分布密度均明显降低, 大量细胞出现皱缩、体积变小。说明薯蓣皂苷均可抑制 HepG2 肝癌细胞的生长, 细胞形态发生明显变化。

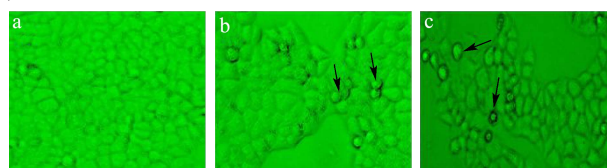


图 2 薯蓣皂苷对细胞形态的影响 ($\times 100$)

Fig.2 Morphological changes induced by dioscin in HepG2 cells ($\times 100$)

注: a: 对照组; b: 1 μM 薯蓣皂苷组; c: 2 μM 薯蓣皂苷组。箭头指示代表损伤细胞。

2.3 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞凋亡形态学的影响

Hoechst 33258 是一种非嵌入性荧光染料, 可以通过染色情况观察受试细胞的凋亡状态, 正常细胞的细胞核呈正常蓝色荧光, 而凋亡细胞的细胞核表现出致密浓染的现象^[14]。结果如图 3 所示, 对照组均未发生凋亡, 细胞形态完整, 细胞核呈低强度蓝色荧光, 未见致密浓染。与阴性对照组比较, 给药组细胞发生凋亡, 细胞质内呈致密浓染的颗粒状荧光, 核膜破裂, 具有典型的凋亡特征。说明薯蓣皂苷可诱导 HepG2 肝癌细胞发生凋亡。

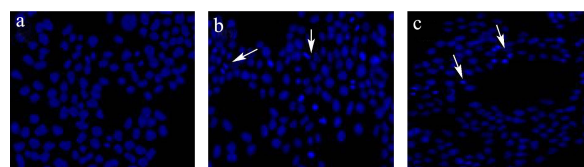


图 3 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞凋亡形态的影响 ($\times 100$)

Fig.3 The effect of apoptosis morphology induced by various doses of dioscin in HepG2 cell ($\times 100$)

注: a: 对照组; b: 薯蓣皂苷 1 μM 组; c: 薯蓣皂苷 2 μM 组。箭头指示代表凋亡细胞。

2.4 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞 ROS 水平及 MMP 影响的比较

ROS 是影响机体保持稳定和细胞信号传导的关键因素。凋亡是一个基因程序化的过程,可以通过多种信号通路触发,其中线粒体途径是目前认为最普遍的凋亡机制和核心。Hong 等^[15]研究结果表明,200、400、800 ng/mL 薯蓣皂苷干预原代肝细胞 24 h 后,可加速细胞中 ROS 积累,从而破坏抗氧化酶与 ROS 之间的平衡,促进其凋亡。结果如图 4 所示,与对照组比较,1 μmol/L、2 μmol/L 薯蓣皂苷干预肝癌细胞 24 h 后可显著升高 ROS 水平 ($p < 0.01$),呈剂量依赖性。

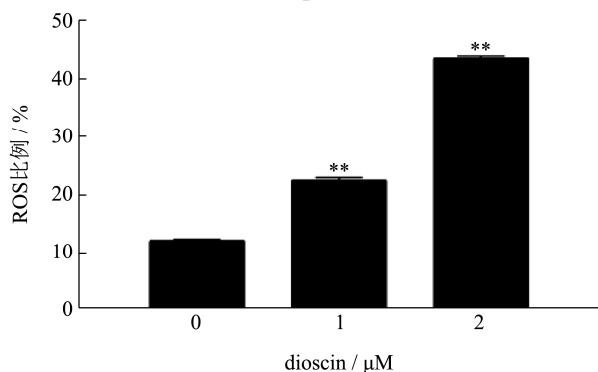


图 4 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞 ROS 水平的影响

Fig.4 The effect of ROS level induced by various doses of dioscin in HepG2 cell

注: 与阴性对照组 (0 μM) 比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

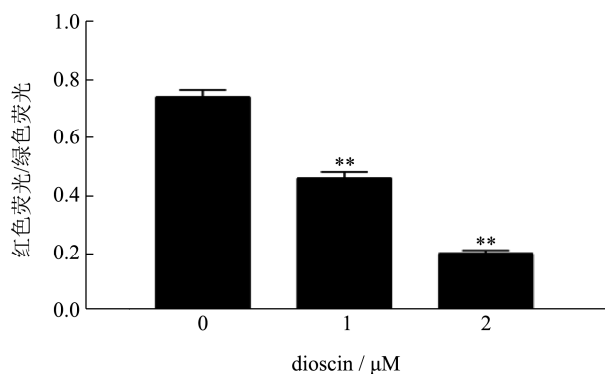


图 5 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞线粒体膜电位影响

Fig.5 The effect of mitochondrial membrane potential induced by various doses of dioscin in HepG2 cell

线粒体在调节细胞凋亡中具有不可忽视的作用。在细胞凋亡过程中,首先引起活性氧大量增加,进而引起一系列与线粒体有关的生理活动,如 MMP 下降。细胞染色后,当 MMP 水平较高时发出红色荧光;反之,发出绿色荧光。结果如图 5 所示,与对照组比较,1 μmol/L、2 μmol/L 薯蓣皂苷干预 HepG2 肝癌细胞 24 h 后,红色荧光减少绿色荧光增多,红色荧光/绿色荧光比例下降 ($p < 0.01$)。说明薯蓣皂苷可显著降低 HepG2 肝癌细胞 MMP 水平,导致线粒体膜不稳定。

2.5 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞中 Bcl-2、Bax

蛋白表达的影响

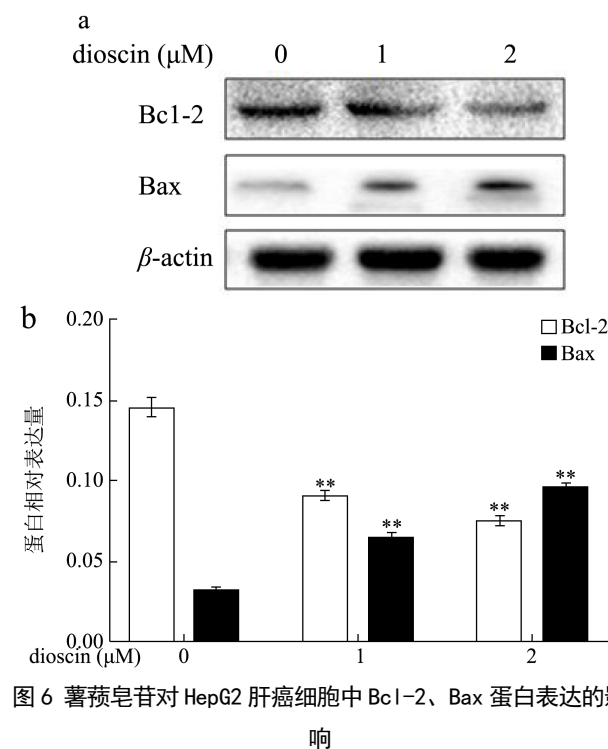


图 6 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞中 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of dioscin on protein expression of Bcl-2, bax in HepG2 cells

注: a: HepG2 肝癌细胞蛋白表达条带; b: HepG2 肝癌细胞内各蛋白相对表达量。

Bcl-2、Bax 是线粒体细胞凋亡通路中的重要因子,两者表达水平的高低与细胞凋亡紧密联系^[16]。上调的 Bax 和下调的 Bcl-2 可首先调节细胞色素 C,进而激活 Caspase 级联反应,最终诱导细胞发生凋亡。抗凋亡因子 Bcl-2 维持线粒体的完整性, Bax 破坏线粒体的完整性。Kim 等^[17]报道,不同浓度薯蓣皂苷(20 μM、30 μM、40 μM)干预 HepG2 肝癌细胞 24 h 后,薯蓣皂苷能够通过下调 Bcl-2 的表达和上调 Bax 的表达抑制 HepG2 肝癌细胞增殖,促进细胞发生凋亡。为了证明薯蓣皂苷可以抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,本实验进一步检测线粒体通路中必需蛋白的表达。本研究结果如图 6 所示,随着浓度的增加,薯蓣皂苷能显著抑制 HepG2 肝癌细胞中 Bcl-2 蛋白的表达,上调 Bax 蛋白的表达,与对照组比较有显著差异 ($p < 0.01$); 2 μmol/L 薯蓣皂苷组 Bcl-2、Bax 相对表达量分别为 0.08、0.10,区别于其他各组。说明薯蓣皂苷干预 HepG2 肝癌细胞 24 h 后,破坏线粒体完整性,并影响线粒体凋亡通路,调控 Bcl-2、Bax 的表达,进而诱导细胞发生凋亡,最终抑制肝癌细胞的发展。

3 结论

在薯蓣皂苷的干预下, HepG2 肝癌细胞的体外增殖受到抑制, 当给药剂量从 1 $\mu\text{mol/L}$ 增加至 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, HepG2 肝癌细胞的增殖抑制率由 3.13% 上升至 41.69%; 给药组细胞呈致密浓染的颗粒状荧光, 核膜破裂, 细胞发生凋亡; 大量 ROS 释放, MMP 降低; 线粒体细胞凋亡通路中的重要因子 Bax 的表达升高, Bcl-2 的表达下降。说明薯蓣皂苷可抑制 HepG2 肝癌细胞增殖, 影响线粒体功能, 其凋亡机制可能是通过调控线粒体凋亡途径中的 ROS 与凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 的表达, 最终诱导细胞发生凋亡。目前本研究仅从体外实验探讨薯蓣皂苷的抗肝癌故为保证薯蓣皂苷的开发应用, 后期本课题组还会从动物实验深入研究其“量-毒-效”关系及机制。

参考文献

- [1] Pietro Lampertico. Nucleos(t)ide analog therapy of chronic hepatitis b and liver cancer risk reduction: better nucleotides than nucleosides [J]. Gastroenterology, 2019, 157(6): 1682-1684
- [2] Qian L, Liu Y, Xu Y, et al. Matrine derivative WM130 inhibits hepatocellular carcinoma by suppressing EGFR/ERK/MMP-2 and pTEN/Akt signaling pathways [J]. Cancer Letters, 2015, 368: 126-134
- [3] Gao J, Zhen R, Liao H, et al. Pharmacokinetics of continuous transarterial infusion of 5-fluorouracil in patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. Oncology Letters, 2015, 15(5): 7175-7181
- [4] Wang Z, Cheng Y, Wang N, et al. Dioscin induces cancer cell apoptosis through elevated oxidative stress mediated by down regulation of peroxiredoxins [J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(3): 138
- [5] Chao L, Yiping L, Sitong D, et al. Dioscin exerts protective effects against crystalline silica-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Theranostics, 2017, 7(17): 4255-4275
- [6] Tao X, Yin L, Xu L, et al. Dioscin: a diverse acting natural compound with therapeutic potential in metabolic diseases, cancer, inflammation and infections [J]. Pharmacol Res, 2018, 137: 259-269
- [7] Zhang M, Xu H, Da H C, et al. potent effects of dioscin against hepatocellular carcinoma through regulating Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR)-mediated apoptosis, autophagy, and DNA damage [J]. British Journal of Pharmacology, 2019, 176(7): 919-937
- [8] 梁玉琼, 黄庆, 梁天坚, 等. 薯蓣皂苷对肝癌细胞 Bel-7402 和正常人肝细胞 LO2 增殖和凋亡的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 30-35
- [9] 梁玉琼, 时乐, 徐立, 等. 基于肝损伤级联反应关系的黄药子水煎液致肝损伤机制研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 144-149
- [10] LIANG Yu-qiong, SHI Le, XU Li, et al. Study on the mechanism of liver injure induced by the decoction of *Dioscorea bulbifera* based on hepatic cascade reaction [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2016, 32(6): 144-149
- [11] Zhang G, Zeng X, Zhang R, et al. Dioscin suppresses hepatocellular carcinoma tumor growth by inducing apoptosis and regulation of Tp53, BAX, BCL2 and cleaved CASp3 [J]. Phytomedicine, 2016, 23: 1329-1336
- [12] Fan Y, Yuqiong L, Li Xu, et al. Exploration in the cascade working mechanisms of liver injury induced by total saponins [J]. Biomedicine Pharmacotherapy, 2016, 83: 1048-1056
- [13] Zhang Y S, Ma Y L, Thakur K, et al. Molecular mechanism and inhibitory targets of dioscin in HepG2 cells [J]. Food & Chemical Toxicology an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2018, 120: 143-145
- [14] 郭仕光. 人参皂甙肠道代谢物 Compound K 通过 Bid 介导的线粒体通路诱导人肝癌细胞凋亡机制[D]. 厦门大学, 2012
- [15] GUO Shi-guang. Ginsenoside intestinal metabolite compound K induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells through bid-mediated mitochondrial pathway [D]. Xiamen University, 2012
- [16] 王瑶, 刘春娜, 林慧娇, 等. 五味子酯甲对 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2021, 22(2): 187-191
- [17] WANG Yao, LIU Chun-na, LIN Hui-jiao, et al. Effect of schisantherin A on proliferation and apoptosis of HepG2 cells [J]. Journal of Beihua University (Natural Science), 2021, 22(2): 187-191
- [18] Hong Y, Youwei X, Lianhong Y, et al. Dioscin protects ANIT-Induced intrahepatic cholestasis through regulating transporters, apoptosis and oxidative stress [J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8(18038): 116

(下转第 213 页)