

· 论 著 ·

叶下珠复方 号对肝星状细胞 TGF- $\beta$  1 及 I 型胶原的影响赵敏<sup>1</sup>, 李常青<sup>1\*</sup>, 赵舫<sup>1</sup>, 李小翠<sup>2</sup>

**摘要:**目的 观察叶下珠复方 号体外对肝星状细胞(HSC-T6)TGF- $\beta$  1 mRNA、I 型胶原 mRNA 表达及其蛋白合成的影响,进一步探讨叶下珠复方 号抗肝纤维化的作用机制。方法 体外培养 HSC-T6 细胞,分为对照组、叶下珠复方 号高剂量组(3.60mg/ml)、中剂量组(1.80mg/ml)和低剂量组(0.9mg/ml),采用 MTT 法检测药物对 HSC-T6 细胞增殖的影响,SYBR 染料法实时荧光定量 PCR 检测药物处理后 HSC-T6 细胞 TGF- $\beta$  1 及 I 型胶原 mRNA 的表达变化,Western Blot 法检测 I 型胶原蛋白表达的改变。结果 叶下珠复方 号处理 HSC-T6 细胞后,高、中、低各剂量组对 HSC-T6 细胞增殖、TGF- $\beta$  1 mRNA 及 I 型胶原合成呈现显著的抑制作用,与细胞对照组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$  和  $0.01$ ),而且随着药物浓度的增加其抑制作用明显加强。结论 叶下珠复方 号能显著抑制 HSC-T6 细胞增殖、明显降低 TGF- $\beta$  1 mRNA、I 型胶原 mRNA 的表达及其蛋白合成,具有明显的抗肝纤维化作用。

**关键词:** 肝星状细胞;叶下珠复方 号;TGF- $\beta$  1;I 型胶原

**中图分类号:** R575.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2012)5-538-04

Impact of compound phyllanthus urinaria(CPU) on the expression of TGF- $\beta$  1 and collagen I synthesis in hepatic stellate cells. ZHAO Min<sup>1</sup>, LI Chang-qing<sup>1\*</sup>, ZHAO Fang<sup>1</sup>, et al. (1. Institute of Tropical Medicine Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine Guangzhou 510405 Guangdong P. R. China. 2. School of Chinese Materia Medica Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine Guangzhou 510405 Guangdong P. R. China; Corresponding author: Li Chang-qing gzlzh2002@163.com)

**Abstract:** Objective To observe the impact of compound phyllanthus urinarian (CPU) on the expression of TGF- $\beta$  1 and collagen I synthesis in hepatic stellate cells and explore the antifibrotic mechanisms of CPU. Methods HSC-T6 cells were cultured in vitro and divided into 4 groups including control group, CPU 3.60 mg/ml group, CPU 1.8mg/ml group, CPU 0.90mg/ml group. The level of TGF- $\beta$  1 and collagen I mRNA were analyzed by real time PCR. The level of collagen I proteins were analyzed by Western blotting. Results After CPU impacted on HSC-T6, real time PCR results showed that the level of TGF- $\beta$  1 and collagen I mRNA in every treatment group of CPU were significantly lower than that of control group ( $P < 0.05, 0.01$ ). Western blotting results showed that the expression of collagen I was inhibited significantly. Conclusion CPU is capable of regulating the expression of TGF- $\beta$  1 and collagen I synthesis in hepatic stellate cells and have the capability of antifibrosis.

**Key words:** CPU; hepatic stellate cells; TGF- $\beta$  1; Collagen I

肝纤维化是肝脏受到各种慢性损伤后发生的一种组织修复,其特征是以胶原为主的细胞外基质(ECM)在肝内过多沉积<sup>[1]</sup>,而 I 型胶原是 ECM 的主要成分。在肝纤维化形成过程中,转化生长因子  $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) 明显增加并持续高水平表达,是促进肝星状细胞(HSC)活化与 I 型胶原等 ECM 生成的重要因素<sup>[2]</sup>。叶下珠复方 号在体内有较好抗肝纤维化作用<sup>[3]</sup>,本实验通过观察叶下珠复方 号体外对肝星状细胞(HSC-T6)增殖及 TGF- $\beta$  1、I 型胶原 mRNA 表达及其蛋白合成的影响,进一步探讨其抗肝纤维化的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 叶下珠复方 号提取物配制成含生药 2.6g/ml 的溶液,经低温间歇灭菌后 -20℃ 保存备用,临用时配成所需的药物浓度。高糖 DMEM 培养液、胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)和胰蛋白酶均购自 sigma 公司;EDTA 购自上海生物工程公司(Amresco 进口分装);总 RNA 提取试剂盒为 Invitrogen 公司产品;SYBR Green PCR Master Mix 购自 TOYOBO 公司;I 型胶原山羊多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG 为武汉博士德生物工程有限公司产品。HRP 标记的 GAPDH 抗体为上海康生物公司产品;TGF- $\beta$  1、I 型胶原 mRNA 和 18srRNA 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司

基金项目 广东省科技计划资助项目(No.2010B030700026, No.2011A03010008)

作者单位 1. 广州中医药大学热带医学研究所 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学中药学院 广东 广州 510405

作者简介 赵敏(1985~) 汉族,女,湖北孝感人,硕士研究生,主要从事肝病治疗研究。

\* 通讯作者 E-mail: gzlzh2002@163.com

司合成。

1.1.2 仪器 倒置显微镜(OlympusBX600) ; 80℃超低温冰箱(美国 Reveo) ;美国 SHELDON2300- 2E 型电热恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱 ;美国宝特 ELX800 型全自动酶标仪 ;ABI PRISM 7500 Sequence Detection System , EPS301 电泳仪。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HSC- T6 细胞株 ,由上海中医药大学肝病研究所徐列明教授惠赠。将 HSC- T6 细胞株复苏后接种于含 10%胎牛血清、青霉素、链霉素各为 100IU/ml、谷氨酰胺终浓度为 0.03%、并用 0.238% Hepes 调 PH 值致 6.8 的高糖 DMEM 培养液中 ,37℃ ,饱和湿度 ,5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。待细胞生长至铺满瓶底 60%面积时 ,用 0.25%的胰蛋白酶和 0.02%EDTA 消化 30s 至 1min 后以 1:2 传代 ,24h 换液 ,72h 再次传代用于以下实验。

1.2.2 叶下珠复方 号对 HSC- T6 细胞半数毒性浓度测定 将传代的 HSC- T6 以  $1.0 \times 10^5$ /ml 的密度 0.1ml 接种于 96 孔板中 ,置于 37℃ ,饱和湿度 ,5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 ,24h 后将叶下珠复方 号以 25.00、12.500、6.250、3.125、1.56mg/ml 药物浓度 ,按 0.1ml/ 孔加入培养孔 ,各组均设 5 个复孔。加药后的第 3d ,轻轻吸去上清 ,其后用 MTT 法 ,在酶标仪测定 OD 值(490nm)并取其均数 ,计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率(IE)=(1- 实验组 OD 值 / 空白对照组 OD 值)× 100% ,Logit 法叶下珠复方 号对 HSC- T6 细胞半数毒性浓度(TC<sub>50</sub>)。

1.2.3 MTT 法检测 HSC- T6 细胞增殖 将传代的 HSC- T6 细胞以  $1.0 \times 10^5$ /ml 的密度 0.1ml 接种于 96

孔板中 ,置于 37℃、饱和湿度、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 ,培养 24h 后 ,吸弃上清 ,分为 4 组 :对照组 ,加含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液。叶下珠复方 号高剂量组、中剂量组和低剂量组 ,加入含药浓度分别为 3.6mg/ml、1.8mg/ml 和 0.9mg/ml 的 10%胎牛血清的 DMEM 培养液。各组均设 5 个复孔 ,继续培养 ,24、48、72h 后吸弃上清液 ,加入 MTT ,放入培养箱中培养 4h ,再用 DMSO 将其溶解 ,用酶标仪测定 OD 值(490nm)并取其均数。计算细胞增殖抑制率(IE)。

1.2.4 HSC- T6 细胞 TGF-β 1 和 I 型胶原 (Col1a 1) mRNA 的表达检测 采用 SYBR 染料法实时荧光定量 PCR 法检测。HSC- T6 细胞以  $5 \times 10^4$ /ml 的密度 2ml/ 孔接种于 6 孔细胞培养板中 ,按上述分组 ,同步化处理 ,加药培养 72h 后收集细胞。总 RNA 提取及 RNA 逆转录 ,用 Trizol 法提取各组总 RNA ,Dnase I (Rnase Free)去除基因组 DNA ,分别测定 260、280nm 处吸光度(OD)值 ,并计算其比值 ,OD<sub>260</sub>/ OD<sub>280</sub> 比值大于 1.8 ;每组取 RNA1ul 进行逆转录反应 (合成 cDNA) ,按说明书操作步骤进行 ;以 cDNA 为模板的荧光定量 PCR 检测 ,各组的样本基因检测按 20ul 体系 ,分别扩增 TGF-β 1 mRNA、I 型胶原 mRNA 和 18srRNA。体系内含 cDNA 模板 5.0ul ,SYBR Green PCR Master Mix 10ul ,上、下游引物各 0.5ul ,dH<sub>2</sub>O 4.0ul ,95℃ 预变性 5min ,95℃ 变性 15s ,60℃ 退火 15s ,72℃ 延伸 32s ,共 40 个循环。融解曲线分析 温度 60~95℃。利用 ABI 公司自带的 PCR 系统软件分析 ,观察扩增曲线 ,计算样本  $\Delta\Delta Ct$  值 ,以  $\Delta\Delta Ct$  值的负数为指数计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ,并进行比较。引物序列见表 1。

表 1 TGF-β 1 和 Colla 1 引物序列及长度

Table 1 The primer and extent of TGF-β 1 and Colla 1

基因 Gene	上游引物(5'-3')Upstream	下游引物(5'-3')Downstream	产物长度(bp)Length	Gene ID
TGF-β 1	TGCTTCAGCTCCACAGAGAA	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC	182	59086
Colla 1	CCCTACCCAGCACCTTCAAA	AGCACAGGCCCTCAAAAACA	130	29393
18srRNA	CCTGGATACCGCAGCTAGGA	GCGGCGCAATACGAATGCCCC	112	003286

1.2.5 HSC- T6 细胞 I 型胶原蛋白表达检测 采用 Western Blot 法 ,在细胞培养 72h 后 ,消化收获各种处理的细胞 ,RIPA 裂解液裂解细胞提取各组蛋白 ;BCA 法进行蛋白定量 ,按照总蛋白浓度一致进行 DS- PAGE 电泳 ,用湿转方法转至 PVDF 膜上 ,5%的脱脂奶粉室温封闭 1h ,分别加入一抗(I 型胶原山羊多克隆抗体稀释倍数 1 :1200) ,4℃ 孵育过夜 ;再加入 HRP 标记的二抗(兔抗山羊 IgG 稀释倍数 1 :3000) ;HRP 标记的 GAPDH 内参抗体 ,稀释倍数 1 :10000 ,放置室温 1h ,彻底洗膜后进行化学发光 ,最后进行显

影、定影。使用 IPWIN60 图像分析软件对条带灰度进行分析 ,计算目的蛋白与内参 GAPDH 条带灰度的比值作为半定量结果 ,实验重复 3 次。

1.2.6 数据处理 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  相对定量法计算各基因相对表达量。先分别求出各样品基因和 18srRNA 基因平均 Ct 值(荧光 PCR 扩增产物的荧光信号达到设定的域值时所经过的扩增循环次数 ,即 Mean Ct 值)。用 18srRNA 对未处理样品(空白对照组)和药物处理组样品进行校正 ,得到校正 Ct 值 ,即  $\Delta Ct$  值 : $\Delta Ct$  空白对照组样品 = 空白对照组基因 Mean Ct 值 - 18srRNA

基因 Mean Ct 值 ; $\Delta\Delta Ct_{\text{药物处理组样品}} = \text{药物处理组样品基因 Mean Ct 值} - 18\text{srRNA 基因 Mean Ct 值}$ 。对空白对照组样品和药物处理组样品的  $\Delta Ct$  值进行归一化 ,即得到归一化 Ct 值 ,即  $\Delta\Delta Ct$  值 : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{药物处理组}} - \Delta Ct_{\text{空白对照组}}$ 。

根据  $\Delta\Delta Ct$  值计算药物处理组样品与空白对照组样品间基因的表达差异 :以 2 为底 ,以  $\Delta\Delta Ct$  值的负数为指数计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ,此值表示药物处理组样品基因表达是空白对照组样品基因表达的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  倍。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 10.0 软件对各组数据进行单因素方差分析(One-ANOVA) ,方差齐时采用多组间两两比较的 LSD 检验法检验 ,方差不齐时采用 Dunnett- t3 检验法。

2 结果

2.1 叶下珠复方 号对 HSC- T6 的半数毒性浓度 将 Hsc- T6 细胞经不同浓度的药物处理后 72h 后 ,采用 MTT 法测定其 OD 值 ,由此计算其半对数浓度为 3.72mg/ml。结果显示 ,叶下珠复方 II 号对 Hsc- T6 细胞增殖抑制作用呈明显的量效关系 ,见表 2。

表 2 叶下珠复方 号对 HSC- T6 细胞增殖的抑制作用  
Table 2 Inhibition of HSC- T6 cell growth by CPUII( $\bar{x} \pm s$  , n=5)

药物浓度(mg/ml)	OD 值	IR(%)
Drug concentration	OD value	Inhibition rate
25.000	0.124± 0.001	91.3
12.500	0.146± 0.012	89.0
6.250	0.179± 0.001	85.5
3.125	0.590± 0.062	42.3
1.563	0.854± 0.065	14.6
对照组 Control group	0.992± 0.002	--

注 :根据  $TC_{50} = \text{Antilog}[(50 - B)/(A - B) \times C + \text{LgC}]$  ,其中 A >50% ; B : <50% ; C=Lg>50% 的浓度 - Lg<50% 的浓度 ,算出此药物的  $TC_{50}$  为 3.72mg/ml。

Notes :According to  $TC_{50} = \text{Antilog}[(50 - B)/(a - b) \times C + \text{LgC}]$  , A >50% ; B <50% ; C=Lg>50% Lg<50% concentration in the concentration calculate the drug  $tc_{50}$  3.72mg/ml.

2.2 叶下珠复方 号对 HSC- T6 细胞增殖的抑制作用 在半数毒性浓度( $TC_{50}$ )以下 ,将叶下珠复方号体外作用 HSC- T6 细胞 ,设 3.6mg/ml(高剂量组) 、1.8mg/ml(中剂量组)和 0.9mg/ml(低剂量组)三个药物处理组 ,并与对照组比较。结果显示在药物作用 24h ( $D_1$ ) ,细胞开始出现凋亡现象 ,在镜下可见 :细胞老化 ,轮廓不清 ,细胞内容物增多 ,形成空斑。叶下珠复方 号高、中、低剂量组在作用 48h( $D_2$ )、72h( $D_3$ )的作用效果明显 ,能够显著抑制 HSC- T6 增殖 ,呈明显的量效关系 ,见表 3。

2.3 叶下珠复方 号对 HSC- T6 细胞 TGF-  $\beta$  1 和 I 型胶原 mRNA 表达的影响 叶下珠复方 号高、中、低

剂量组 TGF-  $\beta$  1 mRNA 和 I 型胶原 mRNA 表达均显著下降 ,与对照组比较 ,差异均有显著性意义( $P<0.05$  , 0.01)。随着叶下珠复方 II 号药物用量增加 ,呈明显的剂量 - 效应关系 ,见表 4 和图 1。

表 3 叶下珠复方 II 号在不同时间点对 HSC- T6 增殖的影响  
Table 3 Effect of CPU on the proliferation of HSC- T6 at different time points( $\bar{x} \pm s$  , n=5)

组别 Groups	D1(OD 值 , OD value)	D2(OD 值 , OD value)	D3(OD 值 , OD value)
高剂量组 High dose group	0.97± 0.08	0.39± 0.04 $\Delta\Delta\ast$	0.32± 0.06 $\Delta\Delta\ast$
中剂量组 Medium dose group	0.96± 0.06	0.48± 0.02 $\Delta\Delta$	0.36± 0.03 $\Delta\Delta\ast$
低剂量组 Low dose group	0.95± 0.22	0.63± 0.01 $\Delta$	0.52± 0.18 $\Delta\Delta$
对照组 Control group	0.98± 0.05	0.85± 0.04	0.98± 0.29

注 :与对照组比较  $\Delta P<0.05$  ,  $\Delta\Delta P<0.01$  ;与低剂量比  $\ast P<0.01$ 。

Notes : $\Delta P<0.05$  ,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs control group ; $\ast P<0.01$  vs low group.

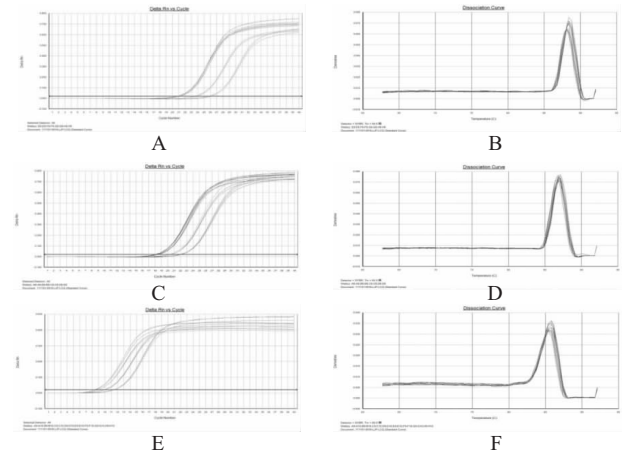
表 4 各组 TGF-  $\beta$  1 mRNA 和 I 型胶原 mRNA 相对表达值  
( $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm s$  , n=3)

Table 4 Relative value of TGF-  $\beta$  1 and Colla1 expression in different groups

组别 Groups	TGF- $\beta$ 1	I 型胶原(Colla 1)
高剂量组 High dose group	0.16± 0.02 $\Delta\Delta\ast$	0.42± 0.01 $\Delta\Delta\ast$
中剂量组 Medium dose group	0.27± 0.04 $\Delta\Delta\ast$	0.52± 0.04 $\Delta\Delta\ast$
低剂量组 Low dose group	0.60± 0.08 $\Delta\Delta$	0.70± 0.03 $\Delta$
对照组 Control group	1.00± 0.13	1.00± 0.08

注 :与对照组比较  $\Delta P<0.05$  ,  $\Delta\Delta P<0.01$  ;与低剂量比  $\ast P<0.01$  ;与中剂量组比较  $\ast P<0.05$  ,  $\ast\ast P<0.01$ 。

Notes : $\Delta P<0.05$  ,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs control group ; $\ast P<0.01$  vs low dose group ; $\ast P<0.05$  ,  $\ast\ast P<0.01$  vs medium dose group.



A :TGF-  $\beta$  1 的扩增曲线 ;TGF-  $\beta$  1 的熔解曲线 C Colla1 的扩增曲线 ; D Colla1 的熔解曲线 E :18srRNA 的扩增曲线 F :18srRNA 的熔解曲线

A :The curves of amplification of TGF-  $\beta$  1 B he curves of melting of TGF-  $\beta$  1 C :The curves of amplification of Colla 1 D :The curves of melting of Colla 1 E :The curves of amplification of 18srRNA F :The curves of melting of 18srRNA

图 1 TGF-  $\beta$  1、Colla1 和 18srRNA 扩增曲线、熔解曲线

Fig 1 The curves of amplification and melting of TGF-  $\beta$  1 、 Colla 1 and 18srRNA



2.4 叶下珠复方 号对 HSC-T6 细胞 I 型胶原蛋白表达的影响 采用 Western Blot 印记法检测。结果显示叶下珠复方 号高、中、低剂量组对 I 型胶原蛋白表达均具有明显的抑制作用,与对照组比较差异均有显著性意义( $P<0.01$ ),见图 2。

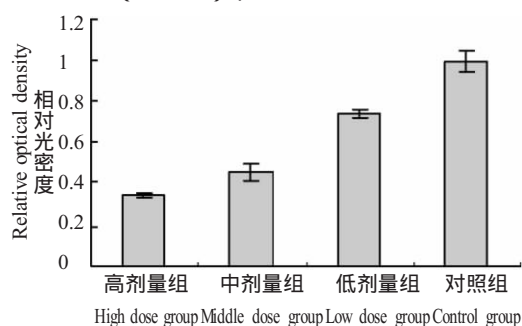


图 2 各组 I 型胶原蛋白表达

Fig 2 Expressipn of colla I mRNA in every treatment group of CPU

### 3 讨论

肝纤维化是指肝脏内弥漫性纤维结缔组织增生,是对炎症和坏死组织损伤的修复反应<sup>[4]</sup>,是多种病因导致的肝硬化必经的病理阶段。肝纤维化的发生是由于细胞外基质(ECM)在肝内过度沉积所致,尤其是胶原异常增生和沉积为特征<sup>[5]</sup>,其中心环节是 HSC 的活化和向成纤维细胞转化合成大量的细胞外基质。肝损伤时库普弗细胞等激活并分泌 TGF- $\beta$  1 等细胞因子,以旁分泌形式启动肝星状细胞活化,而活化的 HSC 可自分泌 TGF- $\beta$  1 以维持细胞活化的持续<sup>[6]</sup>。TGF- $\beta$  1 在肝纤维化发生发展过程中具有活化 HSC、促进胶原基因表达和细胞外基质合成作用,是最强的促肝纤维化细胞因子之一<sup>[2]</sup>,而 I 型胶原是 ECM 的主要成分。

叶下珠复方 号临床上主要用于慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的治疗,已证实叶下珠复方 号能显著抑制 HSC-T6 细胞增殖和细胞因子 TIMP-1mRNA 表达,从而减轻 TIMP-1 对基质金属蛋白酶的抑制作用,促进 ECM 的降解<sup>[7]</sup>。

本实验研究显示:不同浓度的叶下珠复方 号体外能显著抑制 HSC-T6 增殖,具有明显的量效关系,对 HSC-T6 细胞 TGF- $\beta$  1 和 I 型胶原 mRNA 表达均具有明显的抑制作用,与对照组比较差异均有显著性意义( $P<0.01$ ),并且可以显著抑制 I 型胶原蛋白表达,表明叶下珠复方 号可通过抑制 HSC-T6 增殖和 TGF- $\beta$  1 的表达,从而抑制 I 型胶原合成,起到抗肝纤维化作用。

### 参考文献:

- [1] Liu C, Liu P. The research progress of hepatic stellate cell in the process of hepatic fibrosis [J]. Chinese Journal of digestive diseases, 2000, 08(20): 258-260. (In Chinese)
- (刘成, 刘平. 肝纤维化过程中肝星状细胞的研究进展[J]. 中华消化杂志, 2000, 08(20): 258-260.)
- [2] Gressner AM, Weiskirchen R. The tightrope of therapeutic suppression of active transforming growth factor- $\beta$  high enough to fall deeply[J]. J Hepatol, 2003, 39(5): 856-859.
- [3] Li CQ, Li G, Su JF et al. Impact of compound phyllanthus urinaria (CPU) on the inhibition of the development of hepatic fibrosis in rats by two dimethyl nitrosamine induced [J]. Liaoning Journal of traditional Chinese Medicine, 2009, 36(8): 1413-1415. (In Chinese)
- (李常青, 李钢, 苏俊芳, 等. 叶下珠复方 号对二甲亚硝胺诱导大鼠肝纤维化形成的抑制作用 [J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(8): 1413-1415.)
- [4] Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor $\beta$  and the liver[J]. Hepatology, 2001, 34(5): 859-867.
- [5] Roulot D, Sevostianov AM, Coste T et al. Role of transforming growth factor $\beta$  type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis c and experimental fibrosis in rats [J]. Hepatology, 1999, 29(6): 1730-1738.
- [6] Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation[J]. Med Gen Med, 2002, 4(3): 27.
- [7] Shen Y, Li CQ, Liu N et al. The affect of Phyllanthus compound II expression on the proliferation of HSC-T6 and TIMP-1mRNA [J]. China Tropical Medicine, 2008, 8(2): 204-205. (In Chinese)
- (盛杨, 李常青, 刘妮, 等. 叶下珠复方 II 号对 HSC-T6 增殖及 TIMP-1mRNA 表达的影响[J]. 中国热带医学, 2008, 8(2): 204-205.)

收稿日期 2012-03-15 编辑 符式刚

(上接第 537 页)

influential factors of inducing the micronucleus frequency of mouse bone marrow by cyclophosphamide with the orthogonal design [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2003, 20(2): 89-91. (In Chinese)

(夏义武, 程仁璋, 黄芒莉. 正交设计法研究环磷酰胺诱导小鼠骨髓细胞微核的影响因素 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2003, 20(2): 89-91.)

- [3] Yu MZ, Liu YN, Jiang ZR et al. Study on the influential factors of inducing the micronucleus frequency of mouse bone marrow by

cyclophosphamide [J]. Modern preventive medicine, 2007, 34(5): 935-936, 941. (In Chinese)

余明泽, 刘以农, 蒋中仁, 等. 环磷酰胺诱导小鼠骨髓细胞微核的影响因素的研究 [J]. 现代预防医学, 2007, 34(5): 935-936, 941.

- [4] Yin MO. Genetic Toxicology [M]. Beijing science Publishing, 2002: 410-415. (In Chinese)
- (印木泉. 遗传毒理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 410-415.)

收稿日期 2012-01-21 编辑 谢永慧