

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.03.003

小半夏加茯苓醇提物对 HepG2、BGC823 线粒体凋亡途径的影响*

贾亚玲¹,何前松²,冯泳^{3△},闫文娟³,陈丽丽³,罗俊刚¹

(1. 贵州省铜仁市万山区人民医院中医科 554200; 2. 贵阳中医学院第二附属医院神经内科, 贵阳 550002; 3. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 探讨小半夏加茯苓醇提物对人肝癌细胞 HepG2 和人胃癌细胞 BGC823 增殖抑制作用及线粒体凋亡途径的影响。**方法** 运用 CCK-8 法检测 HepG2、BGC823 的增殖抑制情况, 计算生长抑制率及半数抑制浓度; 运用流式细胞术和实时荧光定量 PCR 检测 HepG2、BGC823 的线粒体跨膜电位和 bax、cjun 基因的表达情况。**结果** 小半夏加茯苓醇提物对 HepG2、BGC823 均有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 其半数抑制浓度分别为 $(781.50 \pm 13.00) \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $(560.05 \pm 10.06) \mu\text{g}/\text{mL}$; 与空白对照组相比, 试验组 HepG2 的荧光强度升高 ($P < 0.05$), 试验组 BGC823 的荧光强度显著升高 ($P < 0.01$); HepG2、BGC823 试验组的 bax、cjun 基因的相对表达量与空白对照组比较, 均显著升高 ($P < 0.01$)。**结论** 小半夏加茯苓醇提物诱导 HepG2、BGC823 凋亡的机制可能与激活线粒体途径有关。

[关键词] 半夏属; 茯苓; 肝癌; 胃肿瘤; 小半夏加茯苓醇提物; 肝癌细胞 HepG2; 胃癌细胞 BGC823; 线粒体凋亡途径

[中图分类号] R289.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)03-0296-03

Impacts of small Banxia plus fuling ethanol extract on mitochondrial apoptotic pathway of HepG2 and BGC823*

Jia Yaling¹, He Qiansong², Feng Yong^{3△}, Yan Wenjuan³, Chen Lili³, Luo Jungang¹

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Wanshan District People's Hospital, Tongren, Guizhou 554200, China; 2. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550002, China; 3. College of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibition effect of small Banxia plus Fuling ethanol extract on proliferation of human liver cancer cells HepG2 and human gastric cancer cells BGC823 and its influence on mitochondrial apoptotic pathway. **Methods** CCK-8 was used to test the growth inhibition of HepG2 and BGC823. The growth inhibition rate and the half inhibitory concentration (IC_{50}) of HepG2 and BGC823 were calculated; the flow cytometry and real-time fluorescence quantitative PCR were adopted to detect the mitochondrial transmembrane potential and the expression of cjun and bax genes of HepG2 and BGC823. **Results** HepG2 and BGC823 are significantly inhibited by small Banxia plus fuling ethanol extract ($P < 0.01$), IC_{50} was $(781.50 \pm 13.00) \mu\text{g}/\text{mL}$ and $(560.05 \pm 10.06) \mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. Compared with the blank control group, the fluorescence intensity of HepG2 in the experimental group was increased ($P < 0.05$), and which of BGC823 was increased more obviously ($P < 0.01$); compared with those of the blank control group, the bax and cjun genes relative expressions in experimental group of HepG2 and BGC823 were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of small Banxia plus Fuling ethanol extract inducing HepG2 and BGC823 apoptosis may be related to activate the mitochondrial pathway.

[Key words] pinellia; poria cocos; liver neoplasms; stomach neoplasms; small banxia plus fuling ethanol extract; human hepatocellular carcinoma cell HepG2; human gastric cancer cell BGC823; mitochondrial apoptosis pathway

肿瘤是在多因素协同作用下发生的一种细胞分化异常, 呈过度生长, 并以遗传性方式产生子代细胞的新生物。虽然肿瘤的传统治疗手段具有一定的临床疗效, 但是肿瘤的耐药性和高复发率及放疗的不良反应仍是攻克肿瘤的重要障碍。因此, 有学者提出中西医联合的肿瘤综合治疗方案。中医学认为, 痰湿是肿瘤的致病因素之一。痰湿凝聚不除, 久之阻碍气血运行而凝聚成块, 形成肿瘤。因此, 化痰祛湿法为肿瘤治疗的一种有效治法。小半夏加茯苓汤为中医经典燥湿化痰、降逆止呕的名方, 本试验结合现代分子生物检测技术, 探讨该复方诱导肿瘤细胞凋亡的线粒体机制, 为临床应用该复方提供一定参考。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 药品及试剂 小半夏加茯苓醇提物, 50% 乙醇, DMEM 高糖培养基, 胎牛血清, 胰蛋白酶, 双抗, 磷酸盐缓冲液, CCK-8, 罗丹明 123, TRNzol 总 RNA 提取试剂, PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, SYBR™ Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) ROX plus, DL2000 DNA 标记物、引物。

1.1.2 实验仪器 CO₂ 培养箱(美国热电公司, USA31311), 超净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备, SW-CJ-2FD),

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81160425/H2705); 贵阳中医学院研究生教育创新项目(ZYY14034)。 作者简介: 贾亚玲(1988-), 住院医师, 硕士, 主要从事方剂配伍规律与作用机制方面研究。 △ 通信作者, E-mail: fy668@sina.com。

离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,L600),显微镜(Nicon,TS-100F),细胞计数仪(上海拜力生物科技有限公司,BIO-RAD),水浴锅(常州普天仪器制造有限公司金坛市晶玻实验仪器厂,LKTC-B1),冰箱(上海三菱百富勤,BCD-219),超低温冰箱(Haier,DW-86L386),酶标仪(BioTek,Elx808IU),流式细胞仪(BD,FACSAria),涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,QL-902),分光光度计(Thermo scientific,NANODROP 2000),荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems,ABI7500)。

1.2 实验方法

1.2.1 小半夏加茯苓醇提物的制备 参考前期试验提取流程,取半夏 18 g,茯苓 9 g,另将生姜切碎,称取 15 g,置于 500 mL 圆底烧瓶中,加入 8 倍量的 50% 乙醇于 85 °C 水浴锅中提取,溶剂沸腾开始计时,提取 2 h,过滤;残渣再加入 8 倍量 50% 乙醇,同条件提取,过滤,合并两次滤液,摇匀,干燥,备用^[1]。

1.2.2 细胞培养 人肝癌细胞(HepG2)购自上海细胞库,人胃腺癌细胞(BGC823)购自协和细胞库,采用 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清)贴壁培养 HepG2、BGC823 于含 CO₂、37 °C 饱和湿度的恒温培养箱内。

1.2.3 肿瘤细胞增殖抑制检测 根据有效浓度范围,设置 HepG2 的用药浓度分别为 900、800、700、600、500 μg/mL, BGC823 的用药浓度分别为 800、700、600、500、400 μg/mL;取对数生长期的细胞,按照 7 × 10⁴ /mL 的密度接种于 96 孔板中;待细胞贴壁后,将不同浓度的醇提物加入 96 孔板,每组设至少 3 个平行孔;药物干预 24 h 后,加入 CCK-8;孵育 1~4 h 后,在酶联免疫监测仪上测定各孔吸光度(A)值,计算抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀)。IC₅₀ 用 SPSS16.0 统计软件进行计算。计算公式:生长抑制率=(1-A_{试验组}/A_{对照组}) × 100%。

1.2.4 肿瘤细胞线粒体跨膜电位检测 将细胞分为空白对照组和试验组,根据 IC₅₀ 值设试验组为终浓度 800 μg/mL 的醇提物溶液,空白对照组加入与试验组等量的 50% 乙醇;取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中;待细胞贴壁后,分别加入空白对照组和试验组的药液;药物干预 24 h 后,加入罗丹明 123 进行染色,孵育 10~30 min 后,上流式细胞仪检测,每份样品检测细胞数量 1 × 10⁴,测定门控内相对荧光强度。

1.2.5 肿瘤细胞 bax、cjun 基因表达检测 将细胞分为空白对照组和试验组,根据 IC₅₀ 值设试验组为终浓度 800 μg/mL 的醇提物溶液,空白对照组加入与试验组等量的 50% 乙醇;取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中;待细胞贴壁后,分别加入空白对照组和试验组的药液;药物干预 48 h 后,参照 TRNzol 总 RNA 提取试剂盒说明书和 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录试剂盒说明书提取肿瘤细胞 RNA,并将提取的 RNA 逆转录成 cDNA;参照 SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus),ROX plus 说明书,分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增,采用 2^{-△△CT} 法进行数据的相对定量分析。扩增程序为:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 40 s,45 个循环。引物序列见表 1。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件分析数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态性检验,符合条件者做独立样本 t 检验或方差分析,不符合者做非参数检验,检验水准 $\alpha=0.05$,

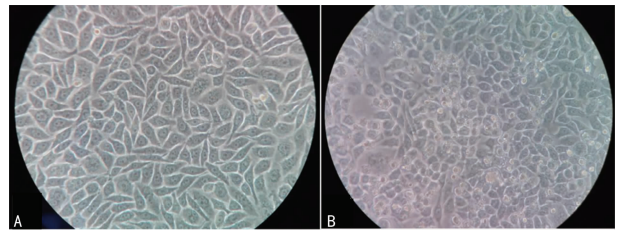
以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小半夏加茯苓醇提物对肿瘤细胞形态的影响 倒置相差显微镜下观察各组细胞的生长状态,发现空白对照组细胞形态饱满,边界清晰,细胞质丰富,胞核呈圆形或椭圆形;小半夏加茯苓醇提物干预细胞后,形态发生改变,细胞外形不规则,边界模糊,并出现很多悬浮的圆形透亮细胞,见图 1、2。

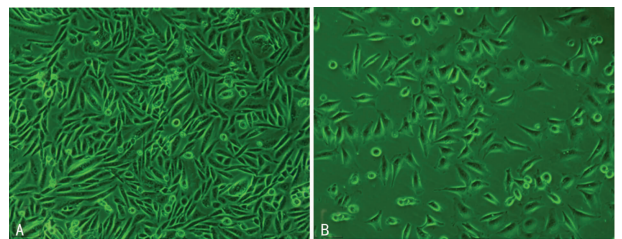
表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
bax	F:GACGAAGTGGACAGTAACATGGAGCT	125
bax	R:CGGCCCCAGTTGAAGTTGC	
cjun	F:CTCAGACAGTGGCCCGAGATG	101
cjun	R:GTTTCCTCATGCGCTTCTCT	
ACTIN	F:CTGAAGTACCCCATCGAGCAC	223
ACTIN 下	R:ATAGCACAGCCTGGATAGCAAC	



A:空白对照组;B:试验组。

图 1 两组人肝癌细胞 HepG2 细胞形态(×400)



A:空白对照组;B:试验组。

图 2 两组人胃腺癌细胞 BGC823 细胞形态(×400)

2.2 小半夏加茯苓醇提物对肿瘤细胞的抑制率和 IC₅₀ 值 试验结果表明,不同浓度的小半夏加茯苓醇提物对 HepG2、BGC823 均有显著的抑制作用(P<0.01);随着醇提物浓度的减小,抑制率逐次降低(P<0.01)。小半夏加茯苓醇提物作用于 HepG2、BGC823 的 IC₅₀ 分别为(781.50 ± 13.00) μg/mL 和(560.05 ± 10.06) μg/mL,两种细胞的 IC₅₀ 差异有统计学意义(P<0.01),见表 2、图 3。

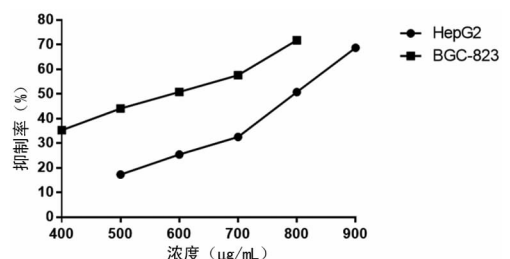


图 3 小半夏加茯苓醇提物对 HepG2、BGC823 的抑制作用

表 2 小半夏加茯苓醇提物对肿瘤细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

醇提物浓度($\mu\text{g/mL}$)	抑制率(%)		IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	HepG2	BGC823	HepG2	BGC823
900	68.79 \pm 3.09 ^a		781.50 \pm 13.00 ^a	560.05 \pm 10.06
800	50.78 \pm 0.33 ^a	71.86 \pm 0.91		
700	32.54 \pm 0.72 ^a	57.66 \pm 1.28		
600	25.42 \pm 1.10 ^a	50.81 \pm 0.95		
500	17.31 \pm 0.91 ^a	44.12 \pm 0.43		
400		35.31 \pm 0.93 ^b		

^a: $P < 0.01$, 与 BGC823 比较。

表 3 小半夏加茯苓醇提物对肿瘤细胞荧光强度、bax、cjun 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	荧光强度		bax 基因		cjun 基因	
	HepG2	BGC823	HepG2	BGC823	HepG2	BGC823
试验组	8 480.33 \pm 84.05 ^a	17 322 \pm 567.17 ^a	0.384 \pm 0.191 ^a	1.91 \pm 0.90 ^a	0.231 \pm 0.042 ^a	1.76 \pm 0.64 ^a
空白对照组	8 048.33 \pm 161.11	14 480 \pm 184.47	0.205 \pm 0.050	0.49 \pm 0.17	0.139 \pm 0.033	0.08 \pm 0.01

^a: $P < 0.05$, 与空白对照组比较。

2.3 小半夏加茯苓醇提物对肿瘤细胞线粒体跨膜电位的影响 结果显示,与空白对照组相比,试验组 HepG2 的荧光强度升高($P < 0.05$),试验组 BGC823 的荧光强度显著升高($P < 0.01$),见表 3。

2.4 小半夏加茯苓醇提物对肿瘤细胞凋亡相关基因的影响 检测发现,与空白对照组相比,HepG2、BGC823 试验组 bax、cjun 基因的相对表达量均显著升高($P < 0.01$),见表 3。

3 讨论

目前大多数人认为,肿瘤的发生是细胞增殖失控和(或)凋亡受阻的结果。细胞凋亡又称细胞程序性死亡,是指机体为了维持细胞内环境稳定,而由基因控制的一种细胞自主性死亡。它既是机体组织和器官发育的维护者,又是机体防御致病因素危害作用的监护者。近年来,随着细胞和分子生物学的飞速发展,人们日益认识到程序性细胞死亡可直接影响到肿瘤治疗的有效性。线粒体介导的凋亡途径是细胞凋亡的主要途径之一。凋亡信号可通过激活多条上游通路而作用于线粒体,线粒体将凋亡信息整合后,发生形态或功能的改变,导致线粒体膜间隙的促凋亡因子释放,活化半胱天冬酶(Caspase)家族,促使细胞进入不可逆的凋亡程序之中。

本试验检测的指标包括线粒体跨膜电位(MMP)、bax 和 cjun 基因。MMP 是由线粒体的内膜与外膜的特点决定,低通透性的内膜依靠质子泵将基质中的质子泵入外室,导致线粒体膜间隙呈现正电荷,基质为负电荷,从而形成外正内负的 MMP;MMP 降低甚至消失,引起线粒体的呼吸链发生断裂,膜间隙的促凋亡因子释放,从而启动细胞凋亡过程。可以说,MMP 的降低是细胞凋亡的早期反应。bax 是 Bcl-2 基因家族中的促凋亡成员,它从线粒体中释放后,会与高同源性的 bak 发生寡聚化而插入线粒体外膜,引起 MMP 降低,启动细胞凋亡过程;bax/bak 还可通过开放线粒体通透性转运孔使小分子物质大量涌入线粒体内,引起线粒体形态膨胀,甚至撑破外膜,导致促凋亡因子进一步释放^[2-4];同时 bax 还可以与 Bcl-2 结合,形成异源二聚体,抑制 Bcl-2 的抗凋亡作用^[5]。另有研究

发现,凋亡早期存在线粒体从网状向点状表型的转换,并且 bax 基因的高表达可以加速这种转换^[6]。cjun 属于即早反应基因,它能够对细胞内外的各种刺激和 DNA 损伤做出反应,且参与调控胞内转录因子的生物作用^[7];cjun 与 cfos 可形成异源二聚体 jun-fos,又称 AP-1,AP-1 作为转录激活因子,可以通过调控 bax 而引起线粒体膜通透性的改变,释放线粒体膜间隙促凋亡因子,最终导致细胞凋亡^[8]。

小半夏加茯苓汤源自《金匱要略痰饮咳嗽病脉证并治十二》,是一首化痰降逆、和胃止呕的名方。该方以“病痰饮者,当以温药和之”为制方原则,选用辛温性燥之半夏为君,燥湿化痰,和胃降逆;配以辛温之生姜为臣,既增强半夏之功,又制半夏之毒;茯苓淡渗利湿,宁心健脾,使水去脾健则痰饮无以由生,为佐使。三药相合,标本兼顾,燥湿降逆法已生之痰,健脾祛湿杜生痰之源^[9]。现代研究表明,小半夏加茯苓汤及组成该复方的各单味药均有抑制肿瘤增殖的作用^[10-12]。

本试验发现,小半夏加茯苓醇提物有抑制 HepG2、BGC823 增殖,并激活线粒体凋亡途径的作用,其机制可能为小半夏加茯苓醇提物增强了肿瘤细胞中 cjun 和 bax 基因的表达,使 bax 与 bak 发生寡聚化,导致 MMP 降低,激活线粒体途径,诱导肿瘤细胞凋亡。通过对比分析两种肿瘤细胞的数据,本试验发现,小半夏加茯苓醇提物对 BGC823 的抑制效应高于 HepG2,与该复方长于调节胃腑升降功能相一致,其作用于 BGC823 的抑癌机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 叶俊,杨占南,何前松,等. HPLC 法测定中药复方小半夏加茯苓汤中的 8 种药效成分[J]. 辽宁中医杂志,2012,38(8):1595-1598.
- [2] 叶齐峰,朱金墙,王丹丹,等. 中药干预细胞凋亡线粒体通路研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2013,20(8):100-102.
- [3] 刘晓婷,王延让,张明. 线粒体介导细胞(下转第 301 页)

3 讨 论

目前研究显示,UC 的发病机制可能与肠道黏膜屏障功能减弱,诱导局部免疫反应有关^[4]。Poly I:C 是一种人工合成的 dsRNA,可形成长期的免疫记忆,对多种免疫系统疾病均有治疗作用^[5-7]。

黏膜屏障功能缺陷和 TJ 蛋白的减少均有利于微生物抗原进入肠黏膜固有层,诱发异常的黏膜免疫应答。故此,肠道黏膜屏障的功能受损可以被认为是 UC 发病的始动因素之一^[8-10]。肠上皮 TJ 对于屏障功能的维持和 TJ 的完整性具有重要作用,肠黏膜上皮 TJ 是由一系列的细胞质蛋白、细胞骨架元素和几种跨膜蛋白组成^[11]。UC 发生时,与肠黏膜通透性密切相关的 TJ 的 zo-1 和 claudin-1 首先从位置分布上发生了改变,正常情况下分布于细胞边缘,沿细胞膜分布;而 UC 发生时 zo-1 和 claudin-1 分布不均,染色变淡,线条模糊,边缘粗糙有刺状突起,分布散乱,稀疏,结肠黏膜紧密连接蛋白的表达明显下降,经过 Poly I:C 治疗后,结肠黏膜的上皮层紧密连接蛋白 zo-1 和 claudin-1 分布均匀,线条清晰,边缘整齐。可见 Poly I:C 在急性 UC 模型小鼠保护肠黏膜屏障过程中起重要作用,为临床上 UC 治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Dupont A, Kaconis Y, Yang I, et al. Intestinal mucus affinity and biological activity of an orally administered anti-bacterial and anti-inflammatory peptide[J]. *Gut*, 2015, 64(2):222-232.
- [2] Long TM, Nisa S, Donnenberg MS, et al. Enteropathogenic escherichia coli inhibits type I interferon-and RNase L-mediated host defense to disrupt intestinal epithelial cell barrier function [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(7): 2802-2814.
- [3] Das A, Chai JC, Kim SH, et al. Transcriptome sequencing of microglial cells stimulated with TLR3 and TLR4 ligands[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1):517-538.
- [4] Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, et al. Epithelial IL-18

equilibrium controls barrier function in colitis[J]. *Cell*, 2015, 163(6):1444-1456.

- [5] Ghaemi A, Sajadian A, Khodaie B, et al. Immunomodulatory effect of Toll-Like receptor-3 ligand 1 Poly I:C on cortical spreading depression[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1):143-154.
- [6] Hartog A, Belle FN, Bastiaans J, et al. A potential role for regulatory T-cells in the amelioration of DSS induced colitis by dietary non-digestible polysaccharides[J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(3):227-233.
- [7] Rao YX, Chen J, Chen LL, et al. The impact of dietary methionine-restriction on tight junction expression and function in a rat colonitis model[J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2013, 52(6):503-509.
- [8] Toumi R, Abdelouhab K, Rafa H, et al. Beneficial role of the probiotic mixture Ultrabiotique on maintaining the integrity of intestinal mucosal barrier in DSS-induced experimental colitis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(3):403-409.
- [9] Miyata R, Kakuki T, Nomura K, et al. Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015(761):375-382.
- [10] Marafini I, Monteleone I, Di Fusco D, et al. TNF- α producing innate lymphoid cells (ILCs) are increased in active celiac disease and contribute to promote intestinal atrophy in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0126291.
- [11] Ko R, Park JH, Ha H, et al. Glycogen synthase kinase 3beta ubiquitination by TRAF6 regulates TLR3-mediated pro-inflammatory cytokine production[J]. *Nat Commun*, 2015(6):6765-6777.

(收稿日期:2016-07-24 修回日期:2016-09-10)

(上接第 298 页)

- 凋亡的研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2013, 30(2):182-185.
- [4] 金姝, 王颖, 张勇, 等. 肿瘤抗原-线粒体蛋白 12 对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. *现代免疫学*, 2011, 31(4):268-274.
- [5] Song W, Yang HB, Chen P, et al. Apoptosis of human gastric carcinoma SGC-7901 induce by deoxycholic acid via the mitochondrial-dependent pathway[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171(4):1061-1071.
- [6] Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, et al. The role of Dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis[J]. *Dev Cell*, 2001(1):515-525.
- [7] 姚明忠, 赵伟康. $A\beta$ 诱导海马神经元凋亡的机制及补肾方的调控作用[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 21(6):450-452.

- [8] 陈伟, 陈宁, 浅析 c-JNK 在细胞凋亡线粒体途径中的作用机制及其运动性干预[J]. *南京体育学院学报(自然科学版)*, 2015, 14(6):20-24.
- [9] 冯泳, 何前松, 时京珍, 等. 小半夏加茯苓汤的研究概况[J]. *江苏中医药*, 2008, 40(2):84-86.
- [10] 杨长福, 冯泳, 何前松. 小半夏加茯苓汤含药血清抑制 HepG2 细胞增殖及促进凋亡[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(8):168-171.
- [11] 杨林森, 何光志, 何前松, 等. 小半夏加茯苓汤及其组分对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用和脾脏 caspase-3 基因表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(3):868-871.
- [12] 韦佳, 杨长福, 陈倩, 等. 小半夏加茯苓汤对 H22 荷瘤小鼠瘤体中颗粒酶 B 和穿孔素表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(9):2086-2089.

(收稿日期:2016-07-11 修回日期:2016-09-26)