

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949 (2011) 19-07-0552-05

tBHQ 通过 Nrf2 通路 抗脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞损伤中的作用及机制

曾 慰¹, 肖新华², 胡名松¹, 邓宏军¹, 胡 军¹, 郑达扬¹, 高文奎¹

(南华大学 1. 附属第二医院胸外科, 2. 附属第一医院内分泌实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 叔丁基对苯二酚; 转录因子 NF- κ B 相关因子 2; 脂多糖; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] 目的 探讨叔丁基对苯二酚(tBHQ)在抗脂多糖诱导人脐静脉内皮损伤中的作用及相关机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞,用脂多糖作用建立人脐静脉内皮损伤模型前,用不同浓度叔丁基对苯二酚预处理 24 h。用 MTT 法检测内皮细胞活性,Western blot 检测细胞核内和核外转录因子 NF- κ B 相关因子 2(Nrf2)蛋白表达,DCFH-DA 染色法检测细胞内活性氧量,Western blot 和 ELISA 检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 和白细胞介素 6 水平。结果 与对照组相比,脂多糖处理能够显著降低细胞活性,而叔丁基对苯二酚能够显著抑制脂多糖的损伤作用($P < 0.05$)。与脂多糖单独处理组相比,叔丁基对苯二酚预处理能够显著增加核内 Nrf2 蛋白水平,并显著降低活性氧、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 和白细胞介素 6 水平($P < 0.05$)。结论 叔丁基对苯二酚能够通过诱导 Nrf2 的核转位来抑制脂多糖诱导的活性氧和炎症因子增加,起到抗内皮细胞损伤作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of tBHQ on Lipopolysaccharide-Induced Impairment of Human Umbilical Vein Endothelial Cell by Nuclear Factor- κ B-Related Factor 2

ZENG Wei¹, XIAO Xin-Hua², HU Ming-Song¹, DENG Hong-Jun¹, HU Jun¹, ZHENG Da-Yang¹, and GAO Wen-Kui¹

(1. Department of Thoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Endocrine, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Tert-Butylhydroquinone; Nuclear Factor- κ B-Related Factor 2; Lipopolysaccharide; Human Umbilical Vein Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role and mechanism of tert-butylhydroquinone (tBHQ) on lipopolysaccharide (LPS)-induced impairment of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). **Methods** Before treated with LPS, HUVEC were cultured with tBHQ in vitro. MTT analysis measured the effects of LPS and tBHQ on HUVEC; Western blot analysis measured the effects of tBHQ on the levels of Nrf2 in HUVEC; DCFH-DA measured the effects of tBHQ on the levels of ROS; Western blot and ELISA analysis measured the effects of tBHQ on the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6.

Results Compared with control group, viabilities of HUVEC were decreased significantly by LPS ($P < 0.05$). However, the effects of LPS could be attenuated notably by tBHQ ($P < 0.05$). Pretreatment with tBHQ could increase the expression of nuclear Nrf2 protein significantly ($P < 0.05$), and reduce the levels of ROS, TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05$). **Conclusions** To prevent LPS-induced impairment of HUVEC, tBHQ can decrease the levels of ROS inflammatory factors induced by LPS via inducing translocation of Nrf2.

动脉粥样硬化是一种慢性炎症过程,炎症作为动脉粥样硬化始动因子,其表达受多种因素调节^[1-3]。研究表明,血管内皮损伤是动脉粥样硬化的

始动及促进因素,氧化应激能促进与动脉粥样硬化相关的多种炎症因子表达^[4]。活性氧(ROS)是与氧化应激密切相关的自由基,ROS的产生能够引

[收稿日期] 2011-05-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81070667)

[作者简介] 曾慰,硕士,主治医师,主要研究方向为冠心病的综合治疗,E-mail 为 zengwei2601@sohu.com。通讯作者肖新华,博士,硕士研究生导师,E-mail 为 dr_xiaoxh@hotmail.com。胡名松,博士,副主任医师,主要研究方向为冠心病的综合治疗。

起血管内皮细胞损伤和凋亡,破坏内皮机构和功能^[5-7]。大量研究表明,转录因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 核转位与抗氧化反应元件 (ARE) 结合,能够激活多种抗氧化基因的转录,起到抗炎抗氧化的作用^[8-10]。研究表明,叔丁基对苯二酚 (tBHQ) 能够促进 Nrf2 的入核,启动相关抗炎抗氧化基因的调控,抑制脂多糖 (LPS) 诱导 PC12 细胞 ROS 的产生,起到抗 PC12 神经细胞凋亡的作用^[11]。但 tBHQ 对内皮细胞损伤是否有保护作用还不清楚。本研究通过建立 LPS 诱导人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 损伤模型,观察 tBHQ 诱导 Nrf2 核转位对 HUVEC 损伤的影响,以验证 Nrf2 核转位水平增加对 HUVEC 损伤的保护作用,并探讨其相关作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

HUVEC 细胞株 (CRL-1730), 购于中科院细胞生物研究所上海细胞库; tBHQ 纯度 > 99%, 购于 Sigma 公司; 活性氧检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司; MTT、DMSO 购于 Amresco 公司; Nrf2 抗体购于 Santa Cruz 公司; TNF- α 抗体购于 Santa Cruz Biotechnology 公司; 核蛋白内参 Lamin B1 购于 Abcam 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购于 Pierce 公司; IL-1 β 和 IL-6 ELISA 试剂盒购于 GeneMay 公司; 其它试剂为国产分析纯。

1.2 细胞培养及分组

细胞于无菌培养瓶中培养,用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂、95% 饱和湿度条件下培养。细胞分为不加处理因素的对照组,不同浓度 (0.75、1 及 1.25 g/L) LPS 处理组,不同浓度 (10、20 及 40 μ mol/L) tBHQ 处理组,不同浓度 (10、20 及 40 μ mol/L) tBHQ 加 1 g/L LPS 处理组。

1.3 MTT 法检测细胞活性

取 80% 满培养瓶的 HUVEC,用 0.25% 胰酶消化,将密度为 5×10^7 个/L 的细胞按每孔 200 μ L 接种在 96 孔板中。48 h 后,细胞密度达到 85%,弃原培养基,PBS 洗 2 遍。无血清培养基同步培养 12 h, PBS 缓冲液洗 2 遍,换培养基。加入处理因素 6、12、18 及 24 h 后,弃上清,每孔加入 DMSO 150 μ L, 震荡 15 min 后,酶联免疫仪 490 nm 波长处测定。

1.4 Western blot 检测 Nrf2 蛋白的表达

细胞接种于培养板中,按步骤提取核蛋白和胞质蛋白,蛋白定量采用 BCA 蛋白定量试剂盒。SDS-

PAGE 分离蛋白,转膜,经 Nrf2 特异性一抗、相应二抗孵育后,ECL 显色分析各组细胞中 Nrf2 蛋白的表达情况,同时检测 β -actin 和核内蛋白内参 Lamin B1 表达情况,并作为上样量标准。扫描图像,光密度软件分析 Nrf2 蛋白表达的相对水平。

1.5 DCFH-DA 染色法检测细胞内活性氧量

以 2×10^5 的密度将细胞接种于 6 孔板内,每孔加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 2 mL。细胞贴壁后,换无血清培养基。加入 0、10、20 及 40 μ mol/L tBHQ 处理 HUVEC 24 h,除对照组和 20 μ mol/L tBHQ 单独处理组之外,其它各组暴露于 1 g/L LPS 6 h。然后根据试剂盒步骤说明进行 DCFH-DA 染色。染色结束后在荧光显微镜下用蓝光激发,观察细胞内的荧光产生情况,细胞中呈现强绿色荧光者为活性氧 (ROS) 产生增多的细胞。

1.6 ELISA 检测培养液中 IL-1 β 和 IL-6 浓度

细胞接种于 24 孔板内,当培养至亚融合状态,换 DMEM 培养基加 1% FCS 培养液,孵育 24 h,使细胞静息。加入处理因素,收集细胞培养液上清液, -20℃ 保存。根据试剂盒说明步骤检测细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-6 浓度。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及 *t* 检测,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 对内皮细胞活性的损伤作用

内皮细胞活性随着 LPS 浓度和处理时间增加而逐渐降低,0.75 g/L LPS 作用 18 h 后、1 g/L 和 1.25 g/L LPS 作用 6 h 后,细胞活性与对照组相比显著降低 ($P < 0.05$; 图 1A)。根据本实验结果将后续实验中 LPS 浓度定为 1 g/L,处理时间为 18 h。

2.2 tBHQ 对 LPS 诱导内皮细胞损伤的保护作用

不同浓度 tBHQ 单独处理组细胞活性与对照组相比差异无统计学意义;与对照组相比,不同浓度 LPS 处理组细胞活性显著降低 ($P < 0.05$);与 LPS 单独处理组相比,不同浓度 tBHQ 加 LPS 处理组细胞活性显著升高 ($P < 0.05$)。而与 10 μ mol/L tBHQ 加 LPS 处理组相比,20 μ mol/L 和 40 μ mol/L tBHQ 加 LPS 处理组细胞活性显著增加 ($P < 0.05$),但 20 μ mol/L 和 40 μ mol/L tBHQ 加 LPS 两组之间差异没有统计学意义 (图 1B)。因此,后续实验 tBHQ 处理浓度定为 20 μ mol/L。

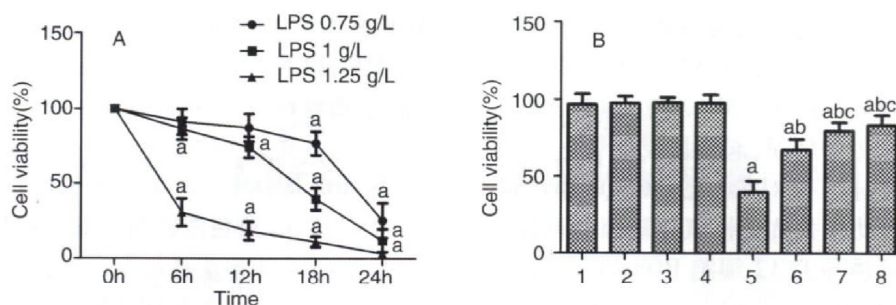


图1. LPS和tBHQ对HUVEC活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$) 1-8分别为对照组、10 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ组、20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ组、40 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ组、LPS组、10 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ + LPS组、20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ + LPS组及40 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ + LPS组。A图中a为 $P < 0.05$,与0 h组比较。B图中a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与LPS组比较;c为 $P < 0.05$,与10 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ + LPS组比较。

Figure 1. Effects of LPS and tBHQ on HUVEC viability

2.3 LPS和tBHQ对细胞核内Nrf2蛋白表达的影响

与对照组相比,LPS单独处理组细胞核内Nrf2蛋白表达显著减少,而tBHQ处理组细胞核内Nrf2蛋白表达显著增多($P < 0.05$);与LPS单独处理组相比,20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ加LPS处理组细胞核内Nrf2蛋白表达显著增多($P < 0.05$;图2A)。

2.4 LPS和tBHQ对细胞浆Nrf2蛋白表达的影响

与对照组相比,LPS单独处理组(1 g/L LPS作用18 h)胞浆内Nrf2蛋白表达显著增加,而tBHQ处理组胞浆内Nrf2蛋白表达显著减少($P < 0.05$);与LPS

单独处理组相比,20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ加LPS处理组胞浆内Nrf2蛋白表达显著减少($P < 0.05$;图2B)。

2.5 LPS处理不同时间对细胞核内Nrf2蛋白表达的影响

与对照组相比,LPS处理30 min细胞核内Nrf2蛋白表达显著升高($P < 0.05$);与LPS处理30 min相比,LPS处理2 h细胞核内Nrf2蛋白表达显著降低($P < 0.05$),但与对照组相比差异无显著性;LPS处理24 h,细胞核内Nrf2蛋白表达与对照组相比显著降低($P < 0.05$;图2C)。

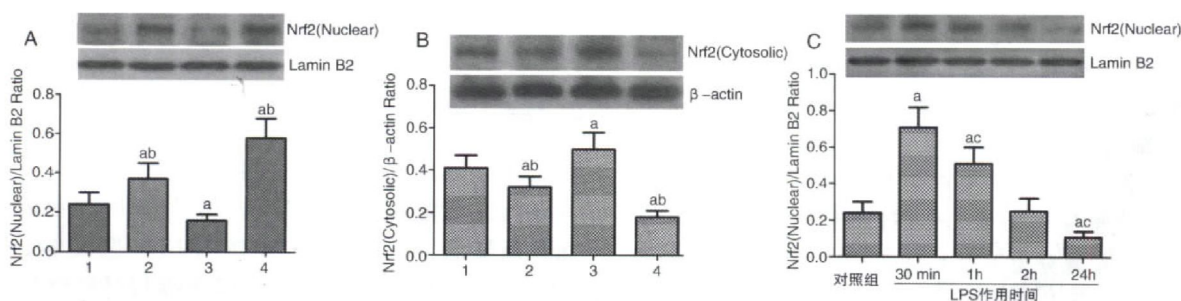


图2. tBHQ对HUVEC Nrf2蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$) 1-4分别为对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ组、LPS组及20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ + LPS组。a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与LPS组比较;c为 $P < 0.05$,与LPS作用30 min组比较。

Figure 2. Effects of tBHQ on the expression of Nrf2 protein in HUVEC

2.6 tBHQ抑制LPS诱导内皮细胞ROS的生成增加

与对照组相比,LPS单独处理组荧光强度明显增强,ROS生成量增加;tBHQ单独处理组与对照组差别不大,但与LPS单独处理组相比荧光强度明显减弱,ROS生成量减少(图3)。

2.7 tBHQ抑制LPS诱导内皮细胞炎症因子的表达水平

与对照组相比,LPS显著增加细胞中TNF- α 蛋白的表达($P < 0.05$);与LPS单独处理组相比,20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ加LPS处理组TNF- α 蛋白的表达显

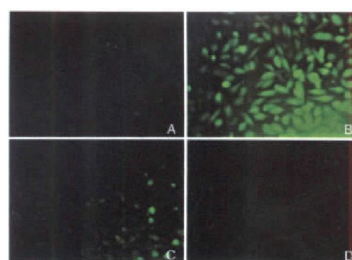


图3. DCFH-DA染色法检测细胞内ROS量 A为对照组,B为LPS组,C为20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ + LPS组,D为20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ组。

Figure 3. DCFH-DA analysis to measure the levels of ROS in HUVEC

著减少 ($P < 0.05$; 图 4A)。与对照组相比, LPS 显著增加培养液中 IL-1 β 和 IL-6 浓度 ($P < 0.05$); 与 LPS 单独处理组相比, 20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ 加 LPS 处理

组培养液中 IL-1 β 和 IL-6 浓度显著减少 ($P < 0.05$; 图 4B 和 4C)。

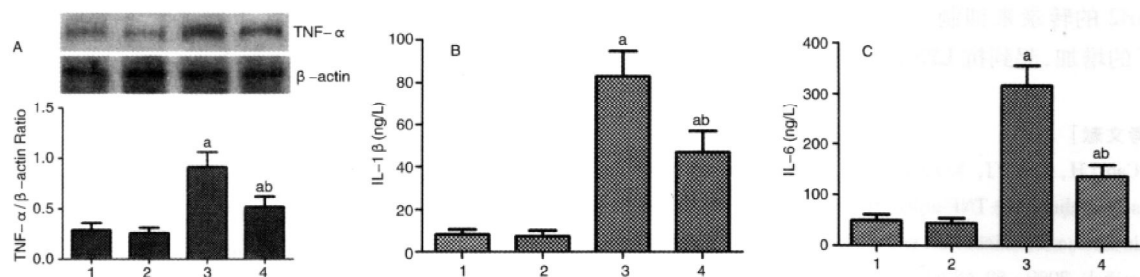


图 4. Western blot 和 ELISA 检测细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) 1-4 分别为对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ 组、LPS 组及 20 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ + LPS 组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 LPS 组比较。

Figure 4. Levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in HUVEC were detected by Western blot and ELISA

3 讨论

血管内皮细胞对各种刺激具有较高的敏感性, 容易受到损伤, 而血管内膜的损伤是动脉粥样硬化发生发展的重要因素, 是冠心病等心血管疾病发生的始动因素, 所以内皮损伤及其相关保护机制的研究对动脉粥样硬化性心血管疾病的防治具有重要的意义。

氧化应激造成 ROS 的产生增加, 引起血管内皮细胞损伤和凋亡, 破坏内皮结构和功能^[5-7]。ROS 包括羟自由基、超氧阴离子、过氧化氢和一氧化氮等。正常情况下, 自由基反应是机体防御所必需的。但在某些病理情况下, 体内产生大量自由基, 使机体的抗氧化防御能力下降, 引起生物膜脂质过氧化、细胞内蛋白及酶变性、DNA 损伤, 导致疾病的发生。同时, ROS 作为重要的细胞内信使来活化许多信号传导通路, 间接导致组织和细胞的损伤。

Nrf2 是一个 CNC 家族的转录因子。在正常情况下, Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1) 耦联, 并与肌动蛋白细胞骨架结合锚定于胞浆, 但是在半胱氨酸残基发生氧化的情况下, Nrf2 和 Keap1 解耦联, 进入细胞核并与 ARE 结合, 激活多种抗氧化基因的转录, 起到抗炎抗氧化应激的作用^[8-10]。tBHQ 是 Nrf2 的特异激活剂, 它通过增加 Nrf2 蛋白的稳定性、激活 Nrf2 的核转位, 继而激活了 Nrf2-ARE 信号通路以及其下游的抗氧化蛋白, 发挥着重要的细胞保护作用。

本研究中, tBHQ 处理能够抑制 LPS 对 HUVEC 的损伤作用, 而相关研究表明 tBHQ 能够通过诱导

Nrf2 的核转位来起到抗氧化作用^[11-13], 这提示 tBHQ 对损伤内皮细胞的保护作用可能是通过诱导 Nrf2 介导的抗炎抗氧化基因的转录来实现。我们检测了各处理组内皮细胞核内和胞浆 Nrf2 蛋白表达情况, 结果表明 tBHQ 能够诱导 Nrf2 由胞浆转入核内, 从而促进了相关抗炎抗氧化基因的转录。而 tBHQ 究竟如何促进 Nrf2 的核转位呢? 我们的研究发现, 内皮细胞核内 Nrf2 蛋白表达在 LPS + tBHQ 组反而比单独 tBHQ 组高。推测可能是 LPS 处理后, 细胞急性应激导致 Nrf2 的转录活性增加, 所以核内蛋白表达增加, 但是 LPS 本身却又能够促进 Nrf2 的降解, 而 tBHQ 处理对 Nrf2 蛋白起到稳定作用。所以我们进一步观察了 LPS 处理不同时间对细胞核内 Nrf2 蛋白表达的影响, 结果表明, 在 30 min 时细胞核内 Nrf2 蛋白表达显著升高, 并达到高峰, 随着时间的增加又逐渐降低。验证了我们的推测。对 ROS 和相关炎症因子水平的检测表明, Nrf2 介导的转录水平的增加能够抑制内皮细胞中 ROS 的生成和炎症因子水平。

内皮细胞损伤是多环节、多通路的相互联系的复杂调控系统。Nrf2 介导的抗炎抗氧化基因的转录也能够同多条通路相互作用, 例如, Nrf2 介导的转录能够抑制 NF- κ B 活性^[14-16], 以及抑制 MAP 激酶 (p38、ERK1/2 和 JNK) 的磷酸化^[17-19]来起到抗炎抗氧化作用, 所以, 对于 Nrf2 究竟是通过何种方式抗内皮细胞损伤, 还需要进一步的研究。同时, 由于本研究没有采用 Nrf2 的抑制剂或者 siRNA 对 Nrf2 信号通路干扰, 使 Nrf2 信号通路在 tBHQ 抗内皮细胞损伤中发挥的作用得到质疑。但 tBHQ 作为 Nrf2 经

典的特异激活剂,通过 Nrf2 信号通路来起到生物效应在很多研究中得到报道^[11, 20, 21],一定程度上解释这种质疑。

综上所述,我们的研究表明 tBHQ 能够通过诱导 Nrf2 的转录来抑制损伤 HUVEC 中 ROS 和炎症因子的增加,起到抗 LPS 诱导内皮细胞损伤作用。

[参考文献]

- [1] Cao LH, Lee YJ, Kang DG, et al. Effect of zanthoxylum schinifolium on TNF- α -induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Vascul Pharmacol*, 2009, 50 (5-6): 200-207.
- [2] Yoon JJ, Lee YJ, Kim JS, et al. Protective role of betulinic acid on TNF- α -induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391 (1): 96-101.
- [3] Lee YJ, Hwang SM, Yoon JJ, et al. Inhibitory effect of thuja orientalis on TNF- α -induced vascular inflammation [J]. *Phytother Res*, 2010, 24 (10): 1 489-495.
- [4] Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4 (2): 110-115.
- [5] Lee YJ, Kang DG, Kim JS, et al. Lycopus lucidus inhibits high glucose-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Vascul Pharmacol*, 2008, 48 (1): 38-46.
- [6] Hwang SM, Lee YJ, Kang DG, et al. Anti-inflammatory effect of gastrodia elata rhizome in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37 (2): 395-406.
- [7] Lee YJ, Moon MK, Hwang SM, et al. Anti-inflammatory effect of buddleja officinalis on vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38 (3): 585-598.
- [8] Angeloni C, Motori E, Fabbri D, et al. H₂O₂ preconditioning modulates phase II enzymes through p38 MAPK and PI3K/Akt activation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300 (6): H2 196-205.
- [9] Freigang S, Ampenberger F, Spohn G, et al. Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammasome activation and exacerbation of atherosclerosis [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41 (7): 2 040-051.
- [10] Jazwa A, Rojo AI, Innamorato N G, et al. Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14 (12): 2 347-460.
- [11] Khodagholi F, Tusi SK. Stabilization of Nrf2 by tBHQ prevents LPS-induced apoptosis in differentiated PC12 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 354 (1-2): 97-112.
- [12] Li HY, Zhong YF, Wu SY, et al. NF-E2 related factor 2 activation and heme oxygenase-1 induction by tert-butylhydroquinone protect against deltamethrin-mediated oxidative stress in PC12 cells. [J]. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20 (9): 1 242-251.
- [13] Imhoff BR, Hansen JM. Tert-butylhydroquinone induces mitochondrial oxidative stress causing Nrf2 activation [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2010, 26 (6): 541-551.
- [14] Konstantinopoulos PA, Fountzilas E, Pillay K, et al. Carboplatin-induced gene expression changes in vitro are prognostic of survival in epithelial ovarian cancer [J]. *BMC Med Genomics*, 2008, 1: 59.
- [15] Garbin U, Fratta PA, Stranieri C, et al. Cigarette smoking blocks the protective expression of Nrf2/ARE pathway in peripheral mononuclear cells of young heavy smokers favouring inflammation. [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (12): e8225.
- [16] Ganster F, Burban M, de la Bourdonnaye M, et al. Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics, inflammatory response and oxidative stress during resuscitated hemorrhagic shock in rats [J]. *Crit Care*, 2010, 14 (5): R165.
- [17] Chen M, Gu H, Ye Y, et al. Protective effects of hesperidin against oxidative stress of tert-butyl hydroperoxide in human hepatocytes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48 (10): 2 980-987.
- [18] Zrelli H, Matsuoka M, Kitazaki S, et al. Hydroxytyrosol induces proliferation and cytoprotection against oxidative injury in vascular endothelial cells: Role of Nrf2 activation and HO-1 induction [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59 (9): 4 473-482.
- [19] Sethy NK, Singh M, Kumar R, et al. Upregulation of transcription factor NRF2-mediated oxidative stress response pathway in rat brain under short-term chronic hypobaric hypoxia [J]. *Funct Integr Genomics*, 2011, 11 (1): 119-137.
- [20] 李航,曹延萍,张连珊,等.叔丁基对苯二酚减轻高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激损伤[J].*中国药理学通报*, 2011, 27 (4): 528-533.
- [21] 李航,任韞卓,刘淑霞,等.叔丁基对苯二酚对糖尿病小鼠肾脏氧化应激损伤及 Nrf2 蛋白表达的影响[J].*中国药理学通报*, 2009, 25 (10): 1 341-345.

(此文编辑 文玉珊)