

健脾消癌方对人结肠癌细胞中 Wnt 信号分子 β -catenin、Axin 及靶基因 MMP-7、CD44 的影响

唐蔚¹, 宋程², 蒋益兰¹, 潘博¹, 杨晓³, 刘科³, 陶子豪³

(1. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙, 410006;

2. 湖南省肿瘤医院/中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院, 湖南 长沙, 410013;

3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208)

[摘要] 目的: 观察健脾消癌方对 Wnt 信号分子 β -连环蛋白(β -catenin)、Axin 及靶基因基质金属蛋白酶-7(MMP-7)、CD44 的影响, 探讨其抗结直肠癌复发转移的作用机制。方法: 将对数生长期的 HCT116 细胞分为空白组、0.9% 氯化钠注射液组、5-Fu 组及健脾消癌方低、中、高剂量组, 分别干预 48h 后, 收集细胞, PCR 检测 β -catenin、Axin 及 MMP-7、CD44 表达。结果: 健脾消癌方含药血清可以降低人结肠癌 HCT116 细胞中 β -catenin mRNA 表达水平, 上调 Axin mRNA 表达水平, 明显抑制 MMP-7 mRNA 及 CD44 mRNA 的表达。结论: 健脾消癌方抗结直肠癌转移侵袭的药理作用可能与其下调 Wnt/ β -catenin 信号通路的信号分子 β -catenin 及上调 Axin 的表达水平并有效降低靶基因 MMP-7、CD44 的表达水平有关, 这可能是健脾消癌方抗结直肠癌复发转移的重要分子机制之一。

[关键词] 健脾消癌方; 结直肠癌; Wnt/ β -catenin 通路; 信号分子; 靶基因; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.01.057

Effect of Jianpi Xiaoi prescription on the Wnt signaling molecules β -catenin and Axin and the target genes matrix metalloproteinase-7 and CD44 in human colon cancer cells

TANG Wei¹, SONG Cheng², JIANG Yilan¹, PAN Bo¹, YANG Xiao³, LIU Ke³, TAO Zihao³

(1. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China;

2. Hunan Provincial Cancer Hospital & The Affiliated Tumor Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China;

3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Jianpi Xiaoi prescription on the Wnt signaling molecules β -catenin and Axin and target genes matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and CD44 in human colon cancer cells and its mechanism of action in preventing the recurrence and metastasis of colorectal cancer. Methods: HCT116 cells in the logarithmic growth phase were divided into blank group, 0.9% sodium chloride injection group, 5-fluorouracil (5-Fu) group, and low-, middle-, and high-dose Jianpi Xiaoi prescription groups. The cells were collected after 48 hours of intervention, and PCR was used to measure the expression of β -catenin, Axin, MMP-7, and CD44. Results: In the human colon cancer cell line HCT116, the serum containing Jianpi Xiaoi prescription reduced the mRNA expression of β -catenin, upregulated the mRNA expression of Axin, and significantly inhibited the mRNA expression of MMP-7 and CD44. Conclusion: Jianpi Xiaoi prescription can downregulate β -catenin and upregulate Axin in the Wnt/ β -catenin signaling pathway and reduce the expression of the target genes MMP-7 and CD44, which might be one of the important molecular mechanisms of action of Jianpi Xiaoi prescription in preventing the recurrence and metastasis of colorectal cancer.

[Key words] Jianpi Xiaoi prescription; colorectal cancer; Wnt/ β -catenin signaling pathway; signaling molecule; target gene; experimental study

近年来, 因为生活方式及饮食结构的改变, 我国结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的发病率急速上升^[1]。据《2017 中国肿瘤登记年报》显示, 结直肠癌发病率在我国男性及女

性恶性肿瘤中均居前 5 位。目前, 结直肠癌治疗仍以手术治疗为主, 辅以化学药物治疗、放射治疗、靶向药物治疗等, 术后 5 年总生存率约 50% 左右^[2]。研究表明, Wnt 信号通路

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(编号:2018JJ3312); 湖南省科技厅重点研发项目(编号:2016SK2049)

第一作者: 唐蔚, 女, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合防治恶性肿瘤

通讯作者: 宋程, 男, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合防治恶性肿瘤, E-mail: 77083182@qq.com

参与结直肠癌的发生、发展,均是通过影响细胞凋亡、增殖和分化等生命活动而实现的^[3],约90%结直肠癌患者存在Wnt信号通路的异常,许多作用于结直肠癌的新药均通过Wnt信号通路发挥作用^[4]。

健脾消癌方是湖南省名中医蒋益兰教授治疗结直肠癌的经验方,该方由人参、白术、黄芪、灵芝、茯苓、薏苡仁等构成,整方寒温并用,攻补兼施,有健脾益气、化痰解毒之功。研究显示,健脾消癌方配合化疗可降低结直肠癌术后患者的复发转移率,延长患者生存期;且联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌可提高患者疾病控制率,延长晚期结直肠癌患者的无进展生存期和总生存期,并能减轻化疗所致的不良反应、提高患者生活质量、有效降低肿瘤标志物;动物实验表明此方可促进小鼠皮下移植瘤细胞凋亡,调节细胞凋亡蛋白的表达^[5-8]。

本实验拟实验对象为人结肠癌HCT116细胞,通过研究健脾消癌方对结直肠癌细胞Wnt信号分子 β -catenin、Axin及靶基因MMP-7、CD44的作用,探讨其拮抗结直肠癌复发转移的作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 SPF级健康Wistar雄性大鼠20只,4~6周龄,体质量(180±20)g,动物合格证号:SCXK(湘)2016-0002,来源于长沙莱克景达实验动物有限公司,饲养于湖南省中医药研究院实验动物房,其温湿度适宜,人工循环照明12h昼/夜,灌胃前适应性饲养3d。

1.2 细胞 人结肠HCT116细胞,上海生物医学工程研究所提供。

1.3 药物 健脾消癌方(由人参、白术、法半夏、灵芝、黄芪、茯苓、薏苡仁、淫羊藿、莪术、白花蛇舌草、半枝莲、蚤休、炒枳壳、郁金、甘草组成),上述饮片购自湖南省中医药研究院附属医院门诊中药房,为同一批次同一产地药材,经湖南省中医药研究院附属医院药剂科马荣丽药师鉴定符合2015年版《中国药典》规定。将以上15味药按处方量抓取,加入10倍量水浸泡1h,煎制1h,滤过,将滤液储存,再加入8倍量水,煎煮1h,滤过,合并2次滤液,浓缩至含生药3g/ml的药液,置于4℃冰箱保存备用。5-氟尿嘧啶(5-Fu),0.25g/支,北京紫竹药业有限公司生产,批号:01646346Y。

1.4 主要试剂与仪器 DMEM培养基(美国Gibco),胎牛血清(杭州四季青),PBS缓冲液(杭州四季青),乙醇(上海化学试剂有限公司),TEMED(美国Sigma),胰酶(上海碧云天),Tris(美国Sigma),SDS(美国Sigma),RIPA裂解液(北京普利莱),Tween-20(美国Sigma),蛋白酶抑制剂(德国Merck),显影液(中国WellBiology),兔 β -catenin一抗(美国Proteintech),反转录试剂盒(北京康为世纪),Trizol(美国Invitrogen),台式冷冻离心机(深圳黑马TGL-18R),摇床(江苏其林贝尔TS-92),超净工作台(法国JouanMSC12),电泳仪(美国Bio-rad 164-5050),电泳槽(DYCZ-24EN,北京六一),转膜仪(DYCZ-40A,北京六一),流式细胞仪(美国Bio-rad),荧光定量PCR仪(美国Thermo SPL0960),

电热干烤箱(上海新苗),高压消毒锅(长沙厚益深泰)。

2 实验方法

2.1 药物血清制备 参照相关文献^[9]制备健脾消癌方药物血清及氯化钠注射对照血清。药物血清组大鼠给药量按人与大鼠等效剂量换算为10g/kg,健脾消癌方高、中、低剂量组大鼠分别给予健脾消癌方药液20、10、2.5g/kg灌胃,1次/d;氯化钠注射液组大鼠给予0.9%氯化钠注射液15ml/kg灌胃,1次/d,连续15d。于末次灌胃前空腹12h,灌胃后30min用10%水合氯醛麻醉腹腔注射,腹主动脉采血,3000r/min离心30min,吸取血清即上清液,合并同组血清,56℃水浴30min灭活补体,用0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌后,使用无菌试管分装后标记类别、日期,置于-20℃冰箱内保存备用。

2.2 细胞培养 人结肠癌HCT116细胞,用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM高糖培养基,放在37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。细胞铺满培养瓶底80%~90%时给予胰蛋白酶消化并传代,传代1次约2d。

2.3 分组给药 取生长期对数细胞,浓度调整为 1.5×10^5 个/ml,取2块6孔板,每孔加入上述细胞悬液2ml,分别设为5-Fu组、氯化钠注射液组、空白组和健脾消癌方低、中、高剂量组,每组3孔。细胞铺板完成后静置12h,换成含药培养液。5-Fu组:1 μ g/ml 5-Fu+10%FBS+DMEM培养基;氯化钠注射液组:5%氯化钠注射液对照血清+10%FBS+DMEM培养基;空白组:5%空白血清+10%FBS+DMEM培养基;健脾消癌方低剂量组:5%低浓度药物血清+10%FBS+DMEM培养基;健脾消癌方中剂量组:5%中浓度药物血清+10%FBS+DMEM培养基;健脾消癌方高剂量组:5%高浓度药物血清+10%FBS+DMEM培养基。继续放回培养箱继续培养48h。

2.4 细胞 β -catenin、Axin、MMP-7、CD44 mRNA表达的检测 收集细胞,Trizol提取各组细胞总RNA,紫外分光光度计测定总RNA浓度,以组织总mRNA为模板,反转录成cDNA,反转录反应体系20 μ l:3 μ l RNA,2 μ l Random primer,5 μ l 无菌DEPC处理水,70℃加热5min,迅速插入碎冰中冷却,再依次加入4 μ l 5Reaction buffer、4 μ l dNTP、1 μ l RNase inhibitor,37℃加热5min。再加入1 μ l M-MLV反转录酶,42℃放置1.5h,转72℃反应10min,得cDNA。SYBR法检测基因表达:实时定量PCR。体系组成:Template 2 μ l, Primer F (10 μ mol/L) 0.5 μ l, Primer R (10 μ mol/L) 0.5 μ l, PCR H₂O 12 μ l, 2XSYBGREEN PCR Master Mix 15 μ l。反应条件:95℃ 10min,95℃ 10s,59℃ 50s,读板,共40个循环。目的基因序列可在NCBI上搜索,采用primer5软件设计引物,合成引物由上海生工完成。引物序列见表1。

采用SPSS 21.0统计软件进行分析。实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,数据符合正态分布及方差齐性时,组间比较用独立样本t检验,多组间比较用方差分析,多重比较用LSD法;数据不符合正态分布或方差不齐时,则用非参数检验中多个独立样本Kruskal-Wallis H检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 各基因 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'~3')	产物长度/bp
Actin	F:CATCCTGCGTCTGGACCTGG	116
	R:TAATGTCACGCACGATTTC	
β-catenin	F:CAGCTCCTTCTCTGAGTGCT	153
	R:TCTGAGCTCGAGTCATTGCAT	
Axin	F:TCGATCCTGCCATGTTTGACC	242
	R:ATCGTCTCATCCATGTCCTG	
MMP-7	F:AAATGCCAACAGTTTAGAAGCC	84
	R:ACGCGGGAGTTTAACATTCCA	
CD44	F:AGACAGAATCCCTGCTACCAC	250
	R:ATCATCAATGCCTGATCCAGA	

2.5 统计学方法

3 实验结果

3.1 各组 HCT116 细胞 β-catenin、Axin mRNA 表达的比较

与空白组、氯化钠注射液组比较,健脾消癌方各剂量组 HCT116 细胞 β-catenin mRNA 表达均明显降低,以健脾消癌方高剂量组尤为明显,健脾消癌方中、高剂量组 HCT116 细胞 Axin mRNA 表达明显升高,差异均有统计学意义。(见表 2)

表 2 各组 HCT116 细胞

β-catenin、Axin mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	剂量(g/kg)	体积分数(%)	β-catenin	Axin
空白组	3	-	5	2.74±3.77	0.56±2.60
氯化钠注射液组	3	-	5	3.04±7.17	0.51±9.91
5-Fu 组	3	-	-	1.24±1.00	1.17±1.81
健脾消癌方低剂量组	3	2.5	5	2.32±4.34 ^a	0.58±8.99
健脾消癌方中剂量组	3	10	5	1.39±2.23 ^a	0.88±4.13 ^a
健脾消癌方高剂量组	3	20	5	1.00±1.97 ^a	1.00±1.72 ^a

注:与空白组及氯化钠注射液组比较,^a $P < 0.05$ 。

3.2 各组 HCT116 细胞 MMP-7、CD44 mRNA 表达的比较

与空白组、氯化钠注射液组比较,健脾消癌方高剂量组 HCT116 细胞 MMP-7 mRNA 表达及健脾消癌方中、高剂量组 CD44 mRNA 表达均明显降低,差异均有统计学意义。(见表 3)

表 3 各组 HCT116 细胞

MMP-7、CD44 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	剂量(g/kg)	体积分数(%)	MMP-7	CD44
空白组	3	-	5	1.47±1.42	2.16±5.14
氯化钠注射液组	3	-	5	1.77±2.73	1.81±5.66
5-Fu 组	3	-	-	0.76±9.73	0.91±2.47
健脾消癌方低剂量组	3	2.5	5	1.93±1.21	2.04±3.68
健脾消癌方中剂量组	3	10	5	1.53±1.25	1.16±3.00 ^a
健脾消癌方高剂量组	3	20	5	1.00±1.76 ^a	1.00±2.06 ^a

注:与空白组及氯化钠注射液组比较,^a $P < 0.05$ 。

4 讨 论

Wnt 信号在细胞中有 2 条通路,即 Wnt/β-catenin 经典

通路和 Wnt/β-catenin 非经典通路。β-catenin 是经典信号通路 Wnt/β-catenin 中的核心信号分子,在其中具有关键作用。Wnt/β-catenin 通路的激活可引起 β-catenin 在细胞质内聚积,激活 cyclinD1 和 c-myc 等原癌基因^[10]。因此,β-catenin 在细胞内的聚积与肿瘤的发生及转移侵袭密切相关。

Axin 是 Wnt 通路的重要调控分子,与多种肿瘤发生、发展关系密切,且对 Wnt 通路负性调节。正常情况下,Axin 与 GSK-3β、APC、β-catenin 等结合,形成多元复合物,使 β-catenin 磷酸化,下调其水平,从而负性调节 Wnt 信号通路,抑制肿瘤发生发展^[11]。但当 Axin 出现异常时,使 GSK-3β 磷酸化从 Axin 上脱落,导致 β-catenin 不能被降解,大量游离的 β-catenin 进入细胞核内,激活转录因子,引起一系列原癌基因的表达^[12]。

Wnt 通路下游靶基因众多,至今已发现的就达 30 多种,其中包括 MMP-7 和 CD44。MMP-7 是目前发现的 MMPs 家族中分子质量最小的一种分泌型蛋白^[13]。研究表明,在多种恶性肿瘤组织中 MMP-7 均表达过度,导致了恶性肿瘤的侵袭、转移,尤其与结直肠癌的关系最密切^[14-15]。CD44 是细胞膜上广泛分布的一种跨膜糖蛋白,属于黏附分子,主要参与异质性黏附。在肿瘤细胞侵袭转移中,异质性黏附起促进作用。研究发现结肠癌患者血清中 CD44 的表达阳性率较正常患者高,且 CD44 的表达与肿瘤的侵袭程度显著相关^[16]。

本实验结果显示,在健脾消癌方各剂量组中,HCT116 细胞 β-catenin mRNA 表达均有明显降低,以健脾消癌方高剂量组最明显;健脾消癌方中、高剂量组 HCT116 细胞 Axin mRNA 表达明显升高。健脾消癌方高剂量组 HCT116 细胞 MMP-7 mRNA 表达降低明显;健脾消癌方高、中剂量组 CD44 mRNA 表达降低明显。提示健脾消癌方抗结直肠癌转移侵袭的药理作用可能与其下调 Wnt/β-catenin 信号通路的信号分子 β-catenin 及上调 Axin 的表达水平并有效降低靶基因 MMP-7、CD44 的表达水平有关,这可能是健脾消癌方抗结直肠癌复发转移的重要分子机制之一。

参考文献

[1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin,2016(66):115-132.
[2] 石远凯,孙燕. 临床肿瘤内科手册[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2015:491-492.
[3] 王倩,张珊,封国生. Wnt 经典信号通路在结直肠癌中的研究进展[J]. 医学综述,2017,23(5):907-911.
[4] Wang S,Bao Z,Liang QM,et al. Octreotide stimulates somatostatin receptor-induced apoptosis of SW480 colon cancer cells by activation of glycogen synthase kinase-3β,A Wnt/β-catenin pathway modulator[J]. Hepatogastroenterology,2013,60(127):1639-1646.
[5] 蒋益兰,潘敏求,蔡美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗结直肠癌术

- 后复发转移62例总结[J]. 湖南中医杂志,2007,23(1):1-3.
- [6] 蒋益兰,俞天俊,赵晔. 健脾消癌方治疗老年中晚期大肠癌临床观察[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(3):94-96.
- [7] 王容容,王其美,蒋益兰,等. 健脾消癌方联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌的临床研究[J]. 中华中医药杂志,2016,31(5):1732-1735.
- [8] 宋程,杨晓,施晓玲,等. 健脾消癌方对小鼠大肠癌皮下移植瘤细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(3):120-124.
- [9] 张君涛,王平,刘爱峰,等. 中药药物血清制备方法的研究概述[J]. 中华中医药杂志,2015,30(11):4006-4009.
- [10] 张嘉美,赵宁,吴晓玲,等. Wnt/ β -catenin信号通路对细胞凋亡和坏死的调控研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2015,37(9):1309-1316.
- [11] 牟光远,徐林浩,陈旭,等. APC, β -catenin和Axin在胸腺瘤中的表达及意义[J]. 潍坊医学院学报,2013,35(4):285-288.
- [12] Mitsuhiro Nakamoto, Atsui Matsuyama, Eisuke Shiba, et al. Prognostic significance of WNT signaling in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Virchows Archiv October,2014,465(4):401-408.
- [13] Bucan V, Mandel K, Bertram C, et al. LEF-1 regulates proliferation and MMP-7 transcription in breast cancer cells[J]. Genes Cells,2012,17(7):559-567.
- [14] Cheng S, Eliaz I, Lin J, et al. Triterpenes from *Poria cocos* suppress growth and invasiveness of pancreatic cancer cells through the downregulation of MMP-7[J]. Int J Oncol,2013,42(6):1869-1874.
- [15] Lu H, Yang Z, Zhang H, et al. The expression and clinical significance of matrix metalloproteinase 7 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 2 in clear cell renal cell carcinoma[J]. Exp Ther Med,2013,5(3):890-896.
- [16] 马丹,张珍祥,徐永健. CD44分子的研究现状[J]. 国际呼吸杂志,2006,26(12):938-942.

(收稿日期:2018-07-03)

(上接第112页)

3 讨论

中医学认为高脂血症多因脏腑功能失调,脾肾两虚,津液运行不畅,而造成痰瘀内阻。因此,临床上常用健脾和胃、活血化瘀、化痰祛湿、益气活血等大法。何首乌属于补益药,可补益精血、乌须发、强筋骨、补肝肾。在治疗高脂血症中,何首乌起滋补肝肾、润燥解毒之功,同时与山楂、丹参、泽泻等药合用共奏疏肝活血、除湿化痰之功。大量动物实验证实何首乌具有降血脂的作用^[18]。

本研究在临床研究文献的基础上,使用Meta分析方法从临床有效率、实验室指标等方面对何首乌及其中药制剂的降血脂作用进行了全面分析,以期为临床应用提供证据支持。结果发现,何首乌治疗高脂血症的疗效优于辛伐他汀、洛伐他汀、脂必妥等常规降脂药物;在治疗高脂血症的疗效指标方面,TC值可能比TG值更加敏感。

同时,通过系统研究分析文献发现,国内发表的治疗高脂血症临床类文献的质量普遍不高,在研究设计方面大多数文献都没有指出随机化的方法,仅说明是随机,是否使用了盲法也没有说明。同时在一般临床资料中,年龄、性别等信息均有缺失,文献质量有待提高。

参考文献

- [1] 逢冰,赵林华,何丽莎,等. 中医对高脂血症的认识和展望[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(5):1107-1109.
- [2] 魏艺. 中医药治疗高脂血症临床随机对照试验文献质量评价[D]. 北京:中国中医科学院,2011.
- [3] 陈扬俊,李淑芬,陈庆耀. 自拟首乌二子调脂饮治疗高脂血症50例[J]. 福建中医药,2005,36(6):9-10.
- [4] 丁丽. 用何首乌治疗高脂血症的效果分析[J]. 当代医药论丛,2015,13(21):23.
- [5] 陆新. 首乌降脂汤治疗高脂血症临床观察[J]. 浙江中医杂志,2006,41(10):588-589.
- [6] 路世亮,李霞丽,原冬亚. 降脂合剂治疗高脂血症98例[J]. 中国医疗前沿,2009,4(22):16.
- [7] 马跃龙,杨素兰,赵启勇,等. 首乌降脂汤治疗高脂血症临床观察[J]. 时珍国医国药,2007,18(9):2254-2255.
- [8] 乔义文. 首乌草决泽楂汤治疗高脂血症120例[J]. 中国中医药现代远程教育,2009,7(8):109.
- [9] 饶洪. 首乌山楂降脂丸治疗高脂血症临床研究[J]. 中医学报,2012,27(12):1642-1643.
- [10] 王丽军,刘栋,申雷. 降脂片治疗高脂血症疗效观察[J]. 药事实践杂志,2013,31(1):51-52,63.
- [11] 吴惠珍. 首乌降脂汤治疗高脂血症32例[J]. 湖北中医杂志,2001,23(3):18.
- [12] 许哲明. 丹参首乌山楂汤治疗高脂血症61例[J]. 江西中医药,2006,37(10):21-22.
- [13] 杨通宝. 国华天麻首乌片治疗高脂血症100例[J]. 湖南中医杂志,2002,18(5):53.
- [14] 于效力. 明楂首乌降脂汤治疗高脂血症64例报道[J]. 甘肃中医,2005,18(8):18-19.
- [15] 张凡鲜,郭燕. 降脂胶囊治疗高脂血症200例[J]. 上海中医药杂志,2000,34(12):27.
- [16] 赵坤元. “首乌泽泻汤”治疗高脂血症60例临床观察[J]. 江苏中医药,2006,27(5):32-33.
- [17] 赵雅丽. 利脉胶囊治疗高脂血症51例临床观察[J]. 齐鲁护理杂志,2008,14(3):16-17.
- [18] 梅雪,余刘勤,陈小云,等. 何首乌化学成分和药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究,2016,39(1):122-131.

(收稿日期:2018-02-08)