

南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞侵袭转移能力的影响

杨庆伟¹, 刘延庆^{1*}, 刘 丽¹, 刘为为¹, 侯 莹¹, 戴小军²

(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州 225001; 2. 扬州中医院, 江苏 扬州 221008)

摘要:目的 研究南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞侵袭和黏附能力的影响。方法 南蛇藤总萜提取物作用肝癌 7721 细胞后, MTT 法及细胞黏附法检测细胞毒作用及对黏附能力的影响; 流式细胞仪检测基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 表达的变化; ELISA 法检测血管内皮生长因子 (VEGF) 分泌量的变化。结果 10、20、40、80 μg/mL 南蛇藤总萜提取物作用肝癌 7721 细胞后, 其生长抑制率分别为 (8.62 ± 0.87) %、(13.42 ± 1.07) %、(27.64 ± 2.13) %、(47.16 ± 3.08) %, 呈剂量依赖性。南蛇藤总萜提取物可以抑制肝癌 7721 细胞与人脐静脉内皮细胞和基底膜成分 Matrigel 的侵袭、黏附能力, 能明显下调 MMP-2 和 VEGF 的表达, 且呈一定的量效关系。结论 南蛇藤总萜提取物可以抑制肝癌 7721 细胞增殖, 降低细胞的侵袭、黏附能力, 其机制可能与下调 VEGF 和 MMP-2 的表达有关。

关键词: 南蛇藤; 肝癌 7721 细胞; 细胞黏附; 血管内皮生长因子 (VEGF); 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)

中图分类号: R286.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)03-0434-04

南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb. 为卫矛科南蛇藤属植物^[1], 主要含有二氢沉香呋喃倍半萜生物碱, 此外还有三萜类、黄酮类、甾体类及鞣质等多种成分。研究证明^[2], 南蛇藤中某些有效成分有很好的抗肿瘤活性, 可以诱导多种肿瘤细胞株凋亡, 并且对小鼠肉瘤 (S₁₈₀) 和肝癌 (Heps) 都有很好的抑制作用。本研究观察南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞侵袭和黏附能力的影响, 通过流式细胞仪和 ELISA 法分别检测南蛇藤总萜提取物对基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的影响, 探讨南蛇藤总萜提取物抑制肝癌 7721 细胞侵袭转移的可能机制。

1 材料

1.1 细胞株: 人肝癌 7721 细胞株和人脐静脉内皮细胞由扬州大学医学院中西医结合研究所提供。

1.2 药物: 南蛇藤饮片购于广东省中医院, 经中国药科大学中药资源研究室秦民坚教授鉴定为卫矛科南蛇藤属植物南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb. 的藤茎。南蛇藤藤茎切断, 粉碎成粉, 烘干, 95% 乙醇加热回流提取 3 次, 回收溶剂得到浸膏, 拌入硅藻土, 真空低温抽干, 再用醋酸乙酯热水浴加热回流, 滤过, 回收得到醋酸乙酯浸膏 (含总萜类化合物 68.3%), 提取物得率约 2%。DMSO 助溶, 其体积

分数小于 0.05%, 以无血清培养基配成实验所需要浓度工作液, 常压滤过除菌。

1.3 主要试剂及仪器: RPMI 1640 培养基购自 Gbico 公司, 小牛血清购自杭州四季青公司, MTT 粉剂购自 Sigma 公司, 鼠抗人 MMP-2 购自北京中杉公司, 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记羊抗鼠 IgG 购自碧云天生物公司, Matrigel 购自 BD 公司, 人血管内皮细胞生长因子 (VEGF) ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物公司; 倒置相差显微镜 (OLYMPUS, 日本), CO₂ 恒温孵箱 (REVCO, 美国), 酶标仪 (Labsystems Dragon, 芬兰), 流式细胞仪 (FACSAria, 美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法测定南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞的细胞毒作用: 肝癌 7721 细胞以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板中, 然后加入南蛇藤总萜提取物工作液, 使其终质量浓度分别为 10、20、40、80 μg/mL, 对照组用等体积的培养液替代。在 37℃、5% CO₂ 的孵箱中培养 24 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 工作液 20 μL, 再孵育 4 h, 去上清, 加入 DMSO 150 μL/孔, 微波振荡器振荡 10 min 后, 使结晶物充分溶解^[3]。选择 490 nm 波长, 在酶标仪上测定每孔吸光度 (A) 值, 每组重复 6 孔, 试验重复 3 次, 计算细胞生长抑制率。

抑制率 = (1 - 药物组 A 值 / 对照组 A 值) × 100 %

* 收稿日期: 2008-06-05

基金项目: 国家中医药管理局普通课题 (04-05ZP35)

作者简介: 杨庆伟 (1980—), 男, 甘肃庆阳人, 硕士研究生, 主要从事抗肿瘤血管生成及其机制的研究。

Tel: (0514) 87996213 E-mail: yangqingwei2001@126.com

* 通讯作者 刘延庆 E-mail: lyq@xzit.edu.cn

2.2 肝癌 7721 细胞同质黏附试验:将对数生长期的肝癌 7721 细胞传代至 96 孔培养板中,细胞生长至融合。待测细胞为经南蛇藤总萜提取物 (2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 24 h 的肝癌 7721 细胞,每孔加入 8×10^4 个待测细胞 100 μL ,对照组只加培养基,每组重复 6 孔。培养箱中孵育 2 h 后倾去细胞上清,PBS 洗 2 遍,洗去未黏附细胞。每孔加入 5 mg/mL MTT 50 μL ,继续培养 4 h 后弃去上清,每孔加入 DMSO 100 μL ,微波振荡器振荡 10 min 后,于酶标仪 490 nm 处测定 A 值。

2.3 肝癌 7721 细胞与细胞外基质黏附试验:取 96 孔培养板,每孔中加入无血清 RPMI 1640 稀释的 Matrigel 胶液 25 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜干燥后,PBS 洗 1 次,室温干燥 1 h,各孔中加入 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,PBS 洗 3 次,每孔加入 100 μL 含有 8×10^4 个经南蛇藤总萜提取物作用 24 h 的肝癌 7721 细胞^[4] (分组同 2.2 项)。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h 后,PBS 洗去未黏附细胞,MTT 法检测同上,计算细胞黏附抑制率。

细胞黏附抑制率 = $(1 - \text{药物组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$

2.4 肝癌 7721 细胞与血管内皮细胞黏附试验:将处于对数生长期的人脐静脉内皮细胞,以每孔 4×10^4 个接种于 96 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h 后,细胞融合成单层,每孔中加入 100 μL 含有 8×10^4 个预先经南蛇藤总萜提取物作用 24 h 的肝癌 7721 细胞 (分组同 2.2 项)。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中再孵育 2 h 后,用 PBS 洗去未黏附细胞,每孔加入 100 μL 0.25% 虎红,室温作用 10 min 后,洗去游离虎红,每孔加入 PBS-乙醇 (1:1) 200 μL ,作用 1 h 后,于酶标仪 490 nm 处测定 A 值。细胞黏附抑制率计算方法同 2.3 项。

2.5 流式细胞仪检测 MMP-2 表达的变化:肝癌 7721 细胞以 4×10^5 个/ mL 接种于 50 mL 细胞瓶中,24 h 后加入按倍数比例稀释后的南蛇藤总萜提取物终质量浓度为 2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对照组用等体积 RPMI 1640 替代药物。孵育 24 h 后,收集细胞,调其浓度为 1×10^6 个/ mL ,取 100 μL 的细胞悬液放入 1.5 mL EP 管中,然后加入含有 1% 多聚甲醛的 PBS 固定 10 min,去上清,加入含有 0.1% Triton X-100 的 PBS,室温放置 15 min,PBS 洗 2 遍,加入 1:50 稀释的鼠抗人 MMP-2 单抗 50 μL ,室温下放置 30 min,PBS 洗 2 遍,弃上清,加入 1:300 稀释的羊抗鼠 FITC-IgG 50 μL ,室温下避光静

置 30 min,PBS 洗 2 遍,最后加入 1 mL PBS,上流式细胞仪检测。以未加一抗的作为对照组。计算 MMP-2 荧光指数 (FI = 检测管细胞平均荧光强度 / 对照管细胞平均荧光强度)。对照管表达 FI = 1,如 FI > 1.0 为阴性表达,FI < 1.0 为阳性表达。

2.6 ELISA 法检测表达的变化:取对数生长期肝癌 7721 细胞,以每孔 3×10^6 个接种于细胞瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h 后,加入等体积南蛇藤总萜提取物 (终质量浓度分别为 2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$),继续培养 48 h 后,吸取细胞培养上清于 EP 管中,离心去细胞碎片和杂质后,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。上清液中 VEGF 蛋白浓度测定按照 VEGF 检测试剂盒进行,于酶标仪 450 nm 处测 A 值,根据标准品的 A 值求出标准曲线方程,并计算出细胞上清中 VEGF 浓度。

2.7 统计学处理:采用 SPSS 10.0 统计软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。

3 结果

3.1 南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞的细胞毒作用:MTT 结果显示,当药物质量浓度为 10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞生长的抑制率分别为 (8.62 \pm 0.87)%、(13.42 \pm 1.07)%、(27.64 \pm 2.13)%、(47.16 \pm 3.08)% ,随着药物质量浓度不断增加,其对细胞增殖的抑制率在逐渐升高,呈剂量依赖性,与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$)。当药物质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对细胞抑制率小于 15%,经过实验观察,可以认为在此条件下无明显的细胞毒作用,故选择 2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的南蛇藤总萜提取物作为细胞黏附试验质量浓度。

3.2 南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞间同质黏附的影响:结果显示,当药物质量浓度为 2.5、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其 A 值分别为 1.214 \pm 0.046、1.318 \pm 0.042,与对照组 (0.918 \pm 0.050) 比较存在显著性差异 ($P < 0.05$),可以认为低质量浓度的南蛇藤总萜提取物可以促进肝癌 7721 细胞间的同质黏附。

3.3 南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞与细胞外基质黏附的影响:结果显示,南蛇藤总萜提取物能明显抑制肝癌 7721 细胞侵袭基底膜成分 Matrigel 的能力。当药物质量浓度为 2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其黏附抑制率分别为 15.94%、26.50%、35.77%、44.72%,与药物剂量呈正相关,结果见表 1。

3.4 南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞与血管内皮细胞黏附能力的影响:南蛇藤总萜提取物能明

表 1 南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞与细胞外基质和人血管内皮细胞黏附能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of total terpenes extracted from *C. orbiculatus* on adhesion ability of hepatoma 7721 cells to extracellular matrix and human vascular endotheliocytes ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

| 组别 | / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 细胞外基质 | | 血管内皮细胞 | |
|--------------|--|----------------------|---------|----------------------|---------|
| | | A 值 | 黏附抑制率/% | A 值 | 黏附抑制率/% |
| 对照 | - | 1.230 \pm 0.055 | 0 | 1.195 \pm 0.072 | 0 |
| 南蛇藤总萜 提取物 | 2.5 | 1.034 \pm 0.120 * | 15.94 | 1.071 \pm 0.047 * | 10.38 |
| | 5 | 0.904 \pm 0.062 ** | 26.50 | 0.991 \pm 0.014 ** | 17.05 |
| | 10 | 0.794 \pm 0.039 ** | 35.77 | 0.829 \pm 0.021 ** | 30.62 |
| | 20 | 0.680 \pm 0.056 * | 44.72 | 0.679 \pm 0.032 ** | 43.16 |

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

显抑制肝癌 7721 细胞与血管内皮细胞的黏附能力,当药物质量浓度为 2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其黏附抑制率分别为 10.38%、17.05%、30.62%、43.16% (表 1)。

3.5 南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞 MMP-2 表达的影响:流式细胞仪结果分析表明,南蛇藤总萜提取物能够下调肝癌 7721 细胞 MMP-2 蛋白的表达,与对照组相比,存在差异性 ($P < 0.05$)。当药物质量浓度为 2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,FI 值分别为 0.92、0.79、0.72、0.65,可见当药物质量浓度在不断增加时,其 FI 值也在逐步下降,与药物剂量呈一定的相关性 (表 2)。

3.6 南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞 VEGF 分泌的影响:ELISA 结果显示,南蛇藤总萜提取物作用于肝癌 7721 细胞 48 h 后,能够明显降低细胞上清中 VEGF 的量,与对照组相比,存在显著性差异 ($P < 0.05$)。随着药物质量浓度成倍数增加,VEGF 的量也在逐步的减少,与药物的剂量存在一定的量效关系。当药物质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,VEGF 的量最少可达到 336.8 pg/mL (表 2)。

表 2 南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞 MMP-2 蛋白表达和 VEGF 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of total terpenes extracted from *C. orbiculatus* on protein expression of MMP-2 and VEGF level in hepatoma 7721 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

| 组别 | / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | MMP-2 (FI 值) | VEGF/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) |
|--------------|--|--------------------|--|
| 对照 | - | 1.00 \pm 0.00 | 571.6 \pm 9.7 |
| 南蛇藤总萜 提取物 | 2.5 | 0.92 \pm 0.03 ** | 543.2 \pm 15.1 * |
| | 5 | 0.79 \pm 0.09 * | 437.6 \pm 11.4 ** |
| | 10 | 0.72 \pm 0.02 ** | 382.1 \pm 9.2 ** |
| | 20 | 0.65 \pm 0.03 ** | 336.8 \pm 13.9 ** |

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

近年来国内外研究表明,南蛇藤的有效成分可以通过细胞毒作用、诱导细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成等多种机制发挥抗肿瘤作用,对胃癌 SGC-7901、宫颈癌 HeLa、乳腺癌 MCF-7 和结肠癌 HCT-8 等多种肿瘤细胞均有抑制作用。细胞黏附贯穿于肿瘤转移的整个过程,对肿瘤的转移发挥着重要作用。恶性肿瘤细胞同质黏附性降低,瘤细胞从母体瘤上脱落下来,异质黏附是肿瘤细胞侵袭周围组织和侵入及穿出血管所必需的,然后通过血道、淋巴道和直接蔓延等方式向远端转移^[5]。自身黏附性降低是肿瘤细胞从母体瘤脱离的重要条件,异质黏附性增高是肿瘤转移的重要因素。

本实验采用 10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的南蛇藤总萜提取物作用肝癌 7721 细胞 24 h。结果表明,随着南蛇藤总萜提取物质量浓度的不断升高,对细胞生长的抑制作用也在逐步增强。而给予小剂量的药物作用肝癌 7721 细胞时,结果发现其可以抑制肝癌 7721 细胞异质黏附,并对同质黏附也有很好的促进作用。Matrigel 含有的层黏素是基膜和细胞外基质的主要成分,经南蛇藤总萜提取物作用后的肝癌 7721 细胞,随着药物质量浓度的不断增加,其对 Matrigel 黏附抑制率也在逐步升高,有明显的剂量依赖性。肿瘤细胞与血管内皮细胞锚定黏附是肿瘤器官转移的关键环节。肿瘤细胞与血管内皮细胞结合后,在细胞因子等作用下肿瘤和血管内皮细胞被激活,促进黏附分子在二者细胞表面表达,细胞间结合的更加紧密。在后续调节因子(基质金属蛋白酶和趋化因子)及整合素介导的信号转导途径作用下可促使内皮细胞收缩,肿瘤细胞运动或者跨静脉壁穿出^[6]。不同质量浓度的低剂量南蛇藤总萜提取物可以抑制肝癌 7721 细胞与血管内皮细胞黏附,当 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其最大黏附抑制率为 43.16%。研究表明^[7],无论是在体内还是体外,血管内皮因子 VEGF、白介素-8 (IL-8) 与基质金属蛋白酶若被明显抑制后,可减少肿瘤组织中新生血管的形成,减少肿瘤侵袭和转移的发生。南蛇藤总萜提取物可以降低肝癌 7721 细胞上清中 VEGF 的量和下调肝癌 7721 细胞 MMP-2 的表达,这可能是南蛇藤总萜提取物作用肝癌细胞后,影响到调控肿瘤侵袭转移相关基因的转录,进一步影响到肿瘤转移相关细胞因子 VEGF 和蛋白 MMP-2 的合成。

本研究证实了南蛇藤总萜提取物可以抑制肝癌 7721 细胞的增殖,促进肝癌 7721 细胞间同质黏附,

抑制异质黏附,能够降低肝癌 7721 细胞侵袭转移的能力,这可能与下调 VEGF 和 MMP-2 的表达有关,但其具体机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Chang F R, Hayashi K, Chen I H, *et al.* Antitumor agents. 228. five new agarofurans, reissantins A-E, and cytotoxic principles from *Reissantia buchananii* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(11): 1416-1419.
- [2] 张 舰, 王维明, 刘延庆, 等. 南蛇藤提取物体内抗肿瘤作用的实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(18): 1514-1516.
- [3] Shim H Y, Park J H, Paik H D, *et al.* Acacetin-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation [J]. *Mol Cells*, 2007, 24

(1): 95-104.

- [4] 郝 钰, 徐泊文, 吴 瑁, 等. 小檗碱对高转移性人巨细胞肺癌 PG 细胞黏附特性的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22(11): 1025-1031.
- [5] Tosetti F, Ferrari N, De Flora S, *et al.* Angioprevention: angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents [J]. *FAS EB*, 2002, 16(1): 2-14.
- [6] Orr F W, Wang H H, Lafrenie R M, *et al.* Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis [J]. *Pathology*, 2000, 190(3): 310-329.
- [7] Huang S, Robinson J B, Deguzman A, *et al.* Blockade of nuclear factor-kappa B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8 [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5334-5339.

菱角提取物诱导 HL-60 细胞凋亡的机制探讨

赵文静, 牛凤兰*

(吉林大学公共卫生学院, 吉林 长春 130021)

摘要:目的 探讨菱角提取物对人早幼粒细胞性白血病细胞株 HL-60 细胞增殖和凋亡的影响及凋亡的分子机制。方法 采用 MTT 法检测菱角提取物对 HL-60 细胞的增殖抑制作用;吖啶橙染色和 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡;流式细胞仪检测细胞凋亡率及线粒体膜电位的变化;比色法测定 Caspase-3、9 蛋白活性。结果 菱角提取物能抑制 HL-60 细胞的增殖,其作用呈明显的时间和剂量依赖性。菱角提取物可诱导 HL-60 细胞凋亡并显示一定的剂量依赖关系。与对照组比较,菱角提取物可明显降低 HL-60 细胞线粒体膜电位,上调 Caspase-3、9 蛋白活性。结论 菱角提取物可抑制 HL-60 细胞的增殖,其机制与降低线粒体膜电位、激活 Caspase-3、9 蛋白继而诱导 HL-60 细胞凋亡有关。

关键词:菱角; HL-60 细胞; 凋亡; 线粒体膜电位

中图分类号:R733.7 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)03-0437-04

菱角又称菱、菱实。近年来对菱角的抗肿瘤成分进行了广泛的研究,主要包括多糖、挥发油、酚类等成分,从菱角提取物中分离出抗肿瘤活性成分 3, 4, 5-三羟基苯甲酸二聚体^[1]。菱角提取物对人早幼粒细胞性白血病细胞株 HL-60 的抑制作用未见报道,为此本实验以 HL-60 细胞为研究对象,采用 MTT 比色法、DNA 琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术等方法,通过观察菱角提取物对 HL-60 细胞凋亡、线粒体膜电位、Caspase-3、9 蛋白活性影响,初步探讨菱角提取物诱导 HL-60 细胞凋亡的线粒体途径,为进一步研究菱角在抗肿瘤方面的功效提供一定的理论基础。

1 材料与方

1.1 材料:RPMI 1640 培养基购于 Gibco 公司;四甲基偶氮唑盐 (MTT)、罗丹明 123 (Rh123) 为 Sigma 公司产品;Caspase-3、9 分光光度法检测试剂盒购自南京凯基生物有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯;MK3 型酶标仪 (Labsystem, Helsinki, 芬兰);CK-18 倒置荧光显微镜 (Olympus, 日本);Epics 流式细胞仪 (Beckman, 美国)。新鲜菱角采集于吉林省大安县,经吉林农业大学樊绍钵教授鉴定为东北菱 *Trapa manshurica* Fler.。

1.2 药物提取:菱角晒干,取 500 g 菱皮,以 8 倍量水煎煮 3 h,定性滤纸滤过,保存滤液,残渣再重复煎煮 2 次,定性滤纸滤过。将 3 次所得滤液合并,减压滤过,浓缩至 600~700 mL,加 95% 乙醇,调整

* 收稿日期:2008-05-05

基金项目:长春市科技攻关项目 (2006319)

* 通讯作者 牛凤兰(1951—),女,吉林省长春市人,教授,博士生导师,研究方向为药食同用植物与健康研究。

E-mail: jiluniu@yahoo.com.cn