

## 苦参素对肝星状细胞 HSC-T6 增殖及端粒酶的影响

周于禄<sup>1</sup>, 刘小云<sup>2</sup>, 刘世坤<sup>1</sup>, 袁洪<sup>1\*</sup>

1. 中南大学湘雅三医院, 湖南 长沙 410013

2. 赣南医学院第一附属医院, 江西 赣州 341000

**摘要:**目的 探讨苦参素在诱导肝星状细胞 HSC-T6 凋亡过程中的作用, 以及对端粒酶及其亚单位端粒酶逆转录酶(rTERT) mRNA 表达的影响。方法 将不同质量浓度的苦参素与 HSC-T6 细胞共培养不同时间后, MTT 法检测苦参素对 HSC-T6 细胞的生长抑制作用; 流式细胞术检测苦参素对 HSC-T6 细胞凋亡的影响; TRAP-PAGE-银染法检测苦参素作用后 HSC-T6 细胞中端粒酶活性的改变; RT-PCR 检测苦参素对 HSC-T6 细胞 rTERT mRNA 表达的影响。结果 苦参素能显著抑制 HSC-T6 细胞生长、诱导细胞凋亡、降低端粒酶活性, 并抑制 rTERT mRNA 表达。结论 苦参素对 HSC-T6 细胞增殖具有抑制作用, 可能与抑制细胞端粒酶及其亚单位 rTERT 的活性有关。

**关键词:** 苦参素; 肝星状细胞; HSC-T6; 细胞凋亡; 端粒酶; 端粒酶逆转录酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)14-2051-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.14.018

## Effects of oxymatrine on proliferation of hepatic stellate cells HSC-T6 and expression of telomerase

ZHOU Yu-lu<sup>1</sup>, LIU Xiao-yun<sup>2</sup>, LIU Shi-kun<sup>1</sup>, YUAN Hong<sup>1</sup>

1. The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China

2. The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China

**Abstract: Objective** To investigate the induction effect of oxymatrine on the apoptosis process in rat hepatic stellate cell line HSC-T6 and to define its impact on telomerase activity and mRNA expression of subunit telomerase reverse transcriptase (rTERT). **Methods** HSC-T6 cells were cultivated with different concentration of oxymatrine for different time periods. Effect of oxymatrine on the growth inhibition of HSC-T6 cells was analyzed by MTT assay. Apoptosis of HSC-T6 cells was detected by flow cytometry. Telomerase activity was determined by TRAP-PAGE-silver staining and the expression of rTERT mRNA was examined by RT-PCR assay. **Results** Oxymatrine significantly suppressed the growth of HSC-T6 cells and induced apoptosis, and also reduced the activity of telomerase and inhibited the rTERT-mRNA expression in HSC-T6 cells. **Conclusion** The function that oxymatrine inhibits the proliferation of HSC-T6 cells may be associated with its action on the cellular telomerase and telomerase rTERT-mRNA activity.

**Key words:** oxymatrine; hepatic stellate cells; HSC-T6; apoptosis; telomerase; telomerase reverse transcriptase

苦参素(oxymatrine)是豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的生物碱提取物, 是苦参的主要药效成分, 其中含氧化苦参碱高达 98%, 以往研究证实, 苦参素具有调节免疫、抗炎、抑菌、抗心律失常、抗病毒、抗纤维化和抗肿瘤等多重功效<sup>[1-4]</sup>。目前关于苦参素治疗肝纤维化的研究较多, 但是对于其治疗肝纤维化的分子机制方面的研究还比较少。本课题组在前期工作的基础上, 选择肝星状细胞

HSC-T6 为研究模型, 探讨不同质量浓度的苦参素对肝星状细胞凋亡、端粒酶及其催化亚单位端粒酶逆转录酶(rTERT) mRNA 表达的影响, 以初步探讨苦参素抑制肝星状细胞生长的作用机制, 旨在为苦参素治疗肝纤维化提供新的理论依据。

### 1 材料

#### 1.1 药品及试剂

苦参素(含氧化苦参碱 98%)购自武汉圣天宇

收稿日期: 2014-03-24

基金项目: 湖南省卫生厅科研基金课题(132011-037)

作者简介: 周于禄(1972—), 男, 博士在读。E-mail: yulu0027@126.com

\*通信作者 袁洪 E-mail: zyltougao@126.com

科技有限公司, 噻唑蓝 (MTT)、硝酸银、焦碳酸二乙酯 (DEPC) 均购自美国 Sigma 公司; 丙烯酰胺、*N,N'*-亚甲基丙烯酰胺、四甲基乙二胺 (TEMED) 购自华美公司; RT-PCR 试剂盒购自 MBI Fermentas 公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 端粒酶活性检测试剂盒购自 Roche 公司; Annexin V-FITC Kit 购自 Gene Tech 公司。

## 1.2 细胞株

HSC-T6 为 SV40 转染 SD 大鼠肝星状细胞而成为活化的肝星状细胞, 购于中南大学湘雅中心实验室。

## 1.3 仪器

MCO—175 CO<sub>2</sub> 培养箱 (日本 Sanyo 公司), IX71 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), ABI9700 型 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司), XDS—1B 型倒置生物显微镜 (重庆光电仪器总公司), FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 Bectondickinson 公司), InGenius LHR 型凝胶成像分析系统 (英国 Syngene 公司), 酶标仪 (美国 Bio-TEK 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将 HSC-T6 细胞接种于含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养, 隔天换液, 待细胞生长至密度为 80%~90% 时, 开始传代。所有实验均采用对数生长期的细胞。

### 2.2 MTT 比色法检测细胞生长抑制率

HSC-T6 细胞经胰酶消化, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL 培养液含 2 000 个细胞, 培养 24 h 后弃培养液, 每孔加入终质量浓度分别为 2、4、6、8 mg/mL 的苦参素培养液 100 μL, 对照组不加药, 另设空白组 (只加培养液, 无细胞), 每组 8 个复孔, 重复 4 个批次, 分别于培养后的 24、48、72 h 加入 MTT (5 mg/L) 10 μL, 4 h 后加入 DMSO 150 μL/孔, 避光振荡摇匀, 以空白孔调零, 在酶标仪上检测 490 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 计算细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率} = 1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}$$

### 2.3 细胞凋亡的检测

取  $1 \times 10^8$  /L 的细胞悬液接种于 6 孔培养板, 每孔加细胞悬液 2.0 mL, 培养 24 h 后弃培养液, 加入终质量浓度分别为 2、4、8 mg/mL 的苦参素新鲜培养液 2.0 mL, 同时设不加药物的对照组, 培养 24、48 h 后收集细胞。采用 Annexin V-PI 双染色法检测细胞凋亡。用冷 PBS 洗涤细胞 (4 °C, 500 r/min

离心 5 min), 去除上清后用冷的结合缓冲液调整细胞数为  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$  /L。取此细胞悬液 100 μL, 加入 5 μL Annexin V-FITC 溶液和 2.5 μL 碘化丙啶 (PI) 溶液。于冰上避光孵育 10 min, 加入 150 μL 冷的结合缓冲液。1 h 内用流式细胞仪检测暴露在细胞表面的磷脂酰丝氨酸 (PS), 所有数据经 WinMDI 软件收集分析。

### 2.4 TRAP-PAGE 银染法检测端粒酶活性

细胞处理同“2.3”项, 收集细胞 ( $1 \times 10^8$  /L) 4 °C, 6 500 r/min 离心 5 min 以形成细胞团。去除上清液, 用 PBS 重悬细胞并重复离心步骤。加入 200 μL 裂解液重悬细胞小团, 冰上预冷并充分混匀, 于冰上孵育 30 min。4 °C, 15 000 r/min 离心 20 min, 将上清 (约 170 μL) 移至另一洁净的 Eppendorf 管中, -80 °C 保存备用或即用。取上述提取液 3 μL 加入 25 μL 扩增液, 用无菌三蒸水补足体积至 50 μL, 加 40 μL 灭菌石蜡油覆盖, 在 PCR 扩增仪上运行, 25 °C、30 min 引物延伸; 94 °C、5 min 端粒酶灭活; 扩增反应, 94 °C、30 s, 50 °C、30 s, 72 °C、90 s, 30 个循环, 72 °C 平衡 10 min。

取 PCR 反应产物 10 μL, 进行 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电压 180 V, 1 h 左右, 银染。当出现相隔 6 bp 的梯形条带即为端粒酶活性阳性。InGenius LHR 型凝胶成像分析系统分析, 用各泳道灰度减阴性对照的灰度后与对照组灰度的比值作为端粒酶活性的相对值。

### 2.5 RT-PCR 法检测端粒酶 rTERT mRNA 的表达

细胞处理同“2.3”项, 收集细胞, 抽提总 RNA: 用不含小牛血清的 DMEM 高糖培养液洗涤收集的 HSC-T6 细胞 2 次, 计数  $1 \times 10^6$  个细胞, Eppendorf 管离心沉淀后加 Trizol 试剂 1 μL, 抽提总 RNA。cDNA 链合成: 按逆转录试剂盒说明书操作。终体积 20 μL, 其中总 RNA 4 μL, 随机引物 1 μL, 5× 缓冲液 4 μL, 核糖核酸酶抑制剂 (RNasin) 1 μL, 10 mmol/L dNTP 2 μL, 逆转录酶 (ReverTra Ace) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL。PCR 扩增仪上运行, 30 °C、10 min, 42 °C、20 min, 99 °C、5 min; -20 °C 保存。扩增引物 rTERT (5'-GCTAAATCCCTCATTCTACT-3', 5'-TTCACCCTCCACATCAGTT-3') 和 GAPDH (5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3', 5'-GGATGTCACGTCACACTTCATG-3'), 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

PCR 反应体系终体积为 50 μL, 含 10× 缓冲液

5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  3  $\mu\text{L}$ , dNTPs 1  $\mu\text{L}$ , cDNA 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ), Taq 酶 2  $\mu\text{L}$ , 取 10  $\mu\text{L}$  扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳 (电压 8 V/cm, 电流 20 mA, 时间 30 min), 用 InGenius LHR 型凝胶成像分析系统分析, 将各泳道灰度减去阴性对照后与 GAPDH 条带灰度的比值作为 rTERT mRNA 的相对活性值。

### 2.6 统计学分析

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析, 先进行方差齐性检验, 如果方差齐性, 进行单因素方差分析 (ANVOA), 认为双侧  $P < 0.05$  为差异有统计学意义, 其中两两比较选用最小显著差异法 (LSD)。

## 3 结果

### 3.1 对 HSC-T6 细胞生长的抑制作用

不同质量浓度苦参素分别作用 HSC-T6 细胞

24、48、72 h, 以生长抑制率为纵坐标, 时间为横坐标绘制生长曲线, 结果作用 24、48、72 h 的直线回归方程分别为  $Y = 0.5656 - 0.0217X$  ( $r^2 = 0.9859$ )、 $Y = 0.8572 - 0.0409X$  ( $r^2 = 0.9898$ )、 $Y = 0.9532 - 0.0558X$  ( $r^2 = 0.9897$ )。随着苦参素质量浓度的增加, 细胞生长抑制率逐渐升高, 表明苦参素对 HSC-T6 细胞生长的抑制作用有显著的浓度依赖性。作用 24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 12.95、10.41、8.36 mg/mL, 结果见表 1。

### 3.2 对 HSC-T6 细胞凋亡的影响

终质量浓度为 2、4、8 mg/mL 的苦参素与 HSC-T6 细胞共培养 24 h 后, Annexin V-PI 双染色, 流式细胞术检测细胞凋亡。结果显示, 随着质量浓度的增加, 苦参素诱导 HSC-T6 细胞凋亡的作用呈上升趋势, 表明苦参素诱导 HSC-T6 细胞凋亡具有浓度依赖性, 结果见表 2。

表 1 苦参素对 HSC-T6 细胞生长的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 1 Inhibition of oxymatrine on growth of HSC-T6 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	24 h		48 h		72 h	
		A 值	抑制率 / %	A 值	抑制率 / %	A 值	抑制率 / %
对照	—	0.569 $\pm$ 0.090	—	0.863 $\pm$ 0.129	—	0.973 $\pm$ 0.114	—
苦参素	2	0.514 $\pm$ 0.019	9.67	0.757 $\pm$ 0.057*	12.28	0.813 $\pm$ 0.069*	16.44
	4	0.489 $\pm$ 0.018*	14.06	0.711 $\pm$ 0.055*	17.61	0.735 $\pm$ 0.057*	24.46
	6	0.427 $\pm$ 0.034*	24.96	0.609 $\pm$ 0.044*	29.43	0.616 $\pm$ 0.037*	36.69
	8	0.396 $\pm$ 0.072*	30.40	0.548 $\pm$ 0.056*	38.82	0.584 $\pm$ 0.085*	47.17

与对照组比较: \* $P < 0.05$ , 表 2 同

\* $P < 0.05$  vs control group, Table 2 is same

表 2 苦参素对 HSC-T6 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 2 Effect of oxymatrine on apoptosis of HSC-T6 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	存活细胞 / %	凋亡细胞 (早期 + 晚期) / %	死亡细胞 / %
对照	—	96.24 $\pm$ 6.24	1.87 $\pm$ 1.05	1.89 $\pm$ 1.12
苦参素	2	90.12 $\pm$ 5.36	7.31 $\pm$ 1.84*	2.57 $\pm$ 1.04
	4	82.34 $\pm$ 6.33	12.54 $\pm$ 2.01*	5.12 $\pm$ 1.22
	8	69.45 $\pm$ 4.68	22.48 $\pm$ 3.35*	8.07 $\pm$ 1.37

### 3.3 对 HSC-T6 细胞端粒酶活性的影响

不同质量浓度苦参素作用不同时间后, 随着苦参素质量浓度的增加和共培养时间的延长, 端粒酶活性的银染条带逐渐减弱。表明苦参素对 HSC-T6 细胞端粒酶活性的抑制作用与其作用质量浓度和时间有依赖关系, 结果见表 3。

表 3 苦参素对 HSC-T6 细胞端粒酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 3 Effect of oxymatrine on activity of telomerase in HSC-T6 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	端粒酶相对活性 / %	
		24 h	48 h
对照	—	96.24 $\pm$ 3.37	90.51 $\pm$ 5.31
苦参素	2	90.31 $\pm$ 6.82	81.34 $\pm$ 5.62**
	4	86.34 $\pm$ 3.51*	62.38 $\pm$ 4.39**
	8	66.84 $\pm$ 6.13*	50.37 $\pm$ 4.42**

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 24 h 比较: \*\* $P < 0.05$ , 表 4 同

\* $P < 0.05$  vs control group; \*\* $P < 0.05$  vs 24 h, Table 4 is same

### 3.4 对 HSC-T6 细胞 rTERT mRNA 表达的影响

凝胶成像可见 HSC-T6 细胞 rTERT mRNA 表达随苦参素质量浓度的升高及作用时间的延长而减弱 (图 1)。结果显示, 相同的作用时间, 4、6 mg/mL

苦参素作用细胞后, rTERT mRNA 的表达较对照组减弱 ( $P < 0.05$ ); 在相同质量浓度的苦参素作用下, 48 h 组的 rTERT mRNA 表达较 24 h 组减弱 ( $P < 0.05$ ); 表明苦参素对 HSC-T6 细胞 rTERT mRNA 表达的抑制作用呈浓度和时间依赖关系, 结果见表 4。

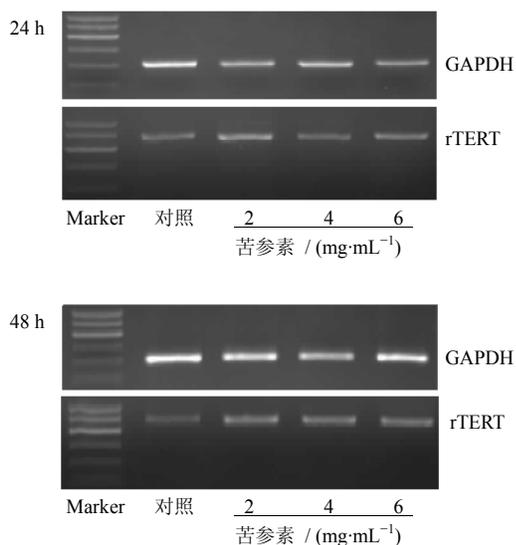


图 1 苦参素对 HSC-T6 细胞 rTERT mRNA 表达的影响  
Fig.1 Effect of oxymatrine on rTERT mRNA expression of HSC-T6 cells

表 4 苦参素对 HSC-T6 细胞 rTERT mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 4 Effect of oxymatrine on relative expression of rTERT mRNA in HSC-T6 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	$\rho /$ (mg·mL <sup>-1</sup> )	rTERT mRNA 相对表达量	
		24 h	48 h
对照	—	84.21 ± 12.33	71.65 ± 10.68
苦参素	2	82.45 ± 15.24	70.36 ± 9.67 <sup>#</sup>
	4	70.62 ± 10.49 <sup>*</sup>	59.87 ± 5.71 <sup>**</sup>
	8	52.69 ± 8.34 <sup>*</sup>	42.36 ± 3.68 <sup>**</sup>

#### 4 讨论

肝星状细胞 (HSCs) 数量占肝脏细胞总数的 15%, 是肝脏纤维化过程中合成细胞外基质 (ECM) 的主要细胞类型。在肝脏受到损伤后肝细胞通过产生过氧化脂质以及释放一系列细胞因子, 包括转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、血小板衍生因子 (PDGF) 等, 导致 HSC 被激活, 活化的 HSC (此时称为肌成纤维样细胞) 合成 ECM 增加, 并且成分也发生变化, 从以合成 I 型胶原为主变为以合成致密的、不易降解的 IV 型胶原为主, 从而导致 ECM 合成增

加, 降解减少, 沉积在肝组织中, 形成纤维化, 甚至发展为肝硬化<sup>[5-9]</sup>。本研究显示, 苦参素具有抑制 HSC-T6 细胞生长、诱导其凋亡的作用, 该作用与苦参素抗肝纤维化药理作用相符<sup>[10]</sup>。有研究表明苦参素可以通过激活肝星状细胞的 NGF/p75 通路, 下调核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 蛋白表达, 上调 Caspase-3 蛋白表达, 从而启动肝星状细胞的凋亡。

端粒的长度和端粒酶活性的调节对器官和组织的衰老、慢性疾病以及肿瘤的发生和进展起了关键作用。对肝脏而言, 端粒的缩短限制了慢性肝病中肝细胞的再生, 最终导致肝再生能力的耗竭和肝硬化及肝癌的形成。肝纤维化病变过程中, 肝细胞端粒缩短, HSCs 中的端粒却与之相反<sup>[11-12]</sup>。提示在肝纤维时 HSCs 端粒酶的活性较强。Schnabl 等<sup>[13]</sup>发现激活的 HSCs 转染 hTERT 后, 激活的 HSCs 会永生代, 并且持续保持激活的表型。这就表明抑制 HSCs 内端粒酶的活性就很可能抑制 HSCs 的激活或生长, 从而治疗肝纤维化。有研究发现, 苦参素可抑制 TGF- $\beta_1$  刺激的 HSC-T6 细胞内 p38MAPK 途径的激活, 明显降低 p38 磷酸化水平; 抑制 TGF- $\beta_1$  刺激的 HSC-T6 细胞内 T $\beta$ RI、Smad2、Smad3 蛋白的表达, 上调 Smad7 的表达。苦参素可以通过抑制 JAK/STAT 途径的激活, 降低炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达, 对抗败血症模型小鼠的肺损伤。在 CCl<sub>4</sub> 诱导的纤维化大鼠中, 苦参素可以抑制 Smad4 的表达, 抑制 Kuffer 细胞活化, 并抑制旁分泌对肝星状细胞的刺激<sup>[3,14]</sup>。本研究发现 HSC-T6 与苦参素随着培养的浓度的增加, 共培养时间的延长, 端粒酶活性的银染条带也逐渐减弱直至消失, HSC-T6 细胞端粒酶活性的抑制与苦参素的作用浓度和时间有依赖关系, 且苦参素对 HSC-T6 细胞 rTERT mRNA 表达的抑制作用呈浓度和时间依赖关系, 提示苦参素可作为一种有效的 HSC-T6 细胞端粒酶活性抑制剂, 提示苦参素可能通过抑制端粒酶活性及其亚单位 rTERT mRNA 表达并最终诱导 HSC-T6 细胞凋亡。

#### 参考文献

[1] 张鸣号, 王秀玉, 何沿虹. 氧化苦参碱对感染性休克大鼠心肌组织细胞因子的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2242-2246.  
[2] 缪永杰, 王君芬. 复方苦参注射液在晚期肿瘤患者联合化疗中的临床观察 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 449-451.

- [3] 邓子煜. 苦参素抗大鼠肝纤维化作用及其分子机制 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2009.
- [4] 冯国梁. 苦参素的治疗作用研究进展 [J]. 疾病监测与控制, 2010, 4(4): 210-211.
- [5] Gressner A M. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis [J]. *Kidney Int Suppl*, 1996, 54: S39-S45.
- [6] Faouzi S, Burckhardt B E, Hanson J C, *et al.* Anti-fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF kappa- $\beta$ -independence caspase-3-dependent pathway [J]. *Biol Chem*, 2001, 276(52): 49077-49082.
- [7] Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, *et al.* Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it [J]. *Mitochondrial*, 2006, 6(1): 1-28.
- [8] Zhao G, Zhang Z Q, Zhang B, *et al.* Down-regulation of tTG expression by RNAi inhibits HSC proliferation and attenuates liver fibrosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011, 112(1): 233-243.
- [9] Brunati A M, Tibaldi E, Carraro A, *et al.* Cross-talk between PDGF and S1P signalling elucidates the inhibitory effect and potential antifibrotic action of the immunomodulator FTY720 in activated HSC-cultures [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(3): 347-359.
- [10] 翁山耕, 胡雨云, 田雄英, 等. 苦参碱诱导大鼠肝星状细胞凋亡的体外研究 [J]. 福建医科大学学报, 2009, 43(6): 443-446.
- [11] Wiemann S U, Satyanarayana A, Tsahuridu M, *et al.* Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis [J]. *Faseb J*, 2002, 16(9): 935-942.
- [12] Autexier C, Lue N F. The structure and function of telomerase reverse transcriptase [J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 493-517.
- [13] Schnabl B, Choi Y H, Olsen J C, *et al.* Immortal activated human hepatic stellate cells generated by ectopic telomerase expression [J]. *Lab Invest*, 2002, 82(3): 323-333.
- [14] Hu Y Y. Pay attention to the study on active antiliver fibrosis components of Chinese herbal medicine [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(3): 1-5.