

竹叶提取物抗肿瘤和神经保护作用研究

高飞¹, 周瑜¹, 王向军¹, 李彤彤^{1,2}, 张宇¹, 黄瑜秋¹, 钱永常^{1*}

1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江, 杭州 311300

2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南, 昆明 650201

摘要: **目的** 研究竹叶提取物抑制肿瘤细胞增殖的活性及其分子生物学机制。**方法** 选取血管内皮生长因子(VEGF)诱导型肿瘤细胞人肝癌细胞 HepG2 和不诱导型肿瘤细胞人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 为模型,用不同质量浓度竹叶提取物处理 HepG2 和 SH-SY5Y 细胞。采用 MTT 法检测竹叶提取物对 2 种细胞增殖的抑制作用;采用 RT-PCR 法检测 VEGF 和血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)基因在 HepG2 和 SH-SY5Y 细胞中的表达差异以及竹叶提取物处理后 HepG2 细胞中 VEGF 基因表达的变化;用荧光倒置显微镜观察竹叶提取物处理后 SH-SY5Y 细胞神经突触的生长情况;采用 RT-PCR 法检测竹叶提取物处理后 SH-SY5Y 细胞中神经生长因子(NGF)表达的变化。**结果** 竹叶提取物对 HepG2 细胞增殖的抑制活性高于对 SH-SY5Y 细胞的增殖抑制作用。进一步研究发现 HepG2 细胞中 VEGF 和 VEGFR2 基因的表达显著高于 SH-SY5Y 细胞,且竹叶提取物可显著抑制 HepG2 细胞的 VEGF 表达。适当剂量的竹叶提取物可以刺激 SH-SY5Y 细胞神经突触的生长,并可上调其 NGF 的表达。**结论** 竹叶提取物可能通过抑制 VEGF 的表达影响 VEGF 诱导型肿瘤细胞的增殖,同时,可能通过上调 NGF 的表达刺激神经细胞神经突触的生长,竹叶提取物可能具有潜在的抗肿瘤和神经保护的双重功效。

关键词: 竹叶; 黄酮; 血管内皮生长因子; 神经生长因子; 抗肿瘤; 神经保护

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)05-0710-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.05.016

Study for anti-tumor and neuroprotection of extract from bamboo leaf

GAO Fei¹, ZHOU Yu¹, WANG Xiang-jun¹, LI Tong-tong^{1,2}, ZHANG Yu¹, HUANG Yu-qiu¹, QIAN Yong-chang¹

1. Nurturing Station for State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China

2. College of Agriculture and Bio-technology, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China

Abstract: Objective In this study, we selected two types of tumor cell lines, HepG2 (VEGF-dependent) and SH-SY5Y (VEGF-independent) to investigate the anti-tumor activity of flavones extract from bamboo leaf (bamboo-leaf flavones) and their molecular mechanism. **Methods** The bamboo-leaf flavones were used to treat HepG2 and SH-SY5Y cells. The activity of bamboo-leaf flavones in inhibition of the proliferation of HepG2 and SH-SY5Y cells was determined by MTT method. Gene expression of VEGF and VEGFR2 in HepG2 and SH-SY5Y cells was determined by RT-PCR method, so did gene expression of VEGF in HepG2 cells and NGF in SH-SY5Y cells after cells treated by bamboo-leaf flavones. Outgrowth of neurite in SH-SY5Y cells after treated by bamboo-leaf flavones was investigated by inverted fluorescence microscope. **Results** Data showed that bamboo-leaf flavones had a significantly higher inhibition to the proliferation of HepG2 cells than that of SH-SY5Y cells. We further observed that HepG2 cells expressed higher levels of VEGF and VEGFR2 cells than those of SH-SY5Y cells and bamboo-leaf flavones down-regulated VEGF expression in HepG2 cells. In addition, we also found bamboo-leaf flavones stimulate the neurite outgrowth in SH-SY5Y cells and up-regulated their NGF expression. **Conclusion** Bamboo-leaf flavones could inhibit the proliferation of VEGF-dependent tumor cells by the probable down-regulation of VEGF expression. Meanwhile, bamboo-leaf flavones could stimulate the neurite outgrowth of neurons by the probable up-regulation of the NGF expression. Therefore, bamboo-leaf flavones probably have the dual functions in anti-tumor and neuroprotection.

Key words: bamboo leaf; flavones; VEGF; NGF; antitumor; neuroprotection

恶性肿瘤是人类健康最严重的威胁之一,而当前的肿瘤治疗多存在特异性差、副作用大等问题。植物源黄酮类化合物是近年研究较多的天然抗肿瘤

活性物质,例如瑞香狼毒总黄酮、大豆异黄酮等具有体外杀死肿瘤细胞的细胞毒性。此外,从植物中筛选得到许多具有抗肿瘤活性的黄酮类化合物,如

收稿日期: 2014-07-22

基金项目: 浙江农林大学科研发展基金(2012FR017); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ14H280007)

作者简介: 高飞(1981—),男,主要从事天然产物中抗肿瘤活性因子的筛选工作。E-mail: gfei1981@live.com

*通信作者: 钱永常(1962—),男,主要从事神经细胞生物学、肿瘤细胞生物学及天然药物的研究。E-mail: qian3906@zafu.edu.cn

芹菜素、黄芩苷、橘皮素、黄芩素等,这些活性化合物均可以抑制肿瘤细胞和/或肿瘤组织的增殖^[1-4]。此外,研究还发现芹菜素、黄芩素、染料木黄酮等多种黄酮类物质的抗肿瘤机制都与调控血管内皮生长因子(VEGF)信号通路有关^[5-7]。竹叶提取物是从竹叶中提取得到的主要成分为黄酮类物质的天然植物制剂,前期研究发现竹叶提取物具有良好的抗自由基、抗氧化、抗衰老等功效^[8-11]。本实验选取毛金竹的竹叶提取物,通过研究其对不同类型肿瘤细胞增殖的抑制活性差异,来探究竹叶提取影响肿瘤细胞的关键基因,从而探讨竹叶提取物的抗肿瘤活性及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

竹叶为毛金竹 *Phyllostachys nigra* (Lodd. ex Lindl.) Munro var. *henonis* (Mitford) Stepf ex Rendle 的叶,竹叶提取物由浙江大学生物系统工程与食品科学学院张英教授惠赠,具体按照文献方法制备^[12],其中含总黄酮量为 28.4%。

1.2 仪器

MCO-18AIC 型细胞培养箱,购自日本三洋公司;DMI3000 型荧光倒置相差显微镜,购自美国徕卡公司;Agilent 1100 型高效液相色谱系统,购自美国安捷伦公司;ABI 2700 型 PCR 仪,购自美国 ABI 公司;ELIX3 型制水机,购自美国 Millipore 公司;MULTISKAN FC 型酶标仪,购自美国 Thermo 公司;生物凝胶成像系统,购自美国 Bio-rad 公司。

1.3 试剂

DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,青霉素和链霉素购自美国 Sigma 公司;MTT 细胞增殖检测试剂盒,购自生工生物工程(上海)有限公司;Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;cDNA 第一链合成试剂盒,购自 Tiangen 公司;Taq DNA 聚合酶,购自日本 TaKaRa 公司;引物由生工生物工程(上海)有限公司合成;色谱纯乙腈、甲醇购自西班牙 Scharlau 公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等常规分析纯试剂购自浙江常青化工有限公司。

1.4 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞和人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,均用添加 10%胎牛血清和 0.3%抗生素(青霉素-链霉素)的 DMEM 细胞培养基培养,放置于 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱,细胞每 2 天更

换 1 次培养基。

1.5 细胞毒性实验

将 HepG2 和 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔细胞培养板,细胞密度为每孔 1×10^4 个细胞。24 h 后分别加入终质量浓度为 0、0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的竹叶提取物,37 °C 条件下分别孵育 1、2、3、4 d。每 2 天更换 1 次细胞培养基,每次更换培养基时重新加入相应质量浓度的竹叶提取物。采用 MTT 法在酶标仪上测定每孔在波长 490 nm 处吸光度(A)值。每个处理设 4 个复孔,并处理 3 批细胞作为 3 次生物学重复。

1.6 突触生长刺激实验

将 SH-SY5Y 细胞接种于 24 孔细胞培养板,细胞密度为每孔 5×10^4 个细胞。37 °C 培养 24 h 后加入终质量浓度分别为 0、0.01、0.10、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 的竹叶提取物,处理后的 SH-SY5Y 细胞连续培养 4 d,每 2 天更换 1 次培养基,每次更换培养基时重新加入相应质量浓度的竹叶提取物。每 24 小时用荧光倒置相差显微镜观察细胞突触的生长情况 1 次,并拍照存档。每孔随机选取 40 条突触,用 Image J 软件量取突触长度,并记录。

1.7 对 HepG2 和 SH-SY5Y 细胞中 VEGF 和血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)表达的影响

将 HepG2 和 SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔细胞培养板,每孔 1×10^4 个细胞,24 h 后分别加入终质量浓度为 0、0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的竹叶提取物,置 37 °C 细胞培养箱孵育 24 h。然后弃去 6 孔板中的细胞培养基,每孔加入 1 mL Trizol 裂解处理后的 HepG2 细胞,Trizol 试剂法提取总 RNA。提取的 HepG2 细胞总 RNA 用反转录试剂盒反转录为 cDNA,反转录方法参考试剂盒说明书。合成的 cDNA 用于进行逆转录 PCR(RT-PCR),以人 β -actin 基因为内参基因。PCR 条件为 95 °C、3 min;95 °C、20 s,62.5 °C、20 s,72 °C、45 s,25 个循环;72 °C、3 min。各引物序列见表 1。

1.8 对 SH-SY5Y 细胞中神经生长因子(NGF)表达的影响

将 SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔细胞培养板,每孔 2×10^5 个细胞,24 h 后分别加入终质量浓度为 0、0.01、0.10、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 的竹叶提取物,置 37 °C 细胞培养箱孵育 24 h。然后弃去 6 孔板中的细胞培养基,每孔加入 1 mL Trizol 裂解处理后的 SH-SY5Y 细胞,Trizol 试剂法提取总 RNA。SH-SY5Y 细胞总

RNA 用反转录试剂盒反转录为 cDNA, 反转录方法参考试剂盒说明书。合成的 cDNA 用于进行 RT-PCR, 以人 β -actin 基因为内参基因。PCR 条件

为 95 °C、3 min; 95 °C、20 s, 61 °C、20 s, 72 °C、45 s, 25 个循环; 72 °C, 3 min。NGF 引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 所用的引物
Table 1 Primers used in RT-PCR

引物	引物序列	GeneBANK 登录号
VEGF-F	ATGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAAT	AB_021221
VEGF-R	TCACCGCCTCGGCTTGTCACA	
VEGFR2-F	GAATCCCTGCGAAGTACCTTGGT	NM_131385
VEGFR2-R	TTGAGTGGTGCCGTAAGTGGTAGG	
NGF-F	CCACACTGAGGTGCATAGCGTAAT	XM_002506
NGF-R	CCTCCTTGCCCTTGATGTCTGT	
β -actin-F	GCGTGACATTAAGGAGAAGCTGTG	NM_001101
β -actin-R	TCCACACGGAGTACTTGCGCT	

1.9 数据处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, RT-PCR 灰度值的测算由 Image J 软件完成, 测得值用 SPSS 17.0 软件的 One-way ANOVA 法分析不同组间数据间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 对 HepG2 和 SH-SY5Y 细胞增殖抑制作用

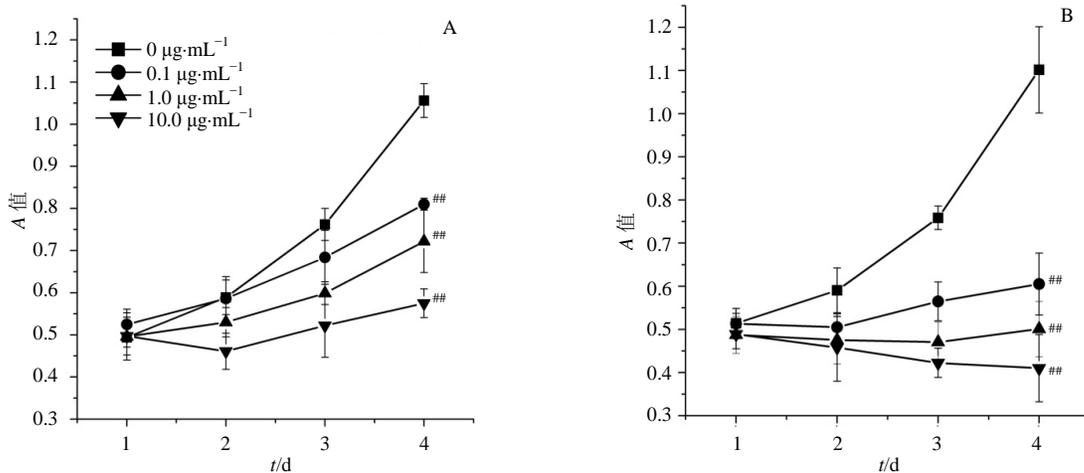
MTT 实验结果显示(图 1), 竹叶提取物对 HepG2 和 SH-SY5Y 细胞增殖均有抑制作用, 且竹叶提取物对 2 种细胞抑制作用均具有剂量效应。但抑制程度不同, 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用更强, 说明竹叶提取物对不同肿瘤细胞的抑制效果存在差异。

2.2 对 HepG2 和 SH-SY5Y 细胞中 VEGF 和 VEGFR2 表达的抑制作用

为研究竹叶提取物抑制 HepG2 和 SH-SY5Y 细

胞增殖活性差异的机制, 本实验检测了 VEGF 及其受体 VEGFR2 在 2 类细胞中的表达, 结果显示 VEGF 在 HepG2 细胞中的表达量约为其在 SH-SY5Y 细胞中表达量的 3 倍, 二者差异为极显著水平 ($P < 0.01$)。此外, HepG2 细胞中检测到了 VEGFR2 基因的表达, 而在 SH-SY5Y 细胞则几乎没有检测到表达(图 2)。

进一步对不同质量浓度竹叶提取物处理后 HepG2 细胞中 VEGF 基因的表达水平进行检测, 结果显示竹叶提取物极显著降低了 HepG2 细胞中 VEGF 基因的表达水平(图 3), 结果显示竹叶提取物对肿瘤细胞增殖的抑制作用可能与抑制 VEGF 的表达有关, 竹叶提取物可能通过抑制 VEGF 的表达抑制 VEGF 依赖型肿瘤细胞的增殖。



与竹叶提取物 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{##}P < 0.01$, 下同
 $^{##}P < 0.01$ vs bamboo-leaf extract 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, same as below

图 1 竹叶提取物对 SH-SY5Y (A) 和 HepG2 (B) 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Inhibition of bamboo-leaf flavones on proliferation of SH-SY5Y (A) and HepG2 (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

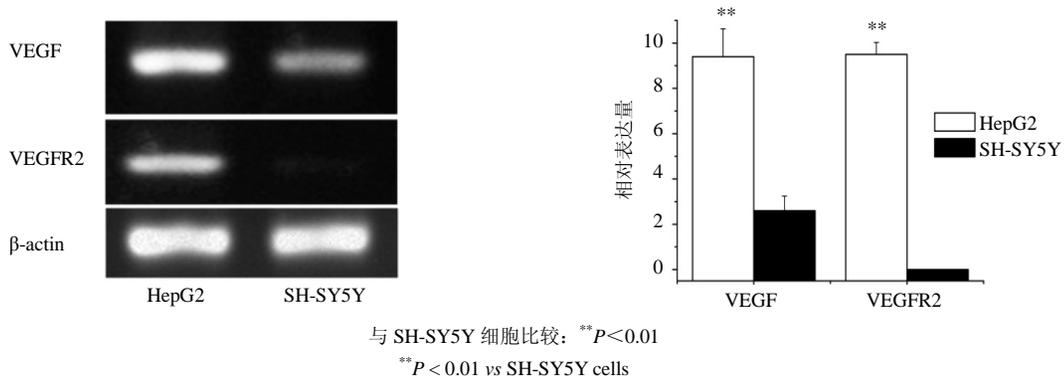


图2 VEGF和VEGFR2基因在HepG2和SH-SY5Y细胞中表达差异分析($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Difference analysis of VEGF and VEGFR2 expression in HepG2 and SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

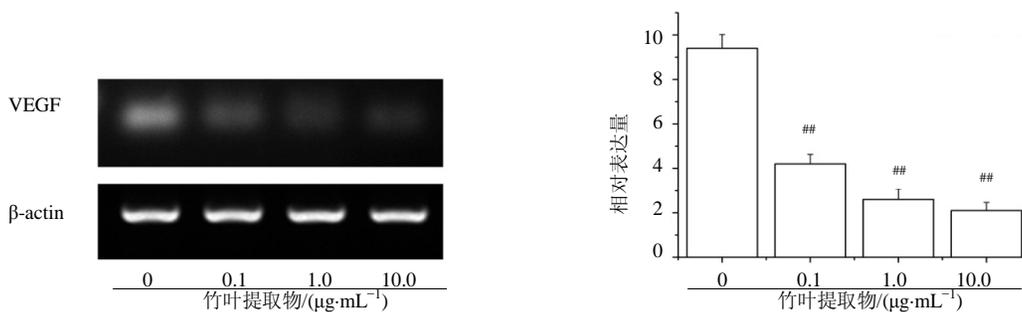


图3 竹叶提取物对HepG2细胞中VEGF基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of bamboo-leaf extract on VEGF expression in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 对SH-SY5Y细胞突触生长的影响

处理SH-SY5Y细胞时发现适当质量浓度的竹叶提取物可以刺激突触的生长,进一步研究观察到0.01~0.10 µg/mL的竹叶提取物可以显著地刺激SH-SY5Y细胞突触的生长,这种刺激也具有一定的剂量效应;但1.00 µg/mL的竹叶提取物没有显示出刺激效应,并且有抑制突触生长的趋势(图4)。

2.4 对SH-SY5Y细胞中NGF基因表达的影响

NGF是神经细胞中突触生长的刺激因子,为了研究竹叶提取物刺激SH-SY5Y细胞突触生长的机制,本实验对竹叶提取物处理后SH-SY5Y细胞中NGF基因的表达进行检测,结果显示,当终质量浓度为0.10 µg/mL时,竹叶提取物显著诱导SH-SY5Y细胞表达NGF(图5),说明竹叶提取物可能通过上调NGF基因的表达刺激了SH-SY5Y细胞的突触生长。

3 讨论

植物源天然物质的开发和利用对于解决当前医学领域难题,如药物副作用较高等具有重要的研究和应用价值。在肿瘤治疗方面,黄酮类物质是其

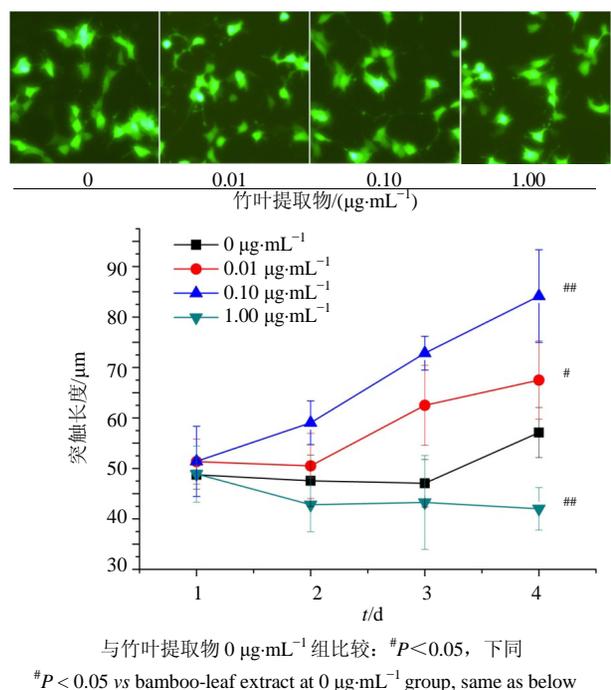


图4 竹叶提取物对SH-SY5Y细胞突触生长的刺激作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Stimulation of bamboo-leaf extract on neurite outgrowth of SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

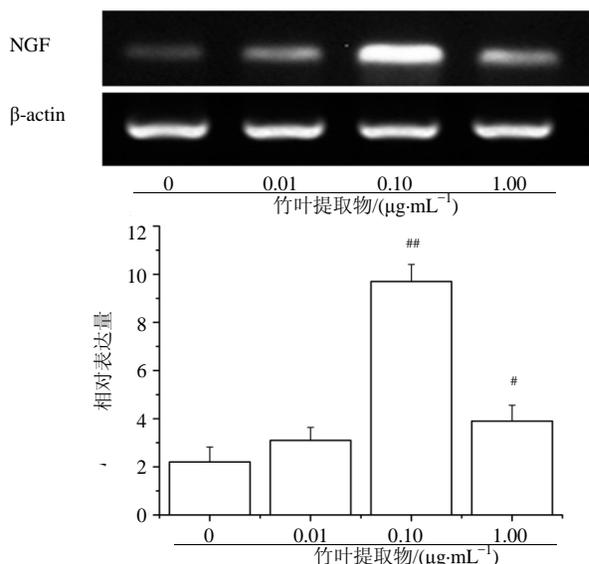


图 5 竹叶提取物对 SH-SY5Y 细胞 NGF 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of bamboo-leaf extract on expression of NGF in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

中最为引人注目的一类天然物质。本实验中使用的毛金竹竹叶提取物即是以黄酮类物质为主的天然活性物质，实验结果显示，竹叶提取物可以特异地通过作用于 VEGF 抑制 HepG2 细胞的增殖，因此是一种具有应用前景和巨大潜力的特异性抗肿瘤活性物质。

前期实验中，本课题组曾证明重组人 VEGF 蛋白可以诱导 HepG2 细胞的增殖，但是无法诱导 SH-SY5Y 细胞的增殖，因此推测 HepG2 和 SH-SY5Y 细胞增殖的机制并不相同，即 HepG2 细胞的增殖依赖于 VEGF 的作用。本实验结果证实竹叶提取物对 HepG2 和 SH-SY5Y 肿瘤细胞增殖的抑制效应并不相同，对 HepG2 的抑制效果显著地高于 SH-SY5Y。为进一步揭示这种差异产生的原因，本实验检测了 VEGF 在 2 种细胞中的表达，结果显示，VEGF 在 HepG2 细胞中的表达显著高于 SH-SY5Y 细胞，而 VEGF 的 2 种受体 VEGFR1 和 VEGFR2，只检测到 VEGFR2 在 HepG2 细胞中表达，VEGFR1 则在 2 种细胞中均不表达。并且竹叶提取物显著下调 HepG2 细胞中表达的 VEGF。这一结果说明竹叶提取物通过抑制 VEGF 的表达影响了 HepG2 细胞的增殖，并且提示 VEGF 是竹叶提取物抑制肿瘤细胞增殖的主要靶标基因。这与其他黄酮类物质通过调控 VEGF 信号通路抑制肿瘤的机制吻合^[5-7]。目

前还没有检测竹叶提取物对 VEGFR2 表达的影响。

本实验在用竹叶提取物处理 SH-SY5Y 细胞时发现一个值得注意的现象，即低剂量竹叶提取物可以一定程度刺激 SH-SY5Y 突触的生长。已有研究证明许多植物源黄酮类物质具有显著地神经保护作用，如槲皮素、银杏叶黄酮、甘草黄酮等具有显著的抗抑郁活性^[13-17]，同时植物源黄酮类物质还对神经系统的损伤具有修复作用^[18-19]。本实验中，在检测到竹叶提取物可以刺激 SH-SY5Y 细胞神经突触生长的基础上，进一步揭示了其分子生物学机制。研究了竹叶提取物对神经系统中的重要生长因子 NGF 的作用，结果显示竹叶提取物可以上调 NGF 的表达，并且竹叶提取物诱导神经突触生长和 NGF 表达的剂量完全一致。NGF 对中枢及外周神经系统的神经元生长发育、分化、再生均具有重要的调控作用，竹叶提取物诱导神经突触生长和 NGF 表达表明其在神经保护作用方面具有潜在的应用价值，值得深入研究。

参考文献

- [1] Chan L P, Chou T H, Ding H Y, *et al.* Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor-and Bcl-2-mediated pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(7): 1081-1091.
- [2] Chen W C, Kuo T H, Tzeng Y S, *et al.* Baicalin induces apoptosis in SW620 human colorectal carcinoma cells *in vitro* and suppresses tumor growth *in vivo* [J]. *Molecules*, 2012, 17(4): 3844-3857.
- [3] Song X, Yao J, Wang F, *et al.* Wogonin inhibits tumor angiogenesis via degradation of HIF-1 α protein [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 271(2): 144-155.
- [4] Yang M Y, Wang C J, Chen N F, *et al.* Luteolin enhances paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells by blocking STAT3 [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 213: 60-68.
- [5] Bhat T A, Nambiar D, Tailor D, *et al.* Acacetin inhibits *in vitro* and *in vivo* angiogenesis and downregulates Stat signaling and VEGF expression [J]. *Cancer Prev Res*, 2013, 6(10): 1128-1239.
- [6] Cheong J H, Hong S Y, Zheng Y, *et al.* Eupatilin inhibits gastric cancer cell growth by blocking STAT3-mediated VEGF expression [J]. *J Gastric Cancer*, 2011, 11(1): 16-22.
- [7] Liu L Z, Jing Y, Jiang L L, *et al.* Acacetin inhibits VEGF

- expression, tumor angiogenesis and growth through AKT/HIF-1 α pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413(2): 299-305.
- [8] Van Hoyweghen L, De Beer T, Deforce D, *et al.* Phenolic compounds and anti-oxidant capacity of twelve morphologically heterogeneous bamboo species [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23(5): 433-443.
- [9] Park H S, Lim J H, Kim H J, *et al.* Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis* [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(2): 161-166.
- [10] Wu D, Chen J, Lu B, *et al.* Application of near infrared spectroscopy for the rapid determination of antioxidant activity of bamboo leaf extract [J]. *Food Chem*, 2012, 135(4): 2147-2156.
- [11] Mantawy E M, El-Bakly W M, Esmat A, *et al.* Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 728: 107-118.
- [12] 张英. 竹叶提取物类 SOD 活性的邻苯三酚法测定 [J]. *食品科学*, 1997, 18(5): 47-49.
- [13] Han S, Lee J H, Kim C. Capillarisin inhibits iNOS, COX-2 expression, and proinflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264. 7 macrophages via the suppression of ERK, JNK, and NF-kappaB activation [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(1): 34-42.
- [14] Chang H C, Yang Y R, Wang P S, *et al.* Quercetin enhances exercise-mediated neuroprotective effects in brain ischemic rats [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2014, 46(10): 1908-1916.
- [15] 樊紫周, 赵伟鸿, 果嘉, 等. 甘草黄酮的抗抑郁作用及对海马脑神经区神经再生的保护作用 [J]. *药学报*, 2012, 47(12): 1612-1617.
- [16] Paladini A C, Marder M, Viola H, *et al.* Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51(5): 519-526.
- [17] 龚金炎, 吴晓琴, 毛建卫, 等. 黄酮类化合物抗抑郁作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 195-200.
- [18] Cai M, Phan P T, Hong J G, *et al.* The neuroprotective effect of eupatilin against ischemia/reperfusion-induced delayed neuronal damage in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 689(1/3): 104-110.
- [19] Kim H G, Ju M S, Ha S K, *et al.* Acacetin protects dopaminergic cells against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced neuroinflammation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(8): 1287-1294.