

· 药理 ·

华蟾素蟾毒配基类有效组分体内免疫效果分析

魏晓露, 杨健, 司南, 韩玲玉, 边宝林*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:通过观察华蟾素酯蟾毒配基类有效组分在体内对免疫相关细胞因子的影响,分析药物对机体免疫系统的调节作用,为阐明其免疫作用机制提供药理学和药效学依据。方法:体外培养人胰腺癌肿瘤细胞 AsPC-1,建立 AsPC-1 胰腺癌荷瘤裸鼠动物模型,待给药结束后,通过流式细胞术的高通量多因子检测技术对小鼠血清进行粒细胞巨噬细胞集落刺激生物因子(GM-CSF),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),干扰素- γ (IFN- γ),白细胞介素-1 α (IL-1 α),白细胞介素-2(IL-2),白细胞介素-4(IL-4),白细胞介素-5(IL-5),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-10(IL-10)检测,并用蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测组织中相应细胞因子的蛋白含量,评价其体内免疫效果。结果:酯蟾毒配基类有效组分体内作用 AsPC-1 胰腺癌荷瘤裸鼠免疫效果观察发现,与吉西他滨和华蟾素注射液比较,配基类组分能更多的增强细胞因子的表达。同时低剂量组对脾脏有一定的保护作用,高剂量组对脾脏的作用与华蟾素注射液和化疗药物吉西他滨相当。结论:华蟾素酯蟾毒配基类有效组分在体内能引起多种免疫相关细胞因子的分泌,增强机体的免疫功能,但具体的免疫作用机制还有待进一步研究。

[关键词] 荷瘤裸鼠; 体内实验; 华蟾素酯蟾毒配基; 免疫功能; 粒细胞巨噬细胞集落刺激生物因子; 肿瘤坏死因子- α ; 干扰素- γ ; 白细胞介素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0087-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210087

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0935.070.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 9:35

Effect of Bufadienolides on Immune Functions in Mouse *in Vivo*

WEI Xiao-lu, YANG Jian, SI Nan, HAN Ling-yu, BIAN Bao-lin*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe and the influence of bufadienolides on the immune-related cytokines *in vivo*, analyze the effect of drug on immune system regulation, and provide the pharmacological and pharmacodynamics evidences to clarify its immune mechanism. **Method:** After the AsPC-1 pancreatic cancer tumor cells were cultured *in vitro*, the animal models of AsPC-1 pancreatic cancer were established in nude mice. After administration for a certain time, flow cytometry with high throughput and multi-factor detection technology was used to detect the cytokines of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) in mice serum. Western blot assay was used to detect the protein content of corresponding cytokines in tissues, and its immune effect *in vivo* was evaluated. **Result:** In the observation of the drug's immune effect on pancreatic cancer tumor-bearing nude mice *in vivo*, as compared with gemcitabine and cinobufotalin injection, bufadienolides can enhance more cytokine expression. The low dosage group had protective effect on spleen while high dosage group achieved the same effect

[收稿日期] 20160412(008)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09102025)

[第一作者] 魏晓露, 博士, 助理研究员, 从事中药药理学研究, Tel:010-84041249, E-mail: xiaolu827@qq.com

[通讯作者] * 边宝林, 博士, 研究员, 从事中药化学及新药开发, Tel:010-64021008, E-mail: bian50101@sina.com

on spleen as gemectabine and cinobufotalin injection. **Conclusion:** Bufadienolides can lead to secretion of various immune-related cytokines, enhance the body's immune function, but the specific mechanism of immune function still needs further research.

[Key words] tumor-bearing nude mice; *in vivo*; bufadienolides; immunologic function; granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF); tumor necrosis factor- α (TNF- α); interferon- γ (IFN- γ); interleukin (IL)

华蟾素是蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍等阴干全皮经加工提取的水溶性制剂,是我国自行研制的二类新药,具有清热解毒、利水消肿、化痰溃坚等作用。对于热毒内蕴所致的中、晚期肿瘤和慢性乙型肝炎^[1-2],顽固性呃逆^[3-4]等均有良好疗效,被列为国家级中药保护品种。化学分析发现华蟾素注射液中主要含有蟾毒配基^[5]、蟾蜍色胺(生物碱)^[6]、核苷^[7]和多肽^[8]4 大类活性成分。蟾毒配基类成分是发挥抗肿瘤作用的有效物质,含量仅占成分的百万分之一^[9],对多种肿瘤细胞有着很强的杀伤作用。目前对华蟾素酯蟾毒配基类的实验研究主要集中在组分或其单体抗肿瘤研究方面,本课题组前期研究已证实华蟾素注射液可一定程度促进 B 淋巴细胞增殖,对机体免疫有明显增强作用^[10],并从体外观察华蟾素注射液中的酯蟾毒配基类成分对小鼠脾淋巴细胞分泌的多种免疫相关细胞因子的作用,发现该组分在体外也能促进 B 淋巴细胞增殖。本次实验将进一步以荷瘤裸鼠为研究对象,分析药物在小鼠体内对脾细胞及血清中免疫相关细胞因子的影响,从体内评价药物对机体的免疫作用,为蟾毒配基类有效组分的免疫促进机制提供更加全面的依据。

1 材料

1.1 细胞及动物 人胰腺癌 AsPC-1 细胞购自北京协和细胞资源中心。SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体重(20 \pm 2)g; SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠,5 周龄,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。

1.2 药品和试剂 华蟾素注射液(安徽金蟾生化股份有限公司,国药准字 Z34020274),含量以其主要成分吡啶生物碱为标量测定;华蟾素蟾毒配基类有效组分由本课题组提取并鉴定,使用前用培养液稀释至所需浓度;吉西他滨(江苏豪森药业股份有限公司,国药准字 H20030104)。二甲基亚砜(DMSO),台盼蓝染料(Sigma 公司,批号分别为 20150105,20141120);RPIM1640 完全细胞培养基,青霉素-链霉素溶液,Hank's 液(Hyclone 公司,批号

分别为 20141010,20140510,20140910);胎牛血清(FBS,Gibco 公司,批号 20140110);单去污剂裂解液(BioTNT 公司,批号 A20120A0101);AimPlex[®] Mouse Th1/Th2/Th17 10-plex 多因子检测试剂盒(北京旷博生物技术有限公司,批号 C280010);GM-CSF 鼠源抗体, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(Abcam 公司,批号分别为 20141210,20141208);肿瘤坏死因子(TNF)- α ,干扰素(IFN)- γ ,白细胞介素(IL)-1 α , IL-4, IL-6, IL-10 鼠源抗体及免疫印迹(Western blot)试剂盒(Cell Signaling 公司,批号分别为 a20141008, a20141101, a20141016, a20141006, a20140608, a20140801, 20140612)。

1.3 仪器 MCO-5AC 型 CO₂ 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司),MS3 数显型振荡器(德国 IKA 公司);ML104 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Safire2 型高速多通道连续波长酶标仪(奥地利 Tecan 公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);Mini Protean 3 型 SDS-PAGE 电泳设备,ChemiDoc MP 型 Western blot 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 急性毒性测定 预设(1,0.5,0.025,0.006 25 g \cdot kg⁻¹)4 个蟾毒配基类有效组分剂量组,按每 10 g 小鼠注射 0.1~0.2 mL 的药量对昆明种小鼠进行腹腔注射,于 2,4,24,48,72 h 连续观察并记录小鼠死亡情况,找出引起 0~100% 小鼠死亡的蟾毒配基类有效组分剂量,估计致死浓度。

取昆明种小鼠 60 只,随机分为 6 组,10 只/组。根据获得的蟾毒配基类有效组分剂量范围,按照等比级数增减,相邻两剂量比值 1:(0.6~0.9),设置(10,14,16,20,24,28 mg \cdot kg⁻¹)6 个剂量组和空白组,腹腔注射相关药物,空白组给以生理盐水。给药后连续观察 7 d,记录不同剂量组小鼠死亡情况,通过改良寇氏法公式计算获得蟾毒配基类有效组分的半数致死量(LD₅₀)。LD₅₀ = lg⁻¹[Xm - i(ΣP - 0.5)],Xm,最大剂量组剂量对数值;i,相邻两组剂量高剂量与低剂量之比的对数(相邻两组对数剂量

的差值); P , 各组动物死亡率; ΣP , 各组动物死亡率之总和。

2.2 模型建立 将 AsPC-1 胰腺癌细胞体外常规培养,待细胞生长至对数生长期后,稳定传代 2~3 次,收集细胞,台盼蓝染色计数细胞成活率 >95% 时,调整细胞密度至 5×10^6 个/mL,皮下接种于裸鼠右侧腋下,接种体积为 0.2 mL/只。连续观察肿瘤生长情况,待体内成瘤后进行体内瘤块传代,2~3 次后取肿瘤生长良好的荷瘤裸鼠,常规消毒后,处死裸鼠,剥离肿瘤,选取透亮肉色部分切成约 2 mm^3 小块,接种于裸鼠右侧腋皮下,待肿瘤长至 100 mm^3 以上时,将符合要求的荷瘤裸鼠留下备用。

2.3 免疫相关因子检测 按随机区组法将荷瘤裸鼠分为空白组、吉西他滨($37.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、华蟾素注射液($3.4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、蟾毒配基类有效低、高剂量($1, 2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,每组 6 只。随后腹腔注射给药,1 周 3 次,连续给药 4 周。于末次给药 24 h 后取出称体重,从眼眶取血,将收集到的小鼠血液于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置 1 h 后,取析出的上层血清,使用 AimPlex® 检测试剂盒,采用流式细胞术分析 TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 的变化。

2.4 免疫脏器检测 AsPC-1 胰腺癌荷瘤裸鼠分别注射酯蟾毒配基类有效组分低、高剂量($1, 2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),华蟾素注射液,吉西他滨,另设空白组,连续给药 4 周,实验结束时,小鼠称体重并取出脾脏称质量,计算脾系数,评价蟾毒配基类有效组分对小鼠脾脏的影响。

脾系数 = 脾脏平均质量(mg)/平均总体质量(g)

2.5 Western blot 检测裸鼠脾脏内细胞因子蛋白表达 取空白组、蟾毒配基类有效组分高、低剂量组小鼠脾脏,去除结缔组织后剪碎,加入单去污剂裂解液裂解 30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清,加入考马斯亮蓝溶液检测蛋白含量。取等量蛋白变性,采用 SDS-PAGE 的 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,取蛋白上样,电泳,转膜,封闭,洗膜,加入一抗(TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10 1:2 000; GM-CSF 1:1 000)反应 1.5 h,洗膜,加入二抗(1:5 000),室温孵育 1 h,洗膜,显色,显影成像。用 Image J 分析各样本蛋白条带,以目的蛋白/ β -actin 表示蛋白相对表达。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Boxplot 检验数据分布的离散程度,并结合整体数据情况剔除异常数据后,多组间比较采用 One-Way ANOVA,方差齐性用 LSD t -

test 分析方法进行组间比较,方差不齐用 Dunnett's T_3 分析方法,两组间比较采用非配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 酯蟾毒配基对小鼠急性毒性的影响 连续 7 d 观察小鼠的状况,给药后短时间内小鼠呼吸加快,呼吸幅度加大,后肢僵直,角弓反张,浑身抖动,剧烈挣扎,身体反应消失,10~15 min 后死亡,雌鼠对蟾毒配基类有效组分的耐受性略强于雄鼠,给药量在 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 以下时,小鼠无任何明显不适反应。见表 1。

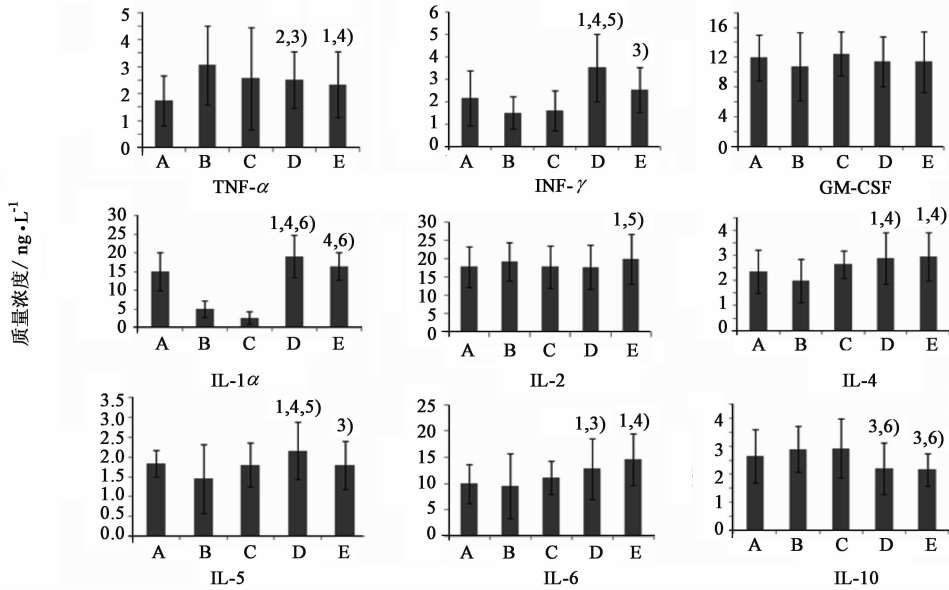
表 1 酯蟾毒配基对昆明种小鼠的急性毒性($n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	存活数/只	
		雄	雌
酯蟾毒配基	10	5	5
	14	4	5
	16	4	4
	20	2	3
	24	1	2
	28	0	0
空白	-	5	5

3.2 蟾毒配基类有效组分对胰腺癌荷瘤裸鼠血清中免疫相关因子的影响 与空白组比较,配基高、低剂量组的 TNF- α , INF- γ , IL-1 α , IL-4, IL-6 表达量升高, GM-CSF, IL-10 表达量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);配基高剂量组的 IL-2 和 IL-5 表达量升高,配基低剂量组 IL-2, IL-5 表达量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);华蟾素注射液组 TNF- α , GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-10 表达量有升高趋势, INF- γ , IL-1 α , IL-2, IL-5 表达量降低;吉西他滨组 TNF- α , IL-2 和 IL-10 的表达量有升高趋势, INF- γ , GM-CSF, IL-1 α , IL-4, IL-5, IL-6 表达量有降低趋势。见图 1。

3.3 蟾毒配基类有效组分对胰腺癌荷瘤裸鼠脾脏的影响 与空白组比较,配基高剂量组、吉西他滨组和华蟾素注射液组脾脏重及脾系数明显降低($P < 0.05$);与吉西他滨组比较,配基低剂量组脾系数明显升高($P < 0.05$),配基高剂量组和华蟾素注射液组无显著性差异。见表 2。

3.4 蟾毒配基类有效组分对脾脏中相关细胞因子蛋白的影响 与空白组比较,蟾毒配基类有效组分高低剂量组能促进 TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-4, IL-6 蛋白在脾脏中的表达,抑制 GM-CSF 和 IL-10 蛋白的表达,促进或抑制的表达与浓度呈一定关系,但无统计学意义。见表 3,图 2。



A. 空白组; B. 吉西他滨 (37.1 mg·kg⁻¹) 组; C. 华蟾素注射液 (3.4 mL·kg⁻¹) 组; D. 酯蟾毒配基 (1 mg·kg⁻¹) 组; E. 酯蟾毒配基 (2 mg·kg⁻¹) 组。与空白组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与吉西他滨组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01; 与华蟾素注射液组比较⁵⁾ P < 0.05, ⁶⁾ P < 0.01

图 1 酯蟾毒配基对荷瘤裸鼠血清中免疫相关因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 1 Effect of bufadienolides on immune-related factors in serum of nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2 酯蟾毒配基对 AsPC-1 胰腺癌荷瘤裸鼠脾脏的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of bufadienolides on spleen of nude mice with AsPC-1 pancreatic cancer ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	体重/g	脾脏重/g	脾系数
空白	-	18.3 ± 2.0	0.112 ± 0.016	6.1 ± 1.2
酯蟾毒配基	1 mg·kg ⁻¹	20.9 ± 1.7	0.141 ± 0.032	6.7 ± 1.6 ²⁾
	2 mg·kg ⁻¹	17.5 ± 1.9	0.077 ± 0.022 ¹⁾	4.4 ± 1.5 ¹⁾
吉西他滨	37.1 mg·kg ⁻¹	15.8 ± 1.8	0.065 ± 0.018 ¹⁾	4.1 ± 0.9 ¹⁾
华蟾素注射液	3.4 mL·kg ⁻¹	16.1 ± 1.2	0.068 ± 0.026 ¹⁾	4.2 ± 1.2 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ P < 0.05; 与吉西他滨组比较²⁾ P < 0.05。

表 3 酯蟾毒配基对多个细胞因子蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of bufadienolides on protein expression of multiple cytokines ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

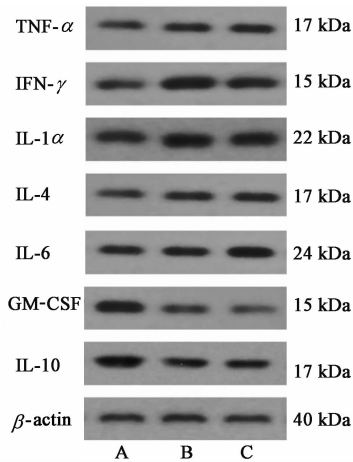
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF-α/β-actin	INF-γ/β-actin	IL-1α/β-actin	IL-4/β-actin	IL-6/β-actin	GM-CSF/β-actin	IL-10/β-actin
空白	-	0.51 ± 0.02	0.64 ± 0.05	1.02 ± 0.09	0.68 ± 0.04	0.88 ± 0.05	1.79 ± 0.11	1.81 ± 0.13
酯蟾毒配基	1	0.95 ± 0.05	1.96 ± 0.15	1.94 ± 0.16	0.93 ± 0.06	1.14 ± 0.08	0.42 ± 0.04	0.97 ± 0.07
	2	1.19 ± 0.08	1.75 ± 0.11	1.69 ± 0.12	1.05 ± 0.08	1.35 ± 0.12	0.26 ± 0.02	0.73 ± 0.08

4 讨论

华蟾素是目前临床上较常用的一种抗肿瘤中药制剂,临床应用及基础实验研究证实华蟾素及其含有的活性成分对人多种肿瘤细胞有不同程度的抑制增殖、诱导分化、促进细胞凋亡及提高机体免疫水平等作用^[11]。华蟾素来源于蟾蜍干皮,存在有效活性成分不明确,无固定的质量标准等问题。临床应用中发现华蟾素注射液中某些成分的药理作用及在体内引起的超敏反应,会引起患者不同程度的不良

反应^[12-14]。引起这些不良反应的主要成分是其的吡啶类生物碱水溶性成分,对血管壁刺激性强,引发疼痛,引起血管收缩^[15]。而活性成分中含量很低的蟾毒配基类成分则对多种肿瘤细胞有着很强的杀伤作用。目前对其的研究也主要集中在抗肿瘤方面,对提高机体免疫的研究较少。

TNF-α 能直接抑制或杀伤肿瘤细胞,还具有激活巨噬细胞和中性粒细胞功能以及促进抗原活化 T, B 淋巴细胞增殖、分化等作用,促进单核巨噬细胞



A. 空白组; B. 酯蟾毒配基低剂量组; C. 酯蟾毒配基高剂量组

图 2 酯蟾毒配基对荷瘤裸鼠脾脏中相关因子蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of bufadienolides on protein expression of related factors in spleen of tumor-bearing nude mice

及其他细胞产生细胞因子 IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α , 发挥重要的免疫调节作用^[16]。GM-CSF 可作用于造血干细胞, 促进其分化增殖, 还能刺激多能干细胞和早期红细胞的增殖和分化。IFN- γ 又称为 II 型干扰素或免疫干扰素^[17], 可诱导细胞因子的产生, 上调 Fc 受体和白血细胞黏附因子等的表达, 通过与其特异性的细胞表面受体高亲和力地结合, 发挥生物学活性, 诱导巨噬细胞及 B 细胞的抗原呈递能力, 活化 NK 细胞, 提高其杀伤能力^[18-19]。IL-1 α 可协同刺激抗原提呈细胞 (APC) 和 T 细胞活化, 促进 B 细胞增殖和分泌抗体。IL-4 可促进 B 细胞增殖分化, 诱导免疫球蛋白 (Ig) G₁ 和 IgE 产生, 促进 Th0 细胞向 Th2 细胞分化, 抑制 Th1 细胞活化及分泌细胞因子, 协同 IL-3 刺激肥大细胞增殖等。IL-6 在神经、造血系统及机体应激反应中发挥作用, 其调控失常与多种炎症及自身免疫疾病有关, 在免疫调节中的主要作用是刺激 T 细胞增殖和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活化, 刺激 B 细胞生长、分化和分泌免疫球蛋白^[20]。IL-10 是抗炎因子, 多个免疫反应的重要调节器, 能够限制白细胞浸润、炎症和皮肤病如接触性皮炎等, 又称为细胞因子合成抑制因子, 能够抑制很多促炎细胞因子、趋化因子及其受体的表达, 促进其他抗炎因子分泌, 近年来发现其能够降低动脉粥样硬化形成的危险因子, 抑制 T 细胞合成 IL-2, IFN- γ 等细胞因子, 促进 B 细胞分化增殖^[21]。

本实验从体内评价酯蟾毒配基类有效组分作用胰腺癌荷瘤裸鼠后的免疫效果。通过流式细胞仪细胞多因子检测发现酯蟾毒配基类有效组分能提高 TNF- α , INF- γ , IL-1 α , IL-4, IL-6 并抑制 GM-CSF 和

IL-10 的表达, 对 IL-2 和 IL-5 的表达则受到蟾毒配基类有效组分浓度的影响。通过对小鼠脾脏中相关细胞因子蛋白的表达也验证了蟾毒配基类有效组分在体内对 TNF- α , INF- γ , IL-1 α , IL-4 和 IL-6 蛋白表达的促进作用和对 GM-CSF 和 IL-10 蛋白表达的抑制作用。与吉西他滨和华蟾素注射液比较, 配基类组分能更多的增强免疫相关细胞因子的表达。对小鼠脾脏观察发现, 配基低剂量组对脾脏有一定的保护作用, 而高剂量组对脾脏的作用与华蟾素注射液和吉西他滨相当。从体内评价酯蟾毒配基类对荷瘤裸鼠免疫效果, 低剂量组较高剂量组对脾脏有一定保护作用, 但高剂量组的免疫增强作用更明显, 可增强 Th1 和 Th2 相关细胞因子的表达, 促进细胞免疫和体液免疫, 但对 IL-10 和 GM-CSF 的抑制可能对炎症反应有部分影响, 需要更深入的探讨。本研究从宏观角度观察蟾毒配基类有效组分对多种免疫相关细胞因子的影响, 由于各种细胞因子间的相互作用较复杂, 对免疫系统的影响也多样, 还无法绘制出蟾毒配基类有效组分在体内外对机体免疫作用的通路。在后续的研究中, 本课题组将以引起细胞免疫或体液免疫发生重要变化的细胞因子为研究目标, 分析蟾毒配基类有效组分对这些细胞因子的作用, 从免疫机制的角度更加细致的研究, 以期能得到酯蟾毒配基类有效组分对机体免疫机制的影响。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 临床用药须知: 中药卷[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 61.
- [2] 柳青, 雷招宝. 华蟾素注射液的不良反应用与合理用药[J]. 中成药, 2012, 34(7): 1409-1411.
- [3] Meng Z, Yang P, Shen Y, et al. Pilot study of Huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, nonsmall-cell lung cancer, or pancreatic cancer [J]. Cancer, 2009, 115(22): 5309-5318.
- [4] 朱晓燕, 孟志强, 陈震, 等. 华蟾素不同组份对荷人胰腺癌 SW1990 裸小鼠的抑瘤作用[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(11): 69-71.
- [5] 曹徐涛, 王东, 王娜, 等. 蟾皮中蟾毒配基类成分的分 离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(10): 778-781.
- [6] 王伟. 注射用蟾皮总碱抗肿瘤有效性和安全性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [7] Zhao H, Wu X, Wang H, et al. Qualitative and quantitative analysis of cinobufacini injection using rapid separation liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and hplc - photodiode array detection, a feasible strategy for the

- quality control of chinese medicine injections [J]. J Separation Sci, 2013, 36(3):492-502.
- [8] 吴旭,高波,杨健,等. 华蟾素注射液多肽成分体外抗肿瘤活性研究[J]. 药学学报, 2012, 47(6):822-826.
- [9] 杨立新,赵海誉,袁圣芬,等. 华蟾素注射液中总蟾毒配基类成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6):87-89.
- [10] 张延京,魏晓露,贺晶,等. 华蟾素注射液体外对小鼠脾淋巴细胞功能影响的研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(23):1921-1925.
- [11] 牛凯,成宇晶. 华蟾素对人肝癌细胞 Bel-7402 细胞增殖及周期的影响[J]. 山西中医, 2013, 29(3):47-49.
- [12] 杨银盛,何明. 华蟾素注射液的不良反应研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2011, 30(23):111-112.
- [13] 刘斌. 华蟾素注射液致不良反应 252 例文献分析[J]. 中国药房, 2011, 22(12):1096-1098.
- [14] 程民. 272 例华蟾素注射液不良反应/事件分析[J]. 中国药业, 2013, 22(16):71-72.
- [15] 夏方,冷春青,付运星,等. 中药地翁颗粒对小鼠脾淋巴细胞功能的影响[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(8):1341-1344.
- [16] 朱科学,聂少平,李文娟,等. 黑灵芝多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱导细胞因子的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(19):351-354.
- [17] Inoue S, Niikur A M, Mineo S, et al. Roles of IFN- γ and $\gamma\delta$ T cells in protective immunity against blood-stage malaria[J]. Fro Immunol, 2013, 4:258.
- [18] 杨巧丽,顾政一,黄华,等. 金蒿抗流感滴丸对小鼠 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 等细胞因子的影响[J]. 石河子大学学报:自然科学版, 2012, 30(1):56-59.
- [19] Vonarbourg C, Mortha A, Bui V L, et al. Regulated expression of nuclear receptor ROR [γ] confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR [γ] innate lymphocytes[J]. Immunity, 2010, 33(5):736-751.
- [20] 于海荣,王济兴,陈建双,等. 穿山龙总皂苷含药血清对小鼠脾淋巴细胞增殖及 IL-6 产生影响的实验研究[J]. 江苏中医药, 2007, 39(1):57-58.
- [21] Kusters P J, Lutgens E. Cytokines and immune responses in murine atherosclerosis [J]. Methods Mol Biol, 2015, doi:10. 1007/978-1-4939-2929-0_2.

[责任编辑 张丰丰]

《中国实验方剂学杂志》简介

《中国实验方剂学杂志》主编为吴以岭院士,由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中华中医药学会共同主办。以报道、介绍中医药研究为主旨的专业性学术期刊,创刊于1995年10月,目前为半月刊。

随着中医药政策扶持力度的加大和中医药科技创新的振兴,在中医药事业蓬勃发展的进程中,《中国实验方剂学杂志》也进入快速发展阶段! 以下是本刊在各权威数据库中的最新评价数据及收录情况:

①中国知网《中国学术期刊影响年报》(2016年版):影响力指数(CI)学科排序3/122(中医药类122本期刊中排第3名);复合影响因子1.319,学科排序9/122;

②万方数据《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》: H 指标为16,总被引频次15664,复合影响因子1.620,在中医药类122本期刊中排序分别为第2,2,11名;

③入选“中国科学引文数据库来源期刊”(CSCD 2015—2016);

④入选最新版《北大中文核心期刊要目总览》(2014年版);

⑤入选“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊2016年版);

⑥入选“RCCSE 中国核心学术期刊”(2015—2016)。