

# 南蛇藤乙酸乙酯提取物通过活化caspase依赖的线粒体通路诱导HepG2细胞凋亡

熊熙, 张馨, 李平, 汪茂荣 (南京中医药大学附属八一医院 全军肝病中心, 南京 210002)

**摘要:** 目的 通过检测南蛇藤乙酸乙酯提取物在诱导肝癌细胞HepG2凋亡过程中产生的凋亡蛋白表达量探讨其凋亡途径。方法 应用Annexin V-FITC与碘化丙啶(promide iodine, PI)双染色法,通过流式细胞技术检测不同浓度(15  $\mu\text{g/ml}$ 、30  $\mu\text{g/ml}$ 、60  $\mu\text{g/ml}$ 、120  $\mu\text{g/ml}$ 和240  $\mu\text{g/ml}$ 南蛇藤乙酸乙酯提取物)干预HepG2细胞24小时后的细胞凋亡情况;应用蛋白质印迹法检测不同浓度(30  $\mu\text{g/ml}$ 、60  $\mu\text{g/ml}$ 及120  $\mu\text{g/ml}$ )南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞24小时及60  $\mu\text{g/ml}$ 和120  $\mu\text{g/ml}$ 南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞48小时后细胞中细胞色素c、裂解的胱冬蛋白原9(cleaved caspase-9)和胱冬蛋白酶3(caspase-3)的表达。结果 当南蛇藤乙酸乙酯提取物浓度为15  $\mu\text{g/ml}$ 、30  $\mu\text{g/ml}$ 和60  $\mu\text{g/ml}$ 时,可诱导HepG2细胞出现细胞凋亡,且细胞色素c、裂解的胱冬蛋白原9和caspase-3的表达量增加;随南蛇藤提取物浓度的增加(30  $\mu\text{g/ml}$ 、60  $\mu\text{g/ml}$ 及120  $\mu\text{g/ml}$ ),蛋白表达亦增强。结论 南蛇藤乙酸乙酯提取物可能是通过促使膜间蛋白细胞色素c表达和释放活化caspase-9与caspase-3而诱导HepG2细胞的凋亡。

**关键词:** 南蛇藤; HepG2细胞; 细胞凋亡; caspase-3; 细胞色素c

## Apoptosis induction of HepG2 cells by Acetoacetate extractive of *Celastrus orbiculatus* Thunb. via activating caspase-dependent mitochondrial pathway

XIONG Xi, ZHANG Xin, LI Ping, WANG Mao-rong (Liver Diseases Center of PLA, Bayi Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210002, China)

**Abstract: Objective** To investigate the molecular mechanisms of acetoacetate extractive of *Celastrus orbiculatus* Thunb. inducing the apoptosis of HepG2 cells via detecting the expression of apoptosis proteins.

**Methods** The apoptosis rates of HepG2 cells intervened by different concentrations of acetoacetate extractive of *Celastrus orbiculatus* Thunb. (15  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$ , 60  $\mu\text{g/ml}$ , 120  $\mu\text{g/ml}$  and 240  $\mu\text{g/ml}$ ) at 12 hours were detected by flow cytometry. The expression of Cytochrome-c, caspase 3 and cleaved caspase-9 after intervened by different concentrations of acetoacetate extractive of *Celastrus orbiculatus* Thunb. (30  $\mu\text{g/ml}$ , 60  $\mu\text{g/ml}$  and 120  $\mu\text{g/ml}$  at 12 hours and 60  $\mu\text{g/ml}$  and 120  $\mu\text{g/ml}$  at 48 hours) were detected by Western blot. **Results** The acetoacetate extractive of *Celastrus orbiculatus* Thunb. (15  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$  and 60  $\mu\text{g/ml}$ ) induced the apoptosis of HepG2 cells, and facilitated the expression of apoptotic proteins such as Cytochrome-c, cleaved caspase-9 and caspase-3. With the increased concentration of acetoacetate extractive of *Celastrus orbiculatus* Thunb., the expression levels of apoptotic proteins improved. **Conclusion** The mechanism of the acetoacetate extractive of *Celastrus orbiculatus* Thunb. inducing the apoptosis of HepG2 cells may be the activation of the mitochondrial apoptotic pathway: leading to the release of mitochondrial mediators such as Cytochrome-c, cleaved caspase-9 and caspase-3.

**Key words:** *Celastrus orbiculatus* Thunb.; HepG2 cells; Apoptosis; caspase 3; Cytochrome-c

南蛇藤(*Celastrus orbiculatus* Thunb.)为卫矛科南蛇藤属植物,其藤茎、根、叶和果均可入药<sup>[1]</sup>。

该药始载于清代《植物名实图考》,药性辛温、有小毒,可祛风、活血、解毒和消肿。现代药物化学研究证实,南蛇藤具有抗肿瘤、抗炎、镇痛及抗菌等广泛的药理活性<sup>[2]</sup>。目前针对南蛇藤抗癌活性及机制的研究相对较少<sup>[3-8]</sup>,对南蛇藤诱导肿瘤细胞凋

DOI: 10.3969/issn.1674-7380.2016.04.012

基金项目: 2006年南京军区“122工程”学术带头人培养基金(122G20060108)

通讯作者: 汪茂荣 E-mail: maorongwang@gmail.com

亡及其途径的研究尚不充分<sup>[9-11]</sup>。为此,本研究旨在探寻南蛇藤乙酸乙酯提取物在体外诱导肝癌细胞凋亡的途径,拟从分子水平初步探讨其抗肝癌作用的可能机制,为研究开发南蛇藤抗肿瘤资源提供一定的理论依据。

## 1 材料及方法

**1.1 主要试剂及仪器** CO<sub>2</sub>培养箱(美国NAPCO公司);超净工作台(苏州安泰公司);MDF-1155ATN超低温冰箱(美国Revco公司);台式水平离心机(安徽科大创新公司);低温离心机(德国Eppendorf公司);FACSTAR流式细胞仪(美国Becton-Dickinson公司);凝胶电泳槽(美国Bio-rad公司)。南蛇藤乙酸乙酯提取物由扬州大学刘延庆教授惠赠;HepG2细胞购自中国科学院上海细胞研究所;DMEM高糖液体培养基(美国HyClon公司);胎牛血清(美国ExCell公司);Alexa®Fluor 488 annexin V-PI试剂盒(美国Invitrogen公司);BCA蛋白定量试剂盒(美国Pierce公司);caspase 3等相关抗体(美国CST公司)。

**1.2 南蛇藤乙酸乙酯提取物的配制** 将南蛇藤5 kg切断粉碎成粉,烘干,95%乙醇加热回流提取3次,旋转蒸发仪回收溶剂,得到浸膏后拌入硅藻土,真空低温抽干,干燥后装入抽滤漏斗,按极性依次用乙酸乙酯和正丁醇分别洗脱至无色,回收溶剂后得两个组分浸膏。分别取浸膏适量,用生理盐水配成所需浓度,溶解后抽滤除杂除菌<sup>[12,13]</sup>。脂溶物用DMSO助溶,其最终浓度<0.05%,在此浓度下DMSO对细胞的生长无影响<sup>[14]</sup>。

南蛇藤乙酸乙酯提取物先用DMSO溶解(摇床过夜)。将2.4 g南蛇藤乙酸乙酯提取物加入5 ml含有0.25 ml DMSO的培养液中,配成浓度为480 mg/ml的液体,然后稀释100倍(4800 µg/ml),再依次稀释成2400 µg/ml、1200 µg/ml、600 µg/ml、300 µg/ml及150 µg/ml的原液,使用时加入培养液的量依次稀释10倍。

**1.3 细胞系培养** 将HepG2细胞加入含10%胎牛血清的DMEM(含100 U/ml的青霉素和100 U/ml的链霉素)培养液中,在37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,按1:3的比例2天传代1次。所有实验均在细胞对数生长期进行。

**1.4 南蛇藤乙酸乙酯提取物干预HepG2细胞** 将5 × 10<sup>6</sup>个正常对数生长期的HepG2细胞接种于25 cm<sup>2</sup>的培养瓶中,每瓶加入含有10%胎牛血清的培养液5 ml,放入37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24小时,更换新鲜培养液后给予南蛇藤干预,保持干预浓度

分别为240 µg/ml、120 µg/ml、60 µg/ml、30 µg/ml和15 µg/ml(在Annexin V-FITC与PI双染色法中使用),用等量DMEM替代南蛇藤提取物作为阴性对照。南蛇藤提取物每个浓度重复实验3次。于37℃、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养,经药物作用24小时和48小时后,用1.2%胰酶消化细胞,分别收集不同组别的细胞至15 ml离心管中,1500 rpm离心5分钟(离心半径为5.5 cm),弃上清液,加入PBS清洗,1500 rpm离心5分钟,弃上清液。

**1.5 Annexin V-FITC与PI双染色法检测HepG2细胞的早期凋亡** 收集南蛇藤乙酸乙酯提取物干预24小时的待测细胞,分别用结合缓冲液重悬、计数,调节细胞浓度为1 × 10<sup>6</sup>个/ml,于100 µl细胞悬液中加入5 µl Annexin V-FITC和1 µl PI(工作浓度为100 µg/ml)混匀后避光、室温孵育15分钟。加入400 µl结合缓冲液,冰浴混合染色。应用流式细胞仪,以530 nm的激发荧光进行检测。对流式细胞仪检测的补偿控制:a管:细胞悬液不加任何试剂,作为阴性对照管;b管:细胞悬液加入5 µl Annexin V-FITC染色;c管:细胞悬液加入1 µl PI染色。

**1.6 细胞凋亡相关蛋白表达的检测** 收集南蛇藤乙酸乙酯提取物干预24小时和48小时的待测细胞,分别用结合缓冲液重悬、计数,收集5 × 10<sup>6</sup>个南蛇藤乙酸乙酯提取物干预后的待测细胞,加入PBS清洗离心后,去上清液,加PBS 1 ml,移入微量离心管,离心,去上清液后再用移液器吸掉剩余水分(尽量吸干,避免影响裂解液),加入含有PMSF的裂解液200 µl,用移液器抽吸10次后振荡1分钟,再剧烈震荡5分钟,14000 rpm离心10分钟(离心半径为5.5 cm),收取上清液,移入新的微量离心管,冰上孵育。用分光光度计测定蛋白质的吸光度A<sub>595</sub>,计算蛋白质含量。采用免疫印迹法<sup>[15]</sup>,将成色完成的底片用BioRad Quantity One 4.1.0软件分析密度积分,并计算出受检蛋白和β-actin光密度积分值之比。

**1.7 统计方法** 采用SPSS 17.0统计软件对数据进行单因素方差分析和方差齐性检验。方差分析两两比较应用LSD和法,当方差不齐时,应用Dunnett T3法。以P < 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 南蛇藤乙酸乙酯提取物作用24小时诱导HepG2细胞凋亡的作用(早期凋亡)** 南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞24小时后,Annexin V-FITC与PI双染色法检测示:阴性对照组HepG2细胞主要分布在3区,但有少量细胞(<8%)分布于1区,可

能与操作过程中引起的细胞机械性死亡有关, 见图1。

南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞24小时后可引起HepG2细胞凋亡, 与阴性对照相比, 南蛇藤乙酸乙酯提取物15  $\mu\text{g/ml}$ 、30  $\mu\text{g/ml}$ 和60  $\mu\text{g/ml}$ 组的细胞凋亡率分别为 $(26.91 \pm 7.03)\%$ 、 $(44.91 \pm 15.92)\%$ 和 $(31.95 \pm 6.77)\%$ , 阴性对照组的细胞凋亡率为 $(0.16 \pm 0.13)\%$ , 差异有统计学意义( $t$ 值分别为5.481、4.006、6.769,  $P$ 值分别为0.024、0.002、0.012), 当药物浓度超过60  $\mu\text{g/ml}$  (120  $\mu\text{g/ml}$ 、240  $\mu\text{g/ml}$ )时, 细胞凋亡率分别为 $(21.58 \pm 5.02)\%$ 和 $(20.94 \pm 10.03)\%$ , 同时较60  $\mu\text{g/ml}$ 组下降, 细胞死亡增多, 见图2。

## 2.2 南蛇藤乙酸乙酯提取物干预细胞后对细胞凋亡相关蛋白表达的影响

### 2.2.1 不同剂量南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞24小时和48小时后对Cytochrome-c表达的影响

当南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞24

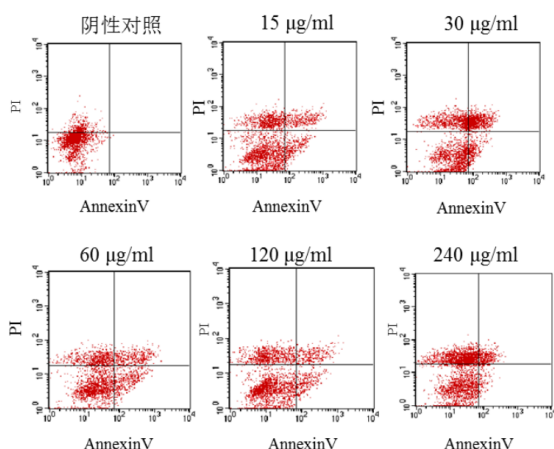


图1 南蛇藤乙酸乙酯提取物作用 HepG2 细胞 24 小时的 AnnexinV-FITC 和 PI 荧光双参数点图

注: “十字象限”左上方为1区, 该区 Annexin V-FITC 染色阴性、PI 染色阳性, 标志为死亡细胞; “十字象限”右上方为2区, 该区 Annexin V-FITC 染色阳性、PI 染色阳性, 标志为凋亡所致的死亡细胞; “十字象限”左下方为3区, 该区 Annexin V-FITC 染色阴性、PI 染色阴性, 标志为未出现凋亡的活细胞; “十字象限”右下方为4区, 该区 Annexin V-FITC 染色阳性、PI 染色阴性, 标志为早期凋亡细胞。

小时, Cytochrome-c的表达量随药物浓度的增加 (30  $\mu\text{g/ml}$ 、60  $\mu\text{g/ml}$ 和120  $\mu\text{g/ml}$ ) 而上调, 且均高于阴性对照组, 差异有统计学意义( $t$ 值分别为18.06、26.21、31.00,  $P$ 值分别为0.035, 0.024, 0.021); 在相同浓度 (60  $\mu\text{g/ml}$ 、120  $\mu\text{g/ml}$ ) 的药物作用不同时间后 (24小时与48小时), 组间 Cytochrome-c表达量的差异有统计学意义 (60  $\mu\text{g/ml}$ 药物组:  $t = 53.89$ ,  $P = 0.0012$ ; 120  $\mu\text{g/ml}$ 药物组:  $t = 36.53$ ,  $P = 0.001$ ); Cytochrome-c的表达量在60  $\mu\text{g/ml}$ 南蛇藤提取物作用48小时后达到峰值, 见图3、图4。

### 2.2.2 不同剂量的南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞24小时和48小时后对caspase3表达的影响

南蛇藤乙酸乙酯提取物作用24小时后, caspase3的表达量随药物浓度的增加 (30  $\mu\text{g/ml}$ 、60  $\mu\text{g/ml}$ 和120  $\mu\text{g/ml}$ ) 而上调, 且均高于阴性对照组, 差异有统计学意义( $t$ 值分别为168.27、123.15、112.00,  $P$ 值分别为0.004、0.005、0.006); 当南蛇藤乙酸乙酯提取物的药物浓度为60  $\mu\text{g/ml}$ 时, 在作用24小时与48小时后caspase3表达量的差异无统计学意义( $t = 12.21$ ,  $P = 0.052$ ); caspase3的表达量在120  $\mu\text{g/ml}$ 南蛇藤提取物作用24小时时达到峰值, 见图5、图6。

### 2.2.3 不同剂量南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞24小时和48小时后对cleaved caspase-9表达的影响

南蛇藤乙酸乙酯提取物作用24小时, cleaved

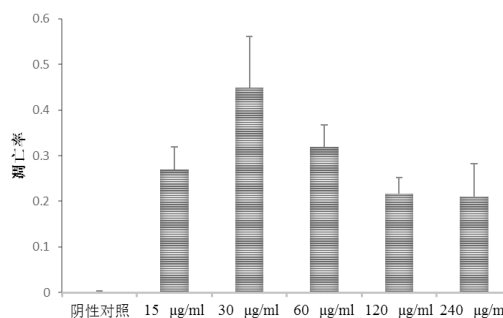


图2 南蛇藤乙酸乙酯提取物作用 HepG2 细胞 24 小时的凋亡率

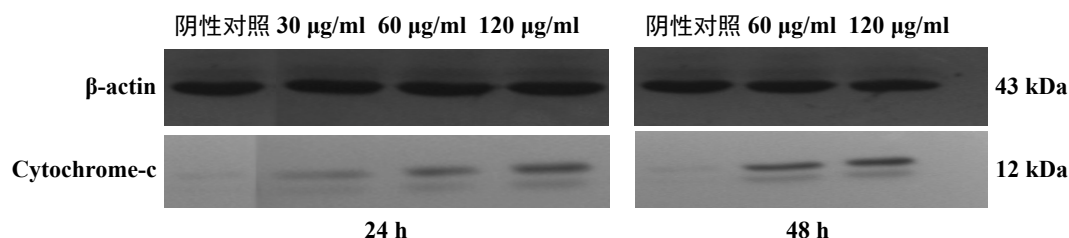


图3 免疫印迹法测定  $\beta$ -actin 蛋白和 Cytochrome-c 蛋白

caspase-9的表达量随药物浓度的增加(30  $\mu\text{g/ml}$ 、60  $\mu\text{g/ml}$ 、120  $\mu\text{g/ml}$ )而上调,且均高于阴性对照组,差异有统计学意义( $t$ 值分别为34.44、64.88、1258.12,  $P$ 值分别为0.00185、0.0098、0.0005);相同浓度的药物(60  $\mu\text{g/ml}$ 、120  $\mu\text{g/ml}$ )作用不同时间时(即24小时与48小时)所cleaved caspase-9表达量的差异有统计学意义(60  $\mu\text{g/ml}$ 药物浓度组:  $t = 20659$ ,  $P < 0.001$ ; 120  $\mu\text{g/ml}$ 药物浓度组:  $t = 255.58$ ,  $P = 0.002$ ) cleaved caspase-9的表达量在120  $\mu\text{g/ml}$ 南蛇藤提取物作用48小时时达到峰值,见图7、图8。

### 3 讨论

细胞凋亡机制研究有助于抗癌药的筛选和应用,同时也是抗肿瘤治疗的一个新指标,本实验在南蛇藤乙酸乙酯提取物诱导HepG2细胞凋亡的相关实验<sup>[5,16]</sup>和对肝癌原位荧光动物模型肿瘤生长和转移抑制作用<sup>[8]</sup>的研究基础上进一步展开细胞实验,探讨其诱导细胞凋亡的可能相关分子机制。结合既往本课题组的相关实验<sup>[5,16]</sup>,南蛇藤乙酸乙酯提取

物诱导HepG2细胞凋亡的作用可能是通过影响线粒体信号转导途径来发挥作用的,即药物作用细胞后促使膜间蛋白Cytochrome c的表达和释放,活化caspase-9与caspase-3,从而导致细胞凋亡。

细胞凋亡包括一系列的生物化学变化<sup>[17-19]</sup>,因此,本课题组还进行了细胞早期凋亡(Annexin V-PI检测)和晚期凋亡(细胞DNA降解分析)的检测,结果表明:随着南蛇藤提取物剂量的提高与作用时间的延长,凋亡细胞的数量和程度在一定范围内逐渐增强<sup>[5,16]</sup>。其中30  $\mu\text{g/ml}$ 南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞24小时后,出现的早期细胞凋亡(用Annexin V-PI检测)最为显著。而120  $\mu\text{g/ml}$ 南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞24小时为细胞DNA降解分析检测核DNA断裂(晚期凋亡)的峰浓度<sup>[16]</sup>。这种不一致是由多种因素引起的,包括不同的细胞系或组织、凋亡诱导剂、药物浓度或刺激强度和暴露时间等<sup>[20,21]</sup>。

本实验显示南蛇藤乙酸乙酯提取物诱导HepG2细胞凋亡可能与“线粒体凋亡途径”有关,尤其是

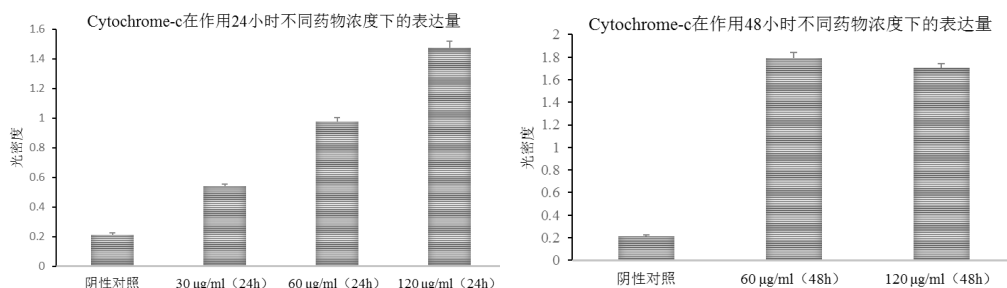


图4 24小时和48小时不同药物浓度下 Cytochrome-c 的表达量

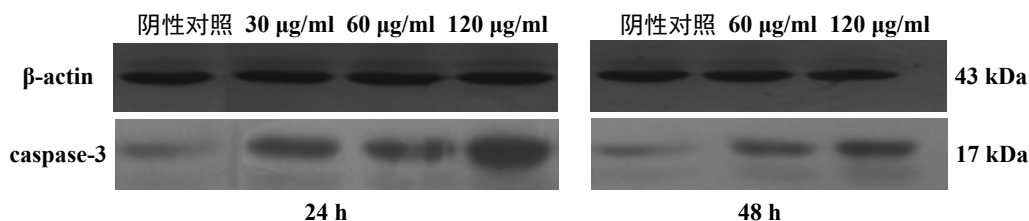


图5 免疫印迹法测定  $\beta$ -actin 蛋白和 caspase-3 蛋白

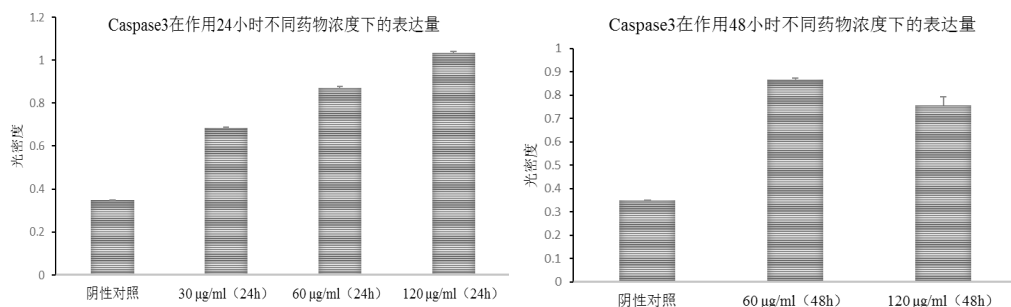


图6 24小时和48小时不同药物浓度下 caspase-3 的表达量

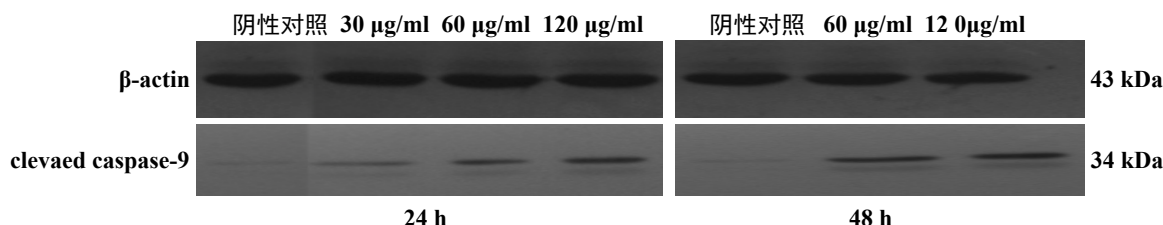
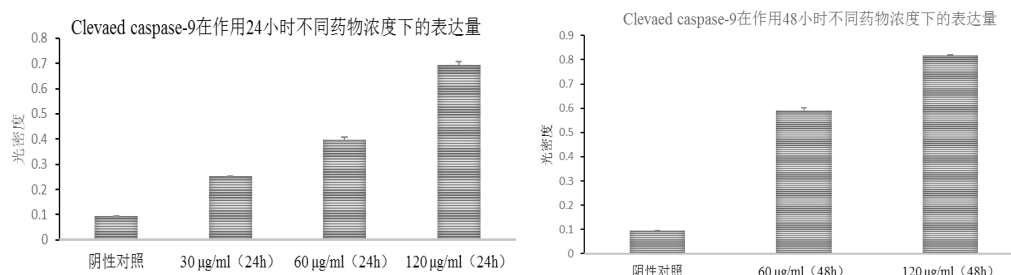
图7 免疫印迹法测定  $\beta$ -actin 蛋白和 cleaved caspase-9 蛋白

图8 24 小时和 48 小时不同药物浓度下 cleaved caspase-9 的表达量

对胱冬蛋白酶 (caspase) 的依赖, 这一结果为南蛇藤乙酸乙酯提取物抗肿瘤治疗提供了可能的理论基础。南蛇藤乙酸乙酯提取物能否通过“外源途径”即“死亡受体途径”诱导肿瘤细胞凋亡仍需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 (第5分册) [M]. 上海: 上海科技出版社, 1999: 375.
- [2] GUO YQ, LI X, XU J, et al. Sesquiterpene esters from the fruits of *Celastrus orbiculatus* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2004, 52(9): 1134-1136.
- [3] 钱亚云, 金凤, 曹玲, 等. 南蛇藤提取物对人肝癌细胞HepG2上皮间质转化的影响[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 16(12): 2647-2651.
- [4] 钱亚云, 曹玲, 刘延庆, 等. 南蛇藤提取物增强抑癌基因Maspin抑制人胃癌细胞株MGC803侵袭能力的研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 16(11): 2470-2474.
- [5] 熊熙, 汪茂荣. 南蛇藤乙酸乙酯提取物诱导HepG2细胞凋亡的实验研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2011, 14(4): 249-252.
- [6] 曹玲, 钱亚云, 刘延庆, 等. 南蛇藤提取物对高表达maspin的人胃癌MGC-803细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 97-101.
- [7] 张华, 付强, 钱亚云, 等. 南蛇藤提取物对人肝癌细胞增殖、迁移及血管内皮生长因子-C表达的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(10): 865-869.
- [8] WANG MR, ZHANG X, XIONG X, et al. Efficacy of the Chinese traditional medicinal herb *Celastrus orbiculatus* Thunb on human hepatocellular carcinoma in an orthotopic fluorescent nude mouse model [J]. Anticancer Res, 2012, 32(4): 1213-1220.
- [9] Qian YY, Zhang H, Hou Y, et al. *Celastrus Orbiculatus* extract inhibits tumor angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor signaling pathway and shows potent antitumor activity in hepatocarcinomas in vitro and in vivo [J]. Chin J of Integr Med, 2012, 18(10): 752-760.
- [10] ZHU Y, LIU Y, QIAN Y, et al. Antimetastatic effects of *Celastrus orbiculatus* on human gastric adenocarcinoma by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and NF-kappaB/snail signaling pathway [J]. Integr Cancer Ther, 2015, 14(3): 271-281.
- [11] ZHANG H, QIAN Y, LIU Y, et al. *Celastrus orbiculatus* extract induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. J Tradit Chin Med, 2012, 32(4): 621-626.
- [12] 张舰, 许运明, 刘延庆. 南蛇藤提取物体外抑瘤作用研究[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3): 99-101.
- [13] 张舰, 许运明, 王维民, 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.
- [14] Kim SE, Kim HS, Hong, YS, et al. Sesquiterpene esters from *Celastrus orbiculatus* and their structure-activity relationship on the modulation of multidrug resistance [J]. J Nat Prod, 1999, 62(5): 697-700.
- [15] Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A [J]. Anal Biochem, 1981, 112(2): 195-203.
- [16] 熊熙, 张馨, 汪茂荣, 等. 南蛇藤乙酸乙酯提取物诱导HepG2细胞凋亡的实验研究[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2015, 7(3): 81-84.
- [17] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999, 15: 269-290.
- [18] Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, et al. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease [J]. Lab Invest, 1998, 78(8): 893-913.
- [19] Thornberry NA, Lazebnik Y. caspases: enemies within [J]. Science, 1998, 281(5381): 1312-1316.
- [20] Sundquist T, Moravec R, Niles A, et al. Timing your apoptosis assays [J]. Cell Notes Promega, 2009, 16: 18-21.
- [21] Feoktistova M, Geserick P, Panayotova-Dimitrova D, et al. Pick your poison: the Ripoptosome, a cell death platform regulating apoptosis and necroptosis [J]. Cell Cycle, 2012, 11(3): 460-467.

收稿日期: 2016-02-15

熊熙, 张馨, 李平, 等. 南蛇藤乙酸乙酯提取物通过活化caspase依赖的线粒体通路诱导HepG2细胞凋亡[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2016, 8(4): 57-61.