DOI:10.16016/j.1000-5404.201609085

虾青素通过 TGF-β1 介导的 Smads/ERK 通路抑制肺纤维化

王芳芹,刘 涛,张 攀,阳群芳,陈晓红 (400038 重庆,第三军医大学药学系药理学教研室)

[摘要] **目的** 研究虾青素(astaxanthin, AX)对博莱霉素(bleomycin, BLM)所致 SD 大鼠肺纤维化的干预作用及机制。**方法** SD 雄性大鼠 32 只,体质量(200±20)g,采用随机数字表法分为 Sham 组(假手术组)、AX 组、BLM 组和 AX+BLM 组。经气道注入 5 mg/kg 的 BLM(BLM 组和 AX+BLM 组)或生理盐水(Sham 组)后,每天灌服虾青素(2 mg/kg)油溶液(AX 组和 AX+BLM 组)或植物油(BLM 组)连续 14 d,最后一次给药 24 h 后取材。检测肺系数,肺组织进行 HE 染色及 Masson 染色,显微镜下观察大鼠肺部炎症及纤维化程度;碱水解法检测羟脯氨酸含量;免疫组化法观察肺组织 α-SMA 蛋白表达情况;酶联免疫夹心法(ELISA)检测血清中 TGF-β1 水平;Western blot 法检测 Smad2/3 及 ERK1/2 蛋白。**结果** 与 Sham 组及 AX 组相比,BLM 组肺损伤严重,有明显的肺纤维化病灶形成;与 BLM 组比较,AX+BLM 组肺炎症程度及纤维化程度明显减轻($P<0.01$),肺组织胶原蛋白沉积减少,羟脯氨酸含量明显降低($P<0.01$),α-SMA 蛋白表达减少,TGF-β1 水平也明显降低($P<0.05$),同时 Smad2/3 蛋白及 ERK1/2 蛋白磷酸化水平明显下降。**结论** 虾青素能明显抑制 BLM 诱导的肺纤维化,其作用机制可能与降低 TGF-β1 水平,从而下调 Smads/ERK 通路有关。

[关键词] 虾青素;肺纤维化;博来霉素;TGF-β1

[中图法分类号] R563.13; R595.4; R979.9 [文献标志码] A

Astaxanthin inhibits lung fibrosis *via* down-regulation of TGF-β1-mediated Smads/ERK signaling pathway

Wang Fangqin, Liu Tao, Zhang Pan, Yang Qunfang, Chen Xiaohong (Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of astaxanthin (AX) on bleomycin (BLM)-induced lung fibrosis in SD rats and explore the underlying mechanism. **Methods** Thirty-two healthy male SD rats (weighing 200~220 g) were randomly divided into 4 groups, that is, Sham, BLM, AX, and AX+BLM groups. After intratracheal administration of BLM (5 mg/kg) or normal saline (Sham), the rats were orally administered with AX (2 mg/kg) oil solution or vegetable oil daily for the AX group and AX+BLM group or BLM group respectively for 14 consecutive days. All rats were sacrificed in 24 h after the last administration and the lung tissues were harvested. Lung pathological changes were evaluated by lung coefficient calculation, hematoxylin-eosin staining, Masson trichrome staining and hydroxyproline assay. The expression of α-SMA in the lung tissue was determined by immunohistochemical assay, and the serum level of TGF-β1 was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of Smad2/3 and ERK1/2 in the lung tissues were determined by Western blotting. **Results** Compared with the Sham and AX groups, the BLM group showed severe lung injury, with obvious formation of lung fibrosis. But the AX+BLM group had notably alleviated lung inflammation and fibrosis ($P<0.01$), reduced collagen deposition, decreased hydroxyproline content ($P<0.01$), lower expression of α-SMA, declined level of TGF-β1 ($P<0.05$), and decreased

[基金项目] 国家自然科学基金(81472912)

[通信作者] 陈晓红, E-mail:pharma821@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161129.1659.018.html

expression levels of Smad2/3 and p-ERK1/2. **Conclusion** AX exerts obvious inhibitory effect on BLM-induced lung fibrosis, which may be related with its decreasing the TGF-β1 level and thus down-regulating Smads/ERK signaling pathway.

[**Key words**] astaxanthin; lung fibrosis; bleomycin; TGF-β1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81472912). Corresponding author: Chen Xiaohong, E-mail: pharma821@163.com

肺纤维化又称间质性肺炎,病理特点是肺实质细胞减少,结缔组织进行性增多,肺结构功能丧失,最终导致呼吸衰竭。近年来肺纤维化的发病率显著上升,引起广泛关注。其发病原因复杂,机制不明,尚缺乏有效的治疗药物。临床上主要以应用肾上腺皮质激素及免疫抑制药为主,而这种疗法常伴随严重的副反应并容易引起继发感染,所以寻找一种安全有效改善肺纤维化的药物亟须解决。

虾青素(astaxanthin, AX)亦称"虾黄素",是一种抗氧化能力极强的脂溶性类胡萝卜素,全称3,3′-二羟基-β,β′-胡萝卜素-4,4′-二酮基,分子式为 $C_{40}H_{52}O_4$。AX 广泛存在于自然界中,如虾、蟹、海藻及鸟类羽毛等。因其具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤及增强免疫力等多种药理作用,而被广泛应用于各种疾病的研究[1-2]。近年研究表明,AX 可抑制肺纤维化,但其作用机制尚未完全清楚[3-6]。本研究旨在观察 AX 对大鼠肺纤维化的治疗效果,并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试药与仪器 羟脯氨酸检测试剂盒(南京建成,A030-2)、大鼠 TGF-β1 检测试剂盒(博士德,EK0514)、α-SMA(Abcam,ab5694)、p-Smad2(Abcam,188334)、p-Smad3(CST,9520)、Smad2/3(SANTA,sc-398844)、p-ERK1/2(CST,4370)、ERK1/2(CST,4695)、虾青素(Astaxanthin,阿拉丁,纯度>98%,CAS:472-61-7)、盐酸博来霉素(日本化药株式会社,规格15 mg/瓶,批号640412)、植物油。全波长酶标仪(美国 Thermo 公司)、倒置显微镜(日本 Nikon 公司)、凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)。

1.1.2 实验动物 由第三军医大学实验动物中心提供无病原体(SPF)级 SD 雄性大鼠[生产许可证号:SGXK(渝)2012-0003],8~10 周龄,体质量(200±20)g,分笼饲养,自由饮水及进食。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及肺纤维化模型的构建 32 只 SD 雄性大鼠采用随机数字表法分为4组:Sham 组(假手术组)、BLM 组、AX 组、AX+BLM 组,每组8只。动物造模前一晚禁食,手术前2 h禁水。大鼠用1%戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔注射麻醉,仰卧固定于手术台上,剪去颈部毛发,碘伏及乙醇消毒后逐层分离并暴露气管,1 mL 注射器经气管软骨环间隙朝向心端刺入气管,注入一定体积的博莱霉素生理盐水溶液(5 mg/kg)(BLM 组和 AX+BLM 组)或生理盐水(Sham 组),并继续注入0.1 mL 的空气,然后立即将动物直立并旋转3 min,使药液在肺内均匀分布。造模第2天 AX 组及 AX+BLM 组灌服 AX(2 mg/kg)油溶液,BLM 组给予等体积植物油,口服体积为1 mL/100 g 大鼠体质量,Sham 组给予正常饲养。

1.2.2 肺组织病理检测 各组大鼠分别于给药14 d后取全肺,称重,按公式"肺系数=肺湿质量/体质量"计算肺系数。左下肺以4%多聚甲醛固定,常规病理学方法经脱水、包埋、切片,进行 HE 染色及 Masson 染色。肺炎症程度评分参照 Szapiel 等[7]方法,肺纤维化程度评分参照 Ashcroft 等[8]的方法进行。

1.2.3 肺组织羟脯胺酸检测 采用碱水解法测肺组织样本中羟脯氨酸(HYP)含量,严格按照试剂盒说明书(南京建成,A030-2)操作:精确称取右肺组织80~100 mg,加入裂解液,沸水浴水解20 min,调 pH 至6.0~6.8,加活性炭离心,取1 mL 上清液依次加反应试剂,水浴反应15 min,离心后取上清于550 nm 处测定光密度值。

1.2.4 免疫组化检测 切片常规脱蜡,抗原修复,滴加单克隆 α-SMA 抗体(工作浓度1∶80),于4 ℃过夜孵育,DAB 显色,苏木精复染,于显微镜下观察 α-SMA 表达情况。

1.2.5 酶联免疫夹心(ELISA)检测 加样品和标准品,37 ℃反应90 min;加生物素标记抗体,37 ℃反应60 min;洗涤缓冲液洗涤3次;加亲和素-过氧化物酶复合物,37 ℃反应30 min;洗涤缓冲液洗涤5次;TMB 显色液37 ℃反应30 min;加入 TMB 终止液,酶标仪测光密度值。

1.2.6 Western blot 检测 采用液氮研磨法提取肺组织蛋白,BCA 法蛋白定量,沸水浴变性5 min,每份样品取30 μg 上样,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后转移至 PVDF 膜上,5% BSA 封闭2 h,加 p-Smad2、

p-Smad3、Smad2/3、p-ERK1/2、ERK1/2 等单克隆一抗 4 ℃孵育过夜,PBST 洗 3 次,辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶5 000)孵育 2 h,PBST 洗 3 次,ECL 化学发光法检测目的条带,GAPDH 为内参对照。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数间比较采用单因素方差分析,计数资料采用非参数秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　肺组织病理观察

肺部拍照结果显示:Sham 组与 AX 组双肺呈粉红色,肺泡壁光滑有弹性;BLM 组双肺呈暗红色,局部呈灰白色,有点状淤血斑点均匀分布;AX + BLM 组情况较模型组有好转,双肺较红润,只见少量斑点出现(图 1)。

肺系数结果显示:BLM 组肺系数较 Sham 组及 AX 组明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);AX + BLM 组肺系数较模型组有所降低,但无统计学差异(表 1)。

表 1　各组肺系数、炎症程度及纤维化程度比较($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	肺系数 (mg/g)	炎症程度	纤维化程度
Sham 组	0.60 ± 0.15	1.14 ± 0.11	0.14 ± 0.03
AX 组	0.47 ± 0.03	1.10 ± 0.10	0.10 ± 0.01
BLM 组	1.19 ± 0.37[a]	3.60 ± 0.42[a]	7.14 ± 0.24[a]
AX + BLM 组	0.96 ± 0.18	2.26 ± 0.15[b]	5.54 ± 0.44[b]

a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 BLM 组比较

HE 结果显示:Sham 组及 AX 组肺泡结构完整,肺泡壁薄,无充血及炎症细胞浸润;BLM 组肺泡大量塌陷,肺泡间隔增厚,甚至融合为大肺泡,肺泡内有充血及炎症细胞浸润,与 Sham 组及 AX 组比较,其炎症程度显著升高($P<0.01$);AX + BLM 组肺泡结构尚能保持,但局部可见肺泡间隔增厚,少量肺泡有融合,与模型组比较,其炎症程度明显降低($P<0.01$,图 1,表 1)。

Masson 结果显示:Sham 组及 AX 组肺泡结构完整,肺泡间隙未见明显的蓝色胶原沉积;与 Sham 组及 AX 组相比,BLM 组双肺大部分肺泡结构丧失,肺部明显实变,间质可见大量蓝色胶原沉积,其纤维化程度显著升高($P<0.01$);AX + BLM 组肺泡间隔可见少量胶原沉积,其纤维化程度显著降低($P<0.01$,图 1,表 1)。

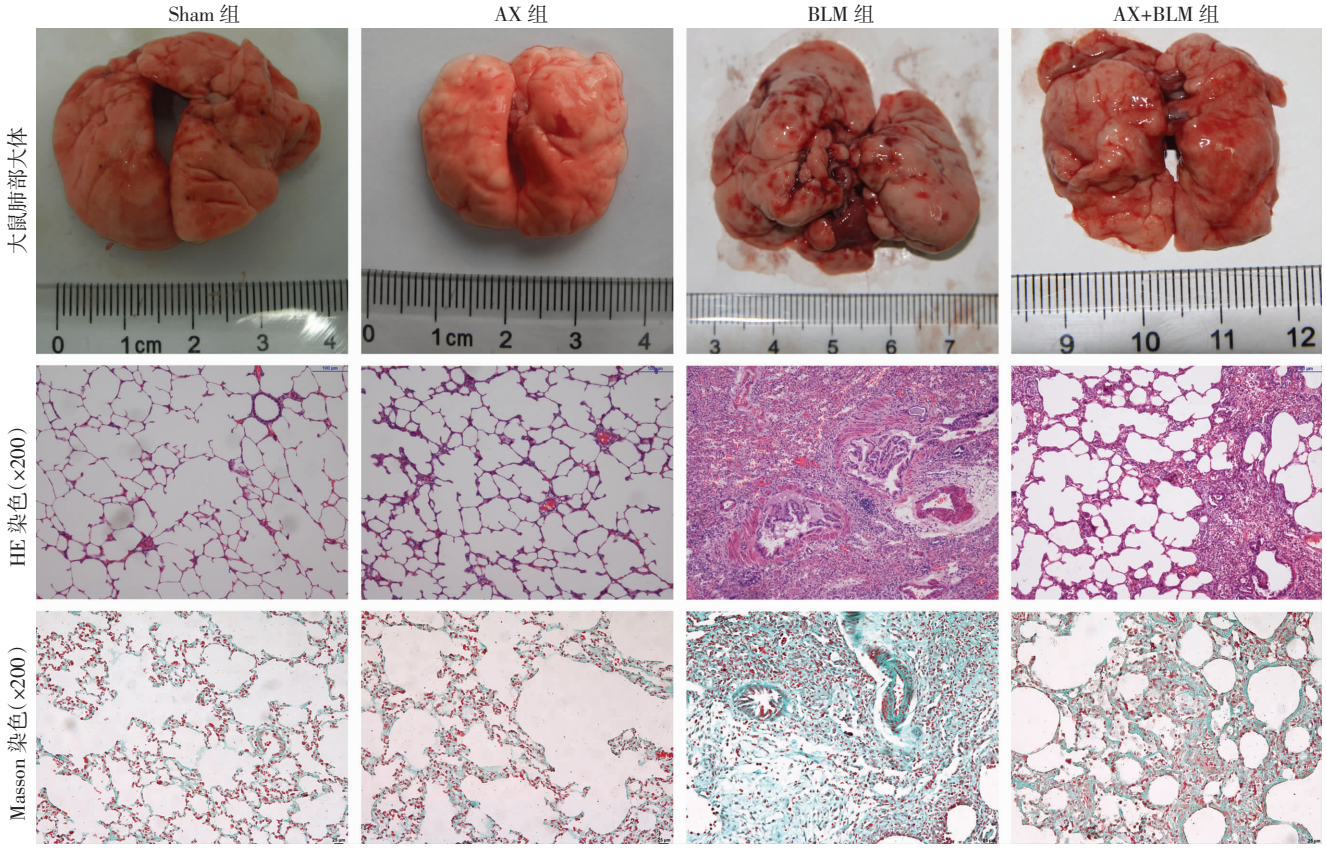
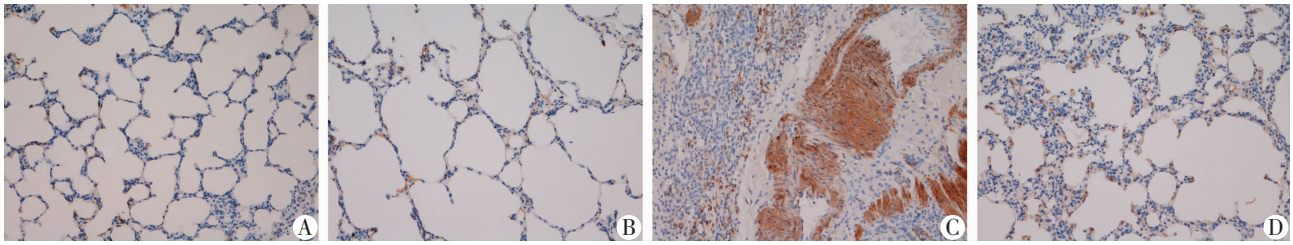


图 1　各组大鼠肺部大体、HE 染色及 Masson 染色观察

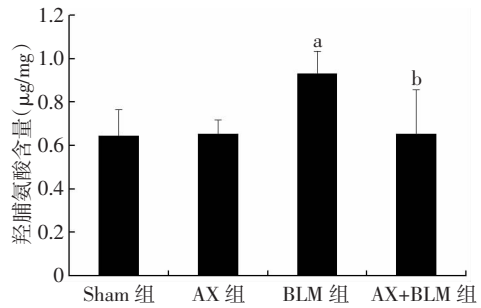


A:Sham 组;B:AX 组;C:BLM 组;D:AX + BLM 组

图 3 各组大鼠肺组织 α-SMA 蛋白表达(×200)

2.2 AX 降低肺组织中 HYP 含量

羟脯氨酸的测定结果显示:与 Sham 组与 AX 组比较,BLM 组 HYP 含量明显上升,差异有统计学意义($P<0.01$);与 BLM 组比较,AX + BLM 组 HYP 含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$,图 2)。



a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 BLM 组比较

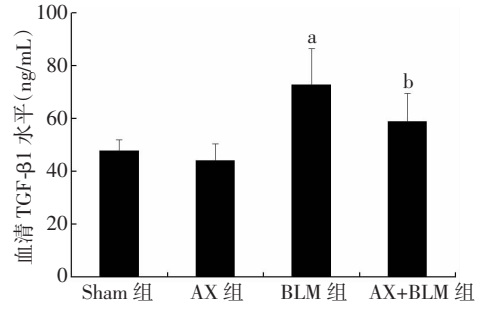
图 2 各组大鼠肺组织 HYP 含量($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

2.3 AX 降低肺组织中 α-SMA 的表达

BLM 组肺组织 α-SMA 表达(棕黄色区域)较 Sham 组及 AX 组明显增高,尤其在肺泡塌陷区域及肺间隔呈蜂窝状分布;AX + BLM 组 α-SMA 表达较 BLM 组低,仅在肺泡隔增厚处有少量表达(图 3)。

2.4 AX 降低血清中 TGF-β1 水平

与 Sham 组和 AX 组比较,BLM 组血清 TGF-β1 水平明显升高($P<0.01$),而 AX + BLM 组 TGF-β1 水平较模型组明显降低($P<0.05$,图 4)。

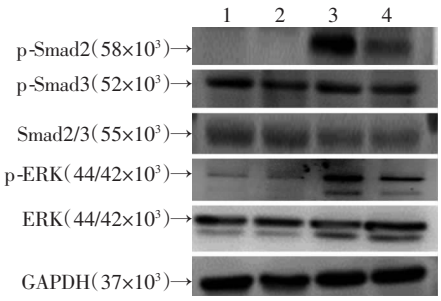


a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 BLM 组比较

图 4 各组大鼠血清 TGF-β1 表达水平($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

2.5 AX 降低肺组织 Smad2/3、ERK1/2 蛋白磷酸化水平

实验结果显示:BLM 组磷酸化 Smad2(p-Smad2)、磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)表达明显升高,而磷酸化 Smad3(p-Smad3)则变化不明显;与 BLM 组比较,AX + BLM 组 p-Smad2、p-Smad3、p-ERK1/2 表达均降低(图 5)。



1:Sham 组;2:AX 组;3:BLM 组;4:AX + BLM 组

图 5 Western blot 检测大鼠肺组织 Smad2/3 与 ERK1/2 蛋白

3 讨论

肺纤维化的病理特点主要以肺成纤维细胞聚集及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)进行性过度沉积取代正常肺组织结构主。博莱霉素致大鼠肺纤维化模型病理学改变与人类肺纤维化极为相似。有文献报道[8-9],大鼠气管注射博来霉素造模后第 14 天即可形成肺纤维化。本实验造模 14 d 后肺组织病理结果观察到,BLM 组肺系数升高($P<0.01$),肺部病变明显;HE 结果显示肺泡结构塌陷,有充血及炎症,肺泡间隙有成纤维样细胞增生;肺组织 Masson 染色结果亦发现胶原蛋白沉积明显增多。同时羟脯氨酸(HYP)检测结果也显示 BLM 组 HYP 明显升高($P<0.01$),而 HYP 是胶原纤维代谢的重要指标,可间接反映组织胶原含量[10]。这些结果都表明 BLM 造模成功,而 AX 可明显减轻 BLM 引起的炎症反应,抑制胶原蛋白沉积及

成纤维样细胞增生,同时降低肺组织中 HYP 含量($P<0.01$),表明 AX 能明显改善 BLM 所致肺纤维化。

肺纤维化病灶主要由肺成纤维细胞及肺肌成纤维细胞组成,而肺肌成纤维细胞是肺纤维化的主要效应细胞。α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)是肺肌成纤维细胞的标志性蛋白,可通过检测 α-SMA 的表达间接衡量肺肌成纤维细胞(MFB)的生成情况[11]。本实验观察到,与 Sham 组及 AX 组比较,BLM 组肺组织 α-SMA 表达明显升高,而 AX + BLM 组 α-SMA 表达较 BLM 组明显降低。此结果也表明 AX 可降低肺纤维化程度。

以往对于 AX 抑制肺纤维化的作用主要是以其抗氧化作用为线索进行研究,并发现 AX 可促进肌成纤维细胞的凋亡来抑制肺纤维化的形成[2-5]。但是肺纤维化的发生机制十分复杂,是多种因素共同作用的结果,其中最关键的因素就是转化生长因子 β1(TGF-β1)。它可促进成肺成纤维细胞过度增殖、分化并转化为肌成纤维细胞,促 ECM 分泌,最终导致肺间质胶原的过度沉积,肺结构实质化[12]。但是 AX 对 TGF-β1 的作用及其相关信号通路的研究还未见报道。研究报道 TGF-β1 诱导肺纤维化的发生与其下游的 Smads 蛋白家族信号通路相关。活性 TGF-β1 通过与其受体 TβRⅡ、TβRI 结合形成三聚体复合物,使磷酸化 Smad2/3 增多,磷酸化的 Smad2/3 与 TβRI 受体分离,即与 Smad4 结合形成复合体,携带信号从细胞质进入胞核激活转录,促进肺纤维化的发生[13];同时,MAPKs 丝裂原活化蛋白激酶家族的 ERK1/2 通路也是促纤维化发生的重要通路,被认为与 Smads 通路存在协同作用[14]。TGF-β1/Smad 信号通路的激活过程受 ERK 通路的调控,Smad2/3 含有 ERK 磷酸化的位点,可被 ERK 磷酸化,促进磷酸化的 Smad2/3 与 Smad4 的结合并转录。同时,ERK 通路受 Smads 通路调控,促使 ERK 通路相关细胞因子或激酶的转录,从而激活 ERK 信号传导通路,使磷酸化的 ERK1/2 参与细胞的增殖、分化和转化,从而促进肺纤维化发生。本课题组通过检测肺纤维化大鼠血清 TGF-β1 水平,发现 BLM 诱导的肺纤维化 TGF-β1 水平明显升高($P<0.01$),表明 BLM 可能是通过引起 TGF-β1 水平升高,从而诱导肺纤维化的发生,而 AX 可明显降低 TGF-β1 水平($P<0.05$)。同时本实验也检测了 Smad2/3 蛋白与 ERK1/2 蛋白,发现 BLM 组 Smad2/3 蛋白与 ERK1/2 蛋白的磷酸化水平明显升高,而 AX + BLM 组 Smad2/3 蛋白与 ERK1/2 蛋白磷酸化水平较 BLM 组明显降低。这些结果提示 AX 抑制肺纤维化的作用机制可能与其降低 TGF-β1 水平,从而下调 Smads/ERK 通路有关。

综上所述,AX 能明显抑制肺纤维化,其作用机制可能与降低 TGF-β1 水平,从而下调 Smads/ERK 通路有关。本实验研究了 AX 对 TGF-β1 介导的 Smads/ERK 通路的影响,为肺纤维化的防治提供了理论依据。但本实验只进行了动物在体研究,后期还需进行细胞水平的研究予以论证。

参考文献:

[1] Yuan J P, Peng J, Yin K, *et al*. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 55(1): 150 - 165. DOI: 10.1002/mnfr.201000414

[2] Wang M, Zhang J, Song X, *et al*. Astaxanthin ameliorates lung fibrosis in vivo and in vitro by preventing transdifferentiation, inhibiting proliferation, and promoting apoptosis of activated cells[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 56: 450 - 458. DOI: 10.1016/j.fct.2013.03.004

[3] Song X, Wang B, Lin S, *et al*. Astaxanthin inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells type II in vivo and in vitro through the ROS-dependent mitochondrial signalling pathway[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(11): 2198 - 2212. DOI: 10.1111/jcmm.12347

[4] Zhang J, Xu P, Wang Y, *et al*. Astaxanthin prevents pulmonary fibrosis by promoting myofibroblast apoptosis dependent on Drp1-mediated mitochondrial fission[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2015: n/a-n/a. DOI: 10.1111/jcmm.12609.

[5] Yang Y, Kim B, Park Y K, *et al*. Astaxanthin prevents TGFβ1-induced pro-fibrogenic gene expression by inhibiting Smad3 activation in hepatic stellate cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(1): 178 - 185. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.10.014

[6] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, *et al*. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893 - 899. DOI: 10.1164/arrd.1979.120.4.893

[7] Ashcroft T, Simpson J M, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. J Clin Pathol, 1988, 41(4): 467 - 470. DOI: 10.1136/jcp.41.4.467

[8] 王响英, 吴淑燕, 李苏安, 等. 实验性大鼠肺纤维化病理形态及超微结构观察[J]. 苏州大学学报(医学版),

2005,25(3):379-382,386. DOI:10.3969/j.issn.1673-0399.2005.03.010

Wang Xiangying, Wu Shuyan, Li Suan, *et al*. Study on Pathomorphology and Ultrastructure of Rat Pulmonary Fibrosis Model[J]. Suzhou University Journal of Medical Science, 2005,25(3):379-382,386. DOI:10.3969/j.issn.1673-0399.2005.03.010

[9] 柴文成,李永春,刘玉玲,等. 博来霉素致肺纤维化大鼠形态学变化的实验研究[J]. 中国实验动物学报,2003,11(2):77-80. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2003.02.004

Chai Wenshu, Li Yongchun, Liu Yuling, *et al*. Morphologic Study of Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Rats[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2003, 11(2):77-80. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2003.02.004

[10] 马荣林,王尉平,蒋小岗,等. 黄芩总黄酮对博莱霉素致大鼠肺纤维化的干预作用[J]. 中国药理学通报,2011,27(4):537-542. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2011.04.023

Ma Ronglin, Wang Weiping, Jiang Xiaogang, *et al*. Effects of total flavonoids of scutellaria baicalensis georgi(TFSB) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2011, 27(4):537-542. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2011.04.023

[11] Jiang D, Jiang Z, Han F, *et al*. HGF suppresses the production of collagen type III and alpha-SMA induced by TGF-beta1 in healing fibroblasts[J]. Eur J Appl Physiol, 2008, 103(5):489-493. DOI:10.1007/s00421-008-0733-7

[12] 肖颖,杨涛涛,周卫民,等. TGF-β/Smad与Wnt/β-catenin在博莱霉素致大鼠肺纤维化中的表达及相互作用[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(2):63-69,封4. DOI:10.3969.j.issn.1671.7856.2014.002.014

Xiao Ying, Yang Taotao, Zhou Weimin, *et al*. Expression and interaction of TGF-β/Smad and Wnt/β-catenin signaling pathway-related genes in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2014, 24(2):63-69. DOI:10.3969.j.issn.1671.7856.2014.002.014

[13] Massagu J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors[J]. Genes Dev, 2005, 19(23):2783-2810. DOI:10.1101/gad.1350705

[14] 万磊. 基于TGF-β1/Smads和ERK通路cross-talk研究新风胶囊改善AA大鼠肺功能的机理[D]. 湖北中医药大学,2013.

Wan Lei. Mechanism Research of Xinfeng Capsule on Pulmonary Function Based on the Cross-talk of TGF-β1/Smads and ERK Pathway in a Rat Model of Adjuvant Arthritis[D]. Wuhan, Hubei Province, China: Hubei University of Chinese Medicine, 2013.

(**收稿**:2016-09-12;**修回**:2016-11-06)

(编辑 张 维)