

荭草花提取物对H9c2心肌细胞缺氧复氧损伤的改善作用^Δ

李月婷^{1*}, 刘 亭¹, 吴 琼², 陆定艳¹, 王明金^{2,3}, 王永林¹, 李勇军², 周 孟², 刘春花^{2#}(1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550004)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)11-1304-09

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.11.05

摘要 目的: 研究荭草花提取物对H9c2心肌细胞缺氧复氧损伤的改善作用及机制。方法: 将H9c2心肌细胞为正常对照组、模型组和荭草花提取物低、中、高浓度组(20、40、80 μg/mL), 除正常对照组外, 其余各组细胞以800 μmol/L CoCl₂复制缺氧复氧损伤模型, 然后观察细胞凋亡情况, 并分别检测细胞中ROS水平、钙离子水平(细胞质中)、线粒体膜电位(MMP)水平、ATP酶(Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶)活性、细胞质中细胞色素c(Cyto c)/线粒体中Cyto c比值、再灌注补救激酶(RISK)信号通路相关蛋白[蛋白激酶B(Akt)、细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)]的磷酸化水平以及缺氧诱导因子1α(HIF-1α)的蛋白表达水平。另取细胞分为正常对照组、模型组、荭草花提取物组(80 μg/mL)、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)抑制剂LY294002+CoCl₂组(15 μmol/L LY294002+800 μmol/L CoCl₂)、LY294002+荭草花提取物组(15 μmol/L LY294002+80 μg/mL 荭草花提取物)、丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)抑制剂PD98059+CoCl₂组(25 μmol/L PD98059+800 μmol/L CoCl₂)、PD98059+荭草花提取物组(25 μmol/L PD98059+80 μg/mL 荭草花提取物), 同法培养后, 测定细胞中Akt蛋白和ERK1/2蛋白的磷酸化水平, 以验证荭草花提取物对RISK信号通路的激活作用。结果: 与模型组比较, 荭草花提取物各浓度组细胞的细胞核固缩现象减轻, 凋亡小体数量减少; 细胞中ROS水平、钙离子水平(低浓度组除外)、MMP、细胞质中Cyto c/线粒体中Cyto c比值和HIF-1α的蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); ATP酶活性(低浓度组除外)、Akt蛋白和ERK1/2蛋白磷酸化水平均显著升高($P < 0.01$)。加入抑制剂LY294002、PD98059后, 细胞中Akt蛋白和ERK1/2蛋白磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 荭草花提取物可改善H9c2心肌细胞缺氧复氧损伤, 其作用机制可能与抑制心肌细胞凋亡、提高ATP酶活性、保护线粒体、调节RISK信号通路相关蛋白和HIF-1α蛋白表达有关。
关键词 荭草花提取物; H9c2心肌细胞; 缺氧复氧损伤; 补救激酶信号通路; 缺氧诱导因子1α

Study on Improvement Effects of *Polygonum orientale* Flower Extract on Hypoxia-reoxygenation Injury of H9c2 Cardiomyocytes

LI Yueting¹, LIU Ting¹, WU Qiong², LU Dingyan¹, WANG Mingjin^{2,3}, WANG Yonglin¹, LI Yongjun², ZHOU Meng², LIU Chunhua² (1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Engineering Research Center of the Ministry of Education for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effects and mechanism of *Polygonum orientale* flower extract on hypoxia-reoxygenation injury of H9c2 cardiomyocytes. METHODS: H9c2 cardiomyocytes were divided into normal control group, model group and low-, medium- and high-concentrations groups of *P. orientale* flower extract (20, 40, 80 μg/mL). Except for normal control group, other groups were given 800 μmol/L CoCl₂ to induce hypoxia-reoxygenation injury model. Cell apoptosis was observed. The levels of Ca²⁺ (in cytoplasm), mitochondrial membrane potential (MMP), ATP enzyme (Na⁺-K⁺-ATP enzyme, Ca²⁺-Mg²⁺-ATP enzyme) activities, the ratio of cytochrome c (Cyto c) protein in cytosol to mitochondria, phosphorylation levels of reperfusion injury salvage kinase (RISK) signaling pathway related protein [protein kinase B (Akt) and extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2)] as well as protein expression of HIF-1α were detected respectively. In addition, the cells were divided into normal control group, model group and *P. orientale* flower extract group (80 μg/mL), PI3K inhibitor LY294002 + CoCl₂ group (15 μmol/L LY294002 + 800 μmol/L

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81803700, No.81560630, No.81660570, No.U1812403); 中央引导地方科技发展专项(No.黔科中引地[2018]4006); 贵州省科技计划项目(No.黔科合基础[2020]1Z068号, No.黔科合基础[2019]1439号, No.黔科合基础[2019]1280号)

* 副教授, 博士。研究方向: 中药药效物质基础及作用机制。电话: 0851-86908468。E-mail: nhwslyt@163.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 中药、民族药药效物质基础及作用机制。电话: 0851-86908468。E-mail: liuch2016@gmc.edu.cn

CoCl₂), LY294002+*P. orientale* flower extract group (15 μmol/L LY294002+80 μg/mL *P. orientale* flower extract), MEK inhibitor PD98059+CoCl₂ group (25 μmol/L PD98059+800 μmol/L CoCl₂), PD98059+*P. orientale* flower extract group (25 μmol/L PD98059+80 μg/mL *P. orientale* flower extract). After cultured by the same method, the phosphorylation levels of Akt protein and ERK1/2 protein in the cells were measured to verify the activation of *P. orientale* flower extract to RISK signaling pathway. RESULTS: Compared with model group, nuclear pyknosis and the number of apoptotic bodies were reduced in different concentrations groups of *P. orientale* flower extract. ROS level, Ca²⁺ level (except for low-concentration group), MMP, ratio of Cyto c in cytoplasm to Cyto c in mitochondria, protein expression of HIF-1α were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); the activity of ATP enzyme (except for the low-concentration group), Akt protein and ERK1/2 protein phosphorylation level were significantly increased ($P<0.01$). After treated with PI3K inhibitor LY294002 and MEK inhibitor PD98059, Akt protein and ERK1/2 protein phosphorylation level in cardiomyocyte were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: *P. orientale* flower extract can improve hypoxia-reoxygenation injury of H9c2 cardiomyocytes, the mechanism of which may be associated with inhibiting cardiomyocyte apoptosis, improving ATPase activity, protecting mitochondria, regulating RISK signaling pathway related proteins and HIF-1α protein expression.

KEYWORDS *Polygonum orientale* flower extract; H9c2 cardiomyocytes; Hypoxia-reoxygenation injury; RISK signaling pathway; HIF-1α

荭草为蓼科植物荭草 *Polygonum orientale* L. 的干燥果穗及带叶茎枝,其味辛,性凉,有小毒,归心、肝、胃、大肠经,具有清热解暑、祛风除湿、活血消肿的功效,常用于治疗风湿性关节炎、冠心病、心胃气痛、疝气、脚气、疮肿^[1]。本课题组前期研究发现,荭草的花序(即荭草花)具有明显的抗心肌缺血、抗氧化损伤的作用^[2-5],且对H9c2心肌细胞的过氧化氢损伤和缺氧复氧损伤具有明显的改善作用^[3-4]。但是,荭草花抗心肌细胞缺氧复氧损伤的作用机制尚不明确。

线粒体在参加和调节心肌细胞的损伤方面发挥着重要作用^[6]。严重的缺氧环境会损伤线粒体的电子传递链^[7],从而损伤线粒体,因此在复氧过程中,由于受损线粒体的驱动,使得大量活性氧(ROS)产生、钙离子失调,进而改变线粒体的通透性,导致线粒体肿胀和损伤^[6,8];另外,受损的线粒体还可导致线粒体的功能失调,从而释放细胞色素 c(Cyto c)进入细胞质,激活级联凋亡反应^[9],进而激活线粒体的重构和细胞内调节细胞存亡的反应^[6],最终导致细胞的凋亡和坏死。因此,保护线粒体是治疗心肌细胞损伤的重要环节。

Hausenloy等^[10]提出了再灌注损伤补救激酶(RISK)的概念,且相关研究已经证实RISK信号通路在心肌缺血/再灌注损伤中具有关键作用^[11]。RISK由磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)和细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)这两条信号通路组成,当RISK被激活时,可显著减少心肌梗死面积,因而是众多生长因子、细胞因子以及药物干预的靶点^[11-13]。缺氧诱导因子1α(HIF-1α)是缺氧转录反应的主要转录调控因子,可调节多种靶基因的表达,对细胞耐受缺氧环境和维持氧平衡具有重要作用,且与心肌细胞损伤的发生机制有关^[14]。

基于此,本研究采用氯化钴(CoCl₂)诱导H9c2心肌细胞缺氧复氧损伤,然后检测荭草花提取物对其细胞中ROS水平、钙离子水平(细胞质中)、线粒体膜电位

(MMP)、腺苷三磷酸(ATP)酶活性、Cyto c蛋白表达(细胞质和线粒体中)、RISK信号通路相关蛋白及HIF-1α蛋白表达等的影响,并应用PI3K抑制剂LY294002(简称“LY”)和丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)抑制剂PD98059(简称“PD”)^[15-16],验证荭草花提取物对RISK信号通路的激活作用,从而探讨荭草花改善H9c2心肌细胞缺氧复氧损伤的作用机制,为其进一步开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有:Forma 321型CO₂细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司),TS100型倒置显微镜(日本Nikon公司),Model 680型酶标仪、Trans-Blot Turbo蛋白转移系统、Power Pac Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司),Allegra 64R型冷冻高速离心机(美国Beckman公司),GBOX chemi XL1.4型凝胶成像仪(英国Syngene公司),R-100型旋转蒸发仪(瑞士Buchi公司)。

1.2 主要药品与试剂

荭草花药材采收于贵州省贵阳市鹿冲关植物园,经贵州医科大学药学院中药民族药标本馆龙庆德副教授鉴定为蓼科植物荭草 *P. orientale* 的干燥花序。其他药品与试剂有:BCA蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号PC0020-500),磷酸盐缓冲液(PBS)、高糖DMEM培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为10010049、12430047、R001100、12664025),抑制剂LY、抑制剂PD、CoCl₂、二甲基亚砷(美国Sigma公司,批号分别为L9908、P215、255599、D2447),ROS检测试剂盒、JC-1线粒体膜电位检测试剂盒、Hoechst 33342染液、Fluo-4 AM钙离子荧光探针、BSA蛋白测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为S0033S、C2006、C1026、S1060、ST025),ATP酶试剂盒

(美国 Promega 公司, 批号 V7001), 细胞质和线粒体蛋白质提取试剂盒(中国 Sangon Biotech 公司, 批号 C500051-0050), 小鼠源 β -actin 单克隆抗体、兔源 Cyto c 单克隆抗体、兔源 Akt 多克隆抗体、兔源磷酸化 Akt (p-Akt) 多克隆抗体、兔源 ERK 单克隆抗体、兔源磷酸化 ERK (p-ERK) 多克隆抗体、兔源 HIF-1 α 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 二抗、HRP 标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白 G (IgG) 二抗(英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab8226、ab133504、ab38449、ab8805、ab184699、ab217322、ab179483、ab6721、ab6728), PVDF 膜(美国 Millipore 公司, 批号 IPVH00010); 其余试剂为实验室常用试剂, 水为纯净水。

1.3 细胞

本研究所用细胞为大鼠 H9c2 心肌细胞株, 购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

2 方法

2.1 苕草花提取物的制备

参照本课题组前期研究方法^[7], 取苕草花药材 7.0 kg, 经水提、醇沉后, 以水饱和正丁醇溶液萃取, 收集正丁醇层, 减压干燥; 残渣以 80% 乙醇溶解, 然后上聚酰胺柱, 以 80% 乙醇进行洗脱; 收集洗脱液, 减压回收乙醇, 残留物采用微波真空干燥器进行干燥, 即得苕草花提取物(得率为 3.43%)。

2.2 细胞培养

将 H9c2 心肌细胞接种到含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(以下简称“完全培养基”)中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养(下同), 待细胞生长至 85% 时进行传代, 取对数生长期细胞进行后续实验。

2.3 分组、造模与给药

参考文献[3]方法复制缺氧复氧损伤模型。将 H9c2 心肌细胞以 5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 弃去上清液; 将细胞分为正常对照组、模型组和苕草花提取物低、中、高浓度组(20、40、80 μ g/mL, 以提取物计, 药物质量浓度根据课题组前期研究设置^[3-4])。模型组细胞加入完全培养基 100 μ L, 培养 24 h 后, 加入终浓度为 800 μ mol/L 的 CoCl₂ 溶液(临用时以完全培养基溶解制成), 培养 22 h 以刺激细胞, 换为完全培养基继续培养 2 h; 苕草花提取物低、中、高浓度组细胞分别加入终浓度分别为 20、40、80 μ g/mL 的苕草花提取物溶液(临用时以完全培养基溶解制成) 100 μ L, 培养 24 h 后, 按上述“加入终浓度为 800 μ mol/L 的 CoCl₂ 溶液……换为完全培养基继续培养 2 h”方法操作; 正常对照组细胞以完全培养基培养, 培养时间与方法同模型组, 但不进行造模。

2.4 H9c2 心肌细胞凋亡的观察

将 H9c2 心肌细胞以 5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种至 6 孔

板中, 每孔 2 mL, 按“2.3”项下方法分组(每组设 3 个复孔)、造模和给药处理后, 弃去培养基; 以 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 1 \times Hoechst 33342 染色液 1 mL, 培养 20 min; 弃去含染料的培养基, 以无血清高糖 DMEM 培养基洗涤 3 次后, 采用荧光显微镜观察并拍照(正常细胞的细胞核被染成均匀的蓝色, 凋亡细胞的细胞核呈碎裂、浓缩的明亮蓝色)。

2.5 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平的检测

将 H9c2 心肌细胞以 5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种至 6 孔板中, 每孔 2 mL, 按“2.3”项下方法分组(每组设 3 个复孔)、造模和给药处理后, 弃去培养基; 按 ROS 检测试剂盒说明书方法操作后, 采用荧光显微镜进行观察, 并随机选取 5 个不同视野拍照。利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析其绿色荧光强度, 以评价细胞中 ROS 水平(绿色荧光强度越大, 则表示细胞中 ROS 水平越高)。

2.6 H9c2 心肌细胞中钙离子水平(细胞质中)的检测

将 H9c2 心肌细胞以 5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种至 6 孔板中, 每孔 2 mL, 按“2.3”项下方法分组(每组设 3 个复孔)、造模和给药处理后, 弃去培养基, 以 PBS 洗涤 3 次; 按 Fluo-4 AM 钙离子荧光探针检测试剂盒说明书方法操作后, 采用荧光显微镜观察, 并随机选取 5 个不同视野拍照。利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析其绿色荧光强度, 以评价细胞质中钙离子水平(绿色荧光强度越大, 则表示细胞质中钙离子水平越高)。

2.7 H9c2 心肌细胞 MMP 的检测

将 H9c2 心肌细胞以 5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种至 6 孔板中, 每孔 2 mL, 按“2.3”项下方法分组(每组设 3 个复孔)、造模和给药处理后, 弃去培养基, 以 PBS 洗涤 1 次; 按 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒说明书方法操作后, 采用荧光显微镜观察并拍照, 并随机选取 5 个不同视野拍照。利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析绿色和红色荧光强度, 并以绿色与红色荧光强度的比值评价 MMP(比值越大, 则表示细胞 MMP 越高)。

2.8 H9c2 心肌细胞中 ATP 酶活性的测定

将 H9c2 心肌细胞以 5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种至 6 孔板中, 每孔 2 mL, 按“2.3”项下方法分组(每组设 3 个复孔)、造模和给药处理后, 以胰蛋白酶消化; 收集细胞至 10 mL 离心管中, 以 1 500 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 沉淀以 PBS 洗涤 2 次; 加入生理盐水 5 mL, 于冰浴条件下, 采用超声破碎仪破碎细胞(功率为 300 W, 频率为 40 kHz, 每隔 4 s 超声 1 次); 经 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后, 取适量蛋白, 按相应试剂盒说明书方法操作, 测定细胞中 ATP 酶(包括 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶)的活性。

2.9 H9c2 心肌细胞中 Cyto c 蛋白、RISK 信号通路相关蛋白及 HIF-1 α 蛋白表达水平的检测

采用 Western blot 法进行检测。将 H9c2 心肌细胞以

5×10⁴ mL⁻¹的密度接种至6孔板中,每孔2 mL,按“2.3”项下方法分组(每组设3个复孔)、造模和给药处理后,以PBS洗涤2次;加入胰酶1 mL消化2 min后,加入完全培养基终止消化;以1 000 r/min离心3 min,弃上清液,收集沉淀,按照细胞质和线粒体蛋白质提取试剂盒说明书方法操作,提取细胞质和线粒体中的蛋白,备用。另外,按上述方法对H9c2心肌细胞分组(每组设3个复孔)、造模和给药处理后,以预冷的PBS洗涤3次,加入RIPA裂解液(含1% PMSF)冰浴裂解细胞5 min,于4 ℃以12 000 r/min转速离心10 min,收集上清液,得细胞总蛋白,备用。取线粒体蛋白、细胞质蛋白、总蛋白适量,使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度;蛋白经变性后进行SDS-PAGE电泳,转膜,加入5% BSA溶液封闭2 h,然后分别加入Cyto c、Akt、p-Akt、ERK1/2、p-ERK1/2、HIF-1α、β-actin一抗(稀释度均为1:1 000),室温孵育2 h;以TBST洗涤5 min×5次,加入相应二抗(稀释度均为1:8 000),室温孵育2 h;以TBST缓冲液洗膜5 min×5次后,加入ECL显色,并于凝胶成像系统中进行成像。采用Quantity One 4.6软件进行分析,以Cyto c在细胞质中灰度值与在线粒体中灰度值的比值表示线粒体膜的开放程度(比值越大,则表示线粒体膜开放程度越大);以p-Akt与Akt、p-ERK1/2与ERK1/2的灰度值的比值分别表示Akt、ERK1/2的磷酸化水平;以HIF-1α与内参β-actin的灰度值的比值表示其表达水平。

2.10 加入抑制剂后H9c2心肌细胞中RISK信号通路相关蛋白表达水平的检测

将H9c2心肌细胞以5×10⁴ mL⁻¹的密度接种至6孔板中,每孔2 mL,然后分为正常对照组、模型组、荜草花提取物组(80 μg/mL,浓度根据前期研究设置)、LY+CoCl₂组(15 μmol/L LY+800 μmol/L CoCl₂)、LY+荜草花提取物组(15 μmol/L LY+80 μg/mL 荜草花提取物)、PD+CoCl₂组(25 μmol/L PD+800 μmol/L CoCl₂)、PD+荜草花提取物组(25 μmol/L PD+80 μg/mL 荜草花提取物),每组设3个复孔。其中,LY和PD给药浓度根据文献[18-20]设置。除正常对照组、模型组、荜草花提取物组外,其余各组细胞均在造模前加入相应抑制剂预处理20 min,然后再按“2.3”项下方法造模与给药。分组培养完毕后,按“2.9”项下方法提取细胞总蛋白并检测加入抑制剂后RISK信号通路相关蛋白的表达情况。

2.11 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 荜草花提取物对缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞凋亡的影响

正常对照组细胞形态正常、核染色均匀;模型组细

胞核固缩、致密浓染,可见大量凋亡小体;与模型组比较,荜草花提取物各浓度组细胞核固缩现象减轻,凋亡小体数量减少,详见图1。

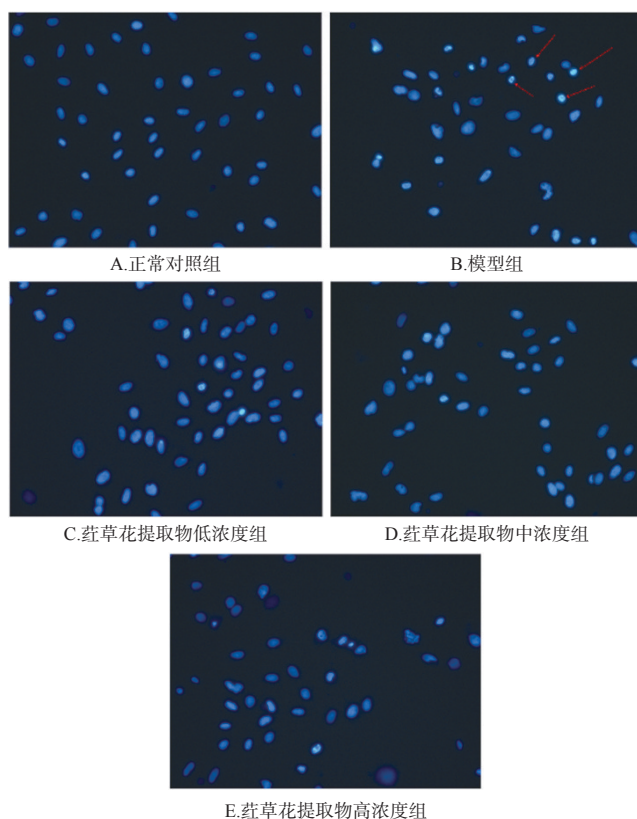


图1 荜草花提取物对缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞凋亡影响的显微图(×200)

Fig 1 Micrograph of the effects of *P. orientale* flower extract on the apoptosis of H9c2 cardiomyocytes with hypoxia-reoxygenation injury(×200)

3.2 荜草花提取物对缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞中ROS水平的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中ROS水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,荜草花提取物各浓度组细胞中ROS水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图2、表1。

3.3 荜草花提取物对缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞中钙离子水平(细胞质中)的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中钙离子水平(细胞质中)显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,荜草花提取物中、高浓度组细胞中钙离子水平(细胞质中)显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图3、表1。

3.4 荜草花提取物对缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞MMP水平的影响

与正常对照组比较,模型组细胞MMP水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,荜草花提取物各浓度组细胞MMP水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图4、表1。

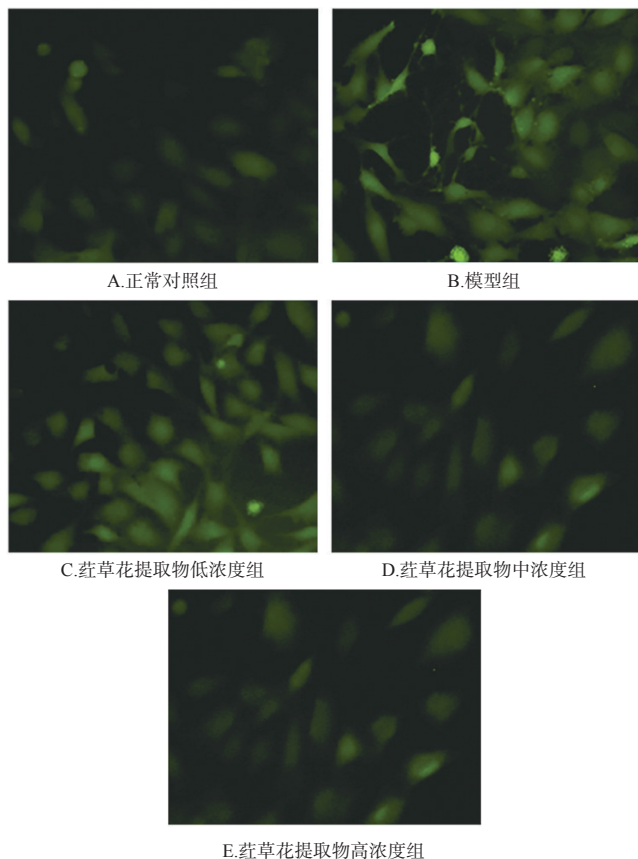


图2 荳草花提取物对缺氧复氧损伤 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平影响的显微图($\times 200$)

Fig 2 Micrograph of the effects of *P. orientale* flower extract on ROS level in H9c2 cardiomyocytes with hypoxia-reoxygenation injury($\times 200$)

表1 各组 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平、钙离子水平(细胞质中)以及 MMP 水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 The levels of ROS, Ca^{2+} (in cytoplasm) and MMP in H9c2 cardiomyocytes of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ROS	钙离子	MMP
正常对照组	20.64 \pm 2.92	21.64 \pm 2.23	0.48 \pm 0.15
模型组	50.09 \pm 2.40**	61.09 \pm 5.66**	2.91 \pm 0.60**
荳草花提取物低浓度组	40.18 \pm 3.55 [#]	56.09 \pm 4.03	2.12 \pm 0.24 [#]
荳草花提取物中浓度组	34.52 \pm 3.64 ^{##}	43.85 \pm 3.56 [#]	1.74 \pm 0.12 ^{##}
荳草花提取物高浓度组	30.82 \pm 2.50 ^{###}	34.64 \pm 3.35 ^{##}	1.50 \pm 0.16 ^{###}

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

3.5 荳草花提取物对缺氧复氧损伤 H9c2 心肌细胞中 ATP 酶活性的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中 Na^+-K^+-ATP 酶和 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶活性均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,荳草花提取物中、高浓度组细胞中上述酶活性均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表2。

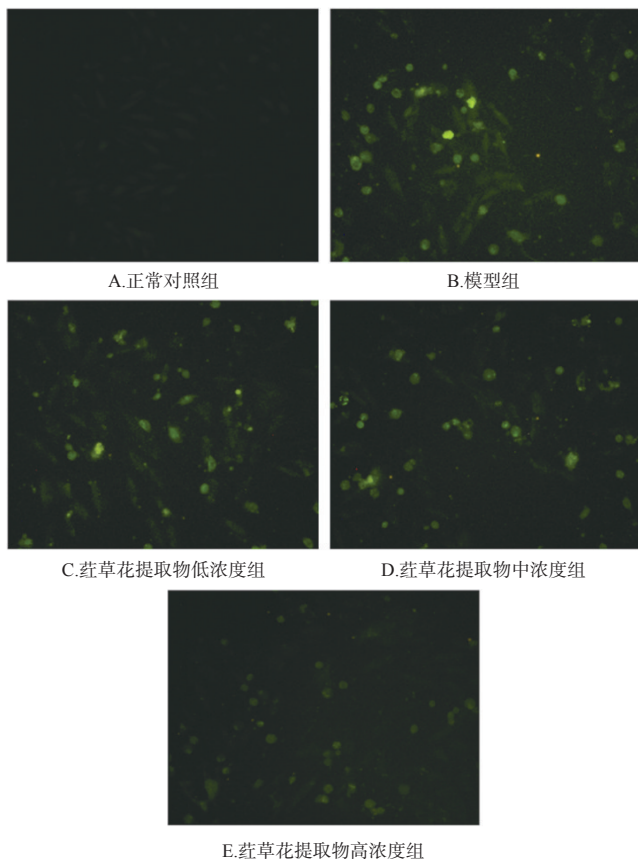


图3 荳草花提取物对缺氧复氧损伤 H9c2 心肌细胞中钙离子水平(细胞质中)影响的显微图($\times 200$)

Fig 3 Micrograph of the effects of *P. orientale* flower extract on Ca^{2+} level (cytoplasm) in H9c2 cardiomyocytes with hypoxia-reoxygenation injury ($\times 200$)

3.6 荳草花提取物对缺氧复氧损伤 H9c2 心肌细胞的细胞质和线粒体中 Cyto c 蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞的细胞质中 Cyto c/线粒体中 Cyto c 比值显著升高($P<0.01$);与模型组比较,荳草花水提取物各浓度组细胞中上述指标比值均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见图5、表3。

3.7 荳草花提取物对缺氧复氧损伤 H9c2 心肌细胞中 RISK 信号通路相关蛋白及 HIF-1 α 蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中 Akt 蛋白和 ERK1/2 蛋白的磷酸化水平均显著降低($P<0.01$),HIF-1 α 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,荳草花提取物各浓度组细胞中 Akt 蛋白和 ERK1/2 蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),HIF-1 α 蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$),详见图6、表3。

3.8 加入抑制剂后荳草花提取物对缺氧复氧损伤 H9c2 心肌细胞中 RISK 信号通路相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中 Akt 蛋白和 ERK1/2 蛋白的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,荳草花提取物组细胞中 Akt 蛋白

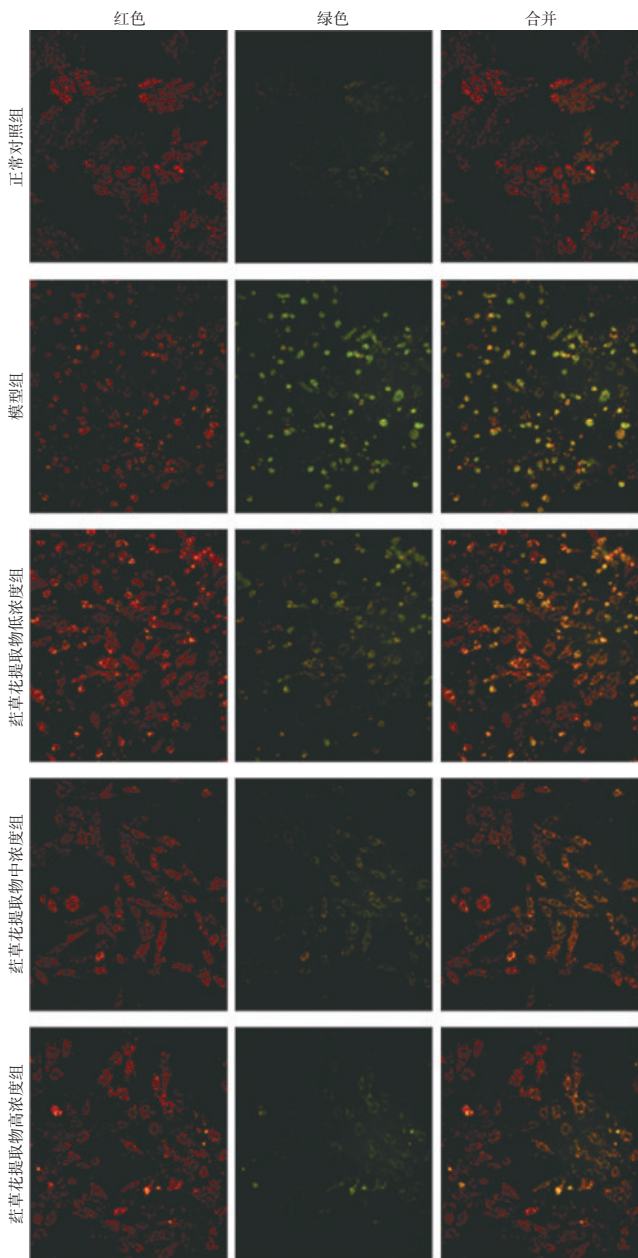


图4 荇草花提取物对缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞MMP影响的显微图($\times 200$)

Fig 4 Micrograph of the effects of *P. orientale* flower extract on MMP in H9c2 cardiomyocytes with hypoxia-reoxygenation injury($\times 200$)

和ERK1/2蛋白的磷酸化水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与荇草花提取物组比较,LY+荇草花提取物组细胞中Akt蛋白磷酸化水平和PD+荇草花提取物组细胞中ERK1/2蛋白磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图7、表4。

4 讨论

CoCl₂是一种模拟缺氧条件的化学试剂,常被用来制备细胞缺血缺氧损伤模型^[21]。在本课题组前期研究的基础上^[3],本研究采用800 μmol/L CoCl₂复制H9c2心肌细胞缺氧复氧损伤模型。在体内外的细胞缺氧复氧

表2 各组H9c2心肌细胞中ATP酶活性测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 ATPase activity in H9c2 cardiomyocytes of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Na ⁺ -K ⁺ -ATP酶,U/mg	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP酶,U/mg
正常对照组	38.45 ± 2.50	26.77 ± 2.08
模型组	17.80 ± 2.21**	12.75 ± 2.35**
荇草花提取物低浓度组	22.37 ± 3.14	14.41 ± 4.01
荇草花提取物中浓度组	24.14 ± 4.05 [#]	19.29 ± 2.00 [#]
荇草花提取物高浓度组	26.27 ± 1.98 ^{##}	21.85 ± 4.61 [#]

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

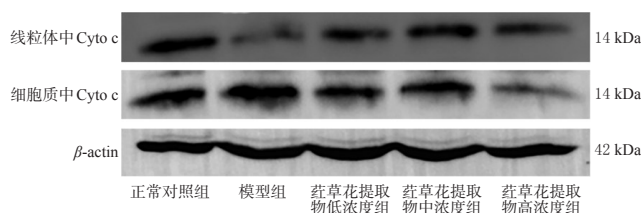


图5 荇草花提取物对缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞的细胞质和线粒体中Cyto c蛋白表达影响的电泳图

Fig 5 Micrograph of the effects of *P. orientale* flower extract on protein expression of Cyto c in cytoplasm and mitochondria in H9c2 cardiomyocytes with hypoxia-reoxygenation injury

表3 各组H9c2心肌细胞的细胞质中Cyto c/线粒体中Cyto c比值、RISK信号通路相关蛋白磷酸化水平及HIF-1α蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Ratio of Cyto c in cytosol to mitochondria, phosphorylation level of RISK signaling pathway related protein and protein expression of HIF-1α in H9c2 cardiomyocytes of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞质中Cyto c/线粒体中Cyto c	p-Akt/Akt	p-ERK1/2/ERK1/2	HIF-1α/β-actin
正常对照组	0.73 ± 0.06	0.76 ± 0.09	0.98 ± 0.06	0.16 ± 0.05
模型组	1.85 ± 0.08**	0.20 ± 0.07**	0.66 ± 0.06**	0.92 ± 0.04**
荇草花提取物低浓度组	1.57 ± 0.06 [#]	0.32 ± 0.03 [#]	0.91 ± 0.06 ^{##}	0.69 ± 0.07 ^{##}
荇草花提取物中浓度组	1.23 ± 0.07 ^{##}	0.52 ± 0.05 ^{##}	1.10 ± 0.06 ^{##}	0.48 ± 0.08 ^{##}
荇草花提取物高浓度组	0.92 ± 0.08 ^{##}	0.70 ± 0.05 ^{##}	1.21 ± 0.06 ^{##}	0.35 ± 0.04 ^{##}

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

损伤过程中,细胞内的氧化应激和钙离子诱导的线粒体功能障碍驱动了细胞的损伤和凋亡^[21-23],其中ROS是氧化应激中破坏机体氧化-抗氧化系统平衡的主要根源^[24]。本研究发现,缺血缺氧损伤H9c2心肌细胞的细胞核固缩、致密浓染,可见大量凋亡小体;细胞中ROS水平

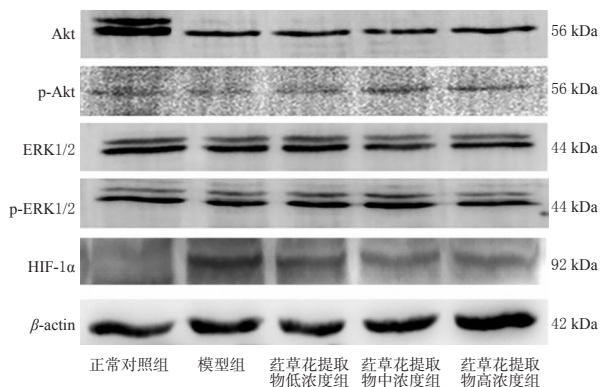


图6 荇草花提取物对缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞中RISK信号通路以及HIF-1 α 蛋白表达影响的电泳图

Fig 6 Electrophoretogram of the effects of *P. orientale* flower extract on RISK signaling pathway and HIF-1 α protein expression in H9c2 cardiomyocytes with hypoxia-reoxygenation injury

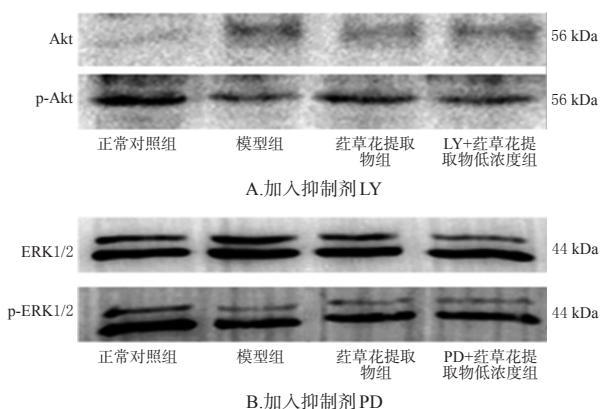


图7 加入抑制剂后荇草花提取物对缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞中RISK信号通路蛋白表达影响的电泳图

Fig 7 Electrophoretogram of the effects of *P. orientale* flower extract on RISK signaling pathway in H9c2 cardiomyocytes with hypoxia-reoxygenation injury after treated with inhibitors

显著升高;经荇草花提取物干预后,细胞中ROS水平显著降低。这表明荇草花提取物可通过提高细胞清除ROS的能力,从而发挥抗缺氧复氧损伤的作用。

ATP酶是存在于生物膜上的一种蛋白酶,具有物质运送、能量转换和信息传递等生物学功能;机体在缺氧刺激下,心肌细胞会迅速由有氧代谢转为无氧糖酵解,使细胞中ATP耗竭,进一步引起一系列的代谢紊乱和异常,从而使得依靠ATP转运的相关ATP酶活性降低,进而导致细胞内外离子交换出现异常,引起细胞内钙离子超载^[25]。本研究发现,缺血缺氧损伤H9c2心肌细胞中Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性显著降低,钙离子水平(细胞质中)显著升高;经荇草花提取物干预后,

表4 加入抑制剂后各组细胞中Akt蛋白和ERK1/2蛋白磷酸化水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Phosphorylation level of Akt protein and ERK1/2 protein in H9c2 cardiomyocytes of each group after treated with inhibitors($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-Akt/Akt	p-ERK1/2/ERK1/2
正常对照组	2.54 ± 0.19	0.93 ± 0.08
模型组	0.88 ± 0.08**	0.48 ± 0.12*
荇草花提取物组	1.51 ± 0.15**	0.68 ± 0.08*
LY+荇草花提取物组	1.05 ± 0.10**	
PD+荇草花提取物组		0.53 ± 0.06*

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与荇草提取物组比较,@ $P < 0.05$,@@ $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. *P. orientale* flower extract group, @ $P < 0.05$, @@ $P < 0.01$

上述ATP酶活性显著升高,钙离子水平(细胞质中)显著降低。这表明荇草花提取物可通过提高ATP酶活性,维持心肌细胞中正常的物质运送、能量转换和信息传递等生物学功能,从而逆转心肌细胞中钙离子水平的升高,最终发挥保护心肌细胞的作用。

线粒体通透性转换孔的打开会导致膜电位去极化、释放凋亡因子和降低氧化磷酸化水平^[26],因此测定MMP可评价线粒体的功能。本研究发现,缺血缺氧损伤H9c2心肌细胞MMP显著升高,经荇草花提取物干预后,细胞MMP显著降低,这表明荇草花提取物可通过保护线粒体,改善H9c2心肌细胞的缺血缺氧损伤。

相关研究发现,当线粒体的功能失调时,可释放Cyto c进入细胞质,激活级联凋亡反应^[9],进而激活线粒体的重构^[6],最终导致细胞的凋亡和坏死。本研究发现,缺血缺氧损伤H9c2心肌细胞的细胞质中Cyto c/线粒体中Cyto c比值显著升高;经荇草花提取物干预后,上述指标比值显著降低。这表明荇草花提取物可通过降低缺血缺氧损伤H9c2心肌细胞线粒体膜的开放程度,改善其缺氧复氧损伤。

RISK信号通路是机体对抗心肌缺血再灌注的最重要的通路之一^[27]。当心肌细胞受到缺氧复氧刺激时,多种内源性和外源性物质会依赖于RISK途径发挥保护细胞的作用^[28]。本研究发现,经荇草花提取物干预后,缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞中Akt蛋白和ERK蛋白的磷酸化水平均显著升高;使用Akt蛋白和ERK蛋白的抑制剂分别处理后,细胞中Akt蛋白和ERK蛋白的磷酸化水平均显著降低,说明荇草花提取物对Akt蛋白和ERK蛋白的激活作用被阻断,证实了其可能是通过RISK信号通路对缺氧复氧损伤的心肌细胞发挥保护作用。

当HIF-1 α 在机体常氧条件下保持稳定水平时,具有保护心肌缺血再灌注的作用,但是,当其过度表达时,可能会导致心脏损伤^[29]。本研究发现,缺氧复氧损伤H9c2心肌细胞中HIF-1 α 的蛋白表达水平显著升高;经荇草花

提取物干预后,细胞中HIF-1 α 蛋白表达水平显著降低。这表明荳蔻花提取物可能通过调节HIF-1 α 蛋白表达,从而发挥保护心肌细胞的作用。

综上所述,荳蔻花提取物可改善H9c2心肌细胞的缺氧复氧损伤,其作用机制可能与抑制心肌细胞凋亡、提高ATP酶活性、保护线粒体、调节RISK信号通路相关蛋白和HIF-1 α 蛋白表达有关。

参考文献

[1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:267-268.

[2] 刘俊宏,王昌权,夏涛,等.荳蔻花提取物对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用研究[J].中国药房,2019,30(1):68-72.

[3] 刘亭,吴琼,刘香香,等.荳蔻花提取物对H9c2心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用[J].中药材,2018,41(1):184-188.

[4] 刘亭,吴琼,刘香香,等.荳蔻花醇提取物对H₂O₂诱导的H9c2细胞氧化损伤的保护作用机制研究[J].天然产物研究与开发,2018,30(2):299-303.

[5] 吴琼,刘香香,陆定艳,等.荳蔻花提取物对H₂O₂诱导的HUVEC细胞氧化损伤的保护作用研究[J].中国中药杂志,2018,43(5):1008-1013.

[6] LESNEFSKY E J, CHEN Q, TANDLER B, et al. Mitochondrial dysfunction and myocardial ischemia-reperfusion: implications for novel therapies[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2017, 57: 535-565.

[7] CHEN Q, CAMARA A K S, STOWE D F, et al. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1): C137-C147.

[8] LESNEFSKY E J, CHEN Q, HOPPEL C L. Mitochondrial metabolism in aging heart[J]. CirRes, 2016, 118(10): 1593-1611.

[9] DE MARINIS E, FIOCCHETTI M, ACCONCIA F, et al. Neuroglobin upregulation induced by 17 β -estradiol sequesters Cytochrome c in the mitochondria preventing H₂O₂-induced apoptosis of neuroblastoma cells[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(2): e508.

[10] HAUSENLOY D J, YELLON D M. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection[J]. Heart Fail Rev, 2007, 12(3): 217-234.

[11] 关月,卫国,段佳林,等.心肌缺血/再灌注的保护机制RISK信号通路的影响因素[J].中国新药杂志,2016,25(19):2211-2217.

[12] 谢延峥,马金,邹旭. PI3K/Akt信号通路串扰在心肌缺血再灌注损伤中的作用及中医药防治进展[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(24):208-217.

[13] SEUNGHEE Y. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions[J].

Growth Factors, 2006, 24(1): 21-44.

[14] NANAYAKKARA G, ALASMARI A, MOULI S, et al. Cardioprotective HIF-1 α -frataxin signaling against ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(5): H867-H879.

[15] VLAHOS C J, MATTER W F, HUI K Y, et al. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)[J]. J Bio Chem, 1994, 269(7): 5241-5248.

[16] HAN Y F, LIN-HUA J I, FENG T T, et al. Effect of ERK1/2 signaling pathway inhibitor PD98059 on the expression of Ras, BRaf, MEK, ERK1/2 in marrow nucleated red blood cells of CMS patients[J]. Zhong Guo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2017, 25(5): 1571-1575.

[17] 向文英,梅朝叶,孙慧园,等.基于UHPLC-Q-TOF-MS分析荳蔻花提取物在H9c2心肌细胞中效应物质[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(12):90-95.

[18] BAO X H, LI H X, CHEN B D, et al. Role and related mechanism of S1P/S1P1 signal pathway during post conditioning of hypertrophic cardiomyocytes[J]. Zhong Hua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2016, 44(5): 431-435.

[19] CHEN P, ZHANG H, ZHANG Q, et al. Basic fibroblast growth factor reduces permeability and apoptosis of human brain microvascular endothelial cells in response to oxygen and glucose deprivation followed by reoxygenation via the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)/ERK pathway[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 7191-7201.

[20] LI L, SHA Z, WANG Y, et al. Pre-treatment with a combination of Shenmai and Danshen injection protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation- and H₂O₂-induced injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(6): 4643-4652.

[21] YANG C X, ZHANG X C, YIN H Q, et al. MiR-429/200a/200b negatively regulate Notch1 signaling pathway to suppress CoCl₂-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Toxicol In Vitro, 2020, 65: 104787.

[22] WU L, TAN J L, CHEN Z Y, et al. Cardioprotection of post-ischemic moderate ROS against ischemia/reperfusion via STAT3-induced the inhibition of MCU opening[J]. Basic Res Cardiol, 2019, 114(5): 39.

[23] SULAIMAN D, LI J, DEVARAJAN A, et al. Paraoxonase 2 protects against acute myocardial ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial function and oxidative stress via the PI3K/Akt/GSK-3 β RISK pathway[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 129: 154-164.

[24] JIN Q, JIANG Y, FU L, et al. Wenxin granule ameliorates hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in mitochondria via the PKC- δ /NOX2/ROS pathway in H9c2 cells[J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2020[2020-12-13].

不同产地衢枳壳药材质量的熵权TOPSIS法综合评价[△]

冯敬骞^{1*},李姜言²,宋剑锋³,王思为⁴,毛碧增⁵(1.衢州职业技术学院医学院,浙江衢州 324000;2.衢州市中医医院药学部,浙江衢州 324022;3.衢州市食品药品检验研究院中药与天然药物中心,浙江衢州 324002;4.衢州市人民医院药学部,浙江衢州 324000;5.浙江大学生物与技术学院,杭州 310058)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)11-1312-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.11.06

摘要 目的:综合评价不同产地衢枳壳药材的质量。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)测定衢枳壳药材中圣草次苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷的含量;采用紫外-可见分光光度法测定衢枳壳药材中总黄酮的含量;采用2020年版《中国药典》(四部)附录2204挥发油测定法甲法测定衢枳壳药材中挥发油的含量。以14批不同产地衢枳壳药材中上述6个黄酮类成分、总黄酮及挥发油的含量为指标,采用熵权TOPSIS法综合评价衢枳壳药材的整体质量。结果:14批不同产地衢枳壳药材中圣草次苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷、总黄酮的含量分别为2.530 4~2.915 1、4.273 7~5.313 8、34.715 8~36.695 8、3.061 1~4.456 0、4.560 9~5.773 5、45.153 6~47.019 7、145.480 1~157.022 5 mg/g,挥发油的含量为0.034~0.040 mL/g。熵权TOPSIS法分析结果显示,上述各指标权重分别为0.109 0、0.140 7、0.148 3、0.125 5、0.067 0、0.139 0、0.124 2、0.146 3;14批不同产地衢枳壳药材的平均相对贴度分别为0.809 0、0.711 9、0.807 0、0.681 5、0.447 0、0.363 1、0.439 8、0.349 6、0.449 6、0.376 5、0.486 6、0.458 7、0.282 0、0.167 0。质量排名前4位的衢枳壳药材分别为常山县大宝山、常山县太公山、常山县鹭山和常山县小翠山产样品。结论:采用熵权TOPSIS法可对衢枳壳药材质量进行综合评价;常山县所产衢枳壳药材质量较优。

关键词 衢枳壳;含量测定;熵权TOPSIS法;质量评价

Comprehensive Evaluation of Citrus Paradisi from Different Producing Areas by Entropy Weight TOPSIS Method

FENG Jingqian¹, LI Jiangyan², SONG Jianfeng³, WANG Siwei⁴, MAO Bizeng⁵(1. School of Medicine, Quzhou College of Technology, Zhejiang Quzhou 324000, China; 2. Dept. of Pharmacy, Quzhou Municipal Hospital of TCM, Zhejiang Quzhou 324002, China; 3. Center of TCM and Natural Medicine, Quzhou Institute for Food and Drug Control, Zhejiang Quzhou 324002, China; 4. Dept. of Pharmacy, Quzhou Municipal People's Hospital, Zhejiang Quzhou 324000, China; 5. College of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To evaluate the quality of Citrus Paradisi from different producing areas comprehensively. **METHODS:** The contents of eriocitrin, narirutin, naringin, naringenin, hesperidin and neohesperidin in Citrus Paradisi were determined by HPLC method; the contents of total flavonoids were determined by UV spectrophotometry; the contents of volatile oil were determined by volatile oil measurement method A stated in appendix 2204 of *Chinese Pharmacopoeia* (part IV). Using the contents of above 6 kinds of flavonoids components, total flavonoids and volatile oil in 14 batches of Citrus Paradisi from different habitats as indexes, the overall quality of Citrus Paradisi was evaluated by using entropy weight TOPSIS method. **RESULTS:** The

- https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32566078/.DOI: 10.1155-112020/3245483.
- [25] 张萍,王海云,苏博,等.延胡索提取物对AMI大鼠模型心肌梗死面积及Na⁺-K⁺-ATPase、Ca²⁺-ATPase活性的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(4):410-415.
- [26] LY J D, GRUBB D R, LAWEN A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) in apoptosis; an update[J]. *Apoptosis*, 2003, 8(2): 115-128.
- [27] WU L Z, FANG J, YUAN X, et al. Adropin reduces hypoxia/reoxygenation-induced myocardial injury via the reperfusion injury salvage kinase pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(5): 3307-3314.
- [28] BURLEY DS, FERDINANDY P, BAXTER GF. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(6): 855-869.
- [29] 熊梦婷,蔡婉垠,杨简.缺氧诱导因子-1在心肌缺血再灌注中的研究进展[J]. *巴楚医学*, 2018, 1(1): 110-114.

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81903873)
* 讲师,硕士。研究方向:中药药效物质基础与质量控制。
E-mail: fengjingqian@126.com

(收稿日期:2021-01-29 修回日期:2021-03-12)
(编辑:唐晓莲)