

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000645

秋水仙碱对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖及细胞周期的影响

杜航航, 沈为民, 张恒术

(重庆医科大学附属第一医院烧伤整形科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究秋水仙碱对体外培养人瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid Fibroblast, KFB)的毒性作用及细胞周期的影响。**方法:**体外培养人 KFB, 不同浓度秋水仙碱(1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g/ml}$)处理细胞。采用 MTT 比色法检测 KFB 的毒性作用;采用流式细胞仪检测秋水仙碱对 KFB 的细胞周期(G2 期)的影响。**结果:**MTT 法结果显示 1 $\mu\text{g/ml}$ 组(12.56 ± 0.79)%, 2 $\mu\text{g/ml}$ 组(27.35 ± 0.50)%, 4 $\mu\text{g/ml}$ 组(34.36 ± 0.25)%, 8 $\mu\text{g/ml}$ 组(39.38 ± 0.57)%, 16 $\mu\text{g/ml}$ 组(40.38 ± 0.23)%, 32 $\mu\text{g/ml}$ 组(44.65 ± 0.60)% ($F=2440.178, P=0.000$);流式细胞仪检测结果显示空白对照组(0.67 ± 0.46)%, 1 $\mu\text{g/ml}$ 组(4.26 ± 1.51)%, 2 $\mu\text{g/ml}$ 组(24.51 ± 4.69)%, 4 $\mu\text{g/ml}$ 组(45.12 ± 2.75)%, 8 $\mu\text{g/ml}$ 组(55.81 ± 5.04)%, 16 $\mu\text{g/ml}$ 组(69.90 ± 3.61)%, 32 $\mu\text{g/ml}$ 组(85.53 ± 2.06)% ($F=491.609, P=0.000$)。秋水仙碱能抑制细胞的生长, 对细胞分裂前期(G2 期)产生影响, 并呈时间依赖性和药物浓度依赖性。**结论:**在 24 h 时间点, 秋水仙碱在 1~32 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内可调控细胞的生长及细胞周期, 可以抑制瘢痕疙瘩的形成。

【关键词】秋水仙碱; 瘢痕疙瘩; 成纤维细胞**【中图分类号】**R62**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-10-15

作者介绍:杜航航, Email: 304018366@qq.com,

研究方向: 创面愈合。

通信作者: 张恒术, Email: 1390527030@qq.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150519.2138.014.html>

(2015-05-19)

chondrosarcoma and its variants[J]. Virchows Arch, 2002, 441(3): 219-230.

[4] Terek RM. Recent advances in the basic science of chondrosarcoma[J]. Orthop Clin North Am, 2006, 37(1): 9-14.

[5] Wang Y, Shen J, Arenzana N, et al. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response[J]. J Biol Chem, 2000, 275(35): 27013-27020.

[6] Llerena M, Bailey D, Curtis H, et al. Different mechanisms of recognition and ER retention by transmembrane transcription factors CREB-H and ATF6[J]. Traffic, 2010, 11(1): 48-69.

[7] 赵文君, 朱慧芳, 周菁华, 等. 内质网应激对 ATF6 调控 XBP1 启动子转录的影响[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(4): 15-19.

[8] Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease[J]. Physiol Rev, 2006, 86(4): 1133-1149.

[9] 韩晓凤, 张 鹏, 李美玲, 等. 携入 ATF6 重组腺病毒载体的构建及对 C28I2 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 医学分子生物学杂志, 2013, 10(4): 187-192.

[10] Liu Y, Zhou J, Zhao W, et al. XBP1S Associates with RUNX2 and regulates chondrocyte hypertrophy[J]. J Biol Chem, 2012, 287(41): 34500-34513.

[11] Kaneto H, Xu G, Song KH, et al. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2001, 276(33): 31099-

31104.

[12] Ubada M, Wang XZ, Zinszner H, et al. Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(4): 1479-1489.

[13] Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis[J]. BMC Cell Biol, 2013(14): 32.

[14] Yoshida H, Matsui T, Yamamoto, et al. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor[J]. Cell, 2001, 107(7): 881-891.

[15] Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response[J]. Physiology, 2007(22): 193-201.

[16] 李祥柱, 赵文君, 刘艳娜, 等. IRE1 α 上调人骨肿瘤细胞 XBP1 启动子转录活性的研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2012, 9(3): 171-177.

[17] Liacini A, Sylvester J, Li WO, et al. Mithramycin downregulates proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(4): R777-783.

[18] Naal FD, Mengele K, Schauwecker J, et al. High hydrostatic pressure-induced cell death in human chondrocytes and chondrosarcoma cells[J]. Anticancer Res, 2005, 25(3B): 1977-1982.

(责任编辑: 冉明会)

Effect of colchicine on human keloid fibroblasts

Du Hanghang, Shen Weiming, Zhang Hengshu

(Department of Burn and Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of colchicine on proliferation and cell cycle (G2) of human KFB. **Methods:** The primary human keloid-derived fibroblast were cultured by tissue. The proliferative behavior of KFB was studied after pre-treating with various concentrations of colchicines (1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g/ml}$) by 4 methyl thiazolyl tetrazolium method and the cell cycle was assessed by flow cytometry. **Results:** MTT analysis showed that 1 $\mu\text{g/ml}$ group ($12.56 \pm 0.79\%$), 2 $\mu\text{g/ml}$ group ($27.35 \pm 0.50\%$), 4 $\mu\text{g/ml}$ group ($34.36 \pm 0.25\%$), 8 $\mu\text{g/ml}$ group ($39.38 \pm 0.57\%$), 16 $\mu\text{g/ml}$ group ($40.38 \pm 0.23\%$), 32 $\mu\text{g/ml}$ group ($44.65 \pm 0.60\%$), $F=2440.178$, $P=0.000$; flow cytometry analysis showed that blank control group ($0.67 \pm 0.46\%$), 1 $\mu\text{g/ml}$ group ($4.26 \pm 1.51\%$), 2 $\mu\text{g/ml}$ group ($24.51 \pm 4.69\%$), 4 $\mu\text{g/ml}$ group ($45.12 \pm 2.75\%$), 8 $\mu\text{g/ml}$ group ($55.81 \pm 5.04\%$), 16 $\mu\text{g/ml}$ group ($69.90 \pm 3.61\%$), 32 $\mu\text{g/ml}$ group ($85.53 \pm 2.06\%$), $F=491.609$, $P=0.000$. Not only was the proliferation of KFB was inhibited, but also the prophase of cell division (G2) was affected depending on the time and drug concentration. **Conclusion:** The primary human keloid-derived fibroblast should be cultured by tissue adherent culture method and colchicine may regulate the proliferation and prophase of cell division of KFB at 1–32 $\mu\text{g/ml}$ in 24 hour.

[Key words] colchicine; keloid; fibroblast

瘢痕疙瘩为皮肤损伤后, 结缔组织过度增生和透明变性而引起的良性皮肤肿瘤^[1]。而成纤维细胞及其产生的胶原纤维在瘢痕形成中占有中心地位^[2]。成纤维细胞是瘢痕增生的主要细胞, 其静息状态的细胞称为纤维细胞。正常情况下, 是一类低代谢、处于非激活状态的细胞, 这种“冬眠”细胞在结缔组织中分布稀少, 只有在血管周围的软组织中密度稍高。而在创面愈合过程中的炎症反应后期才开始出现。在瘢痕疙瘩中, 成纤维细胞数量相当多, 为其主要效应细胞。有关资料表明, 秋水仙碱不仅是一种抗炎药物, 而且也是一种抗纤维化药物, 主要功能为微管蛋白抑制作用。该药目前主要用于通风、肿瘤的治疗, 尚未有报道对人瘢痕疙瘩的治疗。

本文通过观察秋水仙碱对人瘢痕疙瘩成纤维细胞的毒性作用和对细胞周期的影响, 为临床治疗瘢痕疙瘩的药物提供新的靶点, 同时也为秋水仙碱药物浓度筛选指导了方向。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

秋水仙碱(美国 Sigma 公司); FBS(杭州四季青生物工程有限公司); DMEM 培养基(高糖型)(HyClone-PIERCE 公司); 胰蛋白酶(Sigma 公司); PBS(pH=7.4)(北京中杉金桥生物技术有限公司) MTT(Sigma 公司); DMSO(Sigma 公司)。

1.2 主要仪器

台式吸器(TX-III 型, 绍兴市卫星医疗设备制造有限公司); 二氧化碳孵箱(易亮)脱色摇床(TS-1 型, 其林贝尔);

全自动酶标读数仪(F030300 型 Bio-Rad); 数显三用恒温水箱(HH-W420, 江苏金坛荣华); 超低温冰箱(U410 型, 英国 NBS); 超低温冰箱-80℃(DW86L628, 青岛海尔)。

1.3 细胞培养

采用常规的组织块贴壁培养法进行瘢痕疙瘩成纤维细胞的分离和体外原代培养。所用标本来源于本院整形烧伤整形科手术患者, 并征得患者同意, 所有标本均病理证实为瘢痕疙瘩。标本为 6~24 月的瘢痕组织 7 例, 培养后取生长情况最好的患者右背部瘢痕疙瘩组织成纤维细胞用于实验。取手术切下的皮肤瘢痕组织用含 PBS(pH=7.4)缓冲液冲洗 3 次, 然后用眼科剪去除皮下组织, 用含 PBS 缓冲液冲洗组织, 直到液体澄清无漂浮物。将处理好的组织转移到干净的培养皿中。用眼科剪剪成 0.5~1.0 mm³ 的碎块, 用吸管或镊子将组织块接种到干净的培养瓶或培养皿中(培养瓶预先用多聚赖氨酸处理)。组织块间隙在 0.5 cm 左右。置入饱和湿度的培养箱中 1~2 h (37 °C, 5.0% CO₂), 待组织块贴壁后, 加入含 12% 胎牛血清、DMEM 培养基, 使液体完全没过组织块, 置入饱和湿度的培养箱中。2~3 d 换液 1 次。待培养细胞生长基本融合成片, 密度达 80% 时, 吸除培养液, PBS 液漂洗 3 次后加入含 0.125% 胰蛋白酶消化约 1 min, 镜下观察见细胞质回缩, 细胞间隙增大时, 加入含 12% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化, 弯头吸管轻轻吹打细胞使其呈细胞悬液, 按 1:2 比例分瓶传代。

1.4 MTT 法对秋水仙碱的药物浓度筛选

1.4.1 细胞处理 取对数生长期的细胞, 加入 0.125% 胰酶消化后, 收集细胞, 调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个/ml。取 96 孔板, 每孔接种 100 μl 。铺板使待测细胞调密度至 6 000~7 000/孔(边缘孔用无菌 PBS 填充), 并做好分组标志。5% CO₂, 37 °C 孵育, 培养 2 d, 至细胞单层铺满孔底(96 孔平底板), 加入浓度梯度的药物。每孔 180 μl , 设 5 个复孔。5% CO₂, 37 °C 孵育。培养 24 h 在倒置显微镜下观察。每孔加入 20 μl MTT 溶液

(5 mg/ml, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h。终止培养, 小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μ l DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在全自动酶标读数仪 $A_{490\text{ nm}}$ 处测量各孔的吸光度 (absorbance, A) 值。记录结果。

细胞抑制率公式:

$$\text{细胞抑制率}(\%) = 1 - [(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$$

1.4.2 实验分组 设置阴性对照组 A 组为只有培养液, 未经秋水仙碱预处理的瘢痕疙瘩成纤维细胞为空白对照组 B 组。实验组按秋水仙碱浓度分为 4 组。C 组: 秋水仙碱 1 μ g/ml, D 组: 秋水仙碱 10 μ g/ml, E 组: 秋水仙碱 100 μ g/ml, F 组: 秋水仙碱 1 000 μ g/ml。

1.5 MTT 法检测人 KFB 的增殖活性

1.5.1 细胞处理同秋水仙碱的药物浓度筛选部分 加入药物后培养时间分别为 0、6、12、18、24、36、48、60、72、96、120 h。

1.5.2 实验分组 设置阴性对照组 A 组为只有培养液, 未经秋水仙碱预处理的瘢痕疙瘩成纤维细胞为空白对照组 B 组。经过药物浓度的筛选试验, 实验组按秋水仙碱浓度分为 6 组。C 组: 秋水仙碱 1 μ g/ml, D 组: 秋水仙碱 2 μ g/ml, E 组: 秋水仙碱 4 μ g/ml, F 组: 秋水仙碱 8 μ g/ml, G 组: 秋水仙碱 16 μ g/ml, H 组: 秋水仙碱 32 μ g/ml。

1.6 流式细胞仪检测秋水仙碱对人 KFB 的细胞周期的影响

1.6.1 细胞处理 取对数生长期 3~6 代的细胞制成细胞悬液, 送流式细胞仪检测细胞周期分布。每个样本重复 5 次。

1.6.2 实验分组 设置未经秋水仙碱预处理的瘢痕疙瘩成纤维细胞为空白对照组 A 组。实验组按秋水仙碱浓度分为 6 组。B 组: 秋水仙碱 1 μ g/ml, C 组: 秋水仙碱 2 μ g/ml, D 组: 秋水仙碱 4 μ g/ml, E 组: 秋水仙碱 8 μ g/ml, F 组: 秋水仙碱 16 μ g/ml, G 组: 秋水仙碱 32 μ g/ml。

1.7 统计学处理

实验结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。应用 SPSS 13.0 统计分析软件对实验数据进行统计学分析。各组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MTT 法对秋水仙碱的药物浓度筛选

秋水仙碱的不同药物浓度分别作用人 KFB, 在酶联免疫检测仪上测得 24 h $A_{490\text{ nm}}$ 值, 按公式计算出抑制率 (%)。

各组抑制率分别为 C 组: (11.23 $\pm$ 0.12)%, D 组: (39.69 $\pm$ 0.09)%, E 组: (97.73 $\pm$ 0.47)%, F 组: (99.38 $\pm$ 0.36)%。各组间比较采用单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=103.919.91, P=0.000$)。当秋水仙碱的药物浓度 $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ 时, 人 KFB 绝大部分死亡, 因此选取 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 为药物浓度范围。

2.2 MTT 法检测人 KFB 的增殖活性

秋水仙碱的不同药物浓度分别作用人 KFB, 在酶联免疫检测仪上分别测得 0、6、12、18、24、36、48、60、72、96、120 h $A_{490\text{ nm}}$, 按公式计算出抑制率 (%), 用柱状图表示, 如图 1。

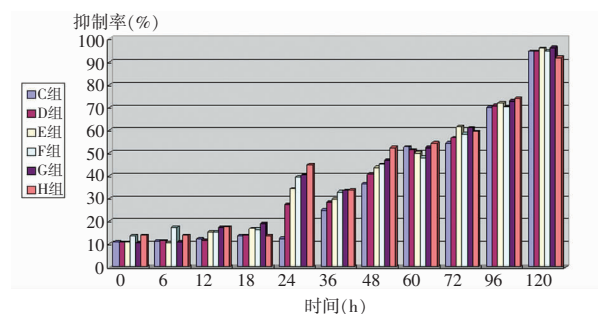


图 1 MTT 法检测秋水仙碱对人 KFB 增殖的影响

Fig.1 Effect of colchicine on proliferation of human KFB detected by MTT assay

由图 1 可以看出, 在 0~120 h 各个时间点上, 秋水仙碱对细胞的抑制率有逐渐增高的趋势, 呈现时间和药物浓度依赖性。

其中 0、6、12、18、36、48 h 6 个时间点上, 秋水仙碱对细胞的抑制率变化范围较小; 60、72、96、120 h 4 个时间点上, 秋水仙碱对细胞的抑制率变化幅度较小, 且趋于某一水平 (在 120 h 时间点上, 细胞绝大部分死亡); 24 h 时间点上, 秋水仙碱对细胞的抑制率变化范围较大, 且呈明显的梯度趋势, 故选取 24 h 时间点做统计学分析。见表 1。

表 1 MTT 法检测秋水仙碱对人 KFB 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Effect of colchicine on proliferation of human KFB detected by MTT assay ($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	细胞抑制率	F 值	P 值
C组	12.56 $\pm$ 0.79	2 440.178	0.000
D组	27.35 $\pm$ 0.50		
E组	34.36 $\pm$ 0.25		
F组	39.38 $\pm$ 0.57		
G组	40.38 $\pm$ 0.23		
H组	44.65 $\pm$ 0.60		

由表 1 可以看出, C~H 组, 随着药物浓度的增加, 其 A 值逐渐减小, 细胞抑制率逐渐增加; 各组间比较采用单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=2 440.178, P=0.000$)。

2.3 流式细胞仪分析秋水仙碱对人瘢痕疙瘩成纤维细胞周期的影响

秋水仙碱作用于人瘢痕疙瘩成纤维细胞后, 流式细胞仪检测 KFB 周期 G0~G1 的变化。选取 24 h 时间点做统计学分析。见表 2。

表 2 流式细胞仪检测秋水仙碱对人 KFB 细胞周期分布 (G0~G1) 影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.2 Effect of colchicine on cell cycle (G0~G1) of human KFB detected by FCM ($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	细胞周期分布 (G0~G1)	F 值	P 值
A组	0.67 $\pm$ 0.46	491.609	0.000
B组	4.26 $\pm$ 1.51		
C组	24.51 $\pm$ 4.69		
D组	45.12 $\pm$ 2.75		
E组	55.81 $\pm$ 5.04		
F组	69.90 $\pm$ 3.61		
G组	85.53 $\pm$ 2.06		

各组间比较采用单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F=491.609, P=0.000$)。

3 讨论

创伤愈合是一个极其复杂的过程,包括出血、凝血、炎症等一系列反应,使原来相对静止的细胞增殖、分化、迁移,参与细胞外基质形成肉芽组织及组织重塑^[1]。成纤维细胞是创伤修复中的主要效应细胞,在增生期和重塑期发挥极其重要的作用^[2-3]。

细胞的增殖活性,常常用细胞周期来加以理解和研究。细胞增殖周期是指亲代细胞分裂结束到子细胞分裂结束之间的间隔时期^[3]。细胞的有丝分裂过程可分为分裂期(M期)和分裂间期,分裂间期又可分为3个时期:DNA合成前期(又称有丝分裂前期,G1期)、DNA合成期(S期)及DNA合成后期(又称有丝分裂后期,G2期)。在这3个时相中,最关键的是DNA倍增和染色体复制的S期。G2期结束后,即进入M期。而细胞分裂受多种因素的调节,如细胞的大小、生长因子、抑素、位置信号、环磷酸腺苷、激素、药物、基因等。

自1937年美国学者Blakeslee等,用秋水仙碱加倍曼陀罗等植物的染色体数获得成功以后,秋水仙碱就被广泛应用于细胞学、遗传学的研究和植物育种的工作中。目前在临床上秋水仙碱主要被用作一种高效的抗痛风药^[4-5]。由于能抑制细胞有丝分裂,阻止纺锤丝的形成,使染色体停滞在分裂中期,因此具有抗肿瘤的作用^[6]。在秋水仙碱对中毒性肝炎小鼠的肝细胞实验中,发现秋水仙碱对病变的细胞有修复作用,主要是能增强胶原酶的活性,促进胶原的降解^[7]。

由于尚未有对秋水仙碱作用于人瘢痕疙瘩KFB的药物浓度范围的具体报道。本实验中参考其他肿瘤药物的大致作用浓度范围,用MTT法秋水仙碱的药物浓度做了筛选。实验发现在药物浓度 $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ 时,细胞几乎全部死亡,因此,本研究选取了 $1\sim 100 \mu\text{g/ml}$ 作为实验浓度范围。通过秋水仙碱对细胞的毒性检测,试验发现,随着药物浓度的增加,对细胞的毒性也越大,活细胞数量减少,细胞抑制率逐渐增加;24 h时,KFB的抑制率呈现明显的递增趋势,而流式仪分析的结果也同样显示为随着作用时间的延长,被阻滞在有丝分裂前期(G0~G1期)的细胞也随药物浓度的增加而增加;24 h时,随着药物浓度的增加,被阻滞在G2期的细胞呈现较均匀的递增趋势,对G0~G1期产生影响,在某一

时间和浓度范围内呈时间依赖性和药物浓度依赖性。其中在24 h的 $1\sim 32 \mu\text{g/ml}$ 时,呈现一个良好的作用时间点下的药物浓度范围。有研究表明,秋水仙碱为微管蛋白抑制药物,不仅可以抑制细胞分裂、增殖,而且还可抑制胶原、细胞外基质的合成和分泌^[8]。本实验中并未对胶原、细胞外基质的合成分泌进行检测,但秋水仙碱对KFB的抑制作用与文献报道的研究结果是一致的。

对于细胞生长、周期进行调节的认识,为有效地控制创面愈合过程提供了理论基础。秋水仙碱是一个典型的抑制细胞有丝分裂药物,是治疗痛风的首选药物^[9],临床上由于毒性较大^[10],尚未在治疗瘢痕疙瘩方面进行深入的研究,本实验证明了秋水仙碱对人瘢痕疙瘩成纤维细胞具有抑制作用,主要是通过通过对细胞周期(G0~G1期)的影响而发挥作用,并对药物浓度对培养KFB的抑制作用进行了筛选,为临床应用秋水仙碱抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增生奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Li F,Zhao SZ.Mesenchymal stem cells:Potential role in corneal wound repair and transplantation[J].World J Stem Cells,2014,6(3):296-304.
- [2] Foty RA.Measurement of intercellular cohesion by tissue surface tensiometry[J].Methods Mol Biol,2015(1189):237-254.
- [3] Huang C,Akaishi S,Hyakusoku H,et al.Are keloid and hypertrophic scar different forms of the same disorder?A fibroproliferative skin disorder hypothesis based on keloid findings[J].International Wound Journal,2014,11(5):517-522.
- [4] Harrold LR,Mazor KM,Negron A,et al.Primary care providers' knowledge, beliefs and treatment practices for gout: results of a physician questionnaire[J].Rheumatology (Oxford, England), 2013, 52(9): 1623-1629.
- [5] Stelzner C,Schellong S,Wollina U,et al.Foot lesions[J].Der Internist, 2013, 54(11): 1330-1336.
- [6] Atasever A,Yaman D.The effects of grape seed and colchicine on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats[J].Exp Toxicol Pathol, 2014, 66(8): 361-365.
- [7] Deftereos S, Giannopoulos G, Papoutsidakis N, et al. Colchicine and the heart: pushing the envelope[J].J Am Coll Cardiol, 2013, 62(20): 1817-1825.
- [8] Alabed S, Cabello JB, Irving GJ, et al. Colchicine for pericarditis[J].Cochrane Database Syst Rev, 2014; 8 CD010652.
- [9] Xu BB, Xu ZS, Zheng SL, et al. Effect of colchicine on rat hepatic cytochrome P450 enzymes by cocktail probe drugs[J].Pharmazie, 2014, 69(1): 43-47.
- [10] Nidorf SM, Eikelboom JW, Thompson PL. Colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease[J].Curr Atheroscler Rep, 2014, 16(3): 391.

(责任编辑:冉明会)