

本文引文格式:黄新亮,余方流,伍云云,等.乙肝病毒表面抗原冲击的树突状细胞诱导记忆T细胞的形成及增殖研究[J].右江民族医学院学报,2021,43(3):339-343.

【论著与临床报道】

## 乙肝病毒表面抗原冲击的树突状细胞诱导 记忆T细胞的形成及增殖研究

黄新亮,余方流,伍云云,王凤各,董博翰

(皖南医学院基础医学院,安徽 芜湖 241002)

**摘要:**目的 探索在体外用乙肝病毒表面抗原(HBsAg)冲击的树突状细胞(DC)诱导记忆T细胞(Tm)的形成及增殖。**方法** 选择健康志愿者,分低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组各6例,且分相应的低剂量自身对照组、中剂量自身对照组、高剂量自身对照组各6例。低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组分别以10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml HBsAg冲击DC;低剂量自身对照组、中剂量自身对照组、高剂量自身对照组均不用HBsAg冲击DC。培养第8天流式仪鉴定DC。后与自身淋巴细胞共培养7天后用流式细胞仪检测CD45RO+CD4+Tm百分率。再以MTT法检测CD45RO+CD4+Tm的增殖活性。**结果** 低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组分别比其相应自身对照组DC中表达CD80、CD40、HLA-DR的百分率、CD45RO+CD4+Tm的百分率、CD45RO+CD4+Tm的增殖活性显著升高( $P < 0.05$ )。且中剂量实验组、高剂量实验组分别比低剂量实验组的CD45RO+CD4+Tm增殖活性更高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 体外用HBsAg冲击的DC能够诱导CD45RO+CD4+Tm的形成及增殖,且用20 ng/ml、30 ng/ml HBsAg分别比10 ng/ml HBsAg诱导的CD45RO+CD4+Tm的增殖活性更高,这为探索免疫记忆机制奠定了依据。

**关键词:**树突状细胞;乙型肝炎病毒表面抗原;记忆T细胞;免疫

**中图分类号:**R392 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2021)03-0339-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.03.009

### Formation and proliferation of memory T cells induced by hepatitis B virus surface antigen-pulsed dendritic cells

Huang Xinliang, Yu Fangliu, Wu Yunyun, Wang Fengge, Dong Bohan

(School of Basic Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the formation and proliferation of memory T (Tm) cells induced by dendritic cells (DCs) which were pulsed with hepatitis B surface antigen (HBsAg) *in vitro*. **Methods** Healthy volunteers were divided into the low-dose, medium-dose and high-dose experimental groups with 6 cases in each group and corresponding low-dose, medium-dose and high-dose self control groups with 6 cases in each group. DCs in the low-dose, medium-dose and high-dose experiments groups were pulsed with 10 ng/ml, 20 ng/ml and 30 ng/ml HBsAg, respectively. The low-dose, medium-dose and high-dose self control group were not pulsed with HBsAg. The DCs were identified by flow cytometry on the eighth day of culture. The percentage of CD45RO+CD4+Tm was detected by flow cytometry after 7 days of co-culture with autolymphocytes. The proliferation activity of CD45RO+CD4+Tm was detected by MTT assay. **Results** The percentage of CD80, CD40 and HLA-DR expressed in DC, the percentage of CD80, CD40, HLA-DR, the percentage of CD45RO+CD4+Tm and the proliferation activity of CD45RO+CD4+Tm in the low-dose, medium-dose and high-dose

**基金项目:**2019年度安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2019A0415)

**第一作者简介:**黄新亮(1974-),男,硕士,讲师,研究方向:免疫分子与应用,E-mail:1076222023@qq.com

**通讯作者简介:**董博翰(1980-),男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤生化与免疫,E-mail:240151563@qq.com

experimental groups were significantly higher than those in the corresponding self control groups ( $P < 0.05$ ). Moreover, the proliferation activity of CD45RO+CD4+Tm in the medium-dose and high-dose experimental groups was higher than that in the low-dose experimental group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** DCs pulsed with HBsAg can induce the formation and proliferation of CD45RO+CD4+Tm *in vitro*, and the proliferation activity of CD45RO+CD4+Tm induced by 20 ng/ml and 30 ng/ml HBsAg is higher than that induced by 10 ng/ml HBsAg, respectively. This provides a basis for exploring the mechanism of immune memory.

**Key words:** dendritic cells; hepatitis B surface antigen; memory T cells; immunity

据 WHO 报道<sup>[1]</sup>,全球约有 2.57 亿慢性乙型肝炎病毒感染者,目前对乙型肝炎病毒(HBV)感染的免疫防御机制尤其是细胞免疫应答的机制尚未阐明,且 HBV 慢性感染过程中病理性免疫耐受的确切机制也未明。虽然记忆 T 细胞(memory T cell, Tm)比非记忆性 T 淋巴细胞的免疫功能更强大且寿命更长、由效应 T 细胞或初始 T 细胞分化而来,但 Tm 的形成、维持、再应答等确切的分子机制尚不清楚。

目前已知树突状细胞(dendritic cell, DC)是递呈抗原功能最强的细胞且 DC 负载抗原的技术成熟;已知记忆性 T 淋巴细胞表达细胞膜分子 CD45RO 和某些黏附分子。Tm 依据 TCR 分类则种类繁多,而能够结合乙型肝炎病毒表面抗原(Hepatitis B surface antigen, HBsAg)的特异性 Tm 就是其中一种。

机体抗乙型肝炎病毒感染免疫过程中特异性 Tm 是如何形成的?增殖活性如何?本研究基于 DC 负载抗原的制备技术和 Tm 的标志分子,进一步用体外用乙型肝炎病毒表面抗原(Hepatitis B surface antigen, HBsAg)冲击的 DC,与自身淋巴细胞反应,探索体外 HBsAg 特异性 CD45RO+CD4+Tm 是否形成及增殖活性如何。

## 1 对象与方法

1.1 对象 选择健康志愿者,纳入标准:年龄均为 20 岁,健康体检指标为乙型肝炎病毒(一)且无乙型肝炎发病史。

1.2 主要试剂 HBsAg、细胞培养基、MTT(SIGMA 公司),荧光素标记抗人 CD4 单克隆抗体、抗人 CD45RO 单克隆抗体、抗人 CD80、CD40 及 HLA-DR 单克隆抗体、IL-2、TNF- $\alpha$ 、IL-4 和 GM-CSF(Biolegend 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 HBsAg 冲击 DC DC 制备参看文献<sup>[2]</sup>:分离人外周血单个核细胞,用 RPMI 1640 完全培养液调整人外周血单个核细胞数为  $2 \times 10^6$ /ml。加入 4 孔细胞培养板。在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培养箱中温育 2 h 后吸弃培养上清和洗涤去除非贴壁细胞,即获得贴壁的细胞。每孔加入含 GM-CSF(800 U/ml)、IL-4(500 U/ml)的  $10\% \text{AB}$  血清完全培养基 1 ml。第 4 天将培养的 DC 加入纯化的 HBsAg 进行冲击:分低剂量实验组、中剂

量实验组、高剂量实验组各 6 例,分别以 10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml HBsAg 冲击 DC;低剂量自身对照组、中剂量自身对照组、高剂量自身对照组均不用 HBsAg 冲击 DC。第 5 天加入 TNF- $\alpha$ (250 U/ml);培养第 8 天收集 DC 细胞检测。

1.3.2 流式细胞仪鉴定 DC DC 培养过程中,倒置显微镜观察细胞形态学变化;采用抗人 CD80、CD40 及 HLA-DR 单克隆抗体和流式细胞仪检测 DC 表面标志分子 CD80、CD40 及 HLA-DR。

1.3.3 负载 HBsAg 的 DC 与自身淋巴细胞混合反应 参看文献<sup>[3]</sup>:取培养第 8 天的实验组和对照组的 DC,以  $1 \times 10^6$ /ml 加入到 4 孔板中,复苏冻存的初始 T 细胞,按 T 细胞:DC=20:1 的比例混合。加入 500 IU/ml IL-2,置于  $37^\circ\text{C}$ 、含  $5\% \text{CO}_2$  的培养箱中培养。4d 后以台盼蓝染色、显微镜观察 T 细胞的形态和活性。

1.3.4 流式细胞仪鉴定 CD45RO+CD4+Tm 每孔 100  $\mu\text{l}$  PBMC 细胞悬液中加入 5  $\mu\text{l}$  PE 标记抗人 CD45RO 单克隆抗体、5  $\mu\text{l}$  FITC 标记抗人 CD4 单克隆抗体, $4^\circ\text{C}$ 避光染色 30 min,用  $3\% \text{FBS-PBS}$  洗细胞 1 次,悬浮于 500  $\mu\text{l}$   $3\% \text{FBS-PBS}$  中,再次加  $3\% \text{FBS-PBS}$  调整容量为 5 ml, $4^\circ\text{C}$ 避光保存。荧光抗体染色后。用流式细胞仪分析,获取细胞数不少于 100 000。用本科室的流式细胞仪 C6 检测,检测前用 BD 公司提供的质控微球进行设置和调节。预先设置空白管、补偿管、样本管。先用空白管在 FSC/SSC 散点图上圈门(圈淋巴细胞区域设门,注意将分析细胞设在门内,尽量减少碎片掺入,保证足够的细胞数量)。随后以 CD4-FITC、CD45RO-PE 进行补偿调节,最后测定样本管。

1.3.5 MTT 法检测 CD45RO+CD4+Tm 的增殖活性 各组经过鉴定 CD45RO+CD4+Tm 后,置  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  温育 72 h 后。参看文献<sup>[3]</sup>:以常规 MTT 法,用酶标仪测各孔 OD<sub>570</sub> 值。计算刺激指数表示增殖活性(SI=实验孔 OD<sub>570</sub>/对照孔 OD<sub>570</sub>)。

1.3.6 统计学方法 用 SPSS 17.0 统计数据,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DC 中表达 CD80、CD40、HLA-DR 的百分率比较 低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组分别

比其相应自身对照组 DC 中表达 CD80、CD40、HLA-DR 的百分率显著升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 实验组和对照组表达 CD80、CD40、HLA-DR 的 DC 百分率比较

单位: %

组别	n	CD80	CD40	HLA-DR
低剂量实验组	6	40.61±0.54 <sup>a</sup>	37.12±0.82 <sup>a</sup>	48.66±1.32 <sup>a</sup>
低剂量自身对照组	6	29.32±0.66	28.95±0.86	39.73±1.45
中剂量实验组	6	39.02±1.36 <sup>b</sup>	35.23±1.43 <sup>b</sup>	51.03±1.26 <sup>b</sup>
中剂量自身对照组	6	31.23±0.59	31.25±1.05	40.76±1.83
高剂量实验组	6	41.15±1.03 <sup>c</sup>	39.16±1.30 <sup>c</sup>	52.31±1.27 <sup>c</sup>
高剂量自身对照组	6	33.06±2.09	30.34±1.43	43.07±2.18

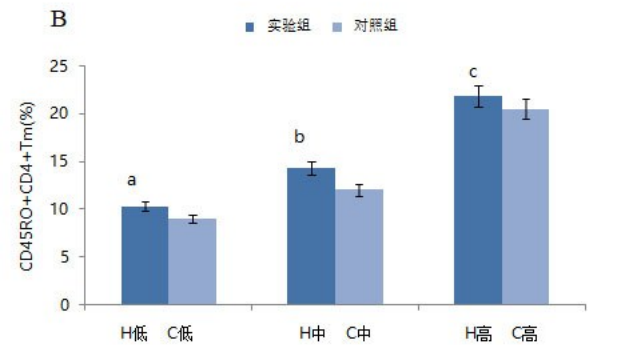
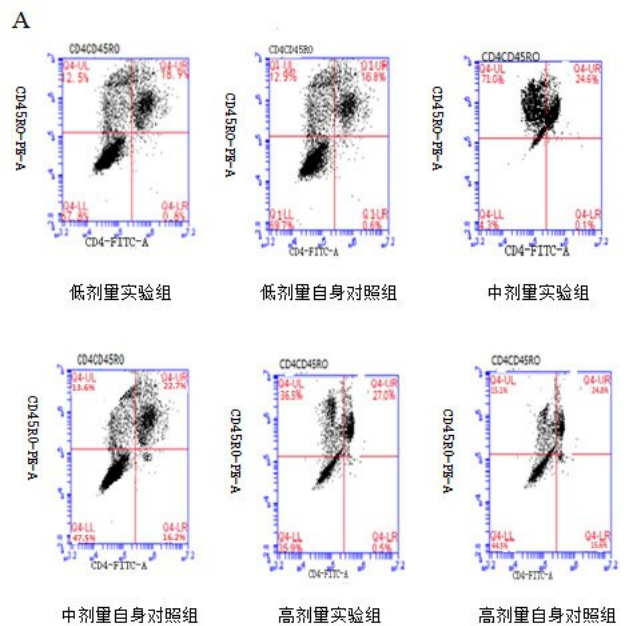
注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与低剂量自身对照组配对比较,a: $P < 0.05$ ;与中剂量自身对照组配对比较,b: $P < 0.05$ ;与高剂量自身对照组配对比较,c: $P < 0.05$ 。

2.2 CD45RO+CD4+Tm 百分率比较 低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组分别比其相应自身对照组的 CD45RO+CD4+Tm 的百分率显著升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1A、图 1B。

2.3 CD45RO+CD4+Tm 的增殖活性比较 低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组分别比其相应自身对照组的 CD45RO+CD4+Tm 的增殖活性显著升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。且中剂量实验组、高剂量实验组分别比低剂量实验组 CD45RO+CD4+Tm 的增殖活性更高,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

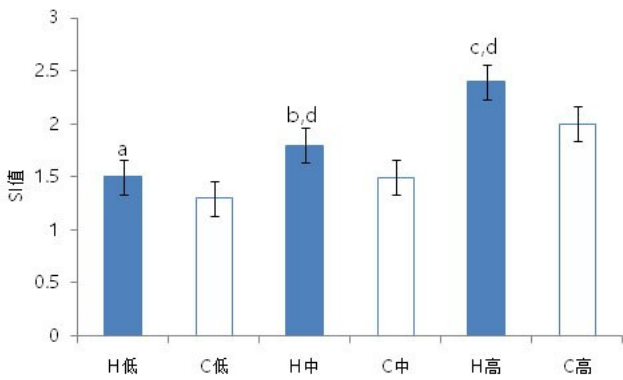
3 讨论

体外能够构建 CD45RO+CD4+Tm 且发现其具有良好增殖活性,这或可为免疫诊断及免疫防治提供新措施。目前诊断上尚无评价慢性乙型肝炎患者的抗乙型肝炎病毒的细胞免疫功能标准,这给选择适应证、实施免疫治疗带来困难。所以也无法推测免疫反应发生后,免疫病理所致的肝损程度以及相应的风险。这些均是导致治疗性乙肝疫苗“走不出实验室”的重要因素<sup>[4]</sup>。但本研究构建了检测 Tm 的体外简易模型,有望进一步通过临床研究、制定 HBV 感染后 Tm 的数量参考值范围,据此评估患者的免疫功能(现代免疫学亦发现免疫功能的增强主要依靠记忆细胞,例如预防性乙肝疫苗的临床应用已经发现免疫记忆功能可持续 20 年或终生)。我国一般人群慢性乙型肝炎病毒感染者约 7000 万例,其中慢性乙型肝炎患者约 2000~3000 万例<sup>[1]</sup>;由于缺乏有效的治疗措施,慢性乙型肝炎对我国社会造成沉重的经济负担,是危害我国人群健康的重大传染病之一。而本研究构建了基于 DC 负载 HBsAg 的疫苗,也为探索防治慢性肝炎的新型疫苗提供新思路。近年研究者发现<sup>[5-6]</sup>  $\gamma\delta$ T 细胞作为 T 淋巴细胞的一种亚型,存在有不变体 T 细胞受体,科学家将其命名为树突状表皮 T 细胞(dendritic epidermal tcells, DETCs),其在皮肤动态平衡、肿瘤免疫监测、创



注:A:流式细胞仪检测 CD45RO+CD4+Tm 实例;B:各组 CD45RO+CD4+Tm 百分率。H 低、H 中、H 高分别为低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组;C 低、C 中、C 高分别为低剂量自身对照组、中剂量自身对照组、高剂量自身对照组。与低剂量自身对照组配对比较,a: $P < 0.05$ ;与中剂量自身对照组配对比较,b: $P < 0.05$ ;与高剂量自身对照组配对比较,c: $P < 0.05$ 。

图 1 实验组和对照组 CD45RO+CD4+Tm 百分率



注: H低、H中、H高分别为低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组; C低、C中、C高分别为低剂量自身对照组、中剂量自身对照组、高剂量自身对照组。与低剂量自身对照组配对比较, a:  $P < 0.05$ ; 与中剂量自身对照组配对比较, b:  $P < 0.05$ ; 与高剂量自身对照组配对比较, c:  $P < 0.05$ 。与低剂量实验组比较, d:  $P < 0.05$ 。

图2 实验组和对照组 CD45RO+CD4+Tm 的增殖活性

伤修复等方面发挥着重要作用。尤其 DETCs 在皮肤创伤或瘢痕的修复过程中, 通过产生胰岛素样生长因子促进表皮干细胞生长等机制利于创面的修复<sup>[5-6]</sup>。而本研究发现体外能够构建 CD45RO+CD4+Tm, 因而进一步探索创面修复中是否有 CD45RO+CD4+Tm 参与、有望在美容外科领域利用其功能维持时间更持久的优点促进患者伤口愈合。体外检测 Tm 或为探索人体免疫奥秘提供实例。其一, 有研究发现机体对乙型肝炎病毒的适应性免疫应答在清除病毒中起主要作用<sup>[7]</sup>; 慢性感染时, 乙型肝炎病毒特异性 T 细胞易凋亡, 产生细胞因子和增殖能力均显著降低甚至功能耗竭, 可能是导致乙型肝炎病毒持续感染的机制之一<sup>[8-10]</sup>。本研究发现体外构建的 HBsAg 特异性 Tm 具有增殖活性, 在疾病状态下 Tm 数量不足或功能低下亦可能是乙型肝炎病毒慢性感染的机制之一。其二, 虽然 Tm 的形成、维持、再应答等确切的分子机制尚不清楚, 但随着研究的深入, 有研究者发现了组织定居 Tm<sup>[11-12]</sup>, 有研究者还发现了活动期结核病患者和 PPD 阳性健康人 Tm<sup>[13]</sup>。若深入研究机体 Tm 的特征, 细致探讨免疫记忆过程, 据此开发新型疫苗以防治疾病, 这将是疫苗研究与开发的目标; 且当前判断疫苗有效性持续的时间尚需长期观察, 若通过检测记忆细胞的特征判断疫苗的效果或可以简化评估流程。上述设想的实现均需体外检测 Tm。

本研究为体外构建方便、准确和灵敏的 Tm 模型提供了一种依据。其一, 目前很少有建立探索人体 Tm 免疫功能的新方法, 倘若在体外直接用抗原表位肽的 MHC 四聚体技术分离特异性 Tm, 或者用免疫磁珠吸附法纯化机体内含量极少的特异性 Tm, 则会费时、费力且费用昂贵。而本研究的血细胞标本来源于

人体, 因而操作比较简便。其二, 一些研究者利用动物模型构建 Tm, 且抗原以多糖为主、缺乏乙肝病毒表面抗原特异性的 Tm, 因而准确性有限<sup>[13-14]</sup>。其三, 本研究采用了流式细胞仪检测 Tm, 灵敏度较高; 且发现中剂量实验组、高剂量实验组分别比低剂量实验组 CD45RO+CD4+Tm 增殖活性更高, 这为体外获得丰富的 Tm 提供实例。

本研究实验组的淋巴细胞经 HBsAg 诱导, 而自身对照组的淋巴细胞未经 HBsAg 诱导且其余条件严格控制, 结果显示实验组比相应自身对照组的 CD45RO+CD4+Tm 的百分率更显著, 提示实验组产生了 HBsAg 特异性 CD45RO+CD4+Tm。故体外构建 HBsAg 特异性 Tm 是可行的。本文总结了依靠 DC 负载 HBsAg 与自身淋巴细胞共培养技术, 发现在体外能够构建 HBsAg 特异性 CD45RO+CD4+Tm 且具有良好增殖活性。但 Tm 依据 TCR 分类则种类繁多, 本研究以 HBsAg 特异性 CD45RO+CD4+Tm 为例, 为探索免疫记忆机制仅仅迈出了第一步。有关免疫记忆持续时间的分子机制、再次应答能力增强的分子机制等尚不明; 且本研究关于 Tm 与性别、年龄段的关系尚未详细探讨, 有待扩大样本深入探究。

#### 参考文献:

- [1] 王贵强, 王福生, 庄辉, 等. 慢性乙型肝炎防治指南 [J]. 中国医学前沿杂志, 2019, 11(12): 51-77.
- [2] 李生伟, 李钺, 刘作金, 等. HBsAg 冲击的树突状细胞疫苗的制备及免疫活性研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(6): 813-816.
- [3] 汪晓莺, 孙晓雷, 汤伟, 等. HBsAg 体外冲击的慢性乙型肝炎患者树突状细胞的生物学特性及其对 HBV 特异性 CTL 的诱导作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19(12): 850-853.
- [4] 陈国民. 治疗性乙型肝炎疫苗研究反思 [J]. 科技导报, 2013, 31(1): 71-74.
- [5] 黄国林, 陈端凯, 唐乾利.  $\gamma\delta$ T 细胞在创面治疗中的作用及其影响因素研究进展 [J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(3): 361-364.
- [6] 龚睿, 周艳, 郭晓萍, 等. 唑来膦酸/白介素-2 诱导的中国恒河猴外周血  $\gamma\delta$ T 细胞体外扩增 [J]. 武汉大学学报(理学版), 2020, 66(1): 81-86.
- [7] Tseng TC, Huang LR. Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus [J]. J Infect Dis, 2017, 216(Suppl 8): S765-S770.
- [8] Bertolotti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection [J]. Gut, 2012, 61(12): 1754-1764.
- [9] Wu J, Han M, Li J, et al. Immunopathogenesis of HBV Infection [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 117(9): 71-107.
- [10] 刘响, 吴长有. 记忆性 T 细胞的形成、维持和功能 [J]. 生

命科学,2010,22(6):506-514.

- [11] 余思菲,吴长有. 组织定居记忆性 T 细胞的免疫学特征研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2017,33(7):1093-1100.
- [12] Zou Y,Zhu H,Pan M. 995 Identification of CD4+CD69 + tissue- resident memory T cell in pemphigus lesions [J]. Journal of Investigative Dermatology,2019,139(5):321-324.
- [13] 牛翰婕,程小星,王心静. 结核抗原特异性 CD4<sup>+</sup> 中央型记忆 T 细胞的检测及分布特性研究[J]. 第三军医大学学报,2009,31(16):1549-1551.
- [14] 邢利和,马文平,王友臣,等. HBsAg 致敏的树突状细胞体外抗乙型肝炎病毒的效应[J]. 解放军医学杂志,2007,32(1):39-42.
- [15] 孙晓雷,苏丽,汤伟,等. HBsAg 体外冲击的慢性乙肝患者树突状细胞对 HBV 特异性 CTL 的诱导作用[J]. 南通医学院学报,2004,24(4):367-368.
- 收稿日期:2021-02-27;修回日期:2021-03-26
- (上接第 313 页)
- [8] Mohamed Hoesein FA, de Jong PA, Lammers JW, et al. Airway wall thickness associated with forced expiratory volume in 1 second decline and development of airflow limitation[J]. Eur Respir J,2015,45(3):644-651.
- [9] Yang MJ, Du YJ, Xu ZB, et al. Functional Effects of WNT1-Inducible Signaling Pathway Protein-1 on Bronchial Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation in OVA-Induced Airway Remodeling [J]. Inflammation,2016,39(1):16-29.
- [10] Yang CH, Tsao CF, Ko WS, et al. The Oligo Fucoidan Inhibits Platelet-Derived Growth Factor-Stimulated Proliferation of Airway Smooth Muscle Cells [J]. Mar Drugs,2016,14(1):15.
- [11] Chang Y, Al-Alwan L, Risse PA, et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation[J]. FASEB J,2012,26(12):5152-5160.
- [12] Oh CK, Geba GP, Molfino N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma [J]. Eur Respir Rev,2010,19(115):46-54.
- [13] Prabhala P, Bunge K, Ge Q, et al. Corticosteroid-Induced MKP-1 Represses Pro-Inflammatory Cytokine Secretion by Enhancing Activity of Tristetraprolin (TTP) in ASM Cells[J]. J Cell Physiol,2016,231(10):2153-2158.
- [14] 陈晶,宋曦,黄小琪. 六味地黄颗粒干预下的哮喘大鼠模型肺组织中 TGF- $\beta$ 1 的变化[J]. 右江民族医学院学报,2016,38(2):139-142.
- [15] 卢虹蓓,张维溪,李昌崇. 哮喘大鼠气道平滑肌细胞 ERK 信号通路调控 Smad6/7 的研究[J]. 医学研究杂志,2012,41(10):42-46.
- [16] 赵华杰,郭宁,杨凌霄,等. 木姜子干果挥发性成分的提取与分析[J]. 香料香精化妆品,2017(5):1-5.
- [17] 侯颖辉,李德文,于二汝,等. 木姜子和木姜子挥发油成分比较[J]. 中国调味品,2017,42(7):139-142.
- [18] 陈守旗,吴娇,周利娟. 樟科杀虫抑菌活性及其活性成分研究进展[J]. 中国植保导刊,2016,36(3):19-27,35.
- [19] 赵媛媛,杨倩茹,郝江波,等. 金银花与忍冬藤及叶药理作用差异的研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(13):2422-2427.
- [20] 贾海燕,滕旭东,王慧,等. 复方忍冬藤提取物促进骨折愈合及抗炎作用研究[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(1):275-281.
- [21] 王慧,张海娟,李志东. 忍冬藤提取物对兔离体肠平滑肌的舒张作用及其机制[J]. 中国农业科学,2017,50(2):372-379.
- [22] 陈焰. 金银花与忍冬藤的药理作用差异简述[J]. 中国继续医学教育,2017,9(17):198-199.
- 收稿日期:2021-01-16;修回日期:2021-05-19