

## 实验技术与方法

## 基于微流控技术的橙黄决明素对 HepG2 细胞的体外安全性评估

陈頔,殷继永,杨倬,秦文,孙静,刘宇赫,朴玮,黄建,霍军生

(中国疾病预防控制中心营养与健康所,北京 100050)

**摘要:**目的 本研究将微流控技术运用到 HepG2 细胞模型构建及对橙黄决明素的潜在体外安全性评估中。方法 以鼠尾胶原 I 型(1.3 mg/mL)+明胶(7.5%)构建仿真人微环境,对乙酰氨基酚(APAP)作为阳性对照组,通过不同浓度橙黄决明素对 HepG2 细胞的增殖活性、活/死细胞染色和功能性生化指标进行体外安全性评估。结果 该平台实现了 HepG2 细胞的稳定培养与应用,经 72 h 培养,细胞成团增殖。橙黄决明素连续处理 48 h 后计算细胞存活率,结果表明随着橙黄决明素浓度的增加,0、50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  细胞存活率分别为 100.0%、95.3%、90.3% 和 81.6%,与空白对照组比较,尤以 200  $\mu\text{mol/L}$  差异最为显著( $P<0.05$ );红色标记的死细胞数量随橙黄决明素浓度增加逐渐增多,绿色标记的活细胞数量则逐渐减少;尿素氮(BUN)含量随着浓度的增加而显著降低,与空白对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )比较,50~200  $\mu\text{mol/L}$  组差异具有显著性( $P<0.05$ ),且 200  $\mu\text{mol/L}$  与 APAP 组 BUN 含量接近;谷丙转氨酶、谷草转氨酶和乳酸脱氢酶活性之间随着浓度的变化均无显著性差异。结论 微流控平台 HepG2 细胞模型适用性良好,该应用为微流控技术与药食同源物质体外安全性评估研究的结合提供了新思路和新方法,在毒理学体外研究方法上具有一定互补可行性。

**关键词:**橙黄决明素; HepG2 细胞; 微流控技术; 安全性评估

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)05-0687-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.05.008

*In vitro* safety assessment of aurantio-obtusin in HepG2 cells based on microfluidic technology

CHEN Di, YIN Jiyong, YANG Zhuo, QIN Wen, SUN Jing, LIU Yuhe, PIAO Wei,

HUANG Jian, HUO Junsheng

(National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To apply microfluidic technology to the human hepatoma (HepG2) cell model construction and potential *in vitro* safety assessment of aurantio-obtusin. **Methods** A simulated human microenvironment was constructed with rat tail collagen type I (1.3 mg/mL) + gelatin (7.5%), and acetaminophen (APAP) was used as a positive control. The proliferation activity, live/dead cell staining, and functional biochemical indicators of HepG2 cells were assessed for cell safety using different concentrations of aurantio-obtusin *in vitro*. **Results** The stable culture and application of HepG2 cells were achieved with the platform; after 72 h of culture, HepG2 cells proliferated in clusters. After 48 h of continuous treatment with aurantio-obtusin and an increase in the concentration of 0, 50, 100, and 200  $\mu\text{mol/L}$ , the cell viability was 100.0%, 95.3%, 90.3%, and 81.6%, respectively. Compared with the blank control group, the cell inhibitory effect was especially significant at 200  $\mu\text{mol/L}$  ( $P<0.05$ ); the number of red-marked dead cells gradually increased with the increase in concentration, and the green-marked number of cells gradually decreased. The content of blood urea nitrogen (BUN) decreased significantly with the increase in concentration. Compared with the blank control group, the difference was significant in the 50-200  $\mu\text{mol/L}$  group ( $P<0.05$ ), and the content in the 200  $\mu\text{mol/L}$  group was close to that in the APAP group. No significant difference was observed in the activities of alanine transaminase, aspartate transaminase, and lactate dehydrogenase at different concentrations. **Conclusion** The microfluidic platform HepG2 cell model has good applicability provides a new approach for combining microfluidic technology and the safety assessment of medicine and food homology substances, and has complementary feasibility in toxicological research methods *in vitro*.

**Key words:** Aurantio-obtusin; HepG2 cells; microfluidic technology; safety assessment

收稿日期:2022-09-08

基金项目:国家财政项目(131031107000210002);国家重点研发计划(2018YFC1602103)

作者简介:陈頔 女 助理研究员 研究方向为营养干预 E-mail: chendi@ninh.chinacdc.cn

通信作者:殷继永 男 研究员 研究方向为营养与食品卫生学 E-mail: yinji@ninh.chinacdc.cn

根据国家卫生健康委国卫食品发[2021]36号文件通知,药食同源物质是指既可以当作食品原料作为传统食品,又列入《中华人民共和国药典》当作药物治疗疾病的物质。随着国民生活质量提升和健康意识的逐渐提高,越来越多的药食同源物质引起人们的关注并被使用,但药食同源物质尚存在毒性成分不明、安全性评估方法不完善等问题。

橙黄决明素又名1,3,7-三羟基-2,8-二甲氧基-6-甲基蒽-9,10-二酮(Aurantio-obtusin, AUR),是药食同源物质决明子中的蒽醌类成分之一<sup>[1]</sup>,作为决明子中重要的生物活性成分之一,其具有抗炎、抗氧化、抗高血压和神经保护等多重功效<sup>[2]</sup>。HU等<sup>[3]</sup>于2022年发表的相关研究发现,橙黄决明素作用于小鼠和斑马鱼模型时,会诱导轻度肝毒性,以肝功能障碍和肝细胞坏死伴炎症浸润为特征。XU等<sup>[4-5]</sup>发现,大鼠连续灌胃不同剂量(4、40和200 mg/kg)橙黄决明素28 d后,40和200 mg/kg剂量组可能导致肝脏损伤,而4 mg/kg剂量组与对照组在肝组织病理学变化方面没有明显差异。

目前,毒理学安全性评估手段通常包括动物和体外模型评价实验。动物评价实验不仅耗时长、费用昂贵、且存在由于种属差异而使结果不能准确外推于人类,无法准确反映人体的真实情况等问题<sup>[6-7]</sup>。另外,目前全社会也希望尽量减少对动物的使用量以达到伦理要求。在此环境下,体外细胞培养方法作为较好的候选方法,广泛替代了动物实验。但细胞在体外的培养环境明显不同于人体内环境,在细胞-细胞和细胞-因子间相互作用等一系列关键生理参数的模拟方面均受到限制,无法重现体内相关的反应<sup>[8-9]</sup>。

鉴于以上方法存在的缺陷及目前橙黄决明素评估研究相对匮乏等问题,本文引入了微流控平台技术。该技术作为目前发展较为迅速的高新技术,以其分析速度快、高通量、实时动态观察、微量化的仿真模拟人体真实情况等特点,为广泛的细胞生物医学应用提供了一个有前途的平台。本研究拟通过微流控技术构建肝细胞仿生模型,使微流控技术与风险评估相结合,有效评估橙黄决明素在微流控肝模型下的细胞效果,以此更真实贴切地还原人体对于该物质的反应。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

MCO-18AIC型CO<sub>2</sub>培养箱(日本Panasonic公司);微流控细胞芯片分析仪CellASIC ONIX2(德国Merck公司);荧光倒置显微镜ECLIPSE TS100(日本

Nikon公司);低温离心机Thermo Scientific Legend Micro(美国Thermo公司);SpectraMax i3x酶标仪(美国Molecular Devices)。

冻存人肝脏肿瘤细胞系HepG2细胞(中国科学院上海细胞库);橙黄决明素、对乙酰氨基酚(Acetaminophen, APAP)、明胶和鼠尾胶原蛋白I型(美国阿拉丁公司);内皮细胞ECM细胞培养基(美国ScienCell公司);DMEM细胞培养基(美国Invitrogen公司);胰蛋白酶-EDTA消化液(0.25%)(Solarbio公司);胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)(美国Gemini公司);活/死细胞双染试剂盒(KeyGEN BioTECH公司);CCK-8试剂盒(Biosharp公司);乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)、谷草转氨酶(Aspartate transaminase, AST)、谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)和尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)试剂盒(南京建成公司)。

### 1.2 橙黄决明素和APAP母液的制备

称取橙黄决明素至二甲基亚砜中,定容至终浓度30 mmol/L,用枪头吹打均匀并分装于EP管,封口膜密封后冰箱4℃保存。母液临用前使用内皮细胞ECM细胞培养基稀释至所需浓度,4 000 r/min离心8~10 min,取上清液待用。肝损伤药物APAP以DMEM培养基溶解,配成60 mmol/L,使用时稀释至所需浓度。

### 1.3 HepG2细胞的培养

HepG2细胞培养于DMEM培养基中(10%胎牛血清),37℃、5% CO<sub>2</sub>浓度条件下培养2~3 d。待生长融合达到80%~90%时,采用0.25%胰蛋白酶消化细胞并传至二代。

### 1.4 微流控平台上HepG2细胞模型构建

将细胞培养瓶中融合度达80%~90%的贴壁HepG2细胞用0.25%的胰蛋白酶在5% CO<sub>2</sub>浓度、37℃条件消化2 min,10%胎牛血清的DMEM培养基终止消化,收集液体于离心机中1 000 r/min离心3 min,去除上清液,加入100 μL 10%胎牛血清的DMEM培养基重悬定容后细胞计数至20×10<sup>6</sup> cells/mL止。按照顺序依次加入10×PBS、0.1% NaOH、1.3 mg/mL鼠尾胶原蛋白I型和7.5%明胶反复吹打混匀定容至20×10<sup>6</sup> cells/mL的HepG2细胞液中,至终细胞胶液浓度为2.54×10<sup>6</sup> cells/mL。进入微流控系统(图1),Cellasic M04S细胞培养板(图2)A6-D6分别加入2.54×10<sup>6</sup> cells/mL细胞胶液,A1-D1分别加入ECM,在37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下加压0.3 psi细胞进样连续培养24 h。

### 1.5 橙黄决明素处理HepG2细胞毒性作用

HepG2细胞贴壁24 h后,将含有不同浓度橙黄决



注:微流控系统构成(包括)一个计算机软件接口、一个气动流量控制器,以及密封在微流控板上的透明歧管

图1 Cellasic 微流控装置图

Figure 1 Cellasic microfluidic device

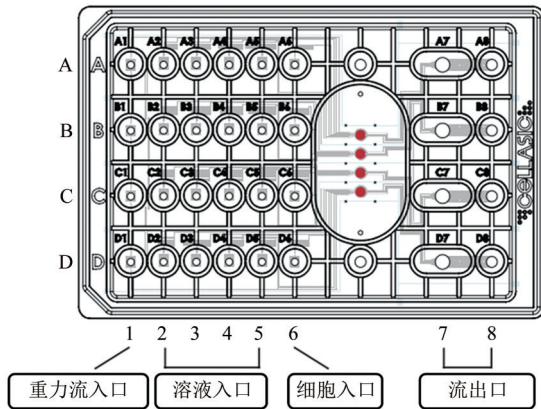


图2 Cellasic M04S细胞培养板结构示意图

Figure 2 Schematic diagram of the structure of Cellasic M04S cell culture plate

明素(0、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ )和含有(APAP 15  $\mu\text{mol/L}$ )、橙黄决明素(50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ )的细胞培养液分别加入两块 Cellasic M04S 细胞培养板通道 A5-D5, 通过压力泵加压 1.3 psi 持续 48 h 灌注, 对细胞进行毒性观察。48 h 后, 用 CCK8 试剂盒在 A2-D2 中各加入 120  $\mu\text{L}$  溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育 3 h, 压力设置为 3.8 psi。吸出 A7-D7 中液体, 收集于 96 孔板中, 酶标仪 450 nm 处测定吸光度, 每个浓度平行测定 3 个重复孔。加入 130  $\mu\text{L}$ /孔 PBS 于 A3-D3 灌注冲洗 1 min。A4-D4 加入 100  $\mu\text{L}$ /孔活/死试剂盒试剂细胞双染(2  $\mu\text{g/mL}$ ) 20 min, PI 和 Calcein-AM 的工作浓度分别为 8 和 5  $\mu\text{mol/L}$ 。荧光显微镜下观察和拍照, 评估细胞生存情况, 并计算细胞活力。以上实验均重复 3 次。

### 1.6 橙黄决明素对 HepG2 细胞功能的影响

给予不同剂量橙黄决明素 48 h 后, 分别收取 A7-D7 细胞代谢产物, 并按照南京建成试剂盒说明书进行生化指标 ALT、AST、LDH 和 BUN 评估。以上实验均重复 3 次。

### 1.7 统计学分析

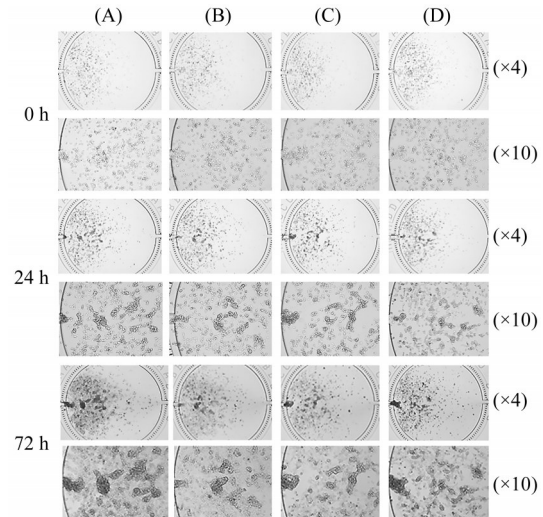
采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 所有数据均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 各组实验均进行 3 次重

复试验, 组间比较采用方差齐性检验及单因素方差分析与 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 微流控平台 HepG2 细胞生长状态

由图 3 可见, 通过倒置显微镜实时观察发现, 微流控平台培养 24 h 即可完成 HepG2 细胞贴壁, 溶于明胶和鼠尾胶原蛋白 I 型混合胶液下的 HepG2 细胞呈现圆球状一簇簇扎堆分布, 细胞生长饱满, 培养至 72 h 后, 4 个培养室内的细胞连片饱满平铺于培养室内, 生长状态完好, 未出现肉眼可见明显的悬浮细胞碎片等。显微镜观察结果显示该基质环境适合细胞的正常生长, 细胞数量显著增加, 并能充分支持完成后续相关的研究。



注:0、24、72 h 下的生长状态图 A-D 分别代表 4 个培养室 HepG2 细胞在(x4)和(x10)镜头下

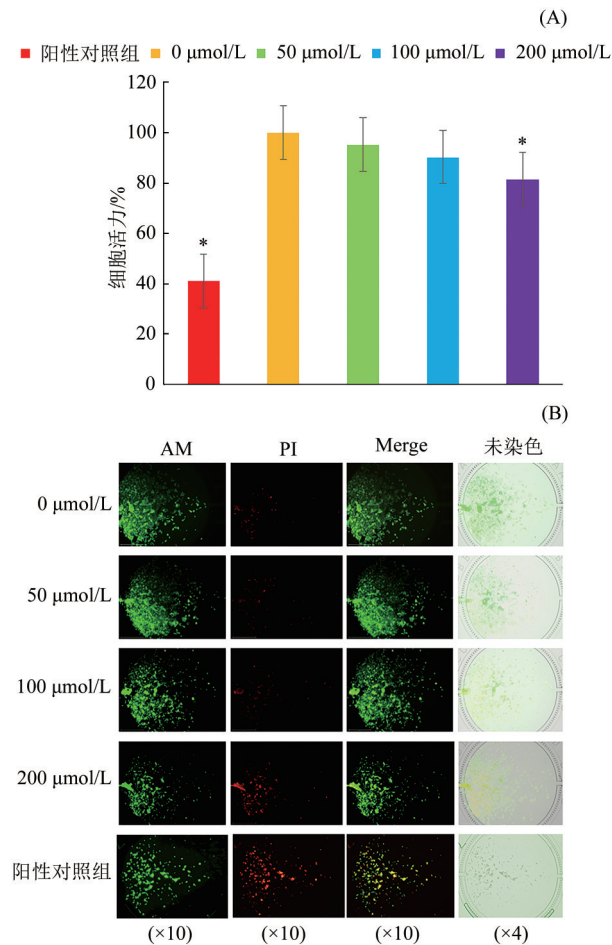
图3 微流控平台上培养 HepG2 细胞生长状态图

Figure 3 Growth state of HepG2 cells cultured on the microfluidic platform

### 2.2 橙黄决明素对微流控平台 HepG2 细胞活力的影响

由图 4 可知, 经不同浓度橙黄决明素对 HepG2 处理 48 h 后, 随着浓度的增加, 对细胞生长的抑制作用逐渐增强, 尤其以 200  $\mu\text{mol/L}$  最为显著, 细胞存活率分别为 100.0%、95.3%、90.3% 和 81.6%, 与空白对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )比较, 200  $\mu\text{mol/L}$  橙黄决明素和阳性对照组存活率均具有显著性差异( $P < 0.05$ )。加入染料孵育 30 min 后显微镜荧光通道观察, 随着橙黄决明素的浓度逐步增加, 视野内红色标记的死细胞荧光强度逐步增强, 绿色标记的活细胞荧光强度逐渐减弱, 细胞凋亡程度随之增加, 尤其以 200  $\mu\text{mol/L}$  浓度视野观察最为显著, 但相较于于





注:与空白对照组(0 μmol/L)比较,\*表示  $P < 0.05$

图4 HepG2细胞在微流控平台培养下暴露于橙黄决明素不同浓度(0~200 μmol/L)的细胞活力(A)和活/死细胞荧光染色结果(B)

Figure 4 Fluorescence staining results of cell viability (A) and live /dead cells of HepG2 cells exposed to different concentrations (0–200 μmol/L) (B) of Aurantio-obtusin in a microfluidic platform

阳性对照组,红色死细胞荧光强度略弱。

### 2.3 橙黄决明素对微流控平台 HepG2 细胞功能指标的影响

与空白对照组相比,不同浓度的橙黄决明素对 HepG2 细胞的 ALT、AST 和 LDH 活性均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),BUN 的含量随着浓度的增加呈梯度的显著性降低 ( $P < 0.05$ ),且 200 μmol/L 剂量组 BUN

含量与阳性对照组接近。与阳性对照组比较,橙黄决明素 50 μmol/L 剂量组 BUN 含量显著增加 ( $P < 0.05$ ),结果详见表 1。

### 3 讨论

传统的毒理学动物实验,在目前的药食同源物质安全性评估中不可或缺,通过大量解剖检查、血液生化指标及病理形态学等检验其毒性,但随着目前越来越多的药食同源物质的安全性评估,新的发展需求以及全社会对实验动物保护概念的关注,亟须一种更为简便快速的体外方法来进行前期的大量筛查以缩短不必要的周期消耗。鉴于以上需求的存在,体外细胞极大地满足了实验的需要。出于对人体安全性考虑,探索更接近人体真实环境的评估方法并确定合理精准的橙黄决明素安全毒性范围极其重要。

实验选用了较为成熟的 CellASIC®-ONIX2 微流控细胞芯片分析仪和 Cellasic M04S 哺乳动物细胞培养板,真正实现动态细胞培养和分析。与传统的细胞培养模式相比,3D 培养环境因更接近体内的真实状态而被作为新型培养模式得到广泛关注<sup>[10]</sup>。为更贴切地仿生肝芯片在人体内的代谢功能,实验在 HepG2 细胞中加入了具有三维细胞培养基质生长环境的鼠尾胶原 I 型及明胶。凝胶材料大多具有良好的生物相容性,特别是从动物组织中提取的鼠尾胶原 I 型。作为新型首选的细胞外基质,除了可与整合素受体相互作用来调节基因的表达外,还可为细胞的生长和分化提供支持,已被广泛应用于细胞增殖、药物毒性等多种研究中<sup>[10-11]</sup>。ZHENG 等<sup>[12]</sup>利用软光刻方法将内皮细胞直接注入和静置培养形成了类似于血管的体外细胞培养模型。明胶作为其他生物相容的水凝胶,具有优良的亲和性、高度分散稳定性和可逆性等物理特性<sup>[13]</sup>。王俊等<sup>[14]</sup>发现,明胶与鼠尾胶是小鼠淋巴管内皮细胞生长较好的支持物。通过大量的实验摸索对比和条件优化筛选发现,鼠尾胶原 I 型(1.3 mg/mL)+明胶(7.5%)能够恰好使胶液包裹住 HepG2 细胞,实现

表 1 橙黄决明素处理 48 h HepG2 细胞 ALT、AST 和 LDH 活性及 BUN 含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The effect of Aurantio-obtusin on the activity of ALT, AST and LDH and the content of BUN in 48 h HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/(μmol/L)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	LDH/(U/L)	BUN/(mmol/L)
阳性对照组	15	15.61±0.82	9.67±0.85 <sup>*</sup>	888.60±60.14	0.50±0.01 <sup>*</sup>
空白对照组	0	16.88±2.11	6.74±0.22 <sup>#</sup>	927.65±44.67	5.36±0.89
橙黄决明素	50	15.36±2.78	7.75±0.67	916.98±1.94	1.79±0.35 <sup>#*</sup>
	100	15.59±1.22	7.54±0.40	934.39±27.90	0.87±0.25 <sup>*</sup>
	200	15.73±1.91	7.54±1.56	882.12±35.57	0.47±0.05 <sup>*</sup>
F 值		0.198	3.096	0.715	43.495
P 值		0.929	0.123	0.616	0.000

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与阳性对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$

精准的条件可控,不但使细胞实现了稳定的增殖和良好的形态分布,又不会造成浓度过高而影响了整个培养室通道液体的流动性。

通过细胞染色、活力鉴定和功能性评价等实验结果看出,随着橙黄决明素浓度的增加,HepG2 细胞活性明显下降,尤其在 200  $\mu\text{mol/L}$  时;功能指标方面,随着浓度的增加,ALT、AST 和 LDH 未出现显著性的增加,BUN 含量则显著降低,且存在量效关系。刘俊<sup>[15]</sup>在传统的 96 孔板 HepG2 细胞的研究中发现,橙黄决明素处理 48 h,浓度在 60  $\mu\text{mol/L}$  时,对细胞活性具有显著性抑制作用,且 ALT、AST 和 LDH 活性均显著性增加,这与本文研究结果存在一定的差异。本文研究结果在细胞活性显著性抑制浓度上要高于传统细胞培养;功能指标上,微流控平台评估 ALT、AST 和 LDH 活性均未出现显著性差异,目前分析的主要原因可能在于,静态传统培养环境易造成细胞周边营养物质消耗和代谢物堆积,使细胞的生长受到抑制;而微流控技术由于能够不断更新营养物质并及时排除代谢废物,全过程的动态培养使得细胞能够不断接受新鲜培养基而维持增长,造成了该实验结果整体毒性浓度高于传统培养方式的结果。

本次研究将已有的微流控技术整合到细胞模型中,提高模型与体内微环境的一致性,提升细胞安全性评估的准确性,并应用到药食同源物质的评价领域,最终与传统的毒理学研究方法形成互补、认证和完善。新的平台的毒理学应用目前尚处在研究初期,还需要更多的时间来验证与完善,目前依然需要进一步确认的问题包括:试验受试物暴露时间是否充足、选取的酶指标是否灵敏适用、细胞系选择是否合适等,以便未来能够精准合理地配合传统毒理学方法运用到安全性评估中。

## 参考文献

- [1] 郭聪颖. 基于 PI3K/Akt/GLUT4 信号通路结合网络药理学研究橙黄决明素对改善胰岛素抵抗作用的机制[D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- GUO C Y. The mechanism of insulin resistance based on PI3K/Akt/GLUT4 signaling pathway and combining with network pharmacology by aurantio-obtusin [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2020.
- [2] HOU J, GU Y, ZHAO S, et al. Anti-inflammatory effects of aurantio-obtusin from seed of *Cassia obtusifolia* L. through modulation of the NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2018, 23(12): E3093.
- [3] HU M J, LIN L, LIU J, et al. Aurantio-obtusin induces hepatotoxicity through activation of NLRP3 inflammasome signaling [J]. *Toxicology Letters*, 2022, 354: 1-13.
- [4] XU L L, LI J, TANG X L, et al. Metabolomics of aurantio-obtusin-induced hepatotoxicity in rats for discovery of potential biomarkers[J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, 24(19): 3452.
- [5] XU L L, WANG Y G, MA Z C, et al. Urine metabolomics study on potential hepatotoxic biomarkers identification in rats induced by aurantio-obtusin[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 1237.
- [6] JEON J S, BERSINI S, GILARDI M, et al. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(1): 214-219.
- [7] ZHANG C, ZHAO Z Q, ABDUL RAHIM N A, et al. Towards a human-on-chip: Culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments [J]. *Lab Chip*, 2009, 9(22): 3185-3192.
- [8] DERELI-KORKUT Z, AKAYDIN H D, AHMED A H R, et al. Three dimensional microfluidic cell arrays for *ex vivo* drug screening with mimicked vascular flow [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(6): 2997-3004.
- [9] GRIFFITH L G, SWARTZ M A. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro* [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(3): 211-224.
- [10] 林路遥. 微流控琼脂糖凝胶芯片在细胞体外培养模型中的应用[D]. 北京: 清华大学, 2017.
- LIN L Y. Application of microfluidic agarose hydrogel chip in the study of cell *in vitro* culture model [D]. Beijing: Tsinghua University, 2017.
- [11] 曲圆. 新一代血脑屏障 3D 体外模型的构建与应用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- QU Y. Construction and application of A new generation of blood-brain barrier 3D *in vitro* model [D]. Changchun: Jilin University, 2019.
- [12] ZHENG Y, CHEN J M, CRAVEN M, et al. *In vitro* microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(24): 9342-9347.
- [13] 周扬, 马良, 戴宏杰, 等. 基于凝胶特性改善的多糖-明胶互作及调控研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(11): 277-284.
- ZHOU Y, MA L, DAI H J, et al. Recent progress in polysaccharide-gelatin interaction and its regulation for improved gel properties [J]. *Food science*, 2020, 41(11): 277-284.
- [14] 王俊, 郭燕, 章必成, 等. 小鼠淋巴管内皮细胞体外不同培养体系的比较[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(16): 1569-1571.
- WANG J, GUO Y, ZHANG B C, et al. Comparison of different culture systems for mouse lymphatic endothelial cells *in vitro* [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2007, 29(16): 1569-1571.
- [15] 刘俊. 决明子中主要肝毒性蒽醌类成分鉴别及其毒性作用机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2021.
- LIU J. Identification of hepatotoxic anthraquinones in cassia seed and study on the underlying mechanisms of hepatotoxicity [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2021.