

研究报告

保健食品提高缺氧耐受力功能评价的替代性研究

杨隽¹,刘蕾¹,张大超²,沈佳琪³,黄燕烽³,陶国华¹,洪新宇¹(1. 上海市疾病预防控制中心,上海 200336;2. 中国保健协会,北京 100142;
3. 杭州环特生物科技股份有限公司,浙江 杭州 310051)

摘要:目的 探讨保健食品提高缺氧耐受力功能替代性新试验方法的可行性。方法 采用小鼠耐缺氧实验,建立斑马鱼缺氧模型,并检测样品对斑马鱼缺氧运动的改善情况及抗缺氧诱发的红细胞增多症。以连二亚硫酸钠处理原代培养乳鼠心肌细胞构建了化学性缺氧细胞模型,样品处理后进行细胞活性与乳酸脱氢酶(LDH)活性检测,分别验证样品对缺氧耐受能力的影响。结果 与正常对照比较,样品可以提高小鼠的缺氧耐受力;与缺氧模型对照比较,可以改善斑马鱼缺氧运动障碍、缺氧诱发的红细胞增多症,可以缓解心肌细胞缺氧导致的细胞活性降低及LDH活性升高。结论 用体内外三种试验体系均能检出样品具有提高缺氧耐受的能力,耐缺氧检验的动物试验替代方法的推出具有可行性。

关键词:小鼠;斑马鱼;心肌细胞;耐缺氧

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2023)02-0179-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.02.005

Studies on the alternative evaluation of improving hypoxia tolerance function in health foodsYANG Jun¹, LIU Lei¹, ZHANG Dachao², SHEN Jiaqi³, HUANG Yanfeng³,
TAO Gonghua¹, HONG Xinyu¹

(1. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 2. China Health Association, Beijing 100142, China; 3. Hunter Biotechnology, Inc., Zhejiang Hangzhou 310051, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of new test methods for evaluation of improving hypoxia tolerance function in health food. **Methods** Hypoxia tolerance experiments were carried out on mice. The zebrafish hypoxia model was established, and the improvement of zebrafish hypoxia movement and erythrocytosis were tested. A chemical hypoxia cell model was constructed with sodium disulfite, and cell activity and lactate dehydrogenase (LDH) activity were detected to verify their effect on hypoxia tolerance. **Results** Compared with normal control group, the hypoxia tolerance was improved in mice by health food sample. Compared with hypoxia model control groups, the sample improved zebrafish hypoxia, hypoxia-induced erythrocytosis, and alleviated the reduced cellular activity and increased LDH activity caused by cardiomyocyte hypoxia. **Conclusion** The ability of the sample to improve hypoxia tolerance can be detected by three test systems *in vitro* as well as *in vivo*, and the introduction of alternative methods to animal testing for hypoxia tolerance tests is feasible.

Key words: Mouse; zebrafish; cardiomyocytes; hypoxia tolerance

目前国内评价保健食品的耐缺氧能力主要使用大鼠、小鼠、兔子等哺乳动物作为实验动物,存在实验周期长、耗资大、特异性差等缺点。寻找哺乳动物的替代试验方法需符合3R原则,近年来已越来越受到关注。斑马鱼是一类与人类基因有着高

度同源性的小型热带淡水鱼,具有产量大、发育速度快、方便观察等优点^[1-2]。目前斑马鱼已作为研究胚胎发育的重要模式生物,常用于构建疾病模型进行药物实验及相关安全性评价^[3-4]。由于细胞模型可排除机体内各脏器间的干扰,且操作容易、便于观察、符合伦理要求,解决了动物模型和临床研究的局限性,近年来被广泛应用于分子生物、毒理、药理研究。

本研究分别以小鼠、斑马鱼为实验动物,并构建细胞模型,验证同一维生素功能饮料对机体耐缺氧能力的影响,并通过比较体内外试验的结果,进

收稿日期:2021-12-30

基金项目:市场监督管理总局特殊食品司项目

作者简介:杨隽 男 副主任技师 研究方向为食品毒理与功能学

E-mail: yangjun@scdc.sh.cn

通信作者:洪新宇 女 主任医师 研究方向为食品毒理与功能学

E-mail: hongxinyu@scdc.sh.cn

一步探讨保健食品及其原料耐缺氧功能的替代性试验方法及其可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

某维生素功能饮料,规格为310 mL/罐,成人口服推荐摄入量为每日310 mL/60 kg·BW。

1.1.2 实验动物

健康封闭群KM雌性成年小鼠80只,SPF级,体质量18~22 g,购自上海杰思捷实验动物有限公司[SPF,SCXK(沪)2018-0004],饲养于上海市松江区南乐路1222-9号动物房[SYXK(沪)2018-0031]。饲料购自苏州双狮实验动物饲料科技有限公司,登记证号:苏饲证(2017)05005。饲养环境温度为22~24℃,湿度55%~68%。2日龄SD乳鼠10只,SPF级;野生型AB品系斑马鱼390尾,黑色素等位基因突变型半透明Albino品系斑马鱼390尾。饲养环境温度为28℃。

1.1.3 主要仪器与试剂

CO₂培养箱(美国Thermo公司)、酶标仪(德国BMG公司)、离心机(cence湘仪)、倒置显微镜(德国LEICA)、96孔细胞培养板(美国corning)、电子天平(美国METTLER)、电子体质量称(大和衡器)、恒温培养箱(日本EYELA)。

胰酶(美国gibco公司)、胎牛血清(美国gibco公司)、DMEM培养基(美国gibco公司)、D-Hank's液(武汉Procell公司)、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒(上海AMEKO公司)、四甲基偶氮唑蓝(MTT,美国Sigma),连二亚硫酸钠(分析纯,润德公司),亚硝酸钠(分析纯,上海国药)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠体内实验

1.2.1.1 实验动物分组

小鼠按体质量随机分为1/4原液组、1/2原液组、原液组三个实验剂量组(分别相当于人体推荐剂量的5倍、10倍、20倍)和一个正常对照组,1/4原液组、1/2原液组分别取受试物原液50、100 mL加蒸馏水至200 mL作为供试液,高剂量组给予受试原液,正常对照组给予蒸馏水。每只小鼠均按20 mL/kg·BW体积灌胃给样。每组10只小鼠,共120只。

1.2.1.2 缺氧耐受力实验

实验按照小鼠常压耐缺氧、亚硝酸钠中毒存活、急性脑缺血性缺氧三种方法进行^[5]。

常压耐缺氧实验:取40只小鼠,每组10只,灌胃15 d后,每只小鼠放入盛有5 g钠石灰的250 mL磨口瓶内,用凡士林密封瓶口,即刻计时,以呼吸停止为指标,精确测定小鼠耐缺氧的窒息时间。

亚硝酸钠中毒存活实验:取40只小鼠,每组10只,灌胃15天后,按240 mg/kg·BW体积腹腔注射亚硝酸钠(0.1 mL/10 g),即刻计时,精确记录小鼠存活时间。

急性脑缺血性缺氧实验:取40只小鼠,每组10只,灌胃15 d后,将小鼠自颈部逐只断头处死,立刻按秒表,精确记录每只小鼠断头后至张口喘气停止的时间。

1.2.2 斑马鱼体内实验

1.2.2.1 受试物对斑马鱼缺氧运动模型改善情况检测

本次试验设置3个浓度组、1个模型对照组、1个阳性对照组和1个正常对照组。选取180条4 dpf野生型AB品系斑马鱼于6孔板中,每孔均处理30尾斑马鱼,根据受试物对斑马鱼的最大检测浓度(Maximum tolerated concentration, MTC)为25 μL/mL,三个浓度组分别给予2.8、8.3和25 μL/mL受试物处理,阳性对照组给予500 μmol/L还原型谷胱甘肽处理,同时设置正常对照组(标准稀释水处理)和模型对照组。24 h后,每个实验组随机选择10尾斑马鱼,分配到各处理组。各组均更换溶液,除正常对照组外,再水溶给予氯化钴处理1.5 h以建立斑马鱼缺氧模型。处理结束后,测定斑马鱼的运动总距离(mm),进行定量分析。

1.2.2.2 受试物抗缺氧诱发的红细胞增多症检测

试验设置3个浓度组、1个模型对照组、1个阳性对照组和1个正常对照组。选取180条1 dpf黑色素等位基因突变型半透明Albino品系于6孔板中,每孔均处理30尾斑马鱼,3个浓度组分别给予2.8、8.3、25 μL/mL MTC样品处理,阳性对照组给予1 μg/mL羟基脲处理,同时设置正常对照组(标准稀释水处理)和模型对照组。每个实验组随机选择10尾斑马鱼,分配到不同受试物处理组。各组更换溶液,除正常对照组外,再以水溶给药方式,用氯化钴处理斑马鱼。处理结束后,测定斑马鱼尾部的红细胞信号(像素),进行定量分析。

1.2.3 细胞体外实验

1.2.3.1 原代心肌细胞培养

断颈处死10只出生2 d的SD大鼠乳鼠,取出心脏,去除大血管和心房。PBS反复冲洗以洗去血凝块和血细胞,将心室肌剪成1 mm³的小块后使用0.1%胰酶于37℃水浴中消化。收集细胞悬液接

种于培养瓶中,置于细胞培养箱中培养 2 h 以纯化心肌细胞。以 1×10^5 cell/孔将细胞接种于 96 孔细胞培养板上,置于细胞培养箱中继续培养 48 h 后进行后续实验。

1.2.3.2 细胞活性与乳酸脱氢酶活性检测

试验设置 4 个浓度组、1 个正常对照组和 1 个缺氧模型组,4 个浓度组分别使用 DMEM 培养基对成品原液进行 4、8、16、32 倍稀释后处理心肌细胞 30 min。处理结束后,去除原培养液,用 PBS 洗一次,换 DMEM,除正常对照组外,以 4 mmol/L 连二亚硫酸钠处理各组以诱导心肌细胞损伤,24 h 后检测细胞活性和 LDH 活性,用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度值。

1.3 统计学分析

数据经 SPSS 16.0 软件计算均数和标准差,并进行统计分析,采用方差分析和 Dunnett's T 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠缺氧耐受能力实验结果

表 1 显示,与正常对照组相比,受试物对小鼠常压耐缺氧效果不明显。表 2 显示,通过小鼠亚硝酸钠中毒存活实验发现,与正常对照组相比,受试物可延长小鼠亚硝酸钠中毒的存活时间,其中 1/4 原液组的小鼠存活时间显著提升($P < 0.05$)。表 3 显示,在小鼠急性脑缺血性缺氧实验中,与正常对照组相比,受试物 1/4 原液组小鼠断头后至张口喘气停止时间显著提高($P < 0.05$)。哺乳动物实验证明,受试物可以提高小鼠的缺氧耐受能力。

表 1 小鼠常压耐缺氧实验

组别	动物数/只	体质量/g	存活时间/s
正常对照组	10	26.6±3.5	1 885±372
1/4 原液组	10	26.6±3.5	1 658±247
1/2 原液组	10	25.2±2.7	1 745±213
原液组	10	27.3±2.5	1 494±196

表 2 小鼠亚硝酸钠中毒存活时间

组别	动物数/只	体质量/g	存活时间/s
正常对照组	10	26.1±3.3	1 474±282
1/4 原液组	10	26.1±3.3	2 222±448*
1/2 原液组	10	27.9±4.7	1 707±350
原液组	10	27.3±3.1	1 694±322

注:*表示与正常对照组比较, $P < 0.05$

2.2 斑马鱼耐缺氧能力实验结果

由表 4 可见,与正常对照组比较,模型对照组显著缩短了总运动距离($P < 0.05$),说明构建斑马鱼缺氧运动模型成功。与模型对照组相比,受试物组

表 3 小鼠急性脑缺血性缺氧实验

组别	动物数/只	体质量/g	小鼠断头后至张口喘气停止时间/s
正常对照组	10	26.1±0.9	13.3±1.8
1/4 原液组	10	24.2±3.3	15.3±1.8*
1/2 原液组	10	25.4±3.7	12.5±2.3
原液组	10	27.9±4.0	13.8±1.4

注:*表示与正常对照组比较, $P < 0.05$

可提高斑马鱼在缺氧情况下的运动距离,其中处理浓度为 8.3、25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,可显著增加斑马鱼的总运动距离($P < 0.05$)。

由表 5 可见,根据缺氧斑马鱼红细胞增多症的实验结果,与正常对照组比较,模型对照组显著增加了斑马鱼尾部血管红细胞染色强度($P < 0.05$),说明构建斑马鱼缺氧运动模型成功。与模型对照组相比,8.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 受试物可显著降低斑马鱼尾部血管红细胞染色强度($P < 0.05$)。上述实验结果表明,受试物对缺氧运动障碍、缺氧诱发的红细胞增多症均具有改善作用,可提高斑马鱼的耐缺氧能力。

表 4 缺氧斑马鱼运动

组别	总数/条	总运动距离/mm
正常对照组	10	7 730±331
模型对照组	10	6 225±337*
阳性对照组(谷胱甘肽 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$)	10	7 906±468 [#]
受试物处理组(2.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	10	7 457±437
受试物处理组(8.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	10	8 042±242 [#]
受试物处理组(25 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	10	8 080±414 [#]

注:*表示与正常对照组比较, $P < 0.05$;[#]表示与模型对照组比较, $P < 0.05$

表 5 缺氧斑马鱼红细胞增多症实验

组别	总数/条	尾部血管红细胞染色强度/像素
正常对照组	10	107±26
模型对照组	10	2 721±528*
阳性对照组(羟基脲 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	10	283±52 [#]
受试物处理组(2.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	10	1 593±416
受试物处理组(8.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	10	196±22 [#]
受试物处理组(25 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	10	部分死亡不予评价

注:*表示与正常对照组比较, $P < 0.05$;[#]表示与模型对照组比较, $P < 0.05$

2.3 心肌细胞耐缺氧能力实验

表 6 显示,分别采用 1/2、1/4、1/8、1/16 和 1/32 原液浓度处理心肌细胞 24 h,MTT 检测结果,与正常对照组相比,1/8、1/16 和 1/32 原液处理组的细胞活性无显著性差异,随着受试物处理浓度的增加,细胞活性逐渐降低;1/2 和 1/4 原液处理可显著抑制心肌细胞活性($P < 0.05$)。因此,在后续实验中,选择 1/8、1/16 和 1/32 原液浓度进行后续缺氧耐受力功能试验。

使用 1/8、1/16 和 1/32 原液预处理心肌细胞 30 min 后,再以 4 mmol/L 连二亚硫酸钠处理,24 h 后采用 MTT 法测定各组细胞活性。由表 7 结果显示,与正常对照组相比,连二亚硫酸钠显著抑制心肌细胞活性($P<0.05$),说明缺氧细胞模型建模成功;与缺氧模型组比较,随着原液处理浓度的增加,心肌细胞活性逐渐降低,但 1/32 原液处理组可一定程度缓解心肌细胞的损伤。

通过对心肌细胞上清液 LDH 活性的检测,由表 8 结果显示,与正常对照组相比,连二亚硫酸钠可引起受试细胞 LDH 活性显著升高($P<0.05$),表明缺氧细胞模型建模成功;与缺氧模型组比较,1/8 原液处理组的 LDH 活性显著降低($P<0.05$)。

综上,采用终浓度为 1/32 原液和 1/8 原液的受试物预处理大鼠离体心肌细胞后,对连二亚硫酸钠诱导的细胞活性降低和 LDH 活性升高分别有一定的缓解作用。这一结果也提示,受试物具有抵抗体外心肌细胞缺氧性损伤的功能。

表 6 心肌细胞活性的实验结果

Table 6 Cardiomyocyte activity test results

组别	OD 值
正常对照组	0.396±0.018
1/32 原液处理组	0.450±0.057
1/16 原液处理组	0.408±0.114
1/8 原液处理组	0.355±0.045
1/4 原液处理组	0.204±0.015*
1/2 原液处理组	0.014±0.013*

注:*表示与正常对照组比较, $P<0.05$

表 7 心肌细胞缺氧模型活性的实验结果

Table 7 Test results of activity in cardiomyocyte hypoxia model

组别	OD 值
正常对照组	0.352±0.012
缺氧模型组	0.211±0.011*
1/32 原液处理组	0.234±0.012
1/16 原液处理组	0.197±0.019
1/8 原液处理组	0.186±0.012

注:*表示与正常对照组比较, $P<0.05$

表 8 心肌细胞缺氧模型 LDH 活性的实验结果

Table 8 Test results of LDH activity in cardiomyocyte hypoxia model

组别	OD 值	LDH(IU/L)
正常对照组	0.375±0.019	0.889±0.048
缺氧模型组	0.728±0.011	1.772±0.029*
1/32 原液处理组	0.813±0.01	1.985±0.024
1/16 原液处理组	0.753±0.014	1.835±0.035
1/8 原液处理组	0.529±0.005	1.275±0.013#

注:*表示与正常对照组比较, $P<0.05$;#表示与缺氧模型组比较, $P<0.05$

3 讨论

建立高效低成本的功能食品评价方法对于保

健食品行业的发展具有重要意义。传统的功能性食品耐缺氧功能评价方法通常是基于小鼠实验模型实施,其中部分传统实验如常压耐缺氧法、亚硝酸钠缺氧法与动物伦理有违,因此需要进一步探索相关的替代性试验。近年来,利用斑马鱼建模进行毒性、食品功能评估的相关分析已逐渐成为研究热点^[6-9]。斑马鱼模式生物具有实验周期短、使用动物数少、更加符合动物伦理原则且大大减少人力成本等优点。推荐使用生命科学、医学和药物研发领域使用最广泛的野生型 AB 品系斑马鱼,而加选黑色素等位基因突变型半透明 Albino 品系斑马鱼,是因为它呈半透明状,可以更方便地观察测量斑马鱼的尾部血管内的红细胞信号。但本次 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组浓度设置过高,导致部分突变型半透明斑马鱼死亡,无法分析评价该组的红细胞染色强度。此外,相对于传统的动物实验模型,细胞建模具有可避免种属差异,减少实验费用,缩短周期等优势^[10]。长期以来,在体外缺氧细胞模型的构建方面已取得长足发展,离体心肌细胞、脑皮质神经元细胞和干细胞等应用较为普遍,单纯性缺氧培养和化学性缺氧是体外缺氧细胞模型构建的常规手段,细胞毒性、LDH 活性、氧化还原酶活性和特定基因表达改变等均可用于评价指标的选择^[11-12]。

本研究通过小鼠、斑马鱼、心肌细胞建模,检测同一功能食品饮料的耐缺氧功能。三个体内外实验结果均表明,该功能饮料有提高机体耐缺氧的能力或趋势。所以,在本研究中,体外实验和体内实验验证结果基本一致。通过比对氯化钴诱导斑马鱼缺氧模型与小鼠的耐缺氧功能实验结果,提示了耐缺氧功能非哺乳类替代性模式生物实验体系的有效性。本研究以耗氧剂连二亚硫酸钠处理原代培养乳鼠心肌细胞,构建化学性缺氧细胞模型,通过测定细胞活性和 LDH 活性,验证了食品耐缺氧功能的体外替代方法的可行性。

本次体内外三类试验体系的结果表明,斑马鱼系统实验与细胞体外实验一样,可作为传统哺乳动物实验的一种辅助检验手段。由此,本次研究可以得出,在评价保健食品及其原料耐缺氧功能时,可利用其他体内实验系统如斑马鱼模式生物开展保健食品及其原料耐缺氧功能实验,并将其结果与哺乳动物实验结果进行比对,部分替代传统耐缺氧功能检测用哺乳动物不人道的常压耐缺氧法、亚硝酸钠缺氧法,只保留断头急性缺氧法,筛选、完善保健食品及其原料耐缺氧功能体外替代性实验体系。今后仍需积累更多数据,来实现对传统哺乳动物实验的全面替代。将斑马鱼模型与现有的哺乳动物

实验、体外细胞实验、人体试食试验相结合,将为深入开展保健食品及其原料的毒理学、功能学研究提供更可靠、快速、有效的方法体系。

参考文献

- [1] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [2] BRIGGS J P. The zebrafish: A new model organism for integrative physiology [J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2002, 282(1): R3-R9.
- [3] 梁爱华. 斑马鱼: 一种可用于中药药效和毒性筛选的鱼类模型[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(22): 2839-2842.
- LIANG A H. Zebrafish—Useful model for pharmacodynamics and toxicity screening of traditional Chinese medicine[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34(22): 2839-2842.
- [4] RASOOLY R S, HENKEN D, FREEMAN N, et al. Genetic and genomic tools for zebrafish research: the NIH zebrafish initiative [J]. *Developmental Dynamics*, 2003, 228(3): 490-496.
- [5] 王明秋, 孟琳, 柴玮杰, 等. 刺五加、刺玫果提取物提高小鼠缺氧耐受力研究[J]. *中国公共卫生管理*, 2015, 31(4): 567-568.
- WANG M Q, MENG L, CHAI W J, et al. Acanthopanax senticosus and Rosa davurica Pall extracts on improving hypoxia tolerance of mice [J]. *Chinese Journal of Public Health Management*, 2015, 31(4): 567-568.
- [6] DUCHARME N A, REIF D M, GUSTAFSSON J A, et al. Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing [J]. *Reproductive Toxicology*, 2015, 55: 3-10.
- [7] ALI S, VAN MIL H G J, RICHARDSON M K. Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21076.
- [8] DUCHARME N A, PETERSON L E, BENFENATI E, et al. Meta-analysis of toxicity and teratogenicity of 133 chemicals from zebrafish developmental toxicity studies [J]. *Reproductive Toxicology*, 2013, 41: 98-108.
- [9] 范能全, 彭兰, 杨武, 等. 红景天对斑马鱼游泳和耐缺氧能力的影响的初步研究[J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(8): 1342-1345.
- FAN N Q, PENG L, YANG W, et al. Preliminary study of effects of *Rhodiola* on swimming performance and hypoxia tolerance of zebrafish [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2015, 35(8): 1342-1345.
- [10] 杨仁君, 梁小星, 郭恒, 等. 人胚胎干细胞在药物毒性风险评估中的研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(11): 3491-3496.
- YANG R J, LIANG X X, GUO H, et al. Research progress on human embryonic stem cells in drug-induced toxicity [J]. *Drugs & Clinic*, 2019, 34(11): 3491-3496.
- [11] 陈雨, 李艳, 王玮玮, 等. 心肌细胞缺氧复氧模型的建立方法及能量代谢相关检测指标研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(10): 809.
- CHEN Y, LI Y, WANG W W, et al. Research progress in the establishment of hypoxia/reoxygenation model of cardiomyocytes and the measurement of energy metabolism [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2019, 33(10): 809.
- [12] 阿迈·塔勒比, 张永杰, 陈西敬. 心肌细胞缺氧/复氧损伤模型研究与应用进展[J]. *内蒙古中医药*, 2011, 30(12): 120-122.
- YAMAI · TALEBI, ZHANG Y J, CHEN X J. Research & development of cardiomyocytes hypoxia/reoxygenation injury models [J]. *Nei Mongol Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2011, 30(12): 120-122.