

中草药提取物对小鼠乳腺上皮细胞增殖的影响

王希春, 周 凡, 冯士彬, 孟庆娟, 李 玉, 刘芳芳, 吴金节

(安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

【摘 要】 【目的】研究中草药单味及复方提取物对原代培养的小鼠乳腺上皮细胞增殖的影响,旨在为探明中草药治疗奶牛乳腺疾病机制提供试验依据。【方法】采用组织块种植法培养 3 月龄、分娩后 3~5 d 的昆明种远交系小白鼠的乳腺组织,采用胰蛋白酶消化法获得相对纯化的小鼠乳腺上皮细胞,并运用 SDS-PAGE 法进行鉴定。制备 5 味中草药(重楼、紫花地丁、木芙蓉、半枝莲、泽兰叶)及治疗奶牛乳房炎用中草药复方提取物,分别作用于对数生长期的乳腺上皮细胞 5 d,用四甲基偶氮唑盐法(MTT 法)分析细胞活力。【结果】将通过组织块种植法与胰蛋白酶消化法相结合,可得到纯化的有酪蛋白分泌功能的乳腺上皮细胞;中草药重楼、紫花地丁、木芙蓉、半枝莲、泽兰叶提取物在其质量浓度分别为 8, 40, 40, 1.6, 8 mg/mL 时,对小鼠乳腺上皮细胞增殖作用最强;除了紫花地丁,其他 4 种中草药提取物在其质量浓度为 200 mg/mL 时,对小鼠乳腺上皮细胞增殖的抑制作用最强。中草药复方提取物质量浓度为 8~200 mg/mL 时,对小鼠乳腺细胞有显著促进作用,随着质量浓度的增加,促增殖作用减弱。【结论】中草药单味及复方提取物在一定质量浓度下对乳腺上皮细胞增殖产生了促进或抑制作用,且中草药复方提取物的适用质量浓度范围较广。

【关键词】 中草药;小鼠乳腺上皮细胞;细胞培养;增殖

【中图分类号】 S853.72

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)07-0015-06

Effects of Chinese medicinal herb extracts on proliferation of mice mammary gland epithelial cells

WANG Xi-chun, ZHOU Fan, FENG Shi-bin, MENG Qing-juan, LI Yu,
LIU Fang-fang, WU Jin-jie

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: 【Objective】 In order to explore the mechanism of treatment dairy cattle breast diseases by using Chinese medicinal herbs, the experiment was carried to study the effects of Chinese medicinal herb extracts on proliferation of normal mice mammary gland epithelial cells in primary culture. 【Method】 The mammary tissue clumps from KM mice in lactation period were obtained and cultured to harvest epithelial cells by both tissue transfer and trypsin digestion. Then the proliferation effects of the cells were detected by SDS-PAGE. Five kinds of Chinese medicinal herbs (*Rhizome paris*, *Herba violae*, *Folium hibisci mutabilis*, *Herba scutellaria barbata*, *Herba lycop*) and the complex were extracted to add to cell cultural medium for five days. The vigor of mice mammary gland epithelial cells was determined by MTT. 【Result】 The result indicated that the normal mice mammary gland epithelial cells which had function of casein excretion could be purified by both tissue transfer and trypsin digestion; the mass concentration of *Rhizome paris*, *Herba violae*, *Folium hibisci mutabilis*, *Herba scutellaria barbata*, *Herba lycop* was 8, 40, 40, 1.6, 8 mg/mL, and Chinese medicinal herb extracts significantly promoted the proliferation of mice mammary gland epithelial cells; Except for *Herba violae*, the other four Chinese medicinal herbs extract significantly

* [收稿日期] 2010-12-14

[基金项目] 安徽省科技攻关项目(08010302157)

[作者简介] 王希春(1978—),男,安徽利辛人,讲师,主要从事动物诊疗技术研究。E-mail: wangxichun@ahau.edu.cn

[通信作者] 吴金节(1962—),男,安徽望江人,教授,主要从事动物诊疗技术及营养代谢病研究。E-mail: wjj@ahau.edu.cn

restrained proliferation of mice mammary gland epithelial cells. The mass concentration of Chinese medicinal herb complex extract was 8—200 mg/mL, the mice mammary gland epithelial cells can be enhanced significantly, and with the growth of mass concentration, the proliferation effect was decreased. 【Conclusion】 The experiment revealed that certain concentration of Chinese medicinal herbs and the complex extracts could promote or restrain mammary gland epithelial cells, and the complex had a wider range of mass concentration.

Key words: Chinese medicinal herbs; mice mammary gland epithelial; cell culture; proliferation

随着生物学技术的发展,细胞培养已经成为研究药物作用机理的重要方法之一。原代培养细胞的生物学特性变化较少,故最能反映体内细胞的生长特性。体外原代培养的乳腺上皮细胞仍具有二倍体遗传特性,具有乳腺上皮细胞的功能,是研究正常乳腺上皮细胞、增生细胞及乳腺癌细胞之间差异的重要材料^[1]。

中草药是纯天然物质,含有多种生物活性成分,在治疗过程中可以通过多个环节、途径或靶点作用于机体^[2-3],并兼有药物与营养剂的双重功能,且资源丰富,价格低廉,具有广阔的发展潜力,日益为国内外专家所关注。目前,有关使用中草药治疗奶牛乳房炎的报道很多^[4-6],但关于其药理作用机制方面的研究甚少。为此,本试验以原代培养的正常小鼠乳腺上皮细胞为研究对象,将中草药及其复方提取液直接作用于细胞,观察其对乳腺上皮细胞增殖的影响,以期探明中草药治疗奶牛乳腺疾病的机制提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与中草药

3月龄、分娩后3~5 d的昆明种远交系小白鼠,购自安徽医科大学实验动物中心;中草药重楼、紫花地丁、木芙蓉、半枝莲、泽兰叶等,购自安徽亳州市济人药业有限公司。中草药复方组成为:木芙蓉、紫花地丁、半枝莲、生大黄、黄柏、泽兰叶、重楼等。

1.2 仪器与试剂

仪器:主要仪器有酶标检测仪(Multiskan MK3,美国)、倒置显微镜(XDS-1B,重庆)、CO₂培养箱(HH·CP-T,上海)、低速离心机(800B,上海)、电泳仪(EPS300,上海)、超净工作台(SW-CJ-2D,苏州)等。

试剂:主要试剂有DMEM/F12培养基(Gibco)、优级胎牛血清(四季青)、胰岛素(Sigma)、氢化考的松、转铁蛋白、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐(MTT)、酪蛋白标准品、无水乙醇等。

1.3 试验方法

1.3.1 中草药提取物的制备 用水提醇沉法^[7],分别提取重楼、紫花地丁、木芙蓉、半枝莲、泽兰叶等单味中草药及治疗奶牛乳房炎用中草药复方的有效成分,抽滤浓缩后冷冻干燥,用DMEM/F12培养基配制成为中草药原液,用孔径0.22 μm微孔滤膜过滤后冷藏备用。

1.3.2 小鼠乳腺上皮细胞的分离培养 取分娩后3~5 d的小白鼠第3对乳腺组织,剪成1~3 mm³大小,用Hanks液反复冲洗后均匀地放置在培养皿中,每块组织块上滴加1滴培养液(DMEM培养液中添加体积分数10%的胎牛血清、100 μg/mL青、链霉素、10 ng/mL表皮生长因子、0.2 μg/mL胰岛素、1 μg/mL氢化考的松、1 μg/mL孕酮、2 μg/mL转铁蛋白、0.3 mg/mL谷氨酰胺),置于37℃ CO₂培养箱中贴壁2 h后,再加适量的培养液继续培养。将原代培养获得的细胞经2.5 g/L胰蛋白酶消化、吹打后,在细胞计数板上计数,调整细胞的密度为10⁴~10⁵ mL⁻¹,接种到直径35 mm的培养皿中,于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中培养。根据细胞的生长情况更换培养液,当细胞长满培养皿的80%~90%时,用2.5 g/L胰蛋白酶消化细胞,将消化下来的细胞按10⁴~10⁵ mL⁻¹的密度传代。用相差消化和相差贴壁的方法^[8],纯化乳腺上皮细胞,经过2~3次传代后获得较纯的乳腺上皮细胞。

计数对数增长期的细胞,按照薛庆善^[8]的公式计算细胞群体倍增时间(T_D):

$$T_D = \Delta t \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$$

式中: t 为培养时间(h), N_t 为培养 t 时间后的细胞平均数, N_0 为接种细胞数。

1.3.3 细胞形态学观察和培养上清液中酪蛋白的检测 将贴壁后的细胞于200×倒置显微镜下观察,进行形态学鉴定。同时,收集培养5 d的细胞培养上清液,对乳腺上皮细胞特异分泌物酪蛋白按电泳常规技术规范进行SDS-PAGE电泳检测,同时设立奶牛酪蛋白标准品为阳性对照,非乳腺上皮细胞的培养液为阴性对照,细胞培养液为空白对照。

1.3.4 中草药提取物对小鼠乳腺上皮细胞增殖的影响 将纯化的乳腺上皮细胞(密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)以 $100 \text{ }\mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔培养板,培养 48 h 后分别加入中草药提取物,首行加入 $25 \text{ }\mu\text{L}$ 并按 5 倍梯度依次稀释,于体积分数 5% CO_2 、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养,分别于培养 1,3 和 5 d,吸去孔内培养液,加入 MTT 溶液($10 \text{ }\mu\text{L}$ /孔),置于 CO_2 培养箱孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入 $150 \text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砜(DMSO),室温振摇 15 min 后,选择波长 490 nm 检测各孔吸光度(OD_{490}),以不加任何中草药提取物培养的细胞为对照组,以只有 DMSO 的空白调零。计算各处理细胞相对增长指数:细胞相对增长指数 = (试验组 OD_{490} - 对照组 OD_{490}) / 对照组 OD_{490} 。

1.4 数据统计与分析

将数据用 SPSS 13.0 软件 ANOVA 方法处理后,

进行方差比较。 $P < 0.05$ 代表差异显著; $P < 0.01$ 代表差异极显著。采用 Origin 7.0 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 小鼠乳腺上皮细胞的体外培养与倍增时间

在镜下可见,分离培养的乳腺上皮细胞密度较低时,在 2~7 d 呈岛屿状聚集生长,并有接触抑制现象(图 1-A);培养 5~9 d 时,间隙可见极性贴壁的乳腺上皮细胞出现拉网现象(图 1-B)。经反复传代纯化的乳腺上皮细胞形态为扁平的多角形,胞质近中央处有圆形的细胞核,细胞之间紧密相靠、相互衔接,连接成片生长,呈典型的“铺路石”状(图 1-C)。选取接种后 4~6 d 细胞计数,计算得小鼠乳腺上皮细胞的倍增时间为 62.02 h。第 2 代小鼠乳腺上皮细胞的生长曲线见图 2。

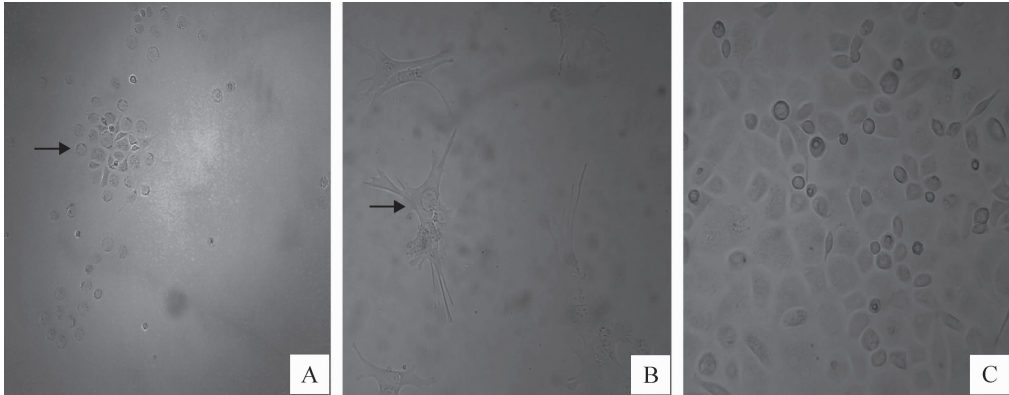


图 1 原代培养的小鼠乳腺上皮细胞形态观察

A. 培养 3 d 的乳腺上皮细胞 ($\times 100$); B. 培养 5 d 的乳腺上皮细胞 ($\times 200$); C. 反复传代纯化的生长状态良好的乳腺上皮细胞 ($\times 200$); $\rightarrow$. 示乳腺上皮细胞
Fig. 1 Morphology of first passage of mice mammary epithelial cell
A. Cultivating 3 d cells ($\times 100$); B. Cultivating 5 d cells ($\times 200$); C. Mammary gland epithelial cells grew well after purified ($\times 200$); $\rightarrow$. Mammary epithelial cells

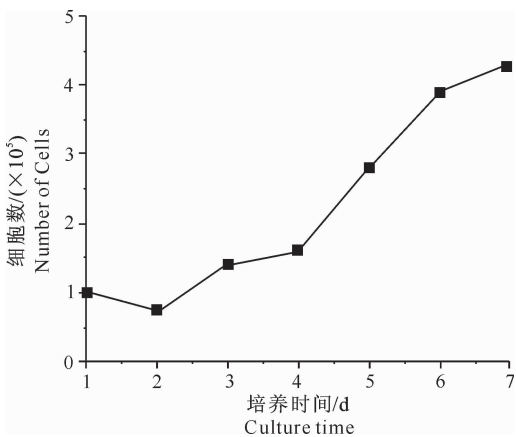


图 2 第 2 代小鼠乳腺上皮细胞的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of mice mammary epithelial cells at the 2nd passage in culture

2.2 小鼠乳腺上皮细胞的检测

SDS-PAGE 电泳分析结果(图 3)表明,收集的小鼠乳腺上皮细胞上清液中蛋白与酪蛋白标准品的分子质量相同,培养纯化后的细胞分泌物中含有酪蛋白,充分说明所培养的细胞是具有正常分泌功能的乳腺上皮细胞。

2.3 中草药提取物对小鼠乳腺上皮细胞增殖的影响

不同质量浓度中草药单味及复方提取物对小鼠乳腺上皮细胞增殖及相对增长指数的影响见表 1 和表 2。由表 1 可知,在质量浓度为 8~200 mg/mL 时,中草药复方提取物对小鼠乳腺上皮细胞表现出显著的促增殖作用 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),在质量

浓度为 200 mg/mL 时促乳腺上皮细胞增殖的作用最强;随着药物质量浓度的降低,其对乳腺上皮细胞的促增殖作用呈减弱的趋势。重楼提取物在高质量浓度(200 mg/mL)时抑制乳腺上皮细胞增殖($P<0.01$),在质量浓度为 8,0.32 mg/mL 时又出现明显的促增殖作用($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。紫花地丁提取物对乳腺上皮细胞增殖没有表现出显著的抑制作用,在质量浓度为 1.6~40 mg/mL 时对乳腺上皮细胞有显著的促增殖作用 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),其中当质量浓度为 40 mg/mL 时促增殖作用极显著增强($P<0.01$);随着质量浓度的降低,其促增殖作用变化不大。木芙蓉提取物在质量浓度为 200 mg/mL 时,可极显著抑制乳腺上皮细胞的增殖 ($P<0.01$),而在质量浓度为 1.6 和 40 mg/mL 时,又可促进乳腺上皮细胞的增殖 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。半枝莲提取物在质量浓度为 200 mg/mL 时抑制作用明显($P<0.01$),但在质量浓度为 1.6~8 mg/mL 时,对乳腺上皮细胞的增殖有极显著的促进作用($P<0.01$),其中当质量浓度为 1.6 mg/mL 时促增殖作用最强。泽兰叶提取物在质量浓度等于或低于 8 mg/mL 时均对乳腺上皮细胞的增殖表现出

显著的促进作用($P<0.01$ 或 $P<0.05$),而在质量浓度为40~200 mg/mL 时,又表现出显著的抑制作用($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

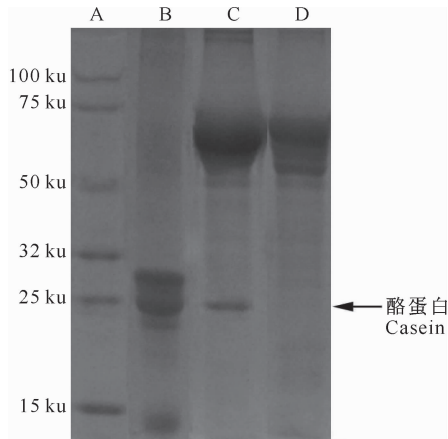


图 3 培养 5~10 d 小鼠乳腺上皮细胞产物的 SDS-PAGE 电泳结果

A. 蛋白质标准品;B. 酪蛋白标准品;C. 乳腺上皮细胞上清液;D. 成纤维细胞上清液

Fig. 3 SDS-PAGE of mice mammary epithelial cells products cultured 5—10 d

A. Marker;B. Casein standard preparation;C. Products of mammary gland epithelial cells;D. Products of fibroblasts cells

表 1 中草药提取物对小鼠乳腺上皮细胞增殖的影响

Table 1 Effect of Chinese medicinal herb extracts on epithelial cell proliferation

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹) Concentration	复方 Compound	重楼 <i>Rhizome paris</i>	紫花地丁 <i>Herba violae</i>	木芙蓉 <i>Folium hibisci sutabilis</i>	半枝莲 <i>Herba scutellaria barbata</i>	泽兰叶 <i>Herba lycop</i>
对照 Control	0.551±0.039	0.703±0.019	0.672±0.019	0.571±0.024	0.667±0.042	0.599±0.026
200	1.315±0.078**	0.223±0.020**	0.681±0.101	0.376±0.085**	0.463±0.061**	0.285±0.079**
40	0.849±0.233*	0.714±0.371	0.934±0.054**	1.023±0.019**	0.708±0.095	0.493±0.050*
8	1.032±0.056**	1.252±0.138**	0.848±0.012**	0.512±0.079	0.840±0.024**	0.842±0.002**
1.6	0.737±0.007	0.750±0.023	0.744±0.020*	0.755±0.033*	0.921±0.008**	0.741±0.046*
0.32	0.609±0.245	0.860±0.148*	0.765±0.128	0.645±0.017	0.720±0.077	0.693±0.048*
0.064	0.546±0.016	0.762±0.046	0.732±0.099	0.510±0.012	0.674±0.015	0.777±0.044*
0.012 8	0.452±0.008	0.763±0.044	0.666±0.074	0.478±0.039	0.659±0.040	0.705±0.026*
0.002 56	0.456±0.011	0.747±0.052	0.653±0.045	0.479±0.017	0.654±0.020	0.670±0.036*

注:表中数据为 OD₄₉₀ 值;数据后标“*”者表示与对照差异显著($P<0.05$);标“**”者表示与对照差异极显著($P<0.01$)。
Note:Date in the table represents OD₄₉₀ value;“*” represents $P<0.05$,”**” represents $P<0.01$,compared with the control group.

表 2 中草药提取物对小鼠乳腺上皮细胞相对增长指数的影响

Table 2 Effect of Chinese medicinal herb extracts on epithelial cell relative growth index

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹) Concentration	复方 Compound	重楼 <i>Rhizome paris</i>	紫花地丁 <i>Herba violae</i>	木芙蓉 <i>Folium hibisci mutabilis</i>	半枝莲 <i>Herba scutellaria barbata</i>	泽兰叶 <i>Herba lycop</i>
200	1.387	-0.683	0.013	-0.342	-0.306	-0.524
40	0.541	0.016	0.390	0.792	0.061	-0.177
8	0.873	0.781	0.262	-0.103	0.259	0.406
1.6	0.338	0.067	0.107	0.322	0.381	0.237
0.32	0.105	0.223	0.138	0.130	0.079	0.157
0.064	-0.009	0.084	0.089	-0.106	0.011	0.297
0.012 8	-0.180	0.085	-0.009	-0.163	-0.012	0.177
0.002 56	-0.172	0.0626	-0.028	-0.161	-0.019	0.119

由表2可见,中药复方提取物质量浓度为200 mg/mL时,小鼠乳腺上皮细胞增长指数最大;此外,复方提取物促进乳腺上皮细胞增殖的有效质量浓度范围高于单味中药提取物。

3 讨论

3.1 小鼠乳腺上皮细胞的体外培养及生长特性

酪蛋白合成量常作为乳腺上皮细胞合成蛋白质能力或细胞功能状态的标志^[9-10]。取纯化后培养5 d的乳腺上皮细胞培养上清液进行SDS-PAGE蛋白电泳,以检测细胞的分泌功能,关于此法已有过诸多报道^[11-12]。本试验采用该法检测纯化后的乳腺上皮细胞培养液,结果发现培养液中含有与酪蛋白分子量相同的蛋白质的分泌,这与丁月云等^[13]的试验结果相似,说明培养获得的原代细胞仍具有正常分泌酪蛋白的功能,证明所得乳腺上皮细胞生理机能健全,适于本次研究。

细胞传一代后,生长一般要经过以下3个阶段:潜伏期、指数增长期和停滞期。在潜伏期中,细胞接种培养后,先经过一个在培养液中呈悬浮状态的悬浮期,此时细胞胞质回缩,胞体呈圆球形;接着细胞贴附于底物表面上,悬浮期结束。贴附是贴附类细胞生长增殖条件之一。细胞贴附现象是一个非常复杂且与多种因素相关的过程。细胞贴附于支持物后,除先经过前述延展过程变成极性细胞,还要经过一个潜伏阶段,才进入生长和增殖期。本试验最初细胞接种数为 1×10^5 个,从细胞生长曲线中可以看到,传代接种第2代时细胞的潜伏期长达3 d,4~6 d为指数生长期,最短的细胞群体倍增时间为72 h,表明此时细胞的增殖能力很强。指数增长期是细胞1代中活力最好的时期,本试验发现,经过24 h待细胞贴壁以后,中草药作用5 d,是进行各种试验最好的和最主要的阶段。

3.2 中草药提取物对小鼠乳腺上皮细胞增殖的双重作用

诸多研究报道证实,中药制剂在乳房炎和乳腺癌的治疗中有显著疗效^[14-15],虽然从基础到临床应用方面的研究很多,但是对于中药制剂的作用机理仍不明。本试验将中草药制剂直接应用于乳腺上皮细胞的培养,可以更加直观地阐明中草药制剂对细胞的作用。叶媚娜等^[1]研究发现,中药制剂对正常人乳腺上皮细胞增殖存在双向调节作用,高浓度温肾中药能明显促进原代培养正常人乳腺上皮细胞的增殖,而低浓度温肾中药则对原代培养人正常乳

腺上皮细胞的增殖表现出抑制作用。本试验发现,单味中草药提取物对小鼠乳腺上皮细胞具有高质量浓度抑制增殖、低质量浓度促进增殖的双重作用,这一现象在有关中药制剂在细胞水平研究的相关报道^[2]中有所体现。同时本试验结果表明,中草药复方提取物比单味中草药的促增殖作用更显著,所适用质量浓度范围更广,这为评价中药制剂安全用药浓度提供了依据,也为中草药组方中各单味中草药的配比提供了理论基础。

3.3 中草药复方提取物对小鼠乳腺上皮细胞增殖的有效质量浓度

由本试验结果可知,中草药复方提取物促进小鼠乳腺上皮细胞增殖的有效质量浓度范围较单味中草药提取物更广。因此,相比单味中草药,中草药复方提取物在临床应用中的有效性与安全性方面可能更具优势。

重楼的主要毒性成分为皂苷及酚类物质,李广助^[16]研究表明,重楼皂苷及酚类物质对小鼠的半数致死量为2.65 g/kg,其万分之一的用量可使鱼类中毒;而给小鼠灌服重楼煎剂30~60 g/kg,3 d内未见小鼠死亡;小鼠静脉注射体积分数0.2%的重楼药液0.4 mL/只,也无死亡现象出现^[17]。导致上述研究结果差异的可能原因,首先是口服中草药以后能否在体内达到相应的血药浓度有待考证;其次,中草药提取物直接作用于细胞所表现出的细胞毒性大于口服制剂,可能与中草药在体内的代谢以及动物机体的解毒作用有关;第三是提取方法的不同,可能造成中草药提取物主要组成成分有差异,如汤海峰^[18]发现,重楼的甲醇提取物对小鼠成纤维细胞L929有很强的毒性,而其水提物对细胞毒活性相对较弱。本研究结果显示,重楼提取物质量浓度为200 mg/mL时,对小鼠乳腺上皮细胞增殖有极显著抑制作用,而在质量浓度较低时却未表现出显著的抑制作用,表明本方法得到了毒性较低的重楼提取物。

有研究表明^[19],木芙蓉叶是低毒、安全的中药制剂,可以进一步开发用于临床,但若延长试验时间或服用较高剂量的木芙蓉提取物会对肝造成损伤^[20]。在本试验中,木芙蓉提取物在高质量浓度(200 mg/mL)时表现出了显著的细胞毒性。

李佩文等^[21]对大剂量半枝莲煎剂的临床试验表明,处方中半枝莲用量达120 g时,其对肝肾功能、血常规、免疫球蛋白、血浆蛋白均未产生明显影响。本试验结果表明,半枝莲提取物在高质量浓度

下(200 mg/mL)对小鼠乳腺上皮细胞增殖有极显著的抑制作用($P < 0.01$)。

本研究中,用中草药复方提取物治疗乳房炎时,在一定剂量范围内可起到促进乳腺上皮细胞增殖,增进细胞生命力的作用。中药制剂直接干预体外培养的乳腺上皮细胞,可以在一定程度上反映药物的作用机理,对临床用药以及新药物研发具有一定的理论参考和指导作用。而中草药复方中各单味中草药之间配伍与药性的关系,单味中草药中各种提取物的作用、各组分比例以及中草药炮制过程中各成分相互作用、相互影响的规律是相当复杂的,均还有待于进一步研究。

【参考文献】

- [1] 叶媚娜,陈红凤. 温肾中药对原代培养正常人乳腺上皮细胞增殖的影响[J]. 中西医结合学报,2006(7):397-401.
Ye M N, Chen H F. Effects of Chinese herbal medicine for warming kidney on proliferation of normal human mammary epithelial cells in primary culture [J]. Journal of Chinese Integrative Medicine, 2006(7):397-401. (in Chinese)
- [2] Lin C Y, Sun J S, Shen S Y, et al. The effect of Chinese medicine on bone cell activities [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2001(9):271-285.
- [3] 周俊. 中药复方-天然组化化学库与多靶作用机理[J]. 中国中西医结合杂志,1998,18(2):67.
Zhou J. Chinese mechanism of medicine compounds-natural combinational chemical labriaries and multitarget [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 1998, 18(2):67. (in Chinese)
- [4] 李永科,李继昌,徐倩倩,等. 复方乳腺康膏治疗奶牛乳房炎临床试验观察[J]. 中国奶牛,2008(4):35-38.
Li Y K, Li J C, Xu Q Q, et al. Clinical observation on the experiment in treatment of dairy cow's mastitis with Fufang-Ruxiankang sticking piaster [J]. China Dairy Cattle, 2008(4):35-38. (in Chinese)
- [5] 覃杰,孙延鸣. “乳康散”对奶牛乳房炎治疗效果试验[J]. 西北农业学报,2010(1):30-33.
Qin J, Sun Y M. Curative effect experiment of rukangsan on cow mastitis [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010(1):30-33. (in Chinese)
- [6] 武瑞,连学昭,富艳玲,等. 防治奶牛乳房炎中药复方的抗炎作用及毒性作用研究[J]. 中国奶牛,2006(9):11-15.
Wu R, Lian X Z, Fu Y L, et al. Studies on the anti-inflammatory action and the toxic effect of Chinese herbal medicine prescription for dairy cow mastitis [J]. China Dairy Cattle, 2006(9):11-15. (in Chinese)
- [7] 谢秀琼. 中药新制剂开发与应用[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2006:215-221.
Xie X Q. The development and application of new drug of TCM [M]. 3rd edition. Beijing: People's Medical Publishers, 2001:215-221. (in Chinese)
- [8] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2001:401-408.
Xue Q S. The principle and technology of *vitro* culture [M]. Beijing: Scientific and Technical Publishers, 2001:401-408. (in Chinese)
- [9] Margot M, Kathleen M D. Three-dimensional mammary primary culture model systems [J]. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 1996, 1:91-110.
- [10] 李震,王英,刘慧莉,等. 牛乳腺上皮细胞的分离培养[J]. 上海农业学报,2000,16(3):25-28.
Li Z, Wang Y, Liu H L, et al. Study on isolation and culture of bovine mammary epithelial Cells [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2000, 16(3):25-28. (in Chinese)
- [11] 郑月茂,彭新荣,徐永平,等. 体外培养的山羊乳腺上皮细胞形态研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(3):37-41.
Zheng Y M, Peng X R, Xu Y P, et al. Study on appearance of goat mammary epithelial cells which cultured *in vitro* [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2004, 32(3):37-41. (in Chinese)
- [12] Tania G, Itamar B. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland [J]. *In vitro* Cellular & Developmental Biology, 2002, 38(5):282-292.
- [13] 丁月云,张莉莉,陈莎莎,等. 组织块种植法体外培养奶牛乳腺上皮细胞[J]. 南京农业大学学报,2008,31(4):91-96.
Ding Y Y, Zhang L L, Chen S S, et al. Explants culture of cow mammary epithelial cells *in vitro* [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2008, 31(4):91-96. (in Chinese)
- [14] Toshiaki K, Katsuhiko I, Hiroko S, et al. Efficacy of Nyoshisan/TJ-67, a traditional herbal medicine, for menopausal symptoms following surgery and adjuvant chemotherapy for premenopausal breast cancer [J]. The Japan Society of Clinical Oncology, 2008, 13:185-189.
- [15] 刘胜,陆德铭,唐汉钧,等. “乳宁冲剂”抑制DMBA诱导大鼠乳腺癌的实验研究[J]. 亚洲医药,1997,5(6):96.
Liu S, Lu D M, Tang H J, et al. Experimental study on running decoction of suppressing rat breast cancer induced by DMBA [J]. Asian Medicine, 1997, 5(6):96. (in Chinese)
- [16] 李广助. 中药药理学与临床[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,1992:452.
Li G Z. Pharmacology and toxicology and clinic of Chinese herb [M]. Tianjin: Tianjin Science & Technology Translation Publishing Corporation, 1992:452. (in Chinese)
- [17] 郭晓庄. 有毒中草药大辞典[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,1992:415.
Guo X Z. Dictionary of poisonous Chinese herbal medicine [M]. Tianjin: Tianjin Science & Technology Translation Publishing Corporation, 1992:415. (in Chinese)