

## 中药莪术几种活性成分对肝脏疾病防治作用的机制

赵铁建, 傅品悦, 刘露露, 郑洋, 彭岳

赵铁建, 彭岳, 广西中医药大学基础医学院 广西壮族自治区南宁市 530200

傅品悦, 刘露露, 郑洋, 广西中医药大学研究生院 广西壮族自治区南宁市 530200

彭岳, 副教授, 主要从事中医药和民族药的基础研究.

基金项目: 国家自然科学基金, Nos. 81460628, 81660705, 81403189.

作者贡献分布: 赵铁建负责思路设计与修订; 傅品悦负责撰写与阅读分析; 刘露露负责文献检索与撰写; 郑洋负责整理、阅读和分析; 彭岳负责组稿与审校.

通讯作者: 彭岳, 副教授, 530200, 广西壮族自治区南宁市五合大道13号, 广西中医药大学基础医学院.  
000583@gxcmu.edu.cn  
电话: 0771-4733794

收稿日期: 2017-06-09

修回日期: 2017-07-12

接受日期: 2017-07-17

在线出版日期: 2017-09-28

### Effects of several active ingredients of *Rhizoma curcumae* on liver diseases

Tie-Jian Zhao, Pin-Yue Fu, Lu-Lu Liu, Yang Zheng, Yue Peng

Tie-Jian Zhao, Yue Peng, School of Basic Medical Sciences, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Pin-Yue Fu, Lu-Lu Liu, Yang Zheng, Postgraduate Department, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81460628, No. 81660705 and No. 81403189.

Correspondence to: Yue Peng, Associate Professor, School of Basic Medical Sciences, Guangxi University of

Traditional Chinese Medicine, 13 Wuhe Avenue, Nanning 530200, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. 000583@gxcmu.edu.cn

Received: 2017-06-09

Revised: 2017-07-12

Accepted: 2017-07-17

Published online: 2017-09-28

### Abstract

The main active ingredients of *Rhizoma curcumae*, such as curcumin, elemene, curcumol, and germacrone, have certain curative effect on liver diseases. Studies have found that curcumin has anti-tumor, anti-inflammatory, anti-fibrosis, and other properties and can be used for treatment of chronic liver disease, tumors and other diseases. Elemene can induce tumor apoptosis, inhibit the growth of tumor cells, improve the immune response, and reduce the toxic and side effects of chemotherapy. Zedoary alcohol can exert anti-fibrosis effects by inhibiting the expression of cytokines, and exert anti-tumor effects by inhibiting the apoptosis of tumor cells. Germacrone can intervene hepatocellular cancer cell proliferation, cell cycle, apoptosis, and other aspects, showing anti-hepatocarcinoma effects.

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *Rhizoma curcumae*; Active ingredient; Liver diseases

Zhao TJ, Fu PY, Liu LL, Zheng Y, Peng Y. Effects of several active ingredients of *Rhizoma curcumae* on liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2017; 25(27): 2433-2440 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i27/2433.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v25.i27.2433>

### 背景资料

中药莪术的活性成分复杂, 近年来研究发现其活性成分具有多种药理作用, 但具体作用机制的探究仍不够系统、深入, 仍需进一步研究与完善.

### 同行评议者

李勇, 教授, 上海中医药大学附属市中医医院消化内科; 张永生, 副研究员, 浙江中医药大学; 祝晨霞, 教授, 广州中医药大学中药学

### ■ 研究前沿

中药莪术几种主要活性成分如姜黄素、榄香烯、莪术醇、吉马酮具有多种药理作用, 特别是防治慢性肝病、抗肿瘤、抗氧化等方面。本文述评的几种莪术活性成分是研究最为热点的主要结构, 对中药莪术的进一步开发利用具有深远的影响。

### 摘要

中药莪术几种主要活性成分如姜黄素、榄香烯、莪术醇、吉马酮对治疗肝脏疾病具有确定的疗效。研究发现姜黄素具有抗肿瘤、抗炎、抗纤维化等作用, 临床用于治疗慢性肝病、肿瘤等疾病; 榄香烯能诱发肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞的生长, 提高机体免疫反应, 降低放化疗不良反应; 莪术醇可以通过抑制细胞因子表达发挥抗肝纤维化作用, 并可以通过抑制基因表达诱导癌细胞的凋亡, 发挥抗肿瘤作用; 吉马酮则在肝癌细胞的增殖、细胞周期及细胞凋亡等方面均有干预影响, 从而呈现抗肝癌作用。

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 莪术; 活性成分; 肝脏疾病

**核心提要:** 中药莪术的活性成分复杂, 近年研究发现其活性成分具有多种药理学作用, 特别是防治慢性肝病、抗肿瘤、抗氧化等方面的作用机制引起研究界的重视。本文述评了几种莪术研究的最热点的活性成分, 针对他们的研究将对莪术防治临床肝脏疾病的深入开发应用有显著的推动作用。

赵铁建, 傅品悦, 刘露露, 郑洋, 彭岳. 中药莪术几种活性成分对肝脏疾病防治作用的机制. 世界华人消化杂志 2017; 25(27): 2433-2440 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i27/2433.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v25.i27.2433>

### 0 引言

莪术为姜科植物的干燥根茎, 首载于《药性论》, 在我国主要产于广西、四川、浙江等地。莪术别称较多, 包括绿姜、山姜黄、羌七、蓬术、文术等; 据2015版《中国药典》中记载分为温郁金(*Curcuma wenyujin* Y.H.Chen et C.Ling)、广西莪术(*Curcuma kwangsiensis* S.G.Lee et C.F.Liang)、蓬莪术(*Curcumaphaeocaulis* Val)三种。中医认为莪术性辛、苦、温, 具有行气破血, 消积止痛的功效, 用于血气心痛, 饮食积滞, 脘腹胀痛, 血滞经闭, 痛经, 瘰疬块, 跌打损伤等症的治疗<sup>[1]</sup>。近代研究<sup>[2]</sup>表明, 挥发油是莪术的主要活性成分, 具有抗癌、抗凝血、抗氧化和保肝等多种药理作用。已从温郁金、广西莪术和蓬莪术中分离得到十几种有效化合物<sup>[3]</sup>; 经研究证实, 中药莪术的几种主要活性成分如

姜黄素、榄香烯、莪术醇等对治疗肝脏疾病具有确定的疗效<sup>[4,5]</sup>, 针对这些成分的药理学研究, 对中药莪术的深入开发应用具有显著的推动作用。本文就近10年文献报道中有关莪术几种主要活性成分对肝脏疾病的作用及机制进行述评。

### 1 姜黄素在肝脏疾病中的应用

姜黄素(Curcumin)是姜黄属植物莪术、姜黄、郁金等根茎中提取的多酚类天然物质。具有抗肿瘤、抗氧化应激、抗炎、抗纤维化、清除自由基等药理作用, 可用于糖尿病并发症、慢性肝病、肿瘤、自身免疫性疾病等的治疗。随着研究的深入, 发现姜黄素在干预肝脏疾病方面有较显著的药理学作用。

1.1 姜黄素对急性肝损伤的作用 姜黄素抗肝损伤作用, 其机制主要体现在清除肝脏自由基、抑制肝脏炎症反应、抑制肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化等方面。其中, 基于姜黄素对自由基引起的氧化损伤及核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)等诱导的炎症反应的干预研究相对较为广泛和深入。

1.1.1 抑制自由基的氧化损伤: 雷公藤甲素致肝损伤机制与脂质过氧化、大量氧自由基产生有关。张伟霞等<sup>[6]</sup>用雷公藤甲素制备小鼠慢性肝损伤模型, 用姜黄素干预发现其对动物模型的肝损伤有保护作用, 其机制与姜黄素能显著降低模型小鼠肝组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 提升抗氧化酶活性, 增强模型小鼠体内抗氧化能力, 降低活性氧对肝细胞膜脂质和蛋白质损伤, 减少脂质过氧化物的产生有关。还有研究<sup>[7]</sup>指出姜黄素的脂质体和纳米颗粒, 具有良好的抗氧化能力, 能清除细胞内活性氧和维持细胞的抗氧化酶水平, 防止线粒体损伤和内源性凋亡途径。

1.1.2 抑制肝脏炎症反应: 韩冰<sup>[8]</sup>研究发现姜黄素能够通过增加调节性细胞因子白介素-10(interleukin-10, IL-10)的分泌以及降低肝脏组织内炎症介质的分泌来抑制肝脏炎症反应, 从而减轻诱导小鼠免疫性肝损伤, 发挥保护肝损伤的药理作用。

核因子相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf-2)是一种与氧化应激反应密切相关的细胞因子。李晶菁等<sup>[9]</sup>用盲肠结扎穿孔法制备脓毒症急性肝损伤大鼠模型, 诱导

Nrf-2表达, 并采用姜黄素进行干预, 测定血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)及肝组织Nrf2的表达, 并用HE染色观察肝组织病理变化; 结果表明姜黄素干预的肝组织Nrf2表达增加, 肝组织内的抗氧化能力增强, 减少或抑制肝内氧化应激反应, 达到抗脓毒症急性肝损伤的作用. 综上所述, 姜黄素可通过调节多种纤维化相关细胞因子的途径抑制肝炎症反应的程度, 进而干预纤维化进程.

1.2 姜黄素对NAFLD的防治作用 非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量饮酒史, 由各种原因引起的肝细胞内脂肪堆积, 以肝细胞脂肪变性和脂质蓄积为主要特征的临床病理综合征. 其发病机制与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)导致的肝内脂质沉积, 及脂质沉积引起的脂质过氧化或肝内氧化应激有关, 而导致线粒体功能障碍、炎症介质产生及HSC的激活等, 姜黄素可通过以下机制呈现作用<sup>[10]</sup>.

1.2.1 改善胰岛素抵抗: IR和炎症反应是NAFLD发生和发展的关键因素. IR能使肝内脂质过量沉积, 胰岛素信号通路受到干扰; 靶细胞对胰岛素敏感性下降, 同时肝脏对胰岛素摄取及葡萄糖利用率下降, 引起肝细胞脂肪变性导致脂肪肝<sup>[11]</sup>. 周玲玲等<sup>[12]</sup>发现, 姜黄素能有效改善IR, 调节肝内脂肪代谢, 逆转NAFLD家兔模型的肝内脂肪变性, 对肝功能异常也有改善; 同时姜黄素还能促进氧化物酶体增殖剂激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ )表达, 催化脂肪酸发生氧化反应, 减少游离脂肪酸含量, 减少活性氧和超氧阴离子生成, 改善机体内氧化和抗氧化的失衡状态, 改善线粒体功能障碍, 促进腺苷三磷酸合成, 减轻肝脂肪变性及肝损伤程度. 研究<sup>[13]</sup>还表明, 激活PPAR- $\gamma$ 是姜黄素减少HSC激活的一个先决条件. 最新研究<sup>[14]</sup>表明, 激活的PPAR- $\gamma$ 打断了FAK/RhoA ERK mTOR信号传导通路和抑制HSC-based, 抑制血管化的PDGF- $\beta$ 受体表达.

1.2.2 调节脂质代谢: 狄建彬等<sup>[15]</sup>运用姜黄素对高脂性脂肪肝大鼠模型进行干预, 发现姜黄素能减轻脂肪肝病变, 其机制是调节脂质代谢、降低血脂及脂肪的肝内沉积, 清除肝内氧自由基, 抑制脂质过氧化, 同时还有保肝、护肝作用. 滕耀红等<sup>[16]</sup>采用油酸诱导法建立NAFLD

细胞模型并给予姜黄素干预, 结果发现姜黄素能有效减少肝内甘油三酯而抑制脂肪肝形成, 并通过抑制内源性胆固醇合成, 促进外源性胆固醇的肝内代谢. 说明姜黄素可通过调节脂质的代谢发挥治疗NAFLD作用.

1.2.3 抗氧化作用: 麦静怡等<sup>[17]</sup>研究发现姜黄素能显著降低ALT、谷草转氨酶、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶等纤维化血清学指标, 减少肝内脂肪沉积, 并提高肝内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平, 证实姜黄素具有减轻氧自由基对细胞的损伤、提高机体清除自由基的能力, 能够有效减少NAFLD对肝脏造成二次损伤. 该研究表明姜黄素具有良好抗氧化作用, 并通过抗氧化呈现保肝作用.

1.2.4 抗炎作用: 诸葛丽等<sup>[18]</sup>研究发现姜黄素对蛋氨酸-胆碱缺乏制备非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型呈现显著的抗炎作用, 其机制是通过抑制NF- $\kappa$ B促炎信号通路的表达, 抑制炎症因子生成, 从而调控炎症信号传导通路, 实现对肝组织的保护作用. 唐丹等<sup>[19]</sup>发现姜黄素能促进PPAR- $\alpha$  mRNA表达, 降低PPAR- $\alpha$ 启动子甲基化, 改善脂肪变细胞的炎症, 减少肝内脂质沉积, 防止脂肪变性达到保肝护肝作用. 以上说明姜黄素对NAFLD的防治机制与抑制炎症介质的产生有关.

1.3 姜黄素对酒精性肝炎防治机制 酒精性肝炎(alcoholic hepatitis, ALD)是大量饮酒引起的肝脏损害性疾病, 诱发肝细胞坏死, 严重者可致肝衰竭. 曾瑜等<sup>[20]</sup>研究表明, 姜黄素能通过降低肝内MDA含量, 升高SOD和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性, 降低活性氧对肝细胞膜的脂质及蛋白质的损伤, 维持细胞膜结构、功能的完整性, 减少脂质过氧化物的产生, 而减少酒精对肝组织损伤, 从而达到治疗ALD的作用. 胡静等<sup>[21]</sup>通过建立体外乙醇诱导氧化损伤细胞模型, 造模成功后予以不同浓度的姜黄素进行干预, 检测肝内SOD、GSH-Px活性以及MDA水平; 结果发现姜黄素可以有效减轻肝内脂质过氧化程度, 提高SOD与GSH-Px活性、降低MDA含量, 以此为机制提高肝细胞的抗氧化能力, 减轻酒精引起的ALD. 有发现姜黄素通过血红素加氧酶(heme oxygenase-1, HO-1)的诱导作用<sup>[22]</sup>, 对酒精诱导的肝氧化损伤形成潜在的保护作用;

#### 创新盘点

本文系统阐述中药莪术几种主要活性成分如姜黄素、榄香烯、莪术醇、吉马酮对治疗肝脏疾病之间的相互关系, 以及姜黄素、榄香烯、莪术醇、吉马酮治疗肝病最新进展, 提示中药莪术的活性成分对肝脏疾病有防治作用且有确定疗效.

**应用要点**

姜黄素具有抗肿瘤、抗炎、抗纤维化等作用, 可用于治疗慢性肝病、肿瘤等疾病; 榄香烯能诱发肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞的生长, 促进机体免疫反应, 降低放疗不良反应; 莪术醇可以抑制转化生长因子- $\beta$ 1等表达从而发挥抗肝纤维化作用, 莪术醇还可以通过抑制基因表达, 来诱导肿瘤细胞的凋亡, 发挥其抗肿瘤的作用; 吉马酮在肝癌细胞的增殖、周期以及凋亡基因都可以发挥作用, 从而呈现抗肝癌作用。

此保护性作用涉及诱导HO-1表达, 此为防治ALD提供了药理学研究新靶点。

1.4 姜黄素对肝纤维化的防治作用 目前国内外大量研究证实姜黄素具有较显著的抗肝纤维化作用, 其机制则较为复杂。吴雄健等<sup>[23]</sup>运用CCl<sub>4</sub>诱导大鼠肝纤维化模型探究姜黄素抗肝纤维化作用和机制, 发现姜黄素能抑制血清活性氧和内毒素的水平, 抑制了肝组织中多种细胞因子的表达; 该结果为姜黄素干预肝纤维化的作用机制提供了佐证。钟越等<sup>[24]</sup>运用CCl<sub>4</sub>诱导大鼠肝纤维化模型, 证实姜黄素对肝纤维化模型具有干预作用, 其机制与抗氧化能力增强、抑制脂质过氧化反应有关。任新风<sup>[25]</sup>观察姜黄素纳米粒对二甲亚硝胺大鼠肝纤维化模型影响, 结果证实此纳米粒能逆转大鼠肝纤维化, 显著改善肝功能, 显著减轻过氧化损伤, 保护肝细胞, 减少胶原生成, 阻断和逆转肝纤维化。有研究<sup>[26]</sup>表明双去甲氧基姜黄素(bisdemethoxycurcumin, BDMC-a)对基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)的表达, BDMC-a能显著降低胶原和TIMPs水平和正向调节MMPs的表达。通过建立CCl<sub>4</sub>大鼠肝纤维化模型, 研究姜黄素对HSC的表达、细胞运动及相关血管形成机制的影响, 发现姜黄素能改善肝纤维化大鼠肝窦毛细血管瘤化<sup>[27]</sup>; 该研究结果还说明了不同剂型的姜黄素对不同的肝纤维化模型均有阻断和逆转肝纤维化作用, 成为一种有效的抗纤维化制剂。

1.5 姜黄素对肝癌的防治作用 肝癌是发生于肝脏的恶性肿瘤, 恶性程度高, 危害大, 且缺乏有效防治措施, 因此针对肝癌的临床防治及其机制的研究意义重大。近年来有不少关于姜黄素抗肝癌的研究, 证实其作用机制可能有以下几方面。

1.5.1 抗氧化及自由基: 赵岩等<sup>[28]</sup>对二乙基亚硝胺、CCl<sub>4</sub>、乙醇制备大鼠肝癌初期模型进行姜黄素干预研究, 结果表明姜黄素能显著提高肝脏及肝线粒体的活性, 同时降低模型大鼠的肝脏相关血清学和酶学的影响, 说明姜黄素能通过减轻肝细胞的损伤, 减少肝细胞内的氧化应激作用强度, 从而抑制肝癌的发生及其病程的进展。

1.5.2 抑制肝癌细胞侵袭转移: 江敏华等<sup>[29]</sup>

用不同浓度姜黄素在体外对人肝癌细胞株SMMC7721干预48 h, 观察该成分对SMMC7721细胞株黏附力、运动力和侵袭力的影响, 证实姜黄素能明显抑制SMMC7721细胞株对Matrigel胶的黏附作用, 并随着给药浓度增加其黏附抑制率也逐步升高, 呈现剂量依赖性, 证明了姜黄素能够明显抑制肝肿瘤细胞与转移灶细胞外基质的黏附能力, 进而降低了肝癌细胞的侵袭转移能力。李帅帅等<sup>[30]</sup>以不同浓度姜黄素和25  $\mu$ mol/L LY294002(LLY294002为抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的选择性抗癌药)处理人肝癌细胞株BEL-7402细胞, 经过结果分析证实姜黄素可能通过PI3K/AKT/mTOR信号传导通路抑制BEL-7402细胞中环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达, 从而抑制肿瘤血管的生成。研究<sup>[31]</sup>表明, 姜黄素对多种肝细胞癌模型表现出抗癌特性: 姜黄素对RasH小鼠有明显抑制肝腺瘤的形成和增长, 此类小鼠对二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)致癌易感性高。姜黄素对DEN诱发小鼠肝癌模型能减少肿瘤多发性和发病率<sup>[32]</sup>。四氢姜黄素对人肝肿瘤HepG2细胞株显示有抗血管生成的作用<sup>[33]</sup>。在DEN诱发和苯巴比妥引起的肝癌大鼠模型, 姜黄素明显减轻氧化应激诱导肝癌发生期间的组织损伤<sup>[34]</sup>。以上研究结果说明姜黄素具有抑制肝癌细胞体内侵袭、转移能力和抑制肿瘤血管生成的作用, 可能是一个潜在的肝癌治疗药物。

1.5.3 通过抗炎呈现抗肝肿瘤: 张会存等<sup>[35]</sup>培养HepG2株, 用姜黄素干预24 h后发现, 不同剂量的姜黄素均能抑制NF- $\kappa$ B的表达, 表明姜黄素通过NF- $\kappa$ B抑制肿瘤相关蛋白的表达, 同时抑制肝细胞NF- $\kappa$ B信号转导通路的激活, 表现出减轻肝脏炎性病变程度, 进而发挥抗肝肿瘤作用。

1.5.4 其他: 焦艺博等<sup>[36]</sup>用DEN诱导肝癌前病变小鼠模型, 同时予姜黄素灌胃, 发现不同剂量姜黄素均能上调肝癌细胞信号分子低氧诱导因子-1的表达, 阻碍细胞周期的调控信号及传导信号, 使细胞周期蛋白D的表达下降, 使肝癌细胞停滞于G<sub>1</sub>/S周期; 并诱导肝癌细胞凋亡, 抑制肝癌细胞增殖活性, 阻断诱导性肝癌前病变。李勇等<sup>[37]</sup>也通过不同浓度姜黄素干预HepG2株的增殖、分化, 发现姜黄素显著抑制HepG2增殖活力。运用细胞黏附重组基底膜

实验检测不同浓度姜黄素对HepG2黏附能力的影响, 用Transwell侵袭实验检测姜黄素对HepG2趋化运动能力的影响, 其结果发现姜黄素能通过显著抑制HepG2侵袭转移能力, 呈现抗肿瘤药理作用。

## 2 榄香烯在肝脏疾病中的作用

榄香烯(elemene)是从姜科植物温郁金中提取的抗癌和抗纤维化的有效成分, 具有辛辣的茴香气味。

2.1 榄香烯的基础研究 榄香烯能抗纤维化, 能诱发肿瘤细胞凋亡, 能抑制肿瘤细胞的生长; 可用于癌性腹水、胸腔积液、脑性水肿等临床治疗; 具有改变和增强免疫原, 促进机体免疫反应; 对实体瘤的西医治疗可增强疗效, 降低放疗不良反应等作用。

2.1.1 榄香烯的抗肝纤维化作用: 胡胜军等<sup>[38]</sup>通过实验证实 $\beta$ -榄香烯可抑制肝纤维化组织中HSC活化标记活化因子的表达, 表明 $\beta$ -榄香烯可通过抑制HSC的活化增殖、诱导凋亡, 抑制活化因子的分泌合成, 从而减少细胞外基质的来源, 使肝脏中的沉积降低, 发挥抗肝纤维化的作用。

2.1.2 榄香烯的抗肿瘤作用: 朱锐等<sup>[39]</sup>用榄香烯对HSC作用后,  $\beta$ -榄香烯对HSC增殖的抑制作用存在剂量依赖性, 半数抑制浓度为27.37 mg/L。方卓等<sup>[40]</sup>用榄香烯对PLAD801株实验表明: 不同浓度榄香烯对PLA801细胞各周期均有抑制作用。龚敏等<sup>[41]</sup>对榄香烯干预48 h后的HepG2株检测结果表明, 能降低DNA拓扑异构酶I和II mRNA表达, 并呈现剂量依赖性。总之, 榄香烯能够通过抑制细胞增殖、下调DNA拓扑异构酶表达, 从而抑制癌株细胞的增殖并诱导其发生凋亡。榄香烯对HepG2株的抑制作用随用药浓度和时间呈梯度的增加。

2.1.3 榄香烯抑制肿瘤血管生成: 榄香烯对鸡胚的绒毛膜囊的研究中发现<sup>[42]</sup>, 低剂量的榄香烯能显著抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达, 从而抑制微血管的形成; 榄香烯能抑制肿瘤的转移, 皮下种植黑色素瘤细胞的裸鼠后腹腔注射榄香烯1 wk, 发现黑色素瘤的肿瘤的大小以及肺转移率均小于对照组, 榄香烯治疗的裸鼠黑色素瘤的大小以及肺转移率均低于对照组, 研究机制可能是榄香烯明显抑制CD34的表达;

榄香烯能够降低荷瘤小鼠血清中层黏连蛋白(laminin, LN)含量, 抑制肿瘤细胞对纤维结合蛋白和LN黏附, 减弱肿瘤细胞的运动能力<sup>[43]</sup>。

2.1.4 榄香烯改变和增强免疫原, 促进免疫反应作用: 金梅等<sup>[44]</sup>研究表明榄香烯的作用有: (1)对肝癌和L615白血病模型及复合瘤株具有明显主动免疫保护效应; (2)能明显提高受体外细胞毒攻击的小鼠免疫脾细胞的体内免疫强度; (3)能增加H22肝癌和L615白血病两种模型的主动免疫保护效应。林琳等<sup>[45]</sup>研究发现, 黄芪甲苷与榄香烯合用可增强抗原提呈细胞——树突状细胞(dendritic cells, DC)表面免疫相关的多种刺激因子表达, 有助于DC传递外源性抗原和激活T细胞, 使机体进一步达到免疫监视和应答作用; 同时榄香烯还可通过促进DC分泌IL-12、IL-6等细胞因子而增强细胞免疫功能。这些都是榄香烯发挥抗肿瘤免疫的机制, 通过多种途径改善和提高机体免疫功能, 对免疫系统具有保护和促进作用。这可能使榄香烯成为一种新型的抗肿瘤药物。

2.1.5 榄香烯抑制细胞周期呈现抑制增殖和促进凋亡: 榄香烯可通过抑制细胞周期蛋白磷酸化达到调控G<sub>1</sub>/S关卡效果, 进而抑制细胞的增殖过程, 并诱导细胞发生凋亡; 在细胞方面榄香烯能抑制肝癌细胞的增殖、诱导细胞凋亡并且能使细胞停滞于G<sub>2</sub>/M期, 也可使细胞迁移、侵袭能力降低<sup>[46]</sup>。动物实验方面, 郭霞等<sup>[47]</sup>研究表明, 榄香烯可降低肝癌荷瘤小鼠的瘤质量, 也显著地上调了c-Met磷酸化表达水平。

2.2 榄香烯的临床研究 榄香烯治疗原发性肝癌: 彭齐荣等<sup>[48]</sup>观察了59例原发性肝癌III期患者, 经肝动脉缓慢注射榄香烯600-1000 mg, 并加常规超乳化碘油10-40 mL混悬液进行栓塞, 介入术后继续静脉滴注榄香烯注射液, 600-800 mg/d, 2 wk为1个疗程, 同时给予护肝、对症和支持治疗。结果显示治疗后患者甲胎蛋白明显下降, 病情的恶化率低至22.03%同时显著改善其生活质量; 同时对其外周血白细胞、红细胞、血小板、肝肾功能无明显影响。赵成等<sup>[49]</sup>采用随机对照研究方法观察了榄香烯注射液联合肝癌介入化疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)治疗原发性肝癌的临床疗效, 41例患者采用TACE治疗, 治疗组在此基础上加用榄香烯注射液40 mL(200 mg)灌注, 结果治疗有效率为71.43%, 对照组为45.00%, 2

### 同行评价

本文对中药莪术中的几种成分的活性进行文献综述, 为莪术的深入研究提供理论基础, 有一定的意义。

组疗效比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而在生活质量和不良反应方面, 加用榄香烯并未使患者治疗的负荷增加. 以上研究结果证实了榄香烯干预肝癌的疗效, 并进行了一定的干预机制探究.

### 3 莪术醇抗肝脏疾病的药理学作用

莪术醇(Curcumol), 又名姜黄环奥醇、姜黄醇, 是20世纪60年代从蓬莪术的挥发油中分离出的倍半萜类化合物. 该成分经研究具有较为确切的保肝护肝, 抗肝纤维化药理学作用.

3.1 莪术醇对肝脏作用的药理学研究 莪术醇对肝癌细胞周期有影响以及能抑制肿瘤细胞的侵袭和转移. 莪术醇还可以通过抑制HepG2细胞株COX-2和VEGF的表达, 来诱导瘤细胞的凋亡, 发挥其抗肿瘤的作用.

3.1.1 莪术醇抑制肝癌细胞血管生成作用: 唐渊等<sup>[50]</sup>利用机械分散和超声乳化法, 成功制成莪术醇脂质体, 其研究结果显示莪术醇能显著抑制体外培养的HepG2增殖及诱导其凋亡; 而使用反转录多聚酶链反应法检测到HepG2株的COX-2 mRNA和VEGF mRNA表达水平出现下降; 提示莪术醇可能是通过抑制HepG2株的COX-2和VEGF基因表达, 诱导瘤细胞凋亡, 减少肿瘤血管形成等机制而发挥其抗肿瘤药理学作用.

3.1.2 莪术醇对细胞周期与侵袭、转移作用的影响: 黄岚珍等<sup>[51]</sup>研究发现, 莪术醇对于人肝癌HepG2株的细胞增殖具有明显抑制作用, 并具有明显的时间和剂量的依赖性. 实验发现莪术醇能够显著抑制细胞周期蛋白A1的表达, 这可能成为其诱导细胞发生G<sub>1</sub>期阻滞的重要原因. 徐立春等<sup>[52]</sup>通过研究发现莪术醇能抑制人胃腺癌细胞(SGC-7901)细胞的增殖, 明显促进肿瘤的细胞凋亡, 显著抑制MMP2的表达, 降低细胞培养液上清中的一氧化氮含量, 从而发挥上述的抗肿瘤作用.

3.1.3 莪术醇对肝癌细胞生长的抑制作用及凋亡蛋白的作用: 龚玲等<sup>[53]</sup>采用不同浓度莪术醇 $\beta$ -环糊精包合物处理解育肝癌Bel-7404细胞后, 证实了莪术醇能够抑制肝癌细胞Bel-7404增殖和促进凋亡, 并通过上调p21WAF1及p27KIP1基因表达而诱导细胞出现G<sub>1</sub>期阻滞现象; 进而报道莪术醇包合物能够抑制肝癌细胞Bel-7404的增殖, 其机制可能是通过诱导细胞发生凋亡.

### 4 吉马酮的基础研究

吉马酮(Germacrone)也是莪术中分离得出的倍半萜类物质. 吉马酮在肝癌细胞的增殖活性、凋亡基因调控方面有显著的药理学作用, 从而呈现抗肝癌作用.

4.1 吉马酮抑制肝癌细胞的增殖 Sadia Roshan等<sup>[54]</sup>通过病理学研究方法比较了吉马酮对Bel7402和L02细胞株的增殖、细胞凋亡和活性氧含量及蛋白合成的影响. 结果在实验浓度范围内, 吉马酮出现可选择性的、浓度依赖性的抑制Bel7402细胞增殖作用; 而吉马酮可以剂量依赖性地促进肝癌Bel7402细胞凋亡及上调活性氧的含量; 并显著促进抑癌蛋白的表达和抑制抗凋亡蛋白表达. 以上结果说明了吉马酮显著的抑制体外肝癌Bel7402细胞增殖的作用.

4.2 吉马酮对肝癌细胞凋亡基因的影响 Liu等<sup>[55]</sup>研究了基于JAK2/STAT3信号通路的吉马酮诱导HepG2细胞凋亡的药理学作用. 将HepG2细胞与吉马酮进行24 h孵育后, 测定p-STAT3、STAT3蛋白的表达水平, 结果表明吉马酮可显著抑制P-STAT3和P-JAK2信号通路的活化, 同时调节p53和Bcl-2家族成员的表达水平. 此外发现细胞因子IL-6通过提高JAK2/STAT3信号通路的表达水平, 可以抑制吉马酮诱导的HepG2细胞的凋亡过程; 而吉马酮通过对JAK2/STAT3信号通路中JAK2抑制剂AG490的抑制作用, 可以进一步使HepG2细胞发生凋亡并使响应吉马酮暴露活性氧的含量增加.

### 5 结论

中药是一个巨大的宝库, 在肝脏疾病高发, 西药干预效果不显著, 防治手段有限的背景下, 中药单体的研究为该疾病的治疗开辟了新思路、新途径. 近年来莪术等中药的有效提取成分已经广泛应用于肝脏疾病的基础及临床研究, 并取得了较为充分的研究效果, 为中药的有效成分防治肝病提供了大量的理论及实验依据. 其中, 中药莪术的有效成分干预肝脏疾病的研究也得到了广泛关注, 并且已经充分开展并呈现猛增趋势, 也取得了一些可喜的研究结果. 研究发现莪术中相当丰富的各单体成分对肝脏疾病都有作用, 然而在作用机制上, 当前所完成实验均未能深入、系统的对该药的抗肝脏疾病机制进行研究, 部分实验在证实了

该活性成分具有抗肝脏疾病作用的同时, 并没有探究可能存在联系的其他相关作用机制. 少数实验虽然对作用机制进行了研究, 但也只是停留在对部分已知的经典信号通路及基因表达调控的层面上, 未能在新的细胞通路上取得突破. 有的研究则作用效应均缺乏具体的量效评价. 综上, 前研究者的成果仍然比较杂、散, 尚缺乏系统性研究, 这些问题使得莪术的逆转肝脏疾病临床药物的开发工作理论意义有限. 所以莪术的单体成分在干预肝脏疾病特异性作用靶点的研究、信号通路及基因调控的明确机制等仍需完善后续研究. 而在未来的研究中, 一旦在以上几方面取得突破, 莪术单体在抗肝脏疾病的临床防治工作上必将发挥不可估量的作用.

## 6 参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 274-275
- 2 陈旭, 曾建红. 广西莪术挥发油化学成分的研究. 药物生物技术 2008; 15: 324
- 3 张红玉, 张丽莎, 张杰, 张永勇, 潘家荣. 温郁金化学成分的研究. 中药 2016; 38: 1534-1537
- 4 李金慈, 陆兔林, 毛春芹, 季德, 李林, 肖永庆. 莪术醋制前后抗复合因素致大鼠肝纤维化作用的比较研究. 中草药 2013; 44: 2710-2716
- 5 邵敬伟, 董海燕, 王涛, 郭养浩. 中药莪术激活PXR及对大鼠肝细胞色素P4503A的影响. 中国药理学通报 2008; 24: 504-509
- 6 张伟霞, 李娟, 陈禾凤, 陈冰. 姜黄素对雷公藤甲素肝损伤的保护作用. 药学与临床研究 2016; 24: 357-360
- 7 Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2007; 25: 185-209 [PMID: 17763046 DOI: 10.1080/10590500701569398]
- 8 韩冰. 姜黄素保护ConA诱导小鼠免疫性肝炎的作用机制. 上海: 复旦大学, 2010: 1-69
- 9 李晶菁, 张霞, 陈瑜, 蔡丹磊, 黄中伟. Nrf2在脓毒症大鼠肝组织中的表达及姜黄素的干预作用. 重庆医学 2013; 42: 2873-2876
- 10 Wong VW, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Li MK, Chan HY, Chim AM, Yu J, Sung JJ, Chan HL. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut* 2010; 59: 969-974 [PMID: 20581244 DOI: 10.1136/gut.2009.205088]
- 11 王子超, 赵丽娟, 黄婷婷, 朱明飞. 姜黄素对大鼠非酒精性脂肪性肝病的治疗作用及其对肝脏瘦素表达的影响. 解放军医学杂志 2016; 41: 909-914
- 12 周玲玲, 林琼琼, 周伶俐, 祁旦已, 赵志光. 姜黄素对非酒精性脂肪肝病兔血脂及肝组织PPAR- $\gamma$ 水平的影响. 浙江中西医结合杂志 2012; 22:7-10
- 13 Lin J, Chen A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by curcumin blocks the signaling pathways for PDGF and EGF in hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2008; 88: 529-540 [PMID: 18332871 DOI: 10.1038/labinvest.2008.20]
- 14 Zhang F, Kong D, Chen L, Zhang X, Lian N, Zhu X, Lu Y, Zheng S. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  interrupts angiogenic signal transduction by transrepression of platelet-derived growth factor- $\beta$  receptor in hepatic stellate cells. *J Cell Sci* 2014; 127: 305-314 [PMID: 24259663 DOI: 10.1242/jcs.128306]
- 15 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 钱培刚, 蒋小岗, 郭次仪. 姜黄素防治大鼠高脂性脂肪肝的研究. 中草药 2010; 41: 1322-1326
- 16 滕耀红, 祝骥, 庞珍珍, 王萍儿, 卢德赵. 姜黄素对非酒精性脂肪肝细胞胆固醇代谢的影响. 中医药大学学报 2014; 38: 115-120
- 17 麦静情, 刘玉莉, 成扬, 陈高峰, 平键, 汪美凤. 姜黄素对大鼠非酒精性脂肪肝的干预作用. 中国中西医结合消化杂志 2011; 19: 239-242
- 18 诸葛丽, 苏冬梅, 李健, 杨美娟, 刘云霞, 李军祥. 姜黄素对小鼠非酒精性脂肪性肝炎炎症信号传导通路的调控作用. 中西医结合肝病杂志 2011; 21: 352-355
- 19 唐丹, 周永健, 李瑜元, 杜艳蕾, 聂玉强. 姜黄素对脂肪变性肝细胞过氧化物酶体增殖物活化受体- $\alpha$ 的去甲基化作用. 广东医学 2014; 35: 175-179
- 20 曾瑜, 刘婧, 黄真真, 潘兴昌, 张立实. 姜黄素对急性酒精性肝损伤小鼠抗氧化功能的影响. 卫生研究 2014; 43: 282-285
- 21 胡静, 陈新祥, 胡剑峰, 王洪武. 姜黄素对乙醇诱导的人L-02肝细胞氧化损伤的保护作用研究. 医学理论与实践 2013; 26: 3-4
- 22 Bao W, Li K, Rong S, Yao P, Hao L, Ying C, Zhang X, Nussler A, Liu L. Curcumin alleviates ethanol-induced hepatocytes oxidative damage involving heme oxygenase-1 induction. *J Ethnopharmacol* 2010; 128: 549-553 [PMID: 20080166 DOI: 10.1016/j.jep.2010.01.029]
- 23 吴雄健, 朱海燕. 姜黄素对大鼠肝纤维化防治作用. 上海医药 2015; 36: 72-75
- 24 钟越, 钟秀宏, 孙艳美, 杨淑燕. 姜黄素拮抗四氯化碳致肝纤维化作用. 中国公共卫生 2015; 31: 447-449
- 25 任新风. 姜黄素mPEG-PLGA纳米粒逆转二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化作用研究. 中华中医药学刊 2011; 29: 2567-2569
- 26 Rajagopalan R, Sridharana S, Menon VP. Hepatoprotective role of bis-demethoxy curcumin analog on the expression of matrix metalloproteinase induced by alcohol and polyunsaturated fatty acid in rats. *Toxicol Mech Methods* 2010; 20: 252-259 [PMID: 20465419 DOI: 10.3109/15376516.2010.482961]
- 27 Yao Q, Lin Y, Li X, Shen X, Wang J, Tu C. Curcumin ameliorates intrahepatic angiogenesis and capillarization of the sinusoids in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *Toxicol Lett* 2013; 222: 72-82 [PMID: 23845850 DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.06.240]
- 28 赵岩, 周毕军. 姜黄素对大鼠肝癌诱发初期肝脏氧化应激的影响. 中药药理与临床 2014; 30: 43-45
- 29 江敏华, 谢莹, 胡凤霞, 甘建和. 姜黄素对人肝癌细胞SMMC7721侵袭转移的影响. 江苏医药 2010; 36: 2780-2782
- 30 李帅帅, 孙军. PI3K/AKT/mTOR信号传导通路在姜黄素抑制人肝癌细胞Cox-2表达中的作用. 解放军医学杂志 2014; 39: 30-33
- 31 Huang AC, Lin SY, Su CC, Lin SS, Ho CC, Hsia TC, Chiu TH, Yu CS, Ip SW, Lin TP, Chung JG. Effects of curcumin on N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)-induced lung and liver

- tumorigenesis in BALB/c mice in vivo. *In Vivo* 2008; 22: 781-785 [PMID: 19181006]
- 32 Chuang SE, Kuo ML, Hsu CH, Chen CR, Lin JK, Lai GM, Hsieh CY, Cheng AL. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 331-335 [PMID: 10657978 DOI: 10.1093/carcin/21.2.331]
- 33 Yoysungnoen P, Wirachwong P, Changtam C, Suksamrarn A, Patumraj S. Anti-cancer and anti-angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2003-2009 [PMID: 18395899 DOI: 10.3748/wjg.14.2003]
- 34 Sreepriya M, Bali G. Effects of administration of Embelin and Curcumin on lipid peroxidation, hepatic glutathione antioxidant defense and hematopoietic system during N-nitroso-diethylamine/Phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem* 2006; 284: 49-55 [PMID: 16477385 DOI: 10.1007/s11010-005-9012-7]
- 35 张会存, 塔娜, 杨美娟. 姜黄素对肿瘤坏死因子- $\alpha$ 诱导后人肝癌细胞核转录因子表达的影响. *中国中医药信息杂志* 2013; 20: 25-27
- 36 焦艺博, 刘晓婷, 毛文超, 张健, 冯丽莉, 田民强, 张东星, 蔡大勇, 王玥琦. 姜黄素对二乙胺基亚硝胺诱发小鼠肝癌前病变的预防作用. *中国药师* 2012; 15: 1218-1222
- 37 李勇, 肖雅玲, 陈朝晖, 黎明, 李青玲, 邹欣, 周海燕. 姜黄素对人肝母细胞瘤细胞株HepG2增殖和转移的影响. *中国普通外科杂志* 2014; 23: 117-120
- 38 胡盛军, 杨玲, 朱清静, 彭汉光.  $\beta$ -榄香烯对实验性肝纤维化大鼠TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA、Col-1表达的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1324-1330
- 39 朱锐, 沈霖, 杨玲, 但丹, 杨建国.  $\beta$ -榄香烯对肝星状细胞分泌ANG及表达AT1RmRNA的影响. *山东医药* 2008; 44: 18-21
- 40 方卓, 陈洪胜, 陈宏勃, 刘跃明. 榄香烯对PLA801D细胞株诱导分化研究. *中国老年学杂志* 2008; 28: 768-769
- 41 龚敏, 梁鑫淼, 崔晓楠. 榄香烯对人肝癌HepG-2细胞增殖及拓扑异构酶 I 的影响. *中国癌症杂志* 2011; 21: 321-325
- 42 Chen W, Lu Y, Wu J, Gao M, Wang A, Xu B. Beta-elemene inhibits melanoma growth and metastasis via suppressing vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67: 799-808 [PMID: 20563582 DOI: 10.1007/s00280-010-1378-x]
- 43 胡军, 金伟, 杨佩满.  $\beta$ -榄香烯逆转人乳腺癌MCF-7/ADM细胞对阿霉素耐药性的研究. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 268-270
- 44 金梅, 白雪, 胡景慧. 榄香烯复合抗肿瘤疫苗免疫的效应机制. *中国农业科学* 2010; 37: 1379-1384
- 45 林琳, 沈洪, 王立新, 周晓波, 吴静. 黄芩甲苷、 $\beta$ -榄香烯对小鼠树突状细胞免疫功能的体外实验研究. *临床检验杂志* 2011; 29: 129-131
- 46 郑瑾, 刘强, 任凯夕, 史恒军, 丁井永.  $\beta$ -榄香烯对肝癌细胞SK-hep-1的迁移和侵袭力的影响. *现代肿瘤医学* 2009; 17: 2054-2058
- 47 郭霞, 秦岩, 谭婧, 张红. 榄香烯对肝癌H22细胞荷瘤小鼠的抑瘤作用及其可能机制. *中国临床药学杂志* 2013; 22: 155-159
- 48 彭齐荣, 肖必, 马珑, 程涛, 谭永才. 榄香烯治疗中晚期原发性肝癌的临床疗效观察. *中西医结合肝病杂志* 2010; 20: 274-276
- 49 赵成, 张蕴超, 孙一予, 贾英杰. 榄香烯注射液联合介入化疗治疗原发性肝癌的临床研究. *疑难病杂志* 2012; 11: 882-883
- 50 唐渊, 李晓辉. 莪术提取物对肝癌细胞系HepG2的抗癌作用及机制研究. *中国药理学通报* 2007; 23: 790-794
- 51 黄岚珍, 王娟, 卢菲婷, 杨飞城, 陈旭. 莪术醇抑制人肝癌细胞HepG2增殖的机制. *中国中药杂志* 2013; 38: 1812-1815
- 52 徐立春, 陈海燕, 文洁, 陶亚玲. 莪术醇对人胃癌细胞凋亡、MMP2、NO影响的初步探讨. *中国医药导报* 2012; 9: 18-21
- 53 龚玲, 夏小芳, 叶晓平, 吴建, 景钊. 莪术醇 $\beta$ -环糊精包合物对Bel-7404肝癌细胞体外抑瘤作用和细胞周期影响的研究. *中国现代医生* 2015; 53: 11-13
- 54 Sadia Roshan, 柳均熠, 郑倩. 吉马酮抑制肝癌BEL7402细胞增殖机制初步研究. *时珍国医国药* 2014; 25: 2875-2877
- 55 Liu YY, Zheng Q, Fang B, Wang W, Ma FY, Roshan S, Banafa A, Chen MJ, Chang JL, Deng XM, Li KX, Yang GX, He GY. Germacrone induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells through inhibition of the JAK2/STAT3 signalling pathway. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2013; 33: 339-345 [PMID: 23771657 DOI: 10.1007/s11596-013-1121-z]

编辑: 马亚娟 电编: 李瑞芳



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2017 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费. 审稿周期及发表周期不变. (《世界华人消化杂志》编辑部)



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

