

microRNA 生物合成的调控进展 --TGF β /Smad 信号途径的作用 *廖清池 周胜华 Δ

(中南大学湘雅二医院 心血管内科 湖南 长沙 410011)

摘要 microRNA(miRNA)是一类非编码的小分子单链 RNA 主要通过转录后抑制靶基因表达调节各种生物功能。miRNA 表达水平在正常发育过程中以及在癌症及心血管疾病等各种疾病中发生变化。目前控制 miRNA 生物合成的信号途径以及调节机制尚未完全阐明。miRNA 基因转录后在大蛋白复合体的介导下经一系列协调加工过程形成成熟的 miRNA。近来发现转化生长因子 β (TGF β)信号途径的转导因子 Smad 蛋白在细胞核内调节 miRNA 的加工处理过程起重要作用。本文主要综述 TGF β /Smad 信号途径在 miRNA 生物合成中的调节作用。

关键词 MicroRNA Smad Drosha 酶

中图分类号 R541.1 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)14-2779-04

Progress of Regulating MicroRNA Biogenesis by TGF- β /Smad Signaling Pathway*LIAO Qing-chi, ZHOU Sheng-hua Δ

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital Affiliated with Central South University, 410011, Changsha, China)

ABSTRACT: MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding and single-strand RNAs which modulate diverse biological function through post-translational repression of target gene expression. The levels of miRNAs are altered during normal development and pathogenesis of various diseases, including cancer and cardiovascular diseases. However, the signaling pathway controlling miRNA biogenesis and the regulating mechanism are not fully elucidated. Following transcription, mature miRNAs are produced through a series of coordinated processes mediated by large protein complexes. Recently the Smads, the signal transducers of the transforming growth factor β (TGF β) signaling pathway, are found to play an important regulatory role in the processing of miRNA. In the present review, we mainly summarized the regulatory effects of the TGF β /Smad signaling pathway on miRNA biogenesis.

Key words: MicroRNA; Smad; Drosha enzyme

Chinese Library Classification(CLC): R541.1 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2779-04

据报导 microRNA(miRNA)控制各种生物过程,包括早期胚胎发育、细胞分化、细胞增值、细胞凋亡以及代谢。人类基因中至少有三分之一受 miRNA 调控。大约 30-50%的 miRNA 编码于蛋白编码基因的内含子中,其余的则定位于各基因间位点上。大多数 miRNA 由 RNA 聚合酶转录,与 mRNA 一样其 5'端具有 7- 甲基鸟苷酸帽样结构,3'端具有多聚腺苷尾巴结构。miRNA 的合成机制高度保守,主要涉及由核糖核酸酶(又名 Drosha 酶)及 Dicer 酶分别介导的两个清除过程。在核内 miRNA 基因首先转录生成原始 miRNA(pri-miRNA) pri-miRNA 在 Drosha 酶的作用下加工形成包含有 65-80 个核苷酸的茎环样结构,即前体 miRNA(pre-miRNA)。Pre-miRNA 迅速被 Ras 相关核蛋白 GTP 酶(Ran-GTP)依赖的核质/细胞质转运蛋白 Exportin-5 转运至细胞浆中。然后在细胞浆内 Dicer 酶的作用下被进一步剪切成大约含有 22 个核苷酸的双链 miRNA(包括领头链及随从链)。随后双链解螺旋,其中领头链结合到

RNA 诱导的沉默复合物(RISC)中与靶 mRNA 相互作用导致负向调控蛋白质合成或降解靶 mRNA,另一随从链随即被降解。miRNA 与靶 mRNA 相互作用需要后者具备能与 miRNA 序列部分互补的结合位点。miRNA 5'端的 2-7 个核苷酸称为种子序列,它在抑制靶 mRNA 中起十分重要的作用。靶 mRNA 的 miRNA 结合序列经常位于其 3'端非翻译区(UTR),但是亦可能位于 5'端 UTR 或者编码区。尽管目前人们理解 miRNA 生物合成的基本机制已取得较大进展,但对 miRNA 生物合成的调节机制却知之甚少。

1 miRNA 表达的时空调节

1993 年 Lee 等在秀丽隐杆线虫中发现第一个 miRNA,被命名为 lin-4。其后 Reinhart 等在研究线虫的发育调控中发现了另一个被命名为 let-7 的 miRNA。Let-7 miRNA 合成的调节在进化过程中是高度保守的,表明 miRNA 以明确的时序模式表

* 基金项目 国家自然科学基金(30871053)

作者简介 廖清池(1977-)男,博士研究生,医师,主要研究方向 Smad3/microRNA 途径调控血管新生,
电话:13507451650 E-mail: lqchyl@gmail.com

Δ 通讯作者 周胜华 教授,博士生导师 E-mail: zxcellenthyll@gmail.com

(收稿日期 2011-03-21 接受日期 2011-04-15)

达。研究者在研究小鼠及人类成人器官的 miRNA 表达谱时发现大约一半 miRNA 的表达具有组织特异性^[1]。譬如,来自不同小鼠组织的克隆小 RNA miRNA-1 (miR-1)、miR-122a 以及 miR-124 分别在心脏、肝脏及脑组织中高表达。此外应用原位杂交技术识别出斑马鱼胚胎中存在大量组织特异性 miRNA 表达,这些 miRNA 在发育过程中也受时序调节。而且组织特异的 miRNA 表达增加可抑制祖细胞特异的 mRNA,这增加了祖细胞分化过程中细胞转化的精确性^[2]。

鉴于 miRNA 在发育过程中的重要性,在癌症、神经系统及心血管系统疾病等人类各种疾病中观察到 miRNA 的异常调节也就不足为奇。肿瘤样本中经常可见整体 miRNA 表达较正常组织明显减少,表明 miRNA 在维持细胞分化状态中起重要作用。事实上,let-7 在肺癌中表达显著减少,过表达 let-7 可明显抑制体内肿瘤生长^[3]。与 let-7 在癌症中低表达相反,另一类 miRNA(miR-21 及 miR-155)在各类肿瘤中被证实高度表达,进一步研究表明,这类 miRNA 有可能通过抑制促凋亡机制促进肿瘤生长。miRNA 表达谱可以用来预测肿瘤起源及预后,而且比传统的基因预测效果更好,这进一步强调了 miRNA 在肿瘤形成中的重要作用^[4]。深刻理解 miRNA 表达的正常及异常调节机制有可能为各种疾病的治疗提供新的思路。

2 Smad 蛋白调节 miRNA 的加工

miRNA 基因转录后形成的 pri-miRNA 在 Drosha 酶的作用下进一步被加工形成 pre-miRNA。由于 Drosha 酶能够识别成熟 miRNA 的 5'端或 3'端核苷酸序列,因此它在剪切加工 pri-miRNA 过程中的精确定位以及移动方向对产生成熟 miRNA 起关键作用。Drosha 酶的清除位点错误有可能导致 miRNA 的种子序列改变,进而引起 miRNA 的靶基因改变。此外在某些情况下清除位点的改变可翻转两条 miRNA 链的相对稳定性,导致错误的 miRNA 链并入 RISC 复合体中。在体内 Drosha 存在于大蛋白复合体中,与复合体中的辅助因子相互作用可促进其清除活性及作用的精确性。特别值得指出的是,Drosha 加工清除 pri-miRNA 需要有迪乔治综合症关键区域基因 8 (DGCR8)的参与。pri-miRNA 包括一个含 33 个核苷酸的茎样结构、将茎样结构连接起来的终末环结构以及两个单链 RNA 侧翼序列。DGCR8 可识别茎样结构与单链 RNA 结构间的区域,指导 Drosha 酶水解一个螺旋打开相应连接。尽管纯化的 DGCR8 及 Drosha 酶可介导许多 miRNA 的剪切加工,然而体外试验表明一些 pri-miRNA 剪切加工成 pre-miRNA 是个相对慢的过程,而且剪切亦不充分^[5]。因此,Drosha/DGCR8 复合体高效处理 miRNA 也许需要其他辅助因子。应用免疫沉淀及质谱分析方法发现 RNA 解旋酶 p68 (DDX5)以及 p72 (DDX17)是大 Drosha 微处理器复合体的组成成分,随后研究表明它们亦可与 DGCR8 相互作用^[6]。有研究者在分析成熟 miRNA 表达水平时发现 p68 及 p72 表达阴性的小鼠胚胎成纤维母细胞中 miRNA 明显减少,这说明 p68/p72 在 miRNA 的生物合成中起重要作用。最近研究显示 p68 可通过与 Smad 蛋白相互作用来正向调节 Drosha 酶的加工过程。Smad 蛋白是转化生长因子 β (TGF β)家族信号途径中的转导因子。在经典作用途径中,配体

与 TGF β 型及 型受体结合可促使核内积聚 Smad 受体 (R-Smad)。R-Smad 与 Smad4 结合形成复合体可与靶基因启动子的序列元件相结合,正向或负向调节基因转录。TGF β 及其家族成员骨形成蛋白 4(BMP-4)在血管平滑肌细胞(VSMC)分化过程中起非常重要的作用。应用 BMP-4 及 TGF β 处理 VSMC 后可增加具有收缩特性的基因表达,这一过程至少部分是由于 miR-21 介导抑制了程序性细胞凋亡蛋白 4(PDCD4)表达。VSMC 中的 miR-21 可被 BMP-4 及 TGF β 迅速诱导表达,随后导致 PDCD4 表达减少及 VSMC 相应基因表达增加^[7]。有趣的是尽管敲减 R-Smad 后可阻止 BMP-4 及 TGF β 对成熟的 miR-21 及 pre-miR-21 表达的上调作用,但对 pri-miR-21 的转录并没有影响^[7]。进一步研究表明 BMP-4 及 TGF β 可在转录后水平通过促进 Drosha 酶的加工步骤增加 pre-miR-21 及成熟 miR-21 的表达。研究证实 R-Smad 是 p68 的结合伴侣,表明 R-Smad 可与 Drosha/p68 复合体相互作用。利用免疫沉淀及 RNA 免疫沉淀方法证实在 BMP-4 及 TGF β 的刺激下 pri-miR-21 茎环结构上包含有 Drosha 酶及 p68 的复合体中亦有 Smad 的存在。经配体处理后结合到 pri-miR-21 的 Drosha 酶亦可升高,表明 Smad 蛋白也许促进 Drosha 酶与 miRNA 茎环样结构的联系。以上结果表明 TGF β 不仅在转录水平直接调节 miRNA 基因表达,而且能通过影响 miRNA 的加工过程来调节基因表达。Smad 蛋白在核浆中的穿梭活动由其 C 端的丝氨酸残基的磷酸化来控制,而 TGF β 型受体激酶可促进丝氨酸残基的磷酸化。有趣的是有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)以及葡萄糖合成酶激酶 3(GSK3)也能通过磷酸化作用改变细胞内 Smad 蛋白的定位。因此,Smad 蛋白介导的 miRNA 的生物合成并不一定依赖于 TGF β 及 BMP-4 分子的调节,它有可能通过 ERK-MAPK 及 Wnt 等信号途径改变 Smad 蛋白的核定位来调节。近来研究显示 p53 可通过 p68 与 Drosha 复合体发生相互作用进而促进 Drosha 酶的加工,这一作用方式与 Smad 相似^[8]。然而促发 p53 与 Drosha/p68 复合体相联系的机制目前尚不明确。需要指出的是 R-Smad 与 Drosha 相互作用并不需要 Smad4,敲减 VSMC 中 Smad4 并不影响 miR-21 的表达,而且在 Smad4 表达阴性的乳腺癌细胞中 TGF β 亦可强烈诱导 miR-21 的表达^[7]。以前有资料报导 R-Smad 与 Smad4 作为复合体一起被转入细胞核内,然而近来有研究证实它们也可通过不同的转入机制互不依赖的转入细胞核内^[9,10]。因此,Smad 受体可不与 Smad4 结合,而与 Drosha/DGCR8 复合体相互作用参与 miRNA 的加工。相反,R-Smad/Smad4 异质复合体则主要作为转录因子与 TGF β 靶基因的启动子区域的 Smad 结合元件 (SBE)相互作用在转录水平调节 miRNA 的合成。

除 miR-21 外,几个其它的 miRNA 也可被 BMP 及 TGF- β 转录后诱导,表明调节 miRNA 水平在细胞对外界信号做出迅速反应中起重要作用^[7]。近来有学者在研究一种被称为 Smad 核相互作用蛋白(SNIP1)的核因子时发现 Smad 在调节 Drosha 复合体功能中起重要作用。SNIP1 最初被证实是 Smad 的核蛋白伴侣,它亦存在于 Drosha 复合体中^[11]。SNIP1 的拟南芥同源体 DAWDLE(DDL)在将 pri-miRNA 有效加工成 pre-miRNA 的过程中是必要的,而且它能促进 Drosha 的拟南芥同源体,即

Dicer 样因子 1(DCL1)识别 pri-miRNA 并与之结合^[11]。下调哺乳动物细胞中的 SNIP1 减少了几类 miRNA 的表达,其中包括 miRNA-21^[11]。这些结果表明 SNIP1 参与了 miRNA 的生物合成,其机制可能与其通过与 Smad 蛋白的相互作用促进了 Drosha 酶的加工过程有关。

与 TGF β 信号途径介导的正向调节 Drosha 形成鲜明对比的是 miRNA 的 let-7 家族的剪切加工过程可受 Lin-28 负向调节。Lin-28 与 pri-let-7 结合后可阻止 Drosha 复合体对后者的剪切作用^[12,13]。研究中观察到尽管 pri-let-7 在大多数细胞类型中高度表达,然而成熟的 let-7 水平在高度表达 Lin-28 的未分化细胞中并不能检测到;相反,并不表达 Lin-28 的高分化细胞却能检测到成熟的 let-7^[14]。Lin-28 除了在核内抑制 Drosha 酶的加工步骤外,它还可在细胞浆中促使 Dicer 酶的降解进而抑制该酶对 pre-let-7 的剪切处理^[15]。目前尚不知 Smad 蛋白在调节 Dicer 酶的加工处理过程中是否起作用。总之,这些观察表明 Smad 蛋白存在于包含多种蛋白的大复合体中,通过与不同的 RNA 结合蛋白相互作用来调节成熟的 miRNA 水平。

3 Smad 蛋白调节 miRNA 基因转录

miRNA 基因的转录主要由 RNA 聚合酶介导。利用染色质免疫共沉淀法分析 miRNA 基因启动子的研究表明 miRNA 基因的启动子结构包括 CpG 岛、转录启动元件以及组蛋白修饰区,这些结构与蛋白编码基因的启动子区域并不能区分开来^[16,17]。而且调节 miRNA 基因转录的 DNA 结合因子与控制蛋白编码基因的那些因子大部分重叠。因此,Smad 蛋白作为转录因子很可能通过调节 miRNA 基因的转录而调节其表达。此外,TGF β /Smad 信号途径可调节 miRNA 生物合成相关的酶或调节因子的基因转录,如 Drosha、DGCR8 以及 Dicer 等。最近发现 Ago 蛋白的稳定性受转录后修饰调节。研究发现敲减或过度表达 Ago 蛋白可相应显著减少或增加 miRNA 水平,因此,相对稳定的 Ago 蛋白在调节 miRNA 的稳定性上起关键作用^[18,19]。Ago 蛋白的稳定性可因其某一特定脯氨酸残基被型胶原蛋白脯氨酸 4-羟化酶(C-P4H)羟化后而增加^[20]。敲减 C-P4H 可减少 Ago 蛋白水平。C-P4H 的 α 亚单位是形成活化型 C-P4H 的限速成分,有研究报导它可在转录水平由 TGF β 等不同刺激因子诱导产生。因此我们有理由推测 TGF β 上调 C-P4H 表达后可导致 Ago 蛋白稳定性增加,进一步导致整个 miRNA 表达增加。

4 Smad 蛋白的表观遗传学调节 miRNA 基因表达

由于大部分 miRNA 基因与蛋白编码基因一样均由同样的 RNA 聚合酶转录,因此蛋白编码基因的表观遗传学调控机制(如甲基化及乙酰化修饰)很可能也适用于 miRNA 基因。事实上几种 miRNA 基因,包括 miR-9-1、miR-193、miR-137、miR-342、miR-203 以及 miR-34b/c,在人类多种癌症中均被发现高度甲基化^[21,22]。相反 let-7a-3 基因在肺癌中却很少被甲基化修饰,这中低甲基化基因的高表达可导致促癌基因的转录增加^[23]。在发育及疾病发生过程中 miRNA 基因的启动子也受组蛋白修饰调节。据报导抑制组蛋白去乙酰酶(HDAC)活性可上

调癌细胞中一类 miRNA 的表达^[24]。研究表明 Smad 蛋白可招募 HDAC 或组蛋白乙酰转移酶(HAT)到各种各样的基因启动子中。因此,我们推断某些以前与 Smad 蛋白介导激活 HAT/HDAC 有关的 mRNA 表达变化很可能是由于 miRNA 表达改变所致的间接效果,而 miRNA 的表达改变主要通过 Smad 蛋白介导的表观遗传学调节方式来实现。

5 展望

miRNA 的生物合成涉及多种亚单位复合体的协调作用以及相继发生的清除、输出以及并入 RISC 复合体的过程。越来越多的研究表明上述每一个步骤均可成为潜在的调节点,因此 miRNA 生物合成的调节机制甚为复杂。至今仅有几个研究证实 TGF β /Smad 途径可在 miRNA 基因的转录水平及在 pri-miRNA 被 Drosha 加工成 pre-miRNA 的步骤中调节 miRNA 水平。与蛋白编码基因必须转录后翻译不同,miRNA 转录后不需要翻译,在应答周围环境刺激的变化时能更迅速修饰基因表达。因此,TGF β 及 BMP 信号可通过调节 miRNA 的生物合成做出更早的反应。由于单个 miRNA 能同时调节数百个靶基因表达,因此 TGF β /BMP 信号途径调节几个 miRNA 即可能对基因表达及细胞生理功能产生显著影响。将来探明 miRNA 的共同调节机制以及受这些共同机制调节的 miRNA 对细胞过程的影响显得尤为重要。随着越来越多 miRNA 的调节机制被揭示,当前一个主要的挑战是阐明调节 miRNA 的多种机制如何相互协调共同调节 miRNA 的表达。此外 Smad 蛋白在调节 miRNA 生物合成的作用有待将来进一步研究,以阐明 Smad 蛋白仅介导处理某些特定 miRNA 的机制(已有个别研究表明这类 miRNA 具有同样的 SBE^[25])以及它在 Drosha 微处理器复合体中的确切作用。

参考文献(References)

- [1] Lee E J, Baek M, Gusev Y, et al. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors [J]. RNA, 2008, 14(1): 35-42
- [2] Bussing I, Slack F J, Grosshans H. Let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer [J]. Trends Mol Med, 2008, 14(9): 400-409
- [3] Kumar M S, Erkeland S J, Pester R E, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(10): 3903-3908
- [4] Olson P, Lu J, Zhang H, et al. MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer [J]. Genes Dev, 2009, 23(18): 2152-2165
- [5] Morlando M, Ballarino M, Gromak N, et al. Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally [J]. Nat Struct Mol Biol, 2008, 15(9): 902-909
- [6] Shiohama A, Sasaki T, Noda S, et al. Nucleolar localization of DGCR8 and identification of eleven DGCR8-associated proteins [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(20): 4196-4207
- [7] Davis B N, Hilyard A C, Lagna G, et al. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation [J]. Nature, 2008, 454(7200): 56-61
- [8] Suzuki H I, Yamagata K, Sugimoto K, et al. Modulation of microRNA

- processing by p53 [J]. Nature, 2009, 460(7254): 529-533
- [9] Xu L, Yao X, Chen X, et al. Msk is required for nuclear import of TGF- β /BMP-activated Smads [J]. J Cell Biol, 2007, 178(6): 981-994
- [10] Yao X, Chen X, Cottonham C, et al. Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (33): 22867-22874
- [11] Yu B, Bi L, Zheng B, et al. The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(29): 10073-10078
- [12] Newman M A, Thomson J M, Hammond S M. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing [J]. RNA, 2008, 14(8): 1539-1549
- [13] Piskounova E, Viswanathan S R, Janas M, et al. Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28 [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (31): 21310-21314
- [14] Roush S, Slack F J. The let-7 family of microRNAs [J]. Trends Cell Biol, 2008, 18(10): 505-516
- [15] Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, et al. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(8): 987-993
- [16] Ozsolak F, Poling L L, Wang Z, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters [J]. Genes Dev, 2008, 22(22): 3172-3183
- [17] Corcoran D L, Pandit K V, Gordon B, et al. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data [J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5279
- [18] Diederichs S, Haber D A. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression [J]. Cell, 2007, 131(6): 1097-1108
- [19] Kim M S, Oh J E, Kim Y R, et al. Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers [J]. J Pathol, 2010, 221(2): 139-146
- [20] Qi H H, Ongusaha P P, Myllyharju J, et al. Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability [J]. Nature, 2008, 455(7211): 421-424
- [21] Lujambio A, Esteller M. How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs [J]. Cell Cycle, 2009, 8(3): 377-382
- [22] Lujambio A, Calin G A, Villanueva A, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(36): 13556-13561
- [23] Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, et al. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function [J]. Cancer Res, 2007, 67(4): 1419-1423
- [24] Nasser M W, Datta J, Nuovo G, et al. Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1 [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (48): 33394-33405
- [25] Davis B N, Hilyard A C, Nguyen P H, et al. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha [J]. Mol Cell, 2010, 39(3): 373-384

(上接第 2769 页)

- Song Ping-shun, Wei Yu-ling, Zhao Jian-bang. Determination of astragaloside in Radix Astragali of Ginseng capsule by HPLC-ELSD [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2008,30(4):629-630
- [7] 潘涛, 夏新华. HPLC-ELSD 法测定胎乐颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中国医药导报, 2010, 7(13) :54-55
- Pan Tao, Xia Xin-hua. Content determination of Astragaloside in Taile Granules by HPLC-ELSD [J]. China Medical Herald, 2010,7 (13):54-55
- [8] 王景. HPLC 测定归脾丸(浓缩丸)中黄芪甲苷的含量[J]. 中国当代医药, 2010, 26 :46-47
- Wang Jing. Determination of Astragaloside IV in Guipi pill (Concentrated Pills) by HPLC[J]. China Modern Medicine, 2010,26:46-47
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2010 年版(一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2010 :283
- State pharmacopoeia committee. prc codex[M]. Bei Jing:chinese medical science press, 2010:283
- [10] 郑国华, 冯其麟. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定复方甲亢片黄芪甲苷含量[J]. 医药导报, 2008,27(11) :1398-1399
- Zheng Guo-hua, Feng Qi-lin. Determination of astragaloside in Tablet-Fufangjiakang by HPLC-ELSD [J]. Herald of Medicine, 2008,27(11) :1398-1399