

盘花垂头菊中两种新型倍半萜类化合物诱导

人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡

陈瑛 张琪 王勤* (兰州大学生命科学学院, 甘肃兰州 730000)

摘要 [目的] 为开发新型肿瘤治疗药物提供依据。[方法] 通过单细胞电泳和流式细胞分析法等技术, 研究2种从盘花垂头菊中分离的高含氧甜没药烯型倍半萜化合物(HOBS)对人肝癌细胞SMMC-7721的抑制作用。[结果] 2种HOBS处理48 h后, SMMC-7721细胞体积变小, 且出现膜泡化和凋亡小体。单细胞电泳试验表明SMMC-7721细胞经不同浓度HOBS处理后, DNA碎片在电场中呈彗星状向阳极移动, 且彗星样尾迹随药物浓度的增大而增长。HOBS能以剂量依赖的方式诱导SMMC-7721细胞凋亡。当2种HOBS浓度为8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 细胞凋亡率分别达36.7%和38.9%。凋亡率随药物浓度的增大而升高, 与对照组相比有显著差异, 并出现典型的凋亡峰。2种HOBS可使细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平升高。[结论] HOBS能诱导SMMC-7721细胞凋亡。

关键词 盘花垂头菊; HOBS化合物; SMMC-7721细胞; 细胞凋亡;

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)10-04140-04

Apoptosis of Human Hepatoma Cells SMMC-7721 Induced by Two Kinds of New Sesquiterpenoid from *Gernanthodium discoidium* Maxim
CHEN Ying et al (College of Life Science of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract [Objective] The research aimed to provide basis for developing new medicines for tumor treatment. [Method] Through the technologies of single cell electrophoresis and flow cytometry analysis the inhibition of 2 kinds of highly-oxygenous bisabdenes sesquiterpenoid (HOBS) isolated from *Gernanthodium discoidium* Maxim on human hepatoma cell SMMC-7721 was studied. [Result] After being treated with 2 kinds of HOBS for 48 h, the volume of SMMC-7721 cells became smaller, and cell membrane vesicles and small apoptotic bodies appeared. Single cell electrophoresis showed that DNA fragment moved towards the anode in the comet shape and the comet-shape wake became longer with the increasing of the drug concn. HOBS could induce SMMC-7721 cell apoptosis in the dose-dependent manner. When both of HOBS were at 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the cell apoptotic rates reached 36.7% and 38.9% resp. The apoptotic rates were enhanced with the increasing of drug concn. and had significant difference with that in control group and typical apoptosis peak appeared. Both of HOBS made the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level in cell enhanced. [Conclusion] HOBS could induce the apoptosis of SMMC-7721 cells.

Key words *Gernanthodium discoidium* Maxim; HOBS compounds; SMMC-7721 cell; Cell apoptosis

垂头菊属植物(*Gernanthodium*)系菊科千里光族,主产喜马拉雅山及其相邻地区,全世界约64种,在我国均有分布。它们集中分布于青藏高原和西南山区,生长于高山灌丛、高山草甸及高山流石滩环境中。盘花垂头菊(*Gernanthodium discoidium* Maxim)为菊科垂头菊属多年生草本植物,须根肉质、较细,花果期为6~8月,主要分布于甘肃、青海、四川、西藏等省,生长在海拔3~5 km的山间草坡或林中^[1]。民间为传统藏药,全草入药,有消炎解毒、消肿、健胃、止咳等疗效^[2-3]。1,8-二当归酰氧基-2-己酰氧基-3,10-二羟基-4-氯-11-甲氧基没药(14)-烯(化合物1)和1,8-二当归酰氧基-2-乙酰氧基-3,4-环氧-10-羟基-11-甲氧基没药(14)-烯(化合物2)是由兰州大学应用有机化学国家重点实验室贾忠建教授和祝英博士等从盘花垂头菊中提取出来的^[4]高含氧甜没药烯型倍半萜(Highly oxygenated bisabdenes sesquiterpene, HOBS)化合物,其结构式见图1。笔者研究了这2种化合物的抗癌活性,旨在探讨它们对人肝癌细胞SMMC-7721的抑制活性。

1 材料与方法

1.1 试剂 化合物1和化合物2用二甲基亚砜助溶,再用培养基稀释(使DMSO终浓度小于0.4%);培养基RPM-1640和小牛血清分别购自Sigma公司和杭州四季青公司;除常规药品外,如无特殊说明其余药品均购自Sigma公司。

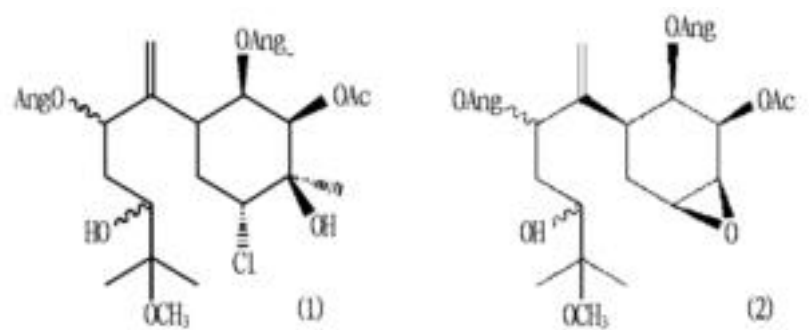
基金项目 甘肃省国际科技合作重点项目(4WS054-A75-036)。

作者简介 陈瑛(1982-),女,甘肃兰州人,硕士研究生,研究方向:肿瘤免疫学。*通讯作者。

鸣谢 兰州大学功能有机分子国家重点实验室贾忠建和祝英提供受试化合物。

收稿日期 2008-02-19

1.2 细胞培养和处理 人肝癌细胞系SMMC-7721细胞,由兰州大学生命科学学院生物物理所提供。将其培养于RPM-1640培养基中,外加灭活小牛血清10%、青霉素100 U/ml、 NaHCO_3 2.0 g/ml,链霉素100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,置于37℃、饱和湿度5% CO_2 的细胞培养箱中。消化收集处于对数生长期的细胞,以 5×10^5 cells/ml密度接种,每24 h更换新鲜培养液并加药。对照组细胞用正常培养基进行培养,每24 h更换培养液。



注:(1)为化合物1的结构,(2)为化合物2的结构。

Note:(1),(2) denote structure of compound 1 and 2, respectively.

图1 2种HOBS化合物的化学结构

Fig.1 The chemical structures of two HOBS compounds

1.3 形态观察 将生长在洁净盖玻片上的细胞直接用吖啶橙在PBS溶液中的浓度为10 $\mu\text{g}/\text{L}$, pH值4.2)染色15 min, PBS液脱色后,在Olympus BH2荧光显微镜下观察并照像。

1.4 单细胞电泳定性检测DNA损伤^[5-7] 单细胞电泳是一项用于检测DNA损伤的技术。包埋于琼脂糖中的细胞群体经过电泳后, DNA未损伤的细胞呈圆形的小球状迁移, DNA损伤导致细胞产生明显的彗尾,因此也称之为彗星电泳^[8]。消化收集经不同浓度(2、4、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)化合物1和化合物2处理的细胞用PBS溶液洗3次,细胞用1 ml PBS溶液悬起,吸取90 μl 0.5%常熔点琼脂糖(煮沸)均匀涂于洁净载玻片上,水

平状室温成胶3~5 min,作为底层固定胶。吸取50 μ l 细胞液(约 10^4 个细胞),按1:3与低熔点琼脂糖在37℃下混匀,吸取90 μ l 均匀涂布在底层胶上,冰上成胶5 min。将凝固好的凝胶玻片浸入裂解液(0.03 mmol/L Tris, 1 mmol/L Na₂EDTA),冰浴裂解1.5 h后取出,呈水平状浸入电泳槽中,电泳液(40 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, 20 mmol/L 乙酸,pH值8.3)浸泡20 min,在60 V电压条件下电泳20 min后取出,用洗涤液冲洗。采用EB(20 μ g/ml)染色,在Olympus BH2 荧光显微镜下观察并照像。

1.5 流式细胞术测定细胞凋亡^[9-10] 经不同浓度(2、4、8 μ g/ml)化合物1和化合物2处理48 h的SMMC-7721细胞消化收集后离心,PBS溶液洗2次,细胞沉淀用预冷的70%乙醇固定,置于-20℃冰箱内24 h以上。上机前用PBS溶液洗去固定液,沉淀重悬于100 U/ml RNaseA液(含0.1% TritonX-100)和50 μ g/ml PI染液中,室温放置30 min,洗去多余染液。经300目尼龙网过滤后,在流式细胞仪(EPICS XL型,U.S COULTER.)上进行测定,激发波长为488 nm,滤光片波长为630 nm。每组计数 10^4 个细胞的DNA含量。

1.6 [Ca²⁺]_i浓度测定^[11] 细胞内Ca²⁺浓度采用最广泛应用的钙荧光染料Fura-2/AM(DMSO配制)进行测定。未处理的SMMC-7721细胞离心后,PBS溶液洗2次。终浓度5

μ mol/L Fura-2/AM37℃ 孵育20 min。离心,PBS溶液洗2次,最后细胞悬于Hepes buffer(150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L MgSO₄, 1.2 mmol/L Na₂HPO₄, 1.8 mmol/L CaCl₂, 25 mmol/L Hepes, 10 mmol/L 葡萄糖,pH值7.4)中,调整细胞浓度为 1×10^6 cells/ml。将该细胞悬液分为对照组和处理组,于荧光分光光度计(M850型,Htachi)37℃恒温检测,荧光发射波长为510 nm,激发波长为340和380 nm。由下式计算细胞内游离钙离子浓度:

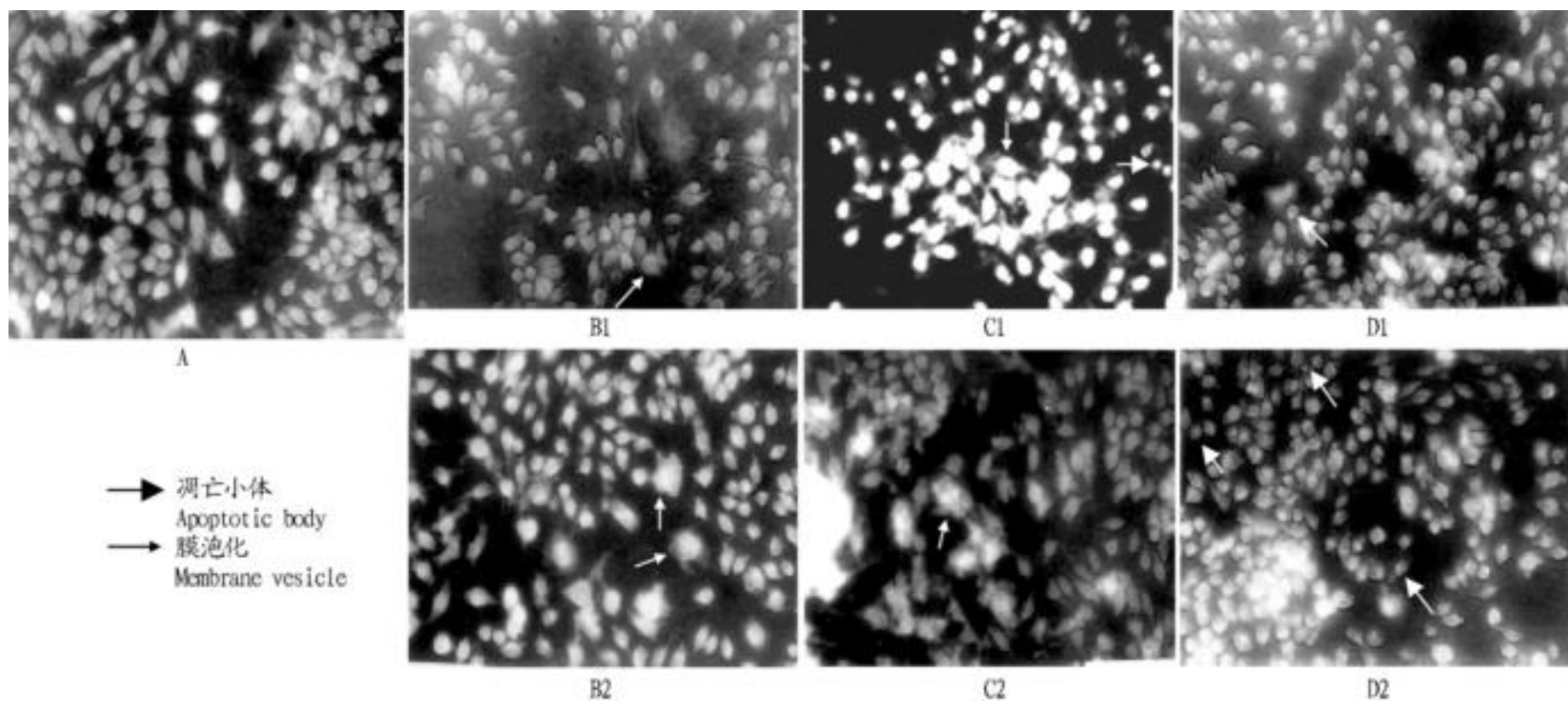
$$[Ca^{2+}]_i = Kd \cdot (F - F_{min}) / (F_{max} - F) \quad (1)$$

其中,Kd为Fura-2与Ca²⁺之间的解离常数(224 nmol/L);在计算Ca²⁺浓度前,应减去细胞的自发荧光;F为细胞的基本荧光值,F_{max}为由裂解细胞膜后带来的过剩的钙离子的荧光值,F_{min}为由EGTA完全整合Ca²⁺后的荧光值。

1.7 数据处理 数据用Microsoft Excel软件进行统计处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 化合物1和化合物2处理后SMMC-7721细胞的形态特征 荧光显微镜观察结果表明,正常SMMC-7721细胞常为多边形扁平细胞,体积大。经2、4、8 μ g/ml的化合物1和2处理48 h后,细胞体积变小,细胞发生膜泡化,出现了凋亡小体(图2)。



注:A为对照;B1和B2分别为2 μ g/ml化合物1和2处理的SMMC-7721细胞;C1和C2为4 μ g/ml化合物1和2处理的SMMC-7721细胞;D1和D2为8 μ g/ml化合物1和2处理的SMMC-7721细胞。下图同。

Note : A, control ; B1 and B2 , 2 μ g/ml compound 1 and compound 2 ; C1 and C2 , 4 μ g/ml compound 1 and compound 2 ; D1 and D2 , 8 μ g/ml compound 1 and compound 2 . The same as follow figure .

图2 荧光显微镜观察结果($\times 330$)

Fig.2 The observed results under fluorescence microscope

2.2 单细胞电泳定性检测DNA损伤 对照组中单个未经药物处理的SMMC-7721细胞的DNA,在荧光显微镜下呈圆形亮团;细胞经不同浓度(2、4、8 μ g/ml)的化合物1和化合物2处理后,在DNA碎片电场中向阳极移动,在荧光显微镜下形同“彗星(Comet)”,很小的彗星头,长而大的彗星尾。随着药物浓度的增大,细胞彗星样尾迹相应增长(图3)。

2.3 流式细胞术定量检测细胞凋亡 SMMC-7721细胞经不同浓度的2种化合物处理48 h后,用流式细胞术观察药物诱导SMMC-7721细胞凋亡。用2和4 μ g/ml浓度化合物1和化

合物2处理后,SMMC-7721细胞的凋亡率分别为18.0%、19.3%、23.9%和27.5%;经浓度为8 μ g/ml化合物1和化合物2处理后,SMMC-7721细胞的凋亡率达到36.7%与38.9%(表1)。凋亡率随药物浓度的增大而升高,与对照组显著差异,并出现典型的凋亡峰(图4)。

2.4 化合物1和化合物2诱导SMMC-7721细胞[Ca²⁺]_i上升 细胞内Ca²⁺作为第二信使,对许多的生命活动起着调控作用。研究表明,化合物1和2可以通过某种方式使细胞内Ca²⁺浓度升高,加入4 μ g/ml化合物1和2后细胞内的

[Ca²⁺]_i 水平在 20 min 内迅速上升并维持在一定的水平(表 2, 图 5)。

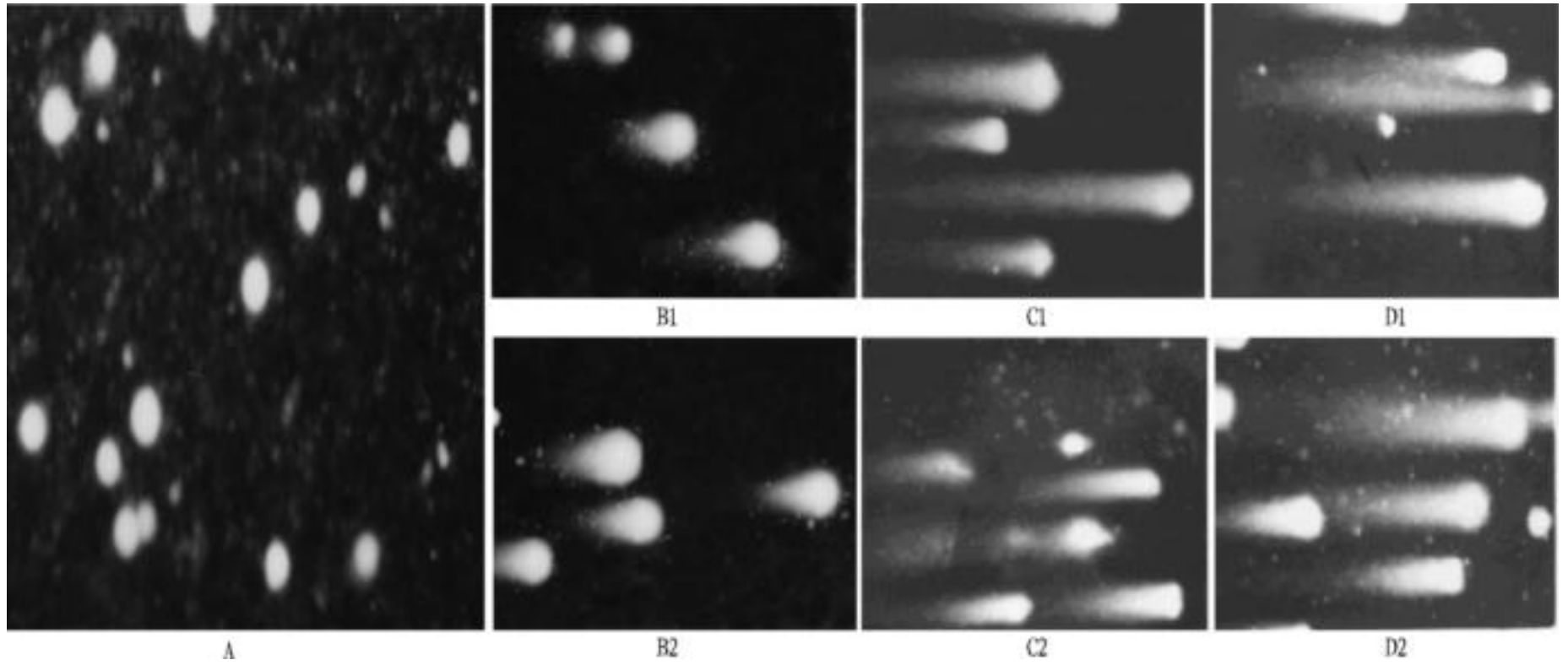


图3 单细胞电泳检测SMMC 7721 细胞的 DNA 损伤(荧光显微镜, 660 ×)

Fig. 3 DNA damage of SMMC 7721 cell by single cell electrophoresis (fluorescence microscope 660 ×)

表1 不同浓度化合物1 和化合物2 诱导的SMMC 7721 细胞凋亡

Table 1 Apoptosis induced by two compounds in SMMC 7721 cell line

浓度 Concentration $\mu\text{g/ml}$	凋亡率 Apoptotic rate %	
	化合物1 Compound 1	化合物2 Compound 2
control	1.7	1.7
2	18.0	19.3
4	23.9	25.1
8	30.6	34.6

3 小结与讨论

(1) 细胞凋亡是由基因编码控制的程序性细胞死亡, 以清理不必要的、衰老的、损伤的细胞, 具有典型的形态学和生物化学的特征。它通过细胞的自杀机制完成, 并且能够通过环境刺激, 包括氧胁迫、毒素、病毒等引发 DNA 损伤^[12-13]。细胞凋亡包括一系列明显的连续的形态学变化, 染色质在核膜处聚集成大块紧凑的颗粒, 细胞质膜皱缩, 核和细胞质膜呈锯齿状, 核裂解, 胞浆内出现空泡, 凋亡小体的出现

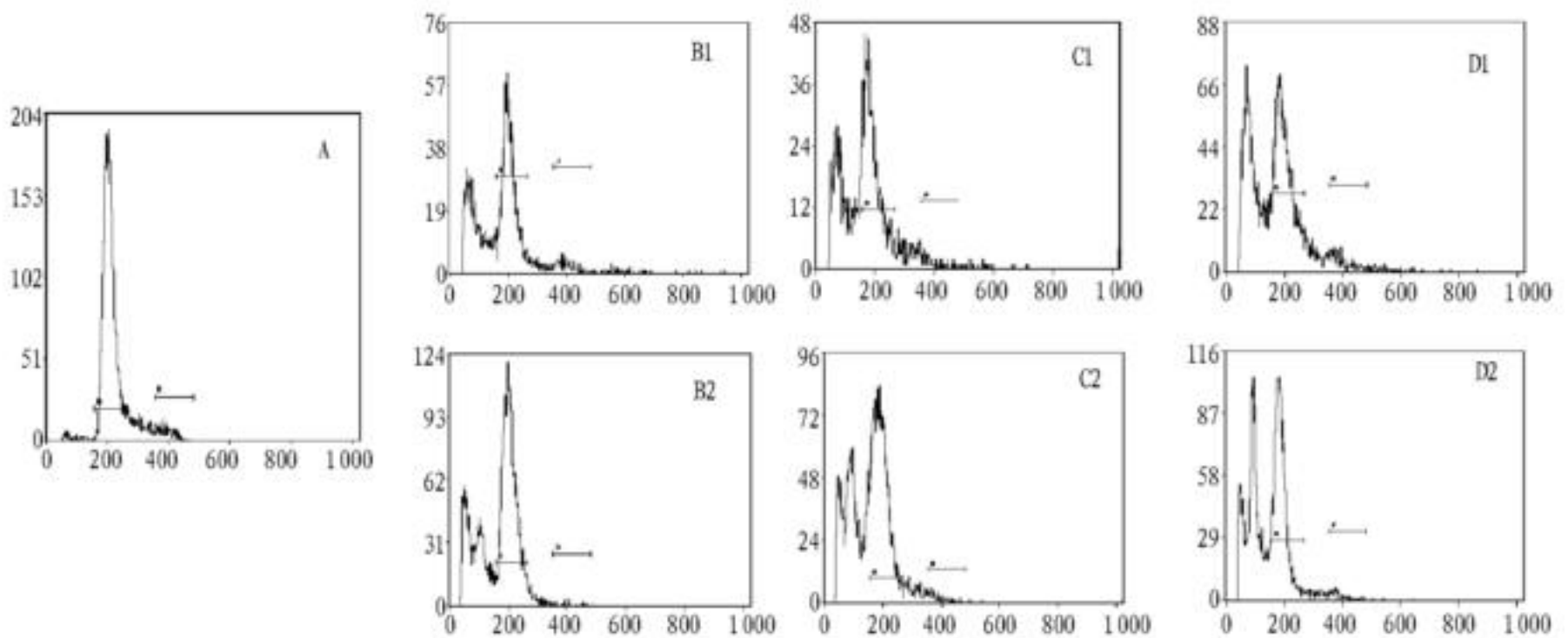


图4 流式细胞技术检测由化合物1 和2 处理48 h 后的SMMC 7721 细胞凋亡

Fig. 4 Flow cytometric analysis of apoptosis induced by two compounds after 48 h treatment

等^[14-15]。经过 2, 4, 8 $\mu\text{g/ml}$ 化合物1 和 2 处理过后, 通过荧光显微镜观察发现 SMMC 7721 确实发生了凋亡。

(2) 凋亡应答的一个方面是通过多级的核酸内切酶诱导 DNA 损伤。近年来, 凋亡的 DNA 损伤已经能在固定的染色质结构水平上被检测^[16], 这些 DNA 损伤的碎片可通过 SCGE 被检测。该方法也叫彗星电泳, 是一种快速检测 DNA 破碎的方法^[17], 比传统有毒的试验技术更为方便、灵敏, 并可以在任何真核细胞群体中定量定性测定 DNA 的损伤^[18]。该研究

中 SCGE 结果表明, 经过 2, 4, 8 $\mu\text{g/ml}$ 化合物1 和 2 处理后, DNA 的确发生了片断化。流式细胞术通过荧光激发分选细胞, 可大量、快速地测定单个细胞, 已广泛应用于定量检测细胞凋亡^[17,19]。流式细胞术检测结果表明, 经 2, 4, 8 $\mu\text{g/ml}$ 的化合物1 和 2 处理后, 细胞有凋亡特征峰出现, 发生了凋亡, 并具有浓度效应。研究表明, 化合物1 和 2 可将细胞周期阻滞在 G₁ 期, 说明细胞的凋亡与细胞周期的改变有关。

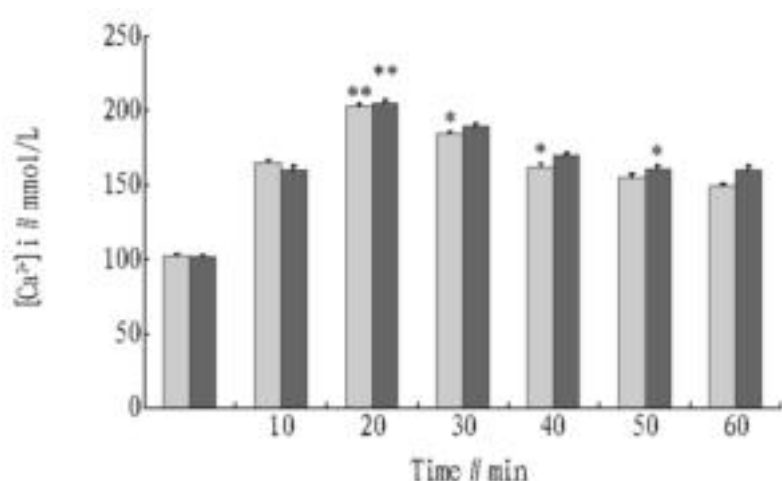
(3) 据报道, [Ca²⁺]_i 持续的升高是细胞凋亡过程中一个

表2 2种化合物对SMMC-7721 细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响Table 2 Effect of two compounds on intracellular $[Ca^{2+}]_i$ concentration in SMMC-7721 cells

Time / min	$[Ca^{2+}]_i$ nmol/L	
	化合物1 Compound 1	化合物2 Compound 2
0	102.5 ± 1.03	102.5 ± 1.03
10	165 ± 2.15	160.2 ± 3.54
20	203.4 ± 1.62 ^{**}	205.6 ± 2.34 ^{**}
30	185 ± 1.35 [*]	190.2 ± 1.35
40	162.5 ± 2.14 [*]	170.2 ± 1.56
50	155 ± 2.65	161.5 ± 2.34 [*]
60	150 ± 0.98	160 ± 3.12

注: * 表示与对照在0.05 水平上差异显著, ** 表示在0.01 水平上差异显著。

Nte: * significantly different at 0.05, ** significantly different at 0.01.

图5 化合物1 和2 对SMMC-7721 中 Ca^{2+} 浓度的影响Fig. 5 Effect of compound 1 and compound 2 on intracellular Ca^{2+} in SMMC-7721 cells

早期的、关键的事件^[20]。笔者通过荧光分光光度法检测 Fura-2/AM 标记的胞内 Ca^{2+} 浓度,发现经 $4 \mu\text{g/ml}$ 的化合物 1 和 2 处理后, $[Ca^{2+}]_i$ 迅速增高。这说明化合物 1 和 2 诱导细胞凋亡可能与胞内 Ca^{2+} 浓度的升高有关。笔者首次探索了由盘花垂头菊中提取出的 2 种新型高含氧的甜没药烯型倍半萜类化合物对于人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的诱导,它们可能成为肿瘤治疗的一种新型药物。这有力证明了传统中草药和现代医学在肿瘤预防和治疗方面的结合。这种中药对靶分子的作用和细胞信号通路的影响仍需进一步研究。

(上接第 4122 页)

[J]. 安徽农业科学, 2001, 29(5): 663-664, 666.

[6] 招启柏, 汤一卒, 王广志. 烤烟烟碱合成及农艺调节效应研究进展[J]. 中国烟草科学, 2005(4): 19-22.

[7] 王峰吉, 陈朝阳, 高文霞, 等. 外源化学物质调节烟碱生物合成的机理 I. 外源化学物质对烟碱生物合成中间产物的影响[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(1): 11-16.

[8] 黄一兰, 王瑞强, 王雪仁, 等. 打顶时间与留叶数对烤烟产质量及内在化学成分的影响[J]. 中国烟草科学, 2004(4): 18-22.

[9] 张丹, 刘国顺, 章建新, 等. 打顶时期对烤烟根系活力及烟碱积累规律的影响[J]. 中国烟草科学, 2006(1): 38-41.

[10] 刘华山, 朱大恒, 韩锦峰, 等. 外源植物生长调节物质对烟草根中烟碱含量和烟碱合成酶活性变化的生理效应[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 319-321.

[11] 胡国松, 杨林波, 魏巍, 等. 海拔高度、品种和某些栽培措施对烤烟香味的影响[J]. 中国烟草科学, 2000(3): 9-13.

[12] 孙梅霞, 李凯军, 王艳. 烤烟成熟期土壤含水量对叶片品质的影响[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(2): 280-282.

[13] ATKINSON WO, RAGLAND J L, SIMS J L, et al. Nitrogen composition of burley tobacco. I. The influence of irrigation on the response of burley tobacco to nitrogen fertilization[J]. Tobacco Science, 1969(17): 63-66.

参考文献

- [1] 林榕, 刘尚武. 中国科学院中国植物志编辑委员会中国植物 M. 北京: 科学出版社, 1989: 115-171.
- [2] 杨永昌等. 中国科学院西北高原生物研究所藏药志 M. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 389-393.
- [3] 郭本兆等. 中国科学院西北高原生物研究所藏青海经济植物志 M. 西宁: 青海人民出版社, 1987: 612-619.
- [4] ZHU Y, YANG L, JIA Z H J. Novel highly oxygenated bisabane sesquiterpenes from *renanthera discolor* [J]. J Nat Prod, 1999, 62: 1479-1483.
- [5] NAI ZHOU, HAI XIAO, II TSAI-KUN, et al. DNA damage mediated apoptosis induced by selenium compounds [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(32): 29532-29537.
- [6] ARRANZ N, HAZA AI, GARCIA A A, et al. Protective effects of organosulfur compounds towards Nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay [J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45: 1662-1669.
- [7] ALAM NUR E KAMAL, II TSAI-KUN, ZHANG AI-LING, et al. Single-stranded DNA Induces Ataxia Telangiectasia Mutant (ATM)/p53-dependent DNA damage and apoptotic signals [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(14): 12475-12481.
- [8] BARKER G F, MANZON D, COUCH K L, et al. DNA damage induced by hyperoxia quantitation and correlation with lung injury [J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2006, 35: 277-288.
- [9] FAN H, ZHAO Z J, CHENG Y C. SMMC-7721 exposed to 5-aza 2'-deoxycytidine [J]. Chin Med J, 2007, 120(18): 1626-1631.
- [10] XIE S Q, WUY L, WANG M W, et al. A novel homospiridine conjugate inhibits growth and induces apoptosis in human hepatoma cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(11): 1827-1834.
- [11] RICHARDSON A, TAYLOR C W. Effects of Ca^{2+} chelators on purified inositol 1,4,5-triphosphate (InsP3) receptors and InsP3-stimulated Ca^{2+} mobilization [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 11528-11533.
- [12] JELLINGER K A. Cell death mechanisms in neurodegeneration [J]. J Cell Mol Med, 2001, 5: 1-17.
- [13] JARVIS W D, FORNARI F A, BROWN J L, et al. Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglycide in human myeloid leukemia cells [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(50): 31685-31692.
- [14] STELLAR H. Mechanisms and genes of cellular suicide [J]. Science, 1995, 10(267): 1445-1449.
- [15] HARDY KAIE. Apoptosis in the human embryo [J]. Journals of Reproduction and Fertility, 1999(4): 125-134.
- [16] MKHOPADHYAYI, CHOWDHURI D K, BAIYAYEE M, et al. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypernethin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay [J]. Mutagenesis, 2004, 19(2): 85-90.
- [17] 胡庆柳, 丁振华. 流式细胞术在细胞凋亡中的应用 [J]. 细胞生物学杂志, 1997, 19(3): 119-123.
- [18] TOUNEKII O V. Relationships between DNA fragmentation, chromatin condensation, and changes in flow cytometry profiles detected during apoptosis [J]. Exp Cell Res, 1995: 217-506-516.
- [19] 敖琳, 曹佳. 细胞凋亡中 Ca^{2+} 稳态失调机制的研究进展 [J]. 国外医学与分子生物学分册, 2001, 23(2): 106-109.
- [20] MAKKER P N, TAT L, HOGAN V, et al. Inhibition of breast tumor growth and angiogenesis by a medicinal herb: *Qi mung taissi mun* [J]. Int J Cancer, 2007, 121: 884-894.
- [14] 徐晓燕, 孙五三, 李章海, 等. 烤烟根系合成烟碱的能力及 pH 值对其根系和品质的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(3): 315-319.
- [15] 简永兴, 杨磊, 谢龙杰, 等. 种植海拔对烤烟石油醚提取物及常规化学成分的影响 [J]. 烟草科技, 2005(7): 3-6.
- [16] 张怡, 靳清河, 刘进才, 等. 连续带渣浸提法提取天然烟碱 [J]. 中国烟草科学, 2000(4): 31-34.
- [17] DAVIS D L, NELSON M T. Tobacco production, chemistry and technology [M]. Oxford: Blackwell Science, 1999.
- [18] 王超杰, 赵瑾, 孙心齐, 等. 烟碱的提取及应用 [J]. 化学世界, 1996(11): 568-571.
- [19] 王献科, 李玉萍. 液膜法提取烟草中的尼古丁 [J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2001, 14(4): 450-453.
- [20] 谢长芹, 宁井铭. 微波法提取烟碱的研究 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(22): 6043, 6059.
- [21] 邱运仁, 俞晓惠, 杜吉华. 超临界 CO_2 萃取烟叶中的烟碱 [J]. 烟草科技, 2006(8): 21-24.
- [22] 周民杰, 梁柏林, 毛明现. 废次烟叶超声提取烟碱的研究 [J]. 化学工程师, 2006(4): 59-61.
- [23] 吴苏喜, 董君英. 络合萃取分光光度法测定烟草提取液中的烟碱 [J]. 烟草科技, 2005(7): 22-23, 40.
- [24] 段焰青, 周红, 王明锋, 等. 粒度对烟末总糖、总氮和烟碱含量 NIR 预测值的影响 [J]. 烟草科技, 2006(2): 33-36.