

# 莪术油注射液的制备及体外抗 PRRSV作用试验

徐端红<sup>1,2</sup>, 崔保安<sup>2</sup>, 王学兵<sup>2</sup>, 张红英<sup>2</sup>, 魏战勇<sup>3</sup>, 张爱芹<sup>2</sup>, 况玲<sup>1\*</sup>

(1. 新疆农业大学 动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052 2. 河南农业大学, 河南 郑州 450002

3. 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为筛选抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 的中药, 制备了莪术油注射液, 并以其为试验药物, 同时以利巴韦林注射液作为对照药物, 观察在体外细胞上对 PRRSV的作用效果。结果表明, 自最大安全浓度 (质量浓度) 作倍比稀释后, 二者对 PRRSV均具有一定的抑制、杀灭和阻断作用。其中, 莪术油注射液对 PRRSV的杀灭作用较为突出, 利巴韦林注射液杀灭和抑制作用均较为显著。

**关键词:** 莪术油注射液; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 体外抗病毒作用; 吐温-80

**中图分类号:** S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)10-0116-05

## Preparation of Oleum Curcumae Aromaticae Oil Injection and Its In Vitro Effects on Anti-PRRSV

XU Duan-hong<sup>2</sup>, CUI Bao-an<sup>2</sup>, WANG Xue-bing<sup>2</sup>, ZHANG Hong-ying<sup>2</sup>,

WEI Zhan-yong<sup>3</sup>, ZHANG Ai-qin<sup>2</sup>, KUANG Ling<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

2. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

3. Animal Food Safety Key Laboratory in Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** For the screening of medicines anti-porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Oleum curcumae aromaticae oil injection was prepared as the investigational drug to observe its in vitro effect on PRRSV. For a negative control, ribavirin injection was used. The results showed that since the maximum safe concentration to do multiple proportion dilute, they had a certain degree of inhibition, killing, and blocking effects on PRRSV. Among them, the killing effect of oleum curcumae aromaticae oil injection was more prominent and ribavirin injection had a significant effect on inhibitory action and killing.

**Key words:** Oleum curcumae aromaticae oil injection; PRRSV; In vitro antiviral effect; Tween-80

畜禽病毒性疾病是由病毒引起的严重危害畜牧业生产的一类传染病, 它不仅造成大批畜禽死亡和畜产品质量下降, 影响经济收入和对外贸易, 而且某些人畜共患病还威胁人类健康<sup>[1]</sup>。

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and

respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)引起的猪的一种高度传染性疾病。其主要症状表现为妊娠母猪的流产、死胎、木乃伊胎等繁殖障碍, 以及各种年龄猪 (特别是仔猪) 的呼吸道症状。该病自 1987年首次被发现以来, 已遍及世

收稿日期: 2010-05-01

基金项目: 郑州市科技创新团队项目 (10CX-TD148)

作者简介: 徐端红 (1972-) 女, 河南孟津人, 在读硕士研究生, 研究方向: 临床兽医学。E-mail: dhxu72@163.com

\* 通讯作者: 况玲 (1962-) 女, 山东青岛人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事临床兽医学研究。

E-mail: Kuangling90@sohu.com

界各个养猪国家<sup>[2]</sup>,它所引发的母猪流产和仔猪的呼吸障碍给养猪业造成了灾难性的打击,特别是2006年以来,PRRSV变异株的出现给我国养猪业的发展造成了巨大的影响<sup>[3-4]</sup>。目前,用于预防PRRS主要是注射灭活苗和弱毒苗,灭活苗的效果不稳定,经常导致免疫失败<sup>[5-6]</sup>;弱毒苗存在毒力返强的危险,而且有可能传播疫苗毒<sup>[7-9]</sup>。

莪术为姜科植物蓬莪术(*Curcuma phaeocaulis* Vahl)、广西莪术(*Curcuma guangxiensis* Lee et C. F. Liang)或者温郁金(*Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling)的干燥块茎。我国大部分地区都有分布。莪术作为我国历史悠久的常用中药,千百年来一直受到人们的关注。其性辛、苦、温,归肝脾经,具有行气破血,消积止痛的功效。主要用于疝瘕痞块、瘀血经闭、食积胀满、早期宫颈癌的治疗,是临床上较为常用的活血化瘀药<sup>[10]</sup>。莪术的主要成分有姜黄醇、大根香叶酮、 $\beta$ -榄香烯炔等<sup>[11]</sup>,一般采用水蒸气蒸馏法、微波萃取法或超临界 $\text{CO}_2$ 萃取法<sup>[12-15]</sup>提取。莪术油有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、免疫和抗早孕作用<sup>[10]</sup>,对金黄色葡萄球菌、 $\beta$ 溶血性链球菌、大肠杆菌、伤寒杆菌有抑制作用<sup>[16]</sup>。莪术油葡萄糖注射液常用于小儿病毒性肺炎等病毒性疾病,现已收入中国药典(2005年版)二部中<sup>[17]</sup>。

近年来,长期应用抗病毒西药易产生耐药性,降低疗效,病情易复发<sup>[18]</sup>。我国中草药资源丰富,中草药以其有害残留少、毒副作用小以及病原菌不易产生耐药性的优点而在疫病防治中备受关注<sup>[19]</sup>。本试验制备了莪术油注射液,并设计3种加药方式,在细胞水平上进行了体外抗PRRSV作用研究,旨在为临床用药提供试验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒株、细胞株

PRRSV毒株和Marc-145细胞株均购自中国兽药监察所,由河南省动物性食品安全重点实验室保存。

### 1.2 药物、试剂和培养基

广西莪术:购自河南省医药公司,超临界 $\text{CO}_2$ 萃取所得,含量为0.98 g/mL。阳性对照药:利巴韦林注射液,由郑州羚锐制药有限公司生产,批号为0803161,含量为0.1 g/mL。吐温-80由天津市瑞金特化学品有限公司生产。培养基为含10%小牛血清的DMEM,小牛血清:批号20051117,由中美合资兰州民海生物工程有限公司生产。

### 1.3 主要仪器设备

$\text{CO}_2$ 恒温培养箱(Nuaire)、倒置显微镜(日本奥林巴斯公司)、 $-85^\circ\text{C}$ 超低温冰箱(日本三洋公司)、超净工作台(苏净集团安泰公司制造)、96孔细胞培养板(Costar产品)、高压锅(上海生银医疗仪器仪表厂)、电热恒温培养箱(南京实验仪器厂制造)、双蒸蒸馏水器(上海亚荣公司)。

### 1.4 莪术油注射液的制备

取一定量的莪术油,加入不同比例的吐温-80反复吹打混匀后,再加入一定量的三蒸水,摇匀后配制成莪术油为1%,吐温-80分别为0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%的混合溶液, $115^\circ\text{C}$ 下灭菌15 min,室温下放置一定时间,观察溶液的澄清度、溶解状况及分层情况。选取稳定性好、透明的注射溶液作为抗PRRSV试验药物。

### 1.5 莪术油注射液安全浓度的测定

将Marc-145细胞接种于96孔细胞培养板上,生长成致密单层,弃上清。分别将莪术油注射液、1%利巴韦林溶液用DMEM维持液先作5倍稀释,然后再作连续2倍倍比稀释,将各稀释度溶液加到已长有单层Marc-145细胞的96孔细胞培养板上,每个稀释度重复4孔,每孔 $100\mu\text{L}$ 。另以细胞维持液代替药液作为正常细胞对照,置 $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$ 恒温细胞培养箱中培养。24 h后连续3 d观察细胞病变情况。最后根据细胞病变判定中药对细胞的毒性,以不出现细胞病变的最大药物浓度为最大安全浓度(文中莪术油注射液的浓度均为质量浓度)。

### 1.6 PRRSV标准毒株 $\text{TCID}_{50}$ 的测定

将Marc-145细胞接种于96孔细胞培养板上,生长成致密细胞单层,弃上清。将PRRSV标准毒株作连续10倍倍比稀释成6个浓度,加到96孔细胞培养板上,每个稀释度重复4孔,每孔 $100\mu\text{L}$ 。其他均设为细胞对照组,置 $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$ 恒温细胞培养箱中培养。72 h后用倒置显微镜观察细胞病变情况,记录产生的细胞病变(CPE),直至病毒最高稀释度不再产生新病变为止。根据Reed-Muench公式,计算PRRSV的半数细胞感染量( $\text{TCID}_{50}$ )。

### 1.7 莪术油注射液对PRRSV的体外作用试验

1.7.1 莪术油注射液在细胞水平上对PRRSV抑制作用测定 将Marc-145细胞接种于96孔细胞培养板上,生长成致密细胞单层,弃上清。先将含有 $100\times\text{TCID}_{50}$ 的病毒液加入96孔细胞培养板上,每孔 $100\mu\text{L}$ 。 $37^\circ\text{C}$ 下吸附2 h后弃上清。再将莪术油注射液、1%利巴韦林溶液从最大安全浓度作连续

2倍倍比稀释, 加到上述已感染病毒的细胞孔内, 每个稀释度重复 4 孔, 每孔 100μL。设立正常细胞及染毒后的细胞分别作为阴性和阳性对照, 置 37℃ CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。24 h后连续 4 d观察细胞病变情况。

1. 7. 2 莜术油注射液在细胞水平上对 PRRSV杀灭作用测定 将 Marc145细胞接种于 96孔细胞培养板上, 生长成致密细胞单层, 弃上清。将莜术油注射液、1%利巴韦林溶液从最大安全浓度作连续的 2倍倍比稀释, 再加入等量的 200×TCID<sub>50</sub>的病毒液, 混匀后置于 37℃作用 2 h加入 96孔细胞培养板中, 每个稀释度重复 4孔, 每孔 100μL。设立正常细胞及染毒后的细胞分别作为阴性和阳性对照, 置 37℃ CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。24 h后连续 4 d观察细胞病变情况。

1. 7. 3 莜术油注射液在细胞水平上对 PRRSV阻断作用测定 将 Marc145细胞接种于 96孔细胞培养板上, 生长成致密细胞单层, 弃上清。将莜术油注射液、1%利巴韦林溶液从最大安全浓度作连续的 2倍倍比稀释, 加到 96孔细胞培养板中, 每个稀释度重复 4孔, 每孔 100μL。置于 37℃作用 2 h后, 弃上清, 加入等量的 100×TCID<sub>50</sub>的病毒液。设立正常细胞及染毒后的细胞分别作为阴性和阳性对照, 置 37℃ CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。24 h连续 4 d观察细胞病变情况。

1. 8 细胞病变判断标准

以“+”号表示细胞发生病变的百分数, 25%以下表示为 CPE(+), 26%~50%表示为 CPE(++) , 51%~75%表示为 CPE(+++) , 76%~100%表示为 CPE(++++)。细胞对照形态均正常, 表示为 CPE(-), 病毒对照都产生病变, 表示为 CPE(++++)。

2 结果与分析

2. 1 莜术油注射液的制备

吐温-80含量在 0. 5%~1. 5%时溶液较浑浊, 在 2%~4%时溶液较清。在 5%~7%时溶液澄清度较好。放置 1个月后, 溶液不分层、澄清度和溶解度都未改变。吐温-80含量越高, 对细胞毒性越大, 因此选择莜术油比例为 1%、吐温-80比例为 2%的溶液制备莜术油注射液。

2. 2 莜术油注射液安全浓度的测定结果

结果表明, 1%莜术油注射液在 Marc145细胞上最大安全浓度为 30. 625 mg/L, 1%利巴韦林注射

液的最大安全浓度为 25 mg/L。1%莜术油注射液在 Marc145细胞上大于 30. 625 mg/L浓度时使细胞圆缩、脱落, 细胞单层被破坏; 小于或等于 30. 625 mg/L浓度时对细胞破坏基本无影响。1%利巴韦林注射液在 Marc145细胞上大于 25 mg/L浓度时使细胞圆缩、脱落, 细胞单层被破坏; 小于或等于 25 mg/L浓度时对细胞破坏基本无影响。

2. 3 PRRSV的 TCID<sub>50</sub>的测定结果

根据 Reed-Muench公式, 计算得到 PRRSV在 Marc145细胞的 TCID<sub>50</sub>为 10<sup>-4. 77</sup> cfu/mL。

2. 4 莜术油注射液对 PRRSV的体外作用

正常对照细胞形态正常, 细胞单层完整; 染毒后的对照细胞病毒发生病变, 细胞单层崩解、脱落、只剩下合胞体。由表 1可知, 莜术油注射液对 PRRSV的抑制效果较利巴韦林不显著; 但与最大无毒浓度相比, 其最小抑制病毒浓度为 0. 478 mg/L, 说明在莜术油注射液大于 0. 478 mg/L时对 PRRSV有较好的抑制效果。由表 2可知, 加药孔细胞均无病变发生, 说明在测定的莜术油注射液和利巴韦林药物浓度范围内都对 PRRSV有较好的杀灭效果。由表 3可知, 莜术油注射液对 PRRSV的阻断效果显著, 其最小阻断病毒浓度为 0. 029 mg/L, 说明在莜术油注射液大于 0. 029 mg/L时对 PRRSV有较好的阻断效果。

体外抗病毒试验结果表明, 莜术油注射液对 PRRSV有明显的抑制作用。

表 1 莜术油注射液对 PRRSV抑制作用

溶液	细胞孔无 CPE时的溶液 稀释度/(mg/L)
1%莜术油注射液	0. 478
1%利巴韦林溶液	0. 098

表 2 莜术油注射液对 PRRSV杀灭作用

溶液	细胞孔无 CPE时的溶液 稀释度/(mg/L)
1%莜术油注射液	均无 CPE
1%利巴韦林溶液	均无 CPE

表 3 莜术油注射液对 PRRSV阻断作用

溶液	细胞孔无 CPE时的溶液 稀释度/(mg/L)
1%莜术油注射液	0. 029
1%利巴韦林溶液	均无 CPE

3 讨论

1) 试验初期分别采用水蒸气蒸馏法和超临界

CO<sub>2</sub>萃取法提取莪术油,但水蒸气法提取的莪术油色泽、透明度较差,提取率较低,而超临界法提取物较好,可能是由于莪术细粉浸泡时间短或加水量多,这有待进一步试验证实。故采用超临界 CO<sub>2</sub>萃取法提取的挥发油作为试验用药物。

2)配置的莪术油注射液中各成分比例为莪术油:吐温-80:水(1:2:97),此状态下莪术油注射液理化性质相对稳定。吐温-80比例越大,溶液澄清度越高、稳定性越好,但是对细胞的毒性也越大。试验结果表明,吐温-80比例小于2%,理化性质不稳定,澄清度低;吐温-80比例大于2%,对细胞的毒性作用大,且吐温-80大于莪术油注射液对细胞的毒性。综合以上因素,采用莪术油:吐温-80:水(1:2:97)的比例制备莪术油注射液。

3)本试验用莪术油注射液,以PRRSV为试验对象,以微量细胞培养法进行莪术油注射液的抗病毒作用试验。试验中选用PRRSV作为对象具有良好的代表性,并且微孔板法具有灵敏度高,药物及各种材料用量少,操作简便,省时省力等优点。试验中同时设立阴性和阳性对照,在同一块96孔细胞培养板中进行,所有条件一致,因此所得的结果可信,具有良好的可比性。另外用利巴韦林注射液抗病毒药作为阳性对照药,使试验结果可比性高。

4)本试验共设计了3种不同的加药方式探讨莪术油注射液对PRRSV作用规律,即第1组采用病毒侵染细胞2h后添加自最大安全浓度作连续2倍比稀释的中药;第2组采用自最大安全浓度作连续2倍比稀释的中药与病毒作用2h后再与细胞作用,第3组采用自最大安全浓度作连续2倍比稀释的中药与细胞作用2h后接种病毒。3组间相比较,第2组中药样品对病毒的杀灭效果更为显著。其作用机制可能为:第1组病毒侵染细胞后添加中药,中药样品对细胞内的病毒起一定的抑制作用,抑制了病毒的生物合成及成熟释放<sup>[20]</sup>;第2组莪术油注射液可能通过体外直接灭活病毒而发挥抗病毒作用;第3组,中药与细胞作用后,一定程度阻止了病毒的吸附和侵入,其具体作用机制有待于进一步说明。

5)该试验是在单层细胞上进行的,不存在调动机体免疫功能的因素。但有文献表明<sup>[21-24]</sup>,莪术油还具有增强机体免疫功能的作用,其抗病毒作用是否能通过调动机体免疫功能而得到加强,还有待通

过体内抗病毒试验和免疫药理学等手段作进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 周岷江.中草药防治畜禽病毒性疾病研究概况及展望[J].中兽医学杂志,2001(4):23-25
- [2] 冯淑萍,何丹,易春华,等.广西部分地市高致病性猪繁殖与呼吸综合征的流行病学研究[J].现代农业科技,2009(1):229-230
- [3] 刘明莉,张凤华,范旭,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒Hn1/06株M基因的原核表达与重组蛋白的复性研究[J].河南农业大学学报,2009 43(5):521-525
- [4] 赵坤,王三虎,李敬玺,等.猪繁殖与呼吸综合征乳剂灭活疫苗的研制[J].河南农业大学学报,2006 40(4):379-382
- [5] Meng X J Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development[J]. Vet Microbiol 2000 74(4):309-329
- [6] Nilubol D Platt K B Halbur P G et al The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs[J]. Vet Microbiol 2004 102:11-18
- [7] Madsen K G Hansen C M Madsen E S et al Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds[J]. Arch Virol 1998 143:1683-1700
- [8] Mengeling W L Lager K M Vorwald A C Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of atypical PRRS[J]. Am J Vet Res 1998 59:1540-1544
- [9] Key K F Guenette D K Yoon K J et al Development of a heteroduplex mobility assay to identify field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with nucleotide sequences closely related to those of modified live attenuated vaccines[J]. J Clin Microbiol 2003 41(6):2433-2439
- [10] 朱善岚,黄品芳,王友芳.莪术的药理作用研究进展[J].海峡药学,2007 19(4):9-11
- [11] 王娟,刘汉清.不同提取方法对莪术油提取的影响[J].安徽医药,2007 11(2):114-115
- [12] 李红侠,杨铁耀,杨天亮,等.超临界 CO<sub>2</sub>萃取法和水蒸气蒸馏法对温莪术油化学成分的影响研究[J].中国中药杂志,2006 31(17):1445-1446

[ 13] 王地,关怀,于萍,等. 莪术细粉提取挥发油的工艺研究[ J]. 时珍国医国药, 2007 18(6): 1437-1438

[ 14] 王道平,张雪琴,周欣欣,等. 正交实验研究莪术挥发油的提取工艺[ J]. 中成药, 2005 27(9): 1085

[ 15] 高素琴,朱春林. 莪术挥发油提取工艺优化试验研究[ J]. 时珍国医国药, 2000 11(10): 878

[ 16] 钟秀会. 中兽医学[ M]. 中国农业科学技术出版社, 2007: 234-235

[ 17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[ M]. 北京: 化学工业出版社, 2005

[ 18] 黄亚东,项琪,姚崇舜,等. 莪术油喷雾剂的研制及抗病毒作用的实验研究[ J]. 中药材, 2007 30(3): 342-345

[ 19] 王玮,高永翔. 中药抗病毒研究进展[ J]. 现代中西医结合杂志, 2008 30(17): 2753-2754

[ 20] 干振华,李金恒. 中药抗病毒药理作用的研究进展[ J]. 医学研究生学报, 2007 18(12): 1290-1293

[ 21] Gonda R, Tom Q, Shimizu N, et al. Characterization of polysaccharides having activity on the reticuloendothelial system from the rhizome of Curcuma longa[ J]. Chem Pharm Bull 1990 38(2): 482

[ 22] Gonda R, Takeda K, Shimizu N, et al. Characterization of a neutral polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the rhizome of Curcuma longa[ J]. Chem Pharm Bull 1992 40(1): 185

[ 23] Gonda R, Tomoda M, Takada K, et al. The core structure of ukonan A, a phagocytosis activating polysaccharide from the rhizome of Curcuma longa and immunological activities of degradation products[ J]. Chem Pharm Bull 1992 40(4): 990

[ 24] Gonda R, Tomoda M, Ohara N, et al. Arabinogalactan core structure and immunological activities of ukonan C, an acidic polysaccharide from the rhizome of Curcuma longa[ J]. Bio Pharm Bull 1993 16(3): 235

(上接第 52页)

2.4 棉花自然结实种子越冬能力

2009年 9月 17日调查, 3个试验材料全试验区边行总计存活棉花植株 16株, 总计结铃 40个。至 11月 15日调查, 因成熟度、虫害等原因, 正常吐絮 27个铃(表 1)。至 2010年 6月 15日, 边行自然吐絮脱落的籽棉其种子未能产生新的棉苗, 地表被杂草全覆盖。由此说明, 转抗病基因棉花及受体和生产对照棉均不能在野外条件下安全越冬。

表 1 不同材料全试验区边行棉株成铃及自然吐絮情况

株数/株			成铃/个			正常吐絮铃/个		
B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
6	2	8	19	5	17	11	3	13

3 结论与讨论

从试验结果看, 自然撒播时, 无论是获得抗病基因棉花, 还是受体及生产对照, 均不能自然形成活体植株; 条播情况下, 除边行外, 转抗病基因棉花与受体及生产对照相比, 其长势虽有差异, 但均不能自然结实, 即不能产生后代; 种子在野外自然条件下因雨、雪、低温等因素不能自然越冬, 植株的残留片段及根也不能越冬, 不能形成新的活体苗; 转抗病基因棉花、受体及生产对照在与杂草的竞争中处于弱势, 均不会成为杂草。

就杂草本身而言, 它是农业生态系统中在自然环境条件下适应性最强、最繁茂的植物, 是在与农作物的相互竞争过程中, 经过长期的自然选择并适应环境的产物。作为栽培品种, 无论是受体棉花还是转基因棉花, 基本丧失了野外生存能力, 在自然条件下不能够正常生存产生后代, 因而也就不能成为恶性杂草。

在进行本试验时, 利用边行的边际效应来让植株自然成铃, 在野外自然越冬, 直接考察其在自然条件下成为潜在杂草的可能性, 应该是一种积极的探索。因为自然条件下, 亦可能有边际效应, 然而种子不能自然越冬成活也就不可能成为杂草, 评价起来更科学。

参考文献:

[ 1] 钱迎倩,田彦,魏伟. 转基因植物的生态风险评价[ J]. 植物生态学报, 1998 22(4): 289-299

[ 2] 吴志平,徐步进. 转基因植物释放后在环境中成为杂草的风险性[ J]. 生物工程进展, 1999 19(1): 9-13

[ 3] 王国英. 转基因植物的安全性评价[ J]. 农业生物技术学报, 2001 9(3): 205-207

[ 4] 贾士荣. 转基因作物的环境风险分析研究进展[ J]. 中国农业科学, 2004 37(2): 175-187

[ 5] 肖显静,陆群峰,国家农业转基因生物安全政策合理性分析[ J]. 公共管理学报, 2008 5(1): 91-99