

甘草附子汤对佐剂性关节炎小鼠的治疗作用

蔡悦^{1*}, 梁红玉², 王建立³, 于洋³, 张晓洁³

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300000; 2. 首钢矿山医院, 河北唐山 064400;
3. 天津红日药业股份有限公司集团研究院脓毒症研究中心, 天津 300000)

[摘要] **目的:**研究甘草附子汤对佐剂性关节炎(AA)小鼠的作用研究。**方法:**雄性 Balb/c 小鼠随机分为6组,为正常组、模型组、雷公藤多苷组、甘草附子汤高、中、低剂量组(3.9, 7.8, 15.6 g·kg⁻¹),每组12只。除正常组外,采用AA小鼠模型,造模第12天,灌胃给予相应药物,1次/d,连续18d,观察药物对AA小鼠足肿胀的影响;苏木素-伊红(HE)染色观察踝关节组织病理学改变;通过酶联免疫吸附法(ELISA)检测AA小鼠血清中的细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测滑膜组织基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和基质金属蛋白酶-3(MMP-3)蛋白表达。**结果:**与模型组比较,甘草附子汤可抑制AA小鼠足肿胀,改变炎症细胞浸润,减轻滑膜增生和骨侵蚀,减少AA小鼠血清中炎症因子TNF- α , IL-1 β 和IL-6水平($P < 0.05$),降低AA小鼠滑膜中MMP-1和MMP-3蛋白表达($P < 0.05$)。**结论:**甘草附子汤AA小鼠具有明显治疗作用,其机制可能与降低炎症因子的产生和降低滑膜组织的MMP-1及MMP-3表达有关。

[关键词] 甘草附子汤; 佐剂性关节炎; 基质金属蛋白酶; 类风湿性关节炎; 白细胞介素-1 β (IL-1 β); 白细胞介素-6(IL-6); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R2-0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0142-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181057

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1028.017.html>

[网络出版时间] 2018-03-09 11:20

Rapeutic Effect of Gancao Fuzi Tang on Adjuvant Arthritis Mouse Model

CAI Yue^{1*}, LIANG Hong-yu², WANG Jian-li³, YU Yang³, ZHANG Xiao-jie³

(1. First Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300000, China;

2. Shougang Mine Hospital, Tangshan 064400, China;

3. Tianjin Chase Sun Pharmaceutical Co. Ltd., Group Research Institute for Sepsis, Tianjin 300000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Gancao Fuzi Tang on adjuvant-induced arthritis (AA) in mice. **Method:** Male Balb/c mice were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, glycoside from *Tripterygium wilfordii* group, Gancao Fuzi Tang high dose, middle dose and low dose groups (3.9, 7.8, 15.6 g·kg⁻¹), $n = 12$ in each group. AA model was used for all the mice except those in normal group, and on day 12 after modeling, corresponding drugs were given, qd, for 18 days. Then the effect of drugs on paw edema of the animals was observed and the histopathological changes of the ankle joint were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expression levels of matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) and matrix metalloproteinases-3 (MMP-3) were detected by Western blot. **Result:** Gancao Fuzi Tang significantly alleviated joint swelling, changed inflammatory cell infiltration, alleviated synovial hyperplasia and bone erosion, reduced the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05$), and decreased

[收稿日期] 20171223(010)

[基金项目] 天津市科技小巨人领军企业培育重大项目(14ZXLJSY00230)

[通信作者] * 蔡悦, 硕士, 主治医师, 从事类风湿研究, E-mail: caiyue2018@126.com

MMP-1 and MMP-3 protein expressions ($P < 0.05$) in AA mice. **Conclusion:** The results indicate that Gancao Fuzi Tang has therapeutic effect on AA mouse, and the mechanism might be associated with its anti-inflammatory effects and down-regulating MMP-1 and MMP-3 expressions in synovial tissues.

[Key words] Gancao Fuzi Tang; adjuvant arthritis; matrix metalloproteinases; rheumatoid arthritis; interleukin-1 β (IL-1 β); interleukin-6 (IL-6); necrosis factor- α (TNF- α)

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜炎病变为主要特征的慢性、进行性、自身免疫性疾病,临床表现为对称发作的关节肿胀、疼痛和持续晨僵等^[1]。作为一种目前无法治愈、结局致畸致残的慢性疾病,RA 患者长期承受了巨大的身心痛苦及沉重的经济负担。RA 发病机制中滑膜炎和关节破坏是 2 个重要病理环节,表现为衬里层炎症细胞浸润、滑膜细胞的异常增生、血管翳的形成和骨侵蚀、软骨破坏^[2]。研究显示,成纤维细胞样滑膜细胞分泌胶原酶、基质溶解素和多种细胞因子,包括白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-6 (IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),促进 RA 炎症发生。在滑膜组织中,这些细胞因子刺激与软骨基质的降解有关的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases MMPs) 的产生。因此,调节 MMPs 的产生和其他炎性细胞因子水平是治疗 RA 的关键^[3]。甘草附子汤出自张仲景的《伤寒论》,由炮附子、炙甘草、白术和桂枝 4 味中药组成。具有祛风除湿、温经散寒、温阳补中的功效,是临床上治疗风湿性和 RA 的经典名方。目前对于其作用机制研究报道较少。本研究拟采用佐剂诱导关节炎 (AA) 小鼠,通过应用不同剂量的甘草附子汤作用于 AA 小鼠,探讨甘草附子汤对 AA 小鼠血清中炎症因子影响、踝关节基质金属蛋白酶-3 (MMP-3) 和金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1) 表达及其病理变化的影响,初步研究甘草附子汤对 RA 的作用和可能机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 甘草附子汤组成为炙甘草、炮附子、白术、桂枝,购买自天津同仁堂药店,由天津中医药大学张丽娟教授鉴定均为正品。炙甘草、炮附子 (先煎半小时),白术、桂枝等比例组成,各 15 g; 药物加 20 倍量水煎煮 1 次,合并煎液,滤过,浓缩,放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。雷公藤多苷 (江苏美通有限公司,批号 1211242063); 弗氏完全佐剂 (FCA, 美国 Sigma 公司,批号 100M8725); TNF- α , IL-6, IL-1 β 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (武汉优尔生科技股份有限公司,批号分别为 L150707213, L150715400, L150734300); MMP-1 兔多克隆抗体

(美国 Abcam 公司,批号 ab137332); MMP-3 兔多克隆抗体, β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (美国 CST 公司,批号分别为 14351S, 4970S)。

1.2 仪器 YLS-7B 型足趾容积测量仪 (北京吉安得尔科技有限公司), BX-51 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), ESP-300 型电泳仪 (上海天能公司), 550 型酶标仪, 1703940 型槽式转膜仪, ChemiDoc MP 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 动物 采用 SPF 级 Balb/c 小鼠,雄性,8 周龄,体质量 (18 ± 2) g, 由北京维通利华实验技术有限公司提供,动物合格证号 SCXK (京) 2012-0001。实验动物开展经天津红日药业动物伦理学审查通过。

2 方法

2.1 分组与给药 将小鼠随机分为 6 组,每组 12 只,分别为正常组,模型组,甘草附子汤低、中、高剂量组 ($3.9, 7.8, 15.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于成人临床日常用量) 及雷公藤多苷组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 各组试剂均用无菌水溶液配制。于小鼠左后足趾皮内注射弗氏完全佐剂 50 μL 制备自身免疫性关节炎模型^[4], 正常组注射等体积生理盐水。致炎后第 12 天,连续灌胃给药 18 d, 每天 1 次,正常组与模型组给予等体积无菌水溶液。造模当天,采用水容积法检测未造模右足趾容积,药物治疗后,每 6 d 测量右后足趾容积,将测量值减去造模前足趾容积的差值作为足趾肿胀度。

2.2 踝关节病理学检查 小鼠眼球取血,断颈椎处死后,取踝关节进行 10% 甲醛固定、脱钙、脱水、透明、切片及苏木素-伊红 (HE) 染色等处理后,显微镜观察病理改变。

2.3 ELISA 测定血清中 TNF- α , IL-6, IL-1 β 的含量 给药 18 d 后,收集各组小鼠血液标本,采用 ELISA 检测血清中 TNF- α , IL-6, IL-1 β 含量,实验步骤参照说明书,用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 A , 计算样品浓度。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测滑膜组织 MMP-1 与 MMP-3 蛋白表达 取关节内滑膜组织放置于离心管中,剪碎滑膜组织,蛋白裂解液处理各组

样品,离心管的下端插入冰水混合物中,超声粉碎。离心(4 ℃, 12 000 r·min⁻¹, 15 min),取中间层液体,用 BCA 法测定蛋白浓度,配平各组蛋白浓度,蛋白变性,SDS-PAGE 电泳后转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2 h, MMP-1 (1 : 1 000), MMP-3 (1 : 1 000), 4 ℃ 冰箱过夜,弃掉一抗, TBST 洗膜 10 min, 3 次; 将膜转入杂交袋, 室温孵育二抗 (1 : 5 000) 2 h, 弃掉二抗, TBST 洗膜 10 min, 3 次; ECL 系统显影, 采用 β -actin 作为内参, 计算相对灰度值, 实验重复 3 次。

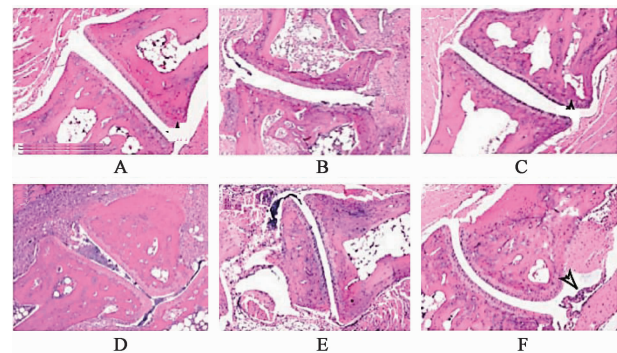
表 1 甘草附子汤对 AA 小鼠足肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Gancao Fuzi Tang on foot swelling degree of AA mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	12 d	18 d	24 d	30 d
正常	-	0.064 ± 0.001	0.082 ± 0.004	0.106 ± 0.002	0.134 ± 0.003
模型	-	0.472 ± 0.032 ¹⁾	0.513 ± 0.042 ¹⁾	0.537 ± 0.023 ¹⁾	0.541 ± 0.032 ¹⁾
甘草附子汤	3.9	0.464 ± 0.020	0.484 ± 0.016	0.473 ± 0.019	0.493 ± 0.023
	7.8	0.462 ± 0.034	0.467 ± 0.019	0.315 ± 0.027 ²⁾	0.345 ± 0.024 ²⁾
	15.6	0.459 ± 0.029	0.457 ± 0.031	0.298 ± 0.025 ²⁾	0.276 ± 0.016 ²⁾
雷公藤多苷	0.01	0.467 ± 0.018	0.469 ± 0.021	0.284 ± 0.014 ²⁾	0.274 ± 0.019 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2, 3 同)。

3.2 甘草附子汤对 AA 小鼠踝关节病理改变的影响 正常组小鼠踝关节软骨、骨组织无破坏, 关节面光滑, 滑膜衬里层滑膜细胞整齐排列, 软骨面平整, 未见炎细胞浸润; 模型组小鼠滑膜组织肥厚, 结缔组织存在大量的炎细胞浸润, 细胞排列紊乱, 软骨面不平整, 关节侵蚀; 给药后, 甘草附子汤各剂量组和雷公藤多苷组对 AA 小鼠踝关节组织的上述病理症状有不同程度的改善。见图 1。



A: 正常组; B: 模型组; C: 雷公藤多苷组; D ~ F. 甘草附子汤低、中、高剂量组 (图 2 同)

图 1 甘草附子汤对小鼠踝关节病理影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Gancao Fuzi Tang on pathology of ankle joint in mice (HE, ×100)

3.3 甘草附子汤对 AA 小鼠血清炎性细胞因子的

2.5 统计学分析 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 采用单因素方差分析 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 甘草附子汤对 AA 小鼠足肿胀影响 与正常组比较, 模型组肿胀度明显升高; 与模型组比较, 甘草附子汤中、高剂量组 (15.6, 7.8 mg·kg⁻¹) 均可降低小鼠完全弗氏佐剂诱导的足趾肿胀的程度 ($P < 0.05$)。雷公藤多苷 (10 mg·kg⁻¹) 亦可明显降低足趾肿胀的程度 ($P < 0.05$)。见表 1。

影响 与正常组比较, 模型组小鼠的 TNF- α , IL-6, IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 雷公藤多苷、甘草附子汤中、高剂量组的 TNF- α , IL-6, IL-1 β 水平有所降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 甘草附子汤对 AA 小鼠血清中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Gancao Fuzi Tang on levels of IL-6, IL-1 β , TNF- α in serum in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6	IL-1 β
正常	-	21.24 ± 1.54	19.17 ± 1.26	21.16 ± 1.16
模型	-	63.42 ± 2.45 ¹⁾	88.92 ± 1.56 ¹⁾	73.21 ± 3.15 ¹⁾
甘草附子汤	3.9	58.13 ± 2.48	82.64 ± 3.14	59.49 ± 1.45
	7.8	34.51 ± 3.45 ²⁾	59.62 ± 5.03 ²⁾	34.27 ± 1.36 ²⁾
	15.6	29.41 ± 4.13 ²⁾	43.79 ± 3.18 ²⁾	26.86 ± 2.06 ²⁾
雷公藤多苷	0.01	27.74 ± 2.16 ²⁾	46.53 ± 2.79 ²⁾	23.46 ± 1.47 ²⁾

3.4 甘草附子汤对 AA 小鼠滑膜组织中 MMP-1 及 MMP-3 蛋白表达影响 与正常组比较, 模型组 MMP-1, MMP-3 相对表达量升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 雷公藤多苷组、甘草附子汤中、高剂量的 MMP-1, MMP-3 相对表达量降低 ($P < 0.05$)。雷公藤多苷组 MMP-1, MMP-3 相对表达量与甘草附子汤

高剂量组相比,差异无统计学意义。见表 3,图 2。

表 3 甘草附子汤对 AA 小鼠滑膜组织中 MMP-1 及 MMP-3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Gancao Fuzi Tang on on expression of MMP-1 and MMP-3 protein in synovial tissues from ankle joints of AA mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MMP-1/ β -actin	MMP-3/ β -actin
正常	-	0.065 ± 0.006	0.053 ± 0.011
模型	-	1.006 ± 0.080 ²⁾	0.898 ± 0.088 ²⁾
甘草附子汤	3.9	0.852 ± 0.024	0.839 ± 0.084
	7.8	0.427 ± 0.031 ²⁾	0.042 ± 0.003 ²⁾
	15.6	0.054 ± 0.009 ²⁾	0.056 ± 0.006 ²⁾
雷公藤多苷	0.01	0.051 ± 0.003 ²⁾	0.063 ± 0.014 ²⁾

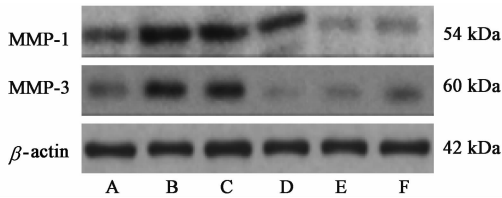


图 2 甘草附子汤对 AA 小鼠 MMP-1 及 MMP-3 表达电泳
Fig.2 Effect of Gancao Fuzi Tang on expression of MMP-1 and MMP-3 protein in synovial tissues from ankle joints of AA rats

4 讨论

RA 是以关节滑膜炎性为主要临床表现的慢性系统性疾病, TNF- α 与 IL-1, IL-1 β 等多种细胞因子是其发病的中心环节。TNF- α 可促进 IL-1, IL-6, IL-8 等炎症细胞因子的生成, TNF- α 与 IL-1 还促进对方的合成^[5]。TNF- α 与 IL-1, IL-1 β 多存在于 RA 患者的血清、关节滑膜之中, 与 RA 滑膜增生和关节破坏密切相关, 既可以诱导成纤维细胞增殖分化, 致使增生和血管翳形成, 又可以刺激骨膜细胞和破骨细胞、软骨细胞, 促进糖蛋白降解, 产生释放骨钙的胶原酶和其他中性蛋白酶, 从而导致关节和软骨破坏^[6-7]。HE 染色实验结果显示甘草附子汤中、高剂量组和雷公藤多苷组可以有效降低 AA 小鼠足肿胀, 改善踝关节炎浸润、滑膜的增生以及骨侵蚀, 对疾病的治疗具有明显的疗效, 通过炎症因子检测证明了甘草附子汤可以降低 IL-1 β , TNF- α , IL-6 水平; 这可能是甘草附子汤阻止滑膜增生、骨质破坏的机制之一。

MMPs 是一类蛋白酶家族, MMPs 能够降解细胞外基质, 分布在各种结缔组织中。有报道, RA 患者的血清和滑膜组织中都可以检测到较高水平的 MMPs^[8]。同时滑膜和滑膜液中的炎症细胞因子,

可刺激 MMPs 的产生, 活化 MMP, 从而促进血管翳的形成和骨质破坏。其中 MMP-1, MMP-3 与 RA 关系最为密切, 是导致关节被破坏、软骨降解最关键的蛋白酶。本研究结果显示, 与模型组比较, 甘草附子汤中、高剂量组和雷公藤多苷组小鼠滑膜中 MMP-1, MMP-3 水平均明显降低, 提示甘草附子汤可通过抑制 MMP-1, MMP-3 的水平从而抑制关节软骨的退变速度。

临床通常应用非甾体抗炎药治疗 RA, 由于其胃肠道溃疡和心血管风险的副作用, 它们的长期使用受到了限制^[9]。应用 TNF- α 中和抗体和 IL-1 受体拮抗剂具有良好的疗效, 但带有成本高、过敏以及严重感染的缺点^[10]。雷公藤多苷片作为抗炎和免疫抑制的药物, 疗效确切。但其疗效与剂量呈正相关, 长期口服雷公藤多苷片会导致肝毒性和影响男性生殖^[11-12]。因此, 寻找治疗 RA 副作用小、疗效显著的药物是必要的。RA 属中医学“痹证”、“尪痹”等病证范畴, 风寒湿侵入筋骨关节, 营卫不利, 气血凝滞, 以筋骨剧痛拒按, 不得屈伸为特征, 甘草附子汤在临床上应用广泛, 该方剂由制附子、桂枝、甘草、白术组成, 温阳散寒, 祛湿止痛功效, 可用来治疗风湿相搏, 骨节疼烦, 掣痛不得屈伸, 近之则痛剧, 为治疗痹证日久方剂, 现有不少用于 RA 的报道^[13-14]。现代药理研究表明, 制附子通过降低血清 NO, IL-1 β 水平, 调控相关细胞因子的表达从而起到抗炎和消除关节肿胀的作用, 改善 AA 大鼠滑膜组织病理学变化^[15]。白术挥发油和桂枝挥发油有显著的抗炎作用^[16-17]。附子生物碱与甘草活性物质配伍组合能有效抗炎, 缓解 AA 症状, 两者配伍作用优于单用附子生物碱^[18-19]。附子与桂枝配伍在抗炎、镇痛、抗自由基损伤等方面具有显著的协同增效作用^[20]。本实验结果显示, 甘草附子汤疗效雷公藤多苷片疗效一致, 通过减少炎症 TNF- α , IL-1 β 等炎症细胞因子的释放, 降低 MMP-1, MMP-3 的蛋白表达, 从而抑制 AA 小鼠关节炎和骨侵蚀。但 RA 是一种累及全身的自身免疫疾病, 需要长期服药治疗, 故需要在后面的实验研究中观察免疫器官脾脏、胸腺的变化以及肝肾毒性, 对药物有更全面的观察。

[参考文献]

[1] Glant T T, Mikecz K, Rauch T A. Epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. BMC Med, 2014, 26(12):35-42.
[2] Bradley J R. TNF-mediated inflammatory disease [J]. J

- Pathol,2008,214(2):149-160.
- [3] Burrage P S, Mix K S, Brinckerhoff C E. Matrix metalloproteinases; role in arthritis [J]. Front Biosci, 2006,11(1):529-543.
- [4] 车萍,季旭明,梁粟,等. 独活寄生汤对佐剂性关节炎大鼠的抗炎镇痛作用及血清中 5-HTP,5-HIAA 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (19): 170-173.
- [5] Abdin A A, Abd El-Halim M S, Hedeya S E, et al. Effect of atorvastatin with or without prednisolone on Freund's adjuvant induced-arthritis in rats [J]. Eur J Pharmacol,2012,676(1/3):34-40.
- [6] Dasgupta S,Meka A,Reddy B M, et al. Genetic factors influencing recurrent pregnancy loss: lessons learnt from recent studies [J]. Expert Rev Obstet Gynecol,2012,7(4):363-378.
- [7] Shankarkumar U,Pawar A,Gaonkar P,et al. HLA allele associations in idiopathic recurrent spontaneous abortion patients from India [J]. J Hum Reprod Sci,2008,1(1):19-24.
- [8] HAN Z,Boyle D L,CHANG L,et al. C-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis [J]. J Clin Invest,2001,108(1):73-81.
- [9] Lacaille D,Guh D P,Abrahamowicz M, et al. Use of nonbiologic disease-modifying antirheumatic drugs and risk of infection in patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum,2008,59(8):1074-1081.
- [10] Slifman N R, Gershon S K, Lee J H, et al. Listeria monocytogenes infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents [J]. Arthritis Rheum,2003,48(2):319-324.
- [11] 冯群,孙蓉. 雷公藤多苷片抗炎作用及伴随肝毒性研究 [J]. 中药新药与临床药理,2014,25(6):713-716.
- [12] 马凰富,李海松,赵宗江,等. 雷公藤多苷诱导生精障碍大鼠模型的建立 [J]. 中华男科学杂志,2015,21(2):179-184.
- [13] 邓伟. 甘草附子汤治疗膝骨关节炎的临床研究 [J]. 中药材,2008,31(7):1107-1110.
- [14] 王雪梅,徐世钊,岳里佳. 甘草附子汤治疗痹症 107 例 [J]. 实用中医内科杂志,2003,17(2):107-108.
- [15] 刘建磊,李宝丽. 制附子对类风湿关节炎抗炎作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):184-187.
- [16] 徐世军,沈映君,解宇环. 桂枝挥发油的抗炎作用研究 [J]. 中药新药与临床药理,2007,18(3):186-189.
- [17] 徐锋,王德健,王凤,等. 桂枝挥发油的药理作用研究进展 [J]. 中华中医药杂志,2016,31(11):4653-4657.
- [18] 杨洁红,张宇燕,万海同,等. 附子生物碱与甘草活性物质组合抗大鼠佐剂性关节炎的实验研究 [J]. 中草药,2010,41(3):439-444.
- [19] 刘鑫馗,吴嘉瑞,张丹,等. 基于网络药理学的附子-干姜药对治疗心力衰竭的作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(21):212-219.
- [20] 孙雪莲,马成. 附子与桂枝配伍对大鼠佐剂性关节炎的实验研究 [J]. 现代中西医结合杂志,2008,17(14):2124-2127.

[责任编辑 全燕]