

大黄调控肠道水通道蛋白对脓毒症大鼠肠道菌群的影响

翟璐^{1*}, 高巧营²

(1. 天津医科大学 第二医院, 天津 300211; 2. 天津市南开医院, 天津 300100)

[摘要] **目的:**探究大黄治疗脓毒症模型大鼠的病原生物学机制。**方法:**采用 LPS 腹腔注射法制作大鼠脓毒症模型, 实验分为 5 组, 分别为假手术组, 脓毒症模型组, 大黄高、中、低剂量组 ($150, 100, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 2 次/d *ig* 给药, 连续给药 3 d, 记录各组大鼠病死率情况, 采用细菌传统培养法对大鼠膜菌群、腔菌群及肠系膜淋巴结、血液进行细菌培养计数, 同时通过 RT-qPCR 及 Western blot 法检测大鼠结肠水通道蛋白水通道蛋白 2 (AQP2) 和 AQP8。**结果:**大黄高、中剂量组大鼠病死率降低; 各组大鼠膜菌群和腔菌群变化差异大, 以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、乳酸杆菌及双歧杆菌较明显, 各治疗组 AQP2 和 AQP8 表达与脓毒症模型组有明显差异性 ($P < 0.05$)。且各治疗组 AQP2 和 AQP8 表达下降, 与大黄剂量有依赖性, 同时淋巴结与血标本细菌含量有所降低。**结论:**大黄可下调 AQPs 表达发挥泻下功能, 减少脓毒症大鼠细菌移位治疗脓毒症, 但中剂量大黄在发挥上述作用时有利用平衡肠道菌群。

[关键词] 大黄; 脓毒症; 肠道菌群; 水通道蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0127-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030127

Effects of Rhei Radix et Rhizoma on Intestinal Flora of Septic Rats by Regulating Aquaporins Expression

ZHAI Lu^{1*}, GAO Qiao-ying²

(1. The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China;
2. Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Rhei Radix et Rhizoma on intestinal flora of septic rats. **Method:** LPS intraperitoneal injections were used to establish septic rats models. The rats in the experiment were divided into five groups: sham operation group, septic model group, Rhei Radix et Rhizoma high dose, middle dose and low dose groups ($150, 100, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 2 times/d *ig*, continuous for 3 days. The mortality of each group was recorded. Traditional bacterial culture method was used to detect bacteria count of membrane flora, cavity flora, mesenteric lymph nodes and blood of the rats. Meanwhile aquaporin 2 (AQP2) and AQP8 were detected by RT-qPCR and Western blot. **Result:** The mortality in Rhei Radix et Rhizoma high dose group and middle dose group was significantly decreased. Membrane flora and cavity flora of all groups differ greatly, especially *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacill* and *Bifidobacterium*. AQP2 and AQP8 expression levels of all treated groups differed greatly from those of model group ($P < 0.05$). The decrease in AQP2 and AQP8 expression levels in various treatment groups was dependent on the dose of Rhei Radix et Rhizoma. meanwhile, the number of pathogens in lymph nodes and blood was lower than that of model group. **Conclusion:** Rhei Radix et Rhizoma can decrease bacterial translocation by reducing expression of AQPs to increase excreta in treating sepsis, and the middle dose is better for the balance of intestinal flora.

[Key words] Rhei Radix et Rhizoma; sepsis; intestinal flora; aquaporins

[收稿日期] 20150213(011)

[基金项目] 天津市科技攻关重大课题项目(05YFGSF02600);天津市中医药管理局科研项目(11020)

[通讯作者] * 翟璐, 从事药学研究, Tel:13920874778, E-mail:1104932780@qq.com

脓毒症是由感染或高度可疑感染灶引起的全身炎症反应综合征,具有病死率高的特点^[1]。在脓毒症的发生发展过程中,肠道菌群移位及菌群失调是重要发病机制之一^[2]。目前,除抗感染和器官功能支持治疗技术外,中医药已经成为了治疗脓毒症的重要手段。其中,大黄具有攻下泻火、荡涤胃肠、清热解毒等功效,已经用于治疗多种消化道的疾病^[3]。现有研究发现水通道蛋白(aquaporins, AQPs)在水转运过程中发挥着重要作用,与肠道水代谢密不可分^[4-5],而大黄的主要作用部位在大肠。故而本研究旨在探究大黄是否通过调控肠道 AQPs 表达产生泻下作用影响脓毒症大鼠的肠道菌群及细菌移位,从而对脓毒症起到治疗作用。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 100 只,体重 240 ~ 260 g,由军事医学科学院环境所动物中心提供,动物合格证号 SCXK(军)2009-003。

1.2 药物及试剂 大黄粉(杭州中药饮片厂,批号 20140509),脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号 56H4096),动物组织总 RNA 提取试剂盒(北京天根公司,批号 N3205),反转录试剂盒、荧光定量试剂盒(美国 Thermo 公司,批号分别为 00045536, 00053821),水通道蛋白 2(AQP2)和 AQP8 蛋白一抗(美国 Santa cruz 公司,批号分别为 SC28629, SC20810),组织蛋白提取试剂盒、蛋白上样缓冲液和蛋白二抗(康为世纪公司,批号分别为 03121, 05362, L1809)。

1.3 仪器 iQ5 型荧光定量 PCR 仪、垂直电泳、转印槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制作^[6] 大鼠随机分为假手术组(10 只),模型组(30 只)和大黄治疗组(高、中、低剂量组,每组 20 只),大鼠适应性喂养 3 d,禁食不禁水 12 h。模型组及治疗组给予 15 mL·kg⁻¹ 的 LPS 进行 ip,假手术组给予生理盐水。大黄治疗组大鼠给大黄粉 ig 治疗(高、中、低剂量分别为 150, 100, 50 mg·kg⁻¹);假手术组和模型组大鼠给予等体积生理盐水 ig。上述 5 组大鼠均 2 次/d,连续 3 d 给药或生理盐水。

2.2 标本取材与处理 造模后 72 h 各组大鼠在无菌条件下麻醉、开腹,收集肠系膜淋巴结、血标本、结肠内容及结肠组织立即进行细菌培养,同时留取结肠组织 3 ~ 5 cm, -80 °C 冻存备用。

2.3 肠道菌群检测 以 200 mg 结肠内容物溶于

0.8 mL 生理盐水中混匀作为原液,用无菌生理盐水进行 10 倍倍比稀释,取 100 μL 各浓度细菌稀释液分别接种于大肠埃希菌选择性培养基(MAC),金黄色葡萄球菌选择性培养基(Sp),类杆菌选择性培养基(Bd),梭杆菌选择性培养基(CD),乳酸杆菌选择性培养基(LC),双歧杆菌选择性培养基(BL)。将 Bd, CD, LC, BL 培养基置于厌氧袋中,与 MAC, SP 培养皿一同置于 37 °C 培养箱内培养 24 ~ 48 h,结束后选择适当稀释度培养皿上生长的菌落进行计数。大鼠结肠组织 1 cm 经生理盐水冲洗 3 次,置于盛有 1 mL 生理盐水的组织匀浆器内磨碎,取 0.2 mL 匀浆液至 0.8 mL 生理盐水中混匀作为原液,再同结肠内容物细菌培养的方法稀释、培养及计数。细菌计数计为 N。

2.4 细菌移位检测 以 20 μL 血液标本作为原液,无菌生理盐水进行 10 倍倍比稀释,各浓度细菌稀释液 20 μL 接种于血琼脂培养皿、麦康凯琼脂培养皿、苯乙醇琼脂培养皿、普通厌氧菌培养皿。称重肠系膜淋巴结 200 mg,加生理盐水 2 mL 匀浆,匀浆液 200 μL 接种于上述培养皿上。此过程严格无菌操作。将上述培养皿置于 37 °C 培养箱内培养 24 ~ 48 h。结束后选择适当稀释度培养皿上生长的菌落进行计数。

2.5 RT-qPCR 检测 应用动物组织总 RNA 提取试剂盒提取大鼠结肠总 RNA,逆转录按试剂盒说明操作。AQP2, AQP8 和 β-actin 引物均由上海生工生物技术有限公司合成(表 1)。应用荧光定量 PCR 仪进行定量检测,每份样本均进行 3 个复空测定,通过软件测得样品阈值循环数(threshold cycle, C_t)。结果分析参照 2^{-ΔΔC_t}法^[7]。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	引物序列	片段长度 /bp
AQP2	上游 5'-TCCACAACAACGCCACAGC-3'	393
	下游 5'-GCACCTTCACGTTCTCCCA-3'	
AQP8	上游 5'-GGGGAAGGAGACCAACAT-3'	470
	下游 5'-CAGCCAATACCAACAGCATC-3'	
β-actin	上游 5'-TGGATTCCTGTGTATCCATGAAAC-3'	346
	下游 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	

2.6 Western blot 检测 参照蛋白提取试剂盒说明提取大鼠结肠组织总蛋白,经热变性处理后 10% SDS-PAGE 电泳,转移蛋白至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉封闭 3 h。AQP2, AQP8 多克隆抗体(1:500 稀释)4 °C 孵育过夜,二抗(1:5 000 稀释)孵育 2 h。化学发光法发光成像。以 β-actin 为内参照,以假手

术组结肠组织中的蛋白水平为基准,计算其他组别中水通道蛋白的相对表达量。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,计数资料两组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况观察 造模后大鼠出现了明显的脓毒症体征,呆纳无力、口唇青紫、呼吸增快,以及死亡,各组大鼠病死率。小剂量大黄灌胃治疗的大鼠腹泻症状不明显,而中剂量和大剂量组大鼠半数出现了腹泻症状。造模后 72 h 模型组大鼠病死率为 40%;大黄 3 个剂量组 72 h 大鼠病死率不同,高、中剂量组与模型组病死率比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 大黄对脓毒症大鼠术后 72 h 病死率的影响

Table 2 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on 72 h postoperative mortality in rats with sepsis

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	死亡数 /只	病死率 /%
假手术	-	10	0	0
模型	-	30	12	40
大黄	150	20	1	5 ²⁾
	100	20	2	10 ²⁾
	50	20	7	35

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3~7 同)。

表 3 大黄对脓毒症大鼠结肠腔菌群定量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on quantitative gut flora in rats with sepsis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	EB /log ₁₀ N·g ⁻¹	Sp /log ₁₀ N·g ⁻¹	Bd /log ₁₀ N·g ⁻¹	CD /log ₁₀ N·g ⁻¹	LC /log ₁₀ N·g ⁻¹	BL /log ₁₀ N·g ⁻¹
假手术	-	10	11.73 ± 1.46	8.30 ± 1.41	3.28 ± 0.23	2.65 ± 0.35	2.56 ± 0.28	1.89 ± 0.11
模型	-	18	11.89 ± 2.63	8.73 ± 0.46	5.84 ± 1.26 ¹⁾	3.72 ± 0.22 ¹⁾	5.27 ± 1.48 ¹⁾	3.91 ± 1.65 ¹⁾
大黄	150	19	3.26 ± 0.57 ²⁾	3.08 ± 0.70 ²⁾	2.26 ± 0.71 ²⁾	1.56 ± 1.08 ²⁾	1.73 ± 1.01 ²⁾	1.72 ± 1.12 ²⁾
	100	18	2.85 ± 1.07 ²⁾	4.28 ± 0.69 ²⁾	2.95 ± 0.82 ²⁾	2.35 ± 0.45 ²⁾	2.36 ± 0.74 ²⁾	2.02 ± 0.89 ²⁾
	50	13	9.74 ± 0.93	8.84 ± 0.52	4.21 ± 1.53 ²⁾	3.68 ± 0.08	4.73 ± 0.82	3.67 ± 0.54

表 4 大黄对脓毒症大鼠结肠膜菌群定量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on intestinal quantitative membrane flora in rats with sepsis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	EB /log ₁₀ N·g ⁻¹	Sp /log ₁₀ N·g ⁻¹	Bd /log ₁₀ N·g ⁻¹	CD /log ₁₀ N·g ⁻¹	LC /log ₁₀ N·g ⁻¹	BL /log ₁₀ N·g ⁻¹
假手术	-	10	1.26 ± 0.97	1.88 ± 1.34	6.54 ± 0.81	5.65 ± 1.11	7.65 ± 1.07	8.89 ± 1.20
模型	-	18	5.87 ± 1.63 ¹⁾	4.71 ± 1.43 ¹⁾	4.03 ± 1.36 ¹⁾	3.95 ± 1.22 ¹⁾	4.43 ± 1.29 ¹⁾	5.67 ± 1.01 ¹⁾
大黄	150	19	1.53 ± 1.05 ²⁾	2.07 ± 0.57 ²⁾	4.26 ± 1.08	2.97 ± 0.93	6.43 ± 1.09	5.72 ± 1.27
	100	18	1.36 ± 0.77 ²⁾	2.28 ± 0.72 ²⁾	4.95 ± 0.70	4.20 ± 1.58 ²⁾	6.76 ± 1.03 ²⁾	6.98 ± 0.73
	50	13	4.98 ± 0.91	3.84 ± 0.98	4.21 ± 1.26	3.94 ± 0.79	4.73 ± 1.44	6.34 ± 1.30

3.2 对大鼠结肠腔菌群定量的影响 模型组与假手术组大鼠 EB 和 Sp 数量无差别,但大黄治疗组中,随剂量的增加上述 2 种菌均有不同程度的减少;模型组大鼠 Bd 和 CD 数量多于假手术组 ($P < 0.05$),高、中剂量治疗组与模型组有统计学差异 ($P < 0.05$);模型组与假手术组比较,LC 和 BL 数量明显增多 ($P < 0.05$),但大黄治疗组中,上述 2 种菌较模型组均有不同程度的减少,且与正常组无统计学差异。见表 3。与假手术组比较,模型组大鼠 EB 和 Sp 数量明显增加 ($P < 0.05$),其他各治疗组较模型组 EB 和 Sp 数量有所减少 ($P < 0.05$);模型组大鼠的 Bd, CD, LC, BL 数量较假手术组均减少 ($P < 0.05$),与模型组比较,只有中剂量治疗组中的大鼠 CD 和 LC 数量有所增加 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.3 对淋巴结及血液细菌定量的影响 假手术组大鼠全部存活,淋巴结及血液中未检出细菌,与假手术组比较,模型组淋巴结及血液中检出的细菌阳性率和菌量计数均明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,各治疗组大鼠在淋巴结及血液中检出的细菌阳性率和菌量计数均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 5。

3.4 对大鼠结肠组织中 AQP2 和 AQP8 的 mRNA 检测 AQP2 和 AQP8 mRNA 表达模型组水平较假手术组有明显增高 ($P < 0.05$);与模型组比较,高、中、低剂量组 AQP2 和 AQP8 mRNA 表达均有所降低 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 5 大黄对脓毒症大鼠淋巴结及血液细菌定量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on lymph gland and quantitative blood bacteria in rats with sepsis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	淋巴结		血液	
			阳性率/%	log ₁₀ N·g ⁻¹	阳性率/%	log ₁₀ N·mL ⁻¹
假手术	-	10	0	0.00 ± 0.00	0	0.00 ± 0.00
模型	-	18	67	3.52 ± 1.02 ¹⁾	59	2.58 ± 0.37 ¹⁾
大黄	150	19	21	2.34 ± 0.73 ²⁾	11	1.29 ± 0.16 ²⁾
	100	18	28	2.98 ± 0.15 ²⁾	22	1.89 ± 0.08 ²⁾
	50	13	61	3.68 ± 0.54	54	2.06 ± 0.33 ²⁾

表 6 大黄对脓毒症大鼠结肠组织中 AQP2 和 AQP8 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on relative transcript level of AQP2 and AQP8 mRNA in rats with sepsis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	AQP2 /β-actin	AQP8 /β-actin
假手术	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	-	0.80 ± 0.12	0.83 ± 0.10
大黄治疗	150	0.27 ± 0.12 ²⁾	0.37 ± 0.24 ²⁾
	100	0.40 ± 0.10 ²⁾	0.41 ± 0.07 ²⁾
	50	0.50 ± 0.09 ²⁾	0.80 ± 0.13

3.5 对大鼠结肠组织中 AQP2 和 AQP8 蛋白表达的影响 与模型组比较,高、中剂量治疗组 AQP2 和 AQP8 蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 7。

表 7 大黄对脓毒症大鼠结肠组织中 AQP2 和 AQP8 蛋白的相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on relative transcript level of AQP2 and AQP8 protein in rats with sepsis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	AQP2 /β-actin	AQP8 /β-actin
假手术	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	-	0.84 ± 0.15	0.89 ± 0.07
大黄	150	0.42 ± 0.28 ²⁾	0.37 ± 0.10 ²⁾
	100	0.49 ± 0.09 ²⁾	0.42 ± 0.06 ²⁾
	50	0.55 ± 0.13 ²⁾	0.85 ± 0.13

4 讨论

肠道中寄居着大量正常菌群,以结肠菌群最繁杂。深层菌群以双歧杆菌和乳酸杆菌为代表;中层为类杆菌及梭杆菌等厌氧菌;游动于肠腔的主要有大肠埃希菌、肠球菌等。后者在特定条件下具有侵袭性,为条件致病菌。目前,肠道已被认为是危重病应激的中心器官和启动器官^[8]。肠源性脓毒症时,

肠道正常菌群平衡被打破,机体正常优势菌数量减少,而肠道游离菌大量增殖^[9]。游离菌可通过移位进入无菌的淋巴结、血液及远端器官,引起严重的腹膜炎, SIRS 或 MODS。

目前,中医药已应用于临床治疗脓毒症。其中,大黄为治疗脓毒症的重要中药之一。它对脓毒症患者的肠道黏膜机械屏障、化学屏障、免疫屏障及生物屏障有一定的保护作用。研究发现大黄可以改善脓毒症时的肠道菌群紊乱情况,但是关于其机制的研究少见。

AQP 在水转运过程中发挥着重要作用,与肠道水代谢密不可分^[4-5],而关于 AQPs 的研究日益增多^[10-11],结肠水分吸收是体内肠道水液吸收的终末环节,结肠的水分吸收与粪便含水量及便质关系密切。大黄可作用于结肠通过泻下作用治疗脓毒症。既往研究认为大黄是通过肠细胞膜上 Na⁺-K⁺-ATP 酶,阻碍 Na⁺ 转运吸收,使肠内渗透压增高,保留大量水分,促进肠蠕动而致泻^[12]。大黄产生泻下作用是否还与调控肠道 AQPs 有关呢?

本研究结果显示,脓毒症大鼠造模后肠道菌群紊乱,肠道游离菌群通过移位进入肠上皮黏膜(表 4),且淋巴结及血液见细菌移位现象(表 5)。给予不同剂量大黄治疗后大鼠出现了不同程度的腹泻现象,肠道中、高剂量治疗组大鼠细菌移位现象明显被抑制。同时,中、高剂量治疗组大鼠其结肠 AQP2, AQP8 的 mRNA 及蛋白水平较模型组有所降低,且对大黄剂量有依赖性。故而推测大黄下调 AQPs 产生泻下作用抑制细菌移位。

表 3 和表 4 分别列出了各组大鼠肠道代表主要菌群的数量。笔者发现伴随着高剂量大黄发挥治疗作用,细菌移位减少,但肠道菌群的膜菌群(如乳酸杆菌及双歧杆菌)和腔菌群(大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌)同时也被大量排除体外,进而对肠道菌

群的平衡状态恢复不利。因此治疗脓毒症时,中剂量大黄治疗脓毒症时肠道菌群紊乱易恢复。

综上,脓毒症时肠道菌群发生移位、正常菌群平衡紊乱。大黄下调 AQP_s 表达产生泻下作用,促进游离菌排泄,减少细菌移位及有毒物质的产生而纠正肠道菌群平衡,保护肠道生物屏障治疗脓毒症。

[参考文献]

[1] Peters R P, Savelkoul P H, Vandenbroucke-Grauls C M. Future diagnosis of sepsis [J]. Lancet, 2010, 375 (9728): 1779-1780.

[2] Ohland C L, Macnaughton W K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298 (6): 807-819.

[3] 闫美娟, 隋峰, 林娜. 大黄调节胃肠功能的作用及机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (4): 181-184.

[4] Wang W, Li Q, Yang T, Bai G, et al. Expression of AQP5 and AQP8 in human colorectal carcinoma and their clinical significance [J]. World J Surg Oncol, 2012, doi: 10. 1186/1477-7819-10-242.

[5] Ikarashi N, Ushiki T, Mochizuki T, et al. Effects of magnesium sulphate administration on aquaporin 3 in rat gastrointestinal tract [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34 (2): 238-242.

[6] 高巧营, 刘大全, 吴尚为, 等. 清热解毒方通过下调肠道水通道蛋白治疗脓毒症大鼠机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (2): 133-136.

[7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method [J]. Methods, 2001, 25 (4): 402-408.

[8] Clark J A, Coopersmith C M. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the “motor” of critical illness [J]. Shock, 2007, 28 (4): 384-393.

[9] Rittirsch D, Huber-Lang M S, Flierl M A, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009, 4 (1): 31-36.

[10] Chu J Y, Chung S C, Lam A K, et al. Phenotypes developed in secretin receptor-null mice indicated a role for secretin in regulating renal water reabsorption [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27 (7): 2499-2511.

[11] Liu S, Zhang S, Jiang H, et al. Co-expression of AQP3 and AQP5 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with aggressive tumor progression and poor prognosis [J]. Med Oncol, 2013, 30 (3): 636.

[12] 刘亮亮, 隋峰, 闫美娟, 等. 大黄炮制品各组分泻下作用的比较研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (17): 161-165.

[责任编辑 周冰冰]