

双黄连抗结肠癌活性组分中药的发现和验证

魏佩煌, 张玮, 李城, 陶仕英, 蔡程科, 李强, 李健*
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:应用网络药理学方法,从双黄连方剂中预测具有抗肿瘤活性的组分中药,并通过离体细胞实验与动物实验对其抗CT26结肠癌活性进行初步验证。方法:基于中药系统药理学数据库(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database, TCMSP),《中药活性成分分析手册》,药品生物信息学和化学信息学数据库(DrugBank),信号通路数据库(Reactome)及人类蛋白质参考数据库(Human protein reference database, HPRD),构建蛋白-蛋白相互作用网络(protein-protein interactions network, PPI)和化合物靶标网络,挖掘化合物的药理作用,发现与PPI网络节点距离较短的化合物,确定组成中药的配伍。以CT26结肠癌细胞为实验材料,结合离体和在体实验初步验证组分中药的抗肿瘤作用。结果:从双黄连组分中预测并发现“黄芩苷、连翘酯苷A和绿原酸”3个化合物配伍具有潜在抗肿瘤活性。验证结果表明,细胞实验中,与空白组比较,双黄连组分中药能显著抑制CT26细胞的增殖和迁移($P < 0.01$);动物实验中,与荷瘤模型组比较,双黄连组分中药治疗组小鼠皮下肿瘤体积增长缓慢、肿瘤重量显著降低($P < 0.01$)。结论:结合数据库挖掘和化合物靶点网络构建、分析等方法从双黄连方剂中发现具有抗肿瘤活性的组分中药“黄芩苷、连翘酯苷A和绿原酸”。经验证,该组分中药具有较好的抗CT26结肠癌活性。

[关键词] 双黄连; 组分中药; 抗肿瘤; 肠癌

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0069-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201523

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200522.1442.003.html>

[网络出版日期] 2020-5-22 17:22

Discovery and Verification of Multi-component Chinese Medicine with Anti-tumor Activity from Shuanghuanglian

WEI Pei-huang, ZHANG Wei, LI Cheng, TAO Shi-ying, CAI Cheng-ke, LI Qiang, LI Jian*
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** The methods of network pharmacology were adopted to predict Multi-component Chinese Medicine (MCCM) with anti-tumor activity from Shuanghuanglian (SHL). Furthermore, the pharmaceutical activity of CT26 colon cancer was verified *in vitro* and *in vivo*. **Method:** Based on the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP), the Handbook of Active Components Analysis of Traditional Chinese Medicine, the Drugbank database, the Reactome database, and the Human protein reference database (HPRD), the protein-protein interactions network (PPI) and the drug target network were built and resolved. The data was mined to discover the pharmacological effect. The anti-tumor activity of components from SHL was determined based on the nearest distance rule between the compounds and the nodes of network. And then, the anti-tumor effect of the MCCM was verified *in vitro* and *in vivo*. **Result:** The 3 combined compounds, baicalin, forsythoside A and chlorogenic acid with the anti-tumor activity from SHL were predicted and discovered. The verification results showed that the combination of baicalin-forsythoside

[收稿日期] 20200412(014)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09201-201-15);北京中医药大学在读研究生科研项目(2019-JYB-XS-0181)

[第一作者] 魏佩煌,在读硕士,从事中医药防治肿瘤的研究, E-mail:17610083233@163.com

[通信作者] *李健,教授,博士生导师,从事中药对于肿瘤微环境影响的研究, E-mail:lijian@bucm.edu.cn

A-chlorogenic acid could significantly inhibit the cell proliferation and migration compared with the control group *in vitro* ($P < 0.01$). Among CT26 bearing mice, the tumor volume and weight were significantly decreased after the combined administration of baicalin-forsythoside A-chlorogenic acid compared with the model group *in vivo* ($P < 0.01$). **Conclusion:** By the methods of network pharmacology, the anti-tumor activities of component of from SHL were discovered. According to the verification *in vitro* and *in vivo*, the combination of baicalin-forsythoside A-chlorogenic acid could play better anti-CT26 tumor activity.

[Key words] Shuanghuanglian; multi-component Chinese medicine (MCCM); anti-tumor; colon cancer

双黄连由黄芩、连翘、金银花(双花)3味中药配伍组成,已开发为不同剂型中成药,如双黄连颗粒、双黄连口服液、双黄连片、双黄连胶囊、双黄连粉针剂等,其功效为疏风解表、清热解毒。双黄连颗粒联合阿奇霉素治疗儿童支原体肺炎安全有效,可明显减轻炎症反应,改善免疫功能^[1]。采用雾化吸入双黄连注射液对慢性扁桃体炎,具有较好的临床疗效,能够显著改善患者临床症状,改善患者白细胞介素(IL)-6,超敏C-反应蛋白(hs-CRP)和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平,降低疾病复发率,安全性较高^[2]。已有的临床研究表明,双黄连用于病毒性及细菌性上呼吸道感染、支气管炎、肺炎、扁桃体炎、咽炎、泌尿系统感染等疾病的治疗,疗效确切^[3]。因此,系统研究双黄连的药理机制、开发安全有效的新药品种成为热点问题。

近几年,本课题组参与科技部“十二五”重大新药创制科技重大专项(双黄连粉针致敏机制),对双黄连制剂药理、毒理机制开展了多维度、多层次的研究^[4-8]。在前期研究中,本课题组应用网络药理学方法研究双黄连组分的药理机制发现,双黄连所含化合物的药理作用与抗肿瘤密切相关^[9]。基于此,本文对双黄连化合物对应靶标网络进一步挖掘和解析,筛选并预测与抗肿瘤活性关联最强的化合物,组成双黄连“组分中药”。进而,本课题组以小鼠结肠癌CT26细胞系为实验材料,结合细胞实验和动物实验对该“组分中药”的抗肿瘤活性进行验证。

1 材料

1.1 动物 小鼠结肠癌CT26 WT细胞株(ATCC® CRL-2638TM)购于中国医学科学院细胞中心,传至15代,DMEM培养基(10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素)常规培养;健康清洁级BALB/c小鼠,5周龄,雌雄各半,购于北京维通利华实验动物公司,合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于北京中医药大学实验动物室(SPF级),许可证号SYXK(京)210024。

本实验通过北京中医药大学动物实验伦理委员会批准(批号110000013419)。

1.2 用药及试剂 黄芩苷,连翘酯苷A,绿原酸(哈药集团中药二厂,批号分别为20181021,20190119,20190125,纯度 $\geq 99\%$);奥沙利铂(北京市肿瘤医院,批号H2000337);细胞增殖/毒性检测法试剂盒(CCK-8,南京建成生物公司,批号180316)。多聚甲醛,中性树胶(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为170106,716U021);苏木素染液、伊红染液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为20190928,19011711)。

1.3 仪器 HERAcell 150i型CO₂细胞培养箱, MVLTIKAN MK3型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);OptiMair系列超净工作台(新加坡艺思高科技有限公司);SC-2542型低速离心机(中国安徽中科中佳科学仪器有限公司);ECLIPSE TE2000-S型倒置显微镜(日本Nikon公司);BD FACSCanto II型电子天平(德国Sartorius AG公司);0~150 mm,0.02 mm带表游标卡尺(中国成都市三和量具有限公司);ASP300S型自动脱水机, Histocore Arcadia H型包埋机(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 化合物靶标网络构建及分析

2.1.1 双黄连组分及靶标信息采集 中药黄芩、连翘、金银花中所包含活性化合物信息来源源于TCMSP数据库及《中药活性成分分析手册》。化合物信息经纯化、筛选后,导入Drugbank数据库(<https://drugbank.ca>)筛选与双黄连组分结构相近的药物信息。将获取的drugbank数据库数据输入Reactome数据库和HPRD数据库,构建蛋白-蛋白相互作用网络。

2.1.2 化合物靶标网络构建 双黄连组分靶标网络构建依据中医药语法系统,即①中药方剂;②中药化学成分;③化合物靶标;④内源性相互作用数据(小分子,蛋白,复合物等);⑤推理引擎

(reasoning engine, 应用 ASP 语言)。生物学网络可视化用 Cytoscape3.7 软件实现。化合物靶标网络构建的推理引擎如下, ① herb1(C, D), drugtarget(D, U).-herbA(C, U); ② herb2(C, D), drugtarget(D, U).-herbB(C, U); ③ herb3(C, D), drugtarget(D, U).-herbC(C, U); ④ herbA(C, U).-tag(C, U); ⑤ herbB(C, U).-ag(C, U); ⑥ herbC(C, U).-tag(C, U); ⑦ tag(C, U), link(U, D).-net(U, D, 1); ⑧ net(C, U, N), link(U, D), N<10.-et(U, D, N+1)。规则①~③用于推断药物组分与靶标的关联性。herb1, herb2, herb3 代表双黄连中的 3 个组分。变量 C 代表所对应中药的化合物, 变量 D 代表与化合物 C 相似的药物, 变量 U 代表 D 的靶标。规则⑤~⑧用于推断 PPI 网络中化合物与靶标的关系。link(U, D) 代表网络节点之间关系, net(U, D, N+1) 是被推断出的双黄连物理结构网络(N+1 表示化合物与靶标节点 D 之间的距离)。

2.2 组分中药抗肿瘤活性验证

2.2.1 CCK-8 法检测肿瘤细胞增殖抑制率 CT26 细胞接种于 96 孔板, 5 000 个/孔, 孵育 24 h 后给予不同浓度双黄连组分中药孵育, 3 个组分(黄芩苷、连翘酯苷 A 和绿原酸)的配比关系依据 3 因素、多水平正交试验获得。被试药的抗肿瘤活性应用 CCK-8 试剂盒测定, 测定各组吸光度 A, 细胞增殖抑制率 = $(A_{\text{空白组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

2.2.2 划痕实验检测肿瘤细胞迁移能力 CT26 细胞接种于 6 孔板, 待细胞融合至 70%~80% 时, 用 1 mL 吸头垂直于培养板底部划痕并给予被试双黄连组分中药处理, 根据半数抑制浓度(IC₅₀)设置空白组、双黄连组分中药低剂量组(50 μmol·L⁻¹)、双黄连组分中药高剂量组(100 μmol·L⁻¹) 3 个分组。于 0, 24 h 观察并拍照, 用 Image J 计算划痕之间的面积比较不同处理组对细胞迁移的影响。

2.2.3 CT26 结肠癌荷瘤小鼠模型的制备及组分中药的抑瘤作用观察 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、双黄连组分中药高剂量组、双黄连组分中药等效剂量组、奥沙利铂组, 每组 12 只, 雌雄各半。除正常组外, 其余各组小鼠麻醉后, 经右前肢背部皮下注入 CT26 细胞 0.2 mL(1×10⁶ 个/只), 正常组小鼠皮下注射等剂量溶剂(0.01 mol·L⁻¹ PBS)。双黄连组分中药高剂量组给予每只小鼠 6 mg·kg⁻¹(0.01 mL·g⁻¹), 双黄连组分中药等效剂量组给予每只小鼠 3 mg·kg⁻¹(0.01 mL·g⁻¹), 奥沙利铂组给予每只小鼠 5 mg·kg⁻¹(0.01 mL·g⁻¹), 隔日给药 1 次^[10]。

正常组和模型组给予同等剂量的生理盐水, 均为腹腔注射给药。

各组小鼠自移植肿瘤细胞第 2 天开始腹腔注射给药, 连续给药 21 d。自移植肿瘤第 6 天, 用游标卡尺测量荷瘤小鼠皮下肿瘤的长度和宽度、计算皮下肿瘤体积。取材时剥离皮下肿瘤, 称质量、拍照并计算抑瘤率。

2.3 数据分析 全部定量数据用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 抗肿瘤活性双黄连组分中药预测结果 TC-MSP 数据库检索结果表明, 黄芩中已知化合物有 143 种, 相关候选靶标 1 203 个; 连翘中有已知化合物 150 种, 相应靶标 1 425 个; 金银花中已知化合物有 236 种, 对应的靶标 1 647 个。依据化合物二维结构相似、功能相近的理论, 将全部化合物信息导入 DrugBank 数据库, 挖掘化合物指向的药理作用, 依照频次排序。其中, 双黄连化合物药理作用频次最高的是抗肿瘤活性, 见图 1。

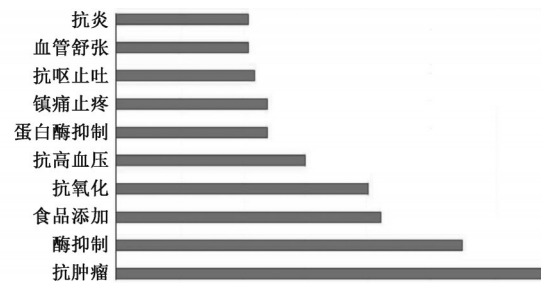


图 1 双黄连组分药理作用频次排序 TOP10

Fig. 1 Sequencing of pharmacological effect of top 10 Shuanghuanglian (SHL) components

依据化合物与 PPI 网络节点距离的长短, 本研究对药物靶标网络做降维处理, 发现黄芩苷、咖啡酸、连翘苷、汉黄芩素、连翘酯苷、绿原酸及其衍生物与 PPI 网络关联紧密。考虑到化合物的可获得性, 本研究最终选取“黄芩苷、连翘酯苷 A 和绿原酸”3 个化合物配伍组成双黄连组分中药, 见图 2。

3.2 双黄连组分中药的体外抑瘤作用 CCK-8 法结果表明, 与空白组比较, 双黄连组分中药 6.25~800 μmol·L⁻¹ 对 CT26 细胞有抑制作用(P<0.01), 且呈剂量依赖性, 其中当浓度为 100 μmol·L⁻¹ 时, 细胞存活抑制率为(50.96±1.29)%, 说明双黄连组分中药在此浓度下对 CT26 细胞的抑制作用处于适当水

汉黄芩素;连翘酯苷A;绿原酸及其衍生物
图2 与靶标网络中关联密切的3类化合物

Fig. 2 Three types of compounds closely related to target network

平,见表1。因此设定细胞划痕实验的双黄连组分中药的给药剂量分别为50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,观察给药24 h后细胞迁移情况。

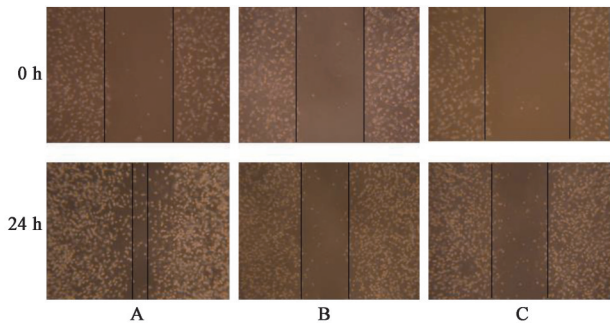
表1 不同浓度双黄连组分中药对CT26细胞抑制作用的影响($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Table 1 Inhibitory effect of SHL components on CT26 cells at different concentrations($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%
空白	0	-
双黄连组分中药	3.125	10.79 \pm 3.80
	6.25	31.42 \pm 5.83 ¹⁾
	12.5	34.72 \pm 12.71 ¹⁾
	25	35.43 \pm 3.32 ¹⁾
	50	39.18 \pm 1.81 ¹⁾
	100	50.96 \pm 1.29 ¹⁾
	200	68.16 \pm 4.27 ¹⁾
	400	72.99 \pm 1.37 ¹⁾
	800	73.25 \pm 0.74 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ (表2)。

细胞划痕实验结果表明,双黄连组分中药处理CT26细胞24 h,可显著抑制CT26细胞的迁移行为,见图3。与空白组比较,双黄连组分中药组愈合面积减小($P<0.01$),见表2。



A. 空白组($0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); B, C. 双黄连组分中药组($50, 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
图3 双黄连组分中药对于CT26细胞迁移的影响(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of SHL components on migration of CT26 cells (invert microscope, $\times 100$)

表2 双黄连组分中药对于CT26细胞迁移的影响($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Table 2 Effect of SHL components on CT26 cells migration ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	愈合面积/ mm^2
空白	0	0.20 \pm 0.01
双黄连组分中药	50	0.08 \pm 0.002 ¹⁾
	100	0.05 \pm 0.06 ¹⁾

3.3 双黄连组分中药对CT26细胞体外抑制作用的影响 与模型组比较,奥沙利铂及双黄连组分中药组小鼠皮下肿瘤体积增长缓慢($P<0.01$),见表3,图4。

与模型组比较,奥沙利铂组及双黄连组分中药治疗组 小鼠皮下肿瘤的质量显著降低($P<0.01$)。见表4。

表3 双黄连组分中药对各组小鼠肿瘤体积的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第6天	第11天	第16天	第21天
模型	-	64±19.27	204.95±68.77	797.78±274.59	2 624.01±737.3
奥沙利铂	5	21.8±3.95	68.44±10.73	269.67±58.88	531.51±123.46 ¹⁾
双黄连组分中药	6	61.47±21.60	196.3±70.3	1 006.78±349.36	1 329.5±146.02 ¹⁾
	3	49.03±19.93	99.89±47.53	359.28±89.15	1 152.8±187.4 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.01$ 。



图4 双黄连组分中药对各组小鼠肿瘤的影响
A. 模型组; B. 奥沙利铂组; C. 双黄连组分中药高剂量组; D. 双黄连组分中药等效剂量组

图4 双黄连组分中药对各组小鼠肿瘤的影响

Fig. 4 Effect of SHL components on tumor of mice

表4 双黄连组分中药对各组小鼠肿瘤质量及抑瘤率的影响

Table 4 Effect of SHL components on tumor weight and tumor inhibition rate

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肿瘤质量($\bar{x}\pm s, n=12$)/g	抑瘤率/%
模型	-	3.40±0.77	-
奥沙利铂	5	0.57±0.29 ²⁾	83.20 ²⁾
双黄连组分中药	6	2.36±0.46 ¹⁾	30.60 ¹⁾
	3	1.99±0.58 ¹⁾	41.50 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

传统中药大多以饮片配伍,按一定规则组成方剂,发挥多靶点调节作用。然而,由于其制剂及质控水平较低,不仅影响传统方剂的临床疗效,而且制约了中医药现代化和国际化的进程^[11]。1999年,张伯礼院士首次提出“组分配伍”的理念^[12-13]。2012年3月21日在北京召开的香山科学会议上,中医药

领域的专家们对组分中药及组分配伍理论进行充分研讨并初步达成共识。

组分中药是以传统中药经方为基础,在中药药效组理论指导下,由固定剂量和比例的中药有效部位、单体化合物组成的新复方制剂。组分中药的作用机制是基于“组-效”关系的多途径、多靶点、多效应和整合调节,既保持了中药方剂的优势,又提高了中药制剂的质控水平^[14]。然而,作为创新理论,组分中药领域尚存在许多亟待突破的关键问题,如组分来源及配伍的原则、组分中药如何体现“药性”等。

中医理论认为,热毒内郁是肿瘤生长不可缺少的因素之一,即热毒是肿瘤快速生长的病理基础^[15]。热为温之渐,火为热之极,火热内蕴,客于血肉,壅聚不散,腐蚀血肉,可为肿瘤^[16-17]。据此,相应的治则和治法是清热解毒、清热泻火、解毒散结。本课题组基于中医“热毒”理论,选取双黄连为研究对象,以期筛选并设计具有抗肿瘤活性的组分中药。本文基于课题组前期研究基础,设计了从双黄连配伍(黄芩、连翘、金银花)所包含化合物筛选活性组分,配伍形成“组分中药”的方案,即①构建化合物对应的靶标网络;②通过计算化合物与靶标网络节点间距离,发现与关键网络节点(高连接区)距离相对较短的化合物;③结合化合物的可获得性,确定组分配伍方案;④实验验证。

本研究结果表明,运用上述“组分中药”设计方案可以筛选得到“黄芩苷、连翘酯苷A和绿原酸”3个组分配伍而成的组分中药。药化检测结果证实,上述3类化合物在双黄连原料药及成品药中含量高,可获得性强,成药性好,本实验以小鼠的CT26结肠癌为实验材料,通过体外细胞实验和动物实验初步验证了该组分中药具有较好的抗肿瘤活性,同时也证实本文设计的组分中药筛选策略具有可操作性。

综上所述,本实验在组分中药概念的指导下,运用网络药理学“干法”预测技术,从双黄连中筛选、获得抗肿瘤活性组分中药。同时结合体内、体外“湿法”实验对组分中药的抗肿瘤活性进行验证。本文为组分中药的发现和研发提供了新思路。组分中药的研究尚处于初期阶段,有大量的研究工作和未知领域需要深入探索。但本文也存在不足,在网络药理学技术的应用上还需要进一步提升,在数据库的选择及生物学网络构建、分析方法等方面尚处于初级水平。此外,对组分中药的药理机制需要开展深入系统的实验研究。

[参考文献]

- [1] 李慧,于晓晴,底建辉,等. 双黄连颗粒联合阿奇霉素治疗儿童支原体肺炎临床研究[J]. 中国药业, 2019, 28(8):27-29.
- [2] 付海生,熊向菁,王青海. 雾化吸入双黄连注射液对慢性扁桃体炎的疗效及IL-6、hs-CRP和TNF- α 水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(2):392-395.
- [3] 孙效珍,解建设,解鲁豫. 双黄连的药理与临床应用[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(1):54-55.
- [4] 韩森,李城,魏佩煌,等. 注射用双黄连诱发肥大细胞脱颗粒的早期生物学效应[J]. 环球中医药, 2018, 11(6):842-845.
- [5] GAO X Y, GUO M X, LI Q, et al. Plasma metabolomic profiling to reveal antipyretic mechanism of Shuang-huang-lian injection on yeast-induced pyrexia rats[J]. PLoS One, 2014, 9(6):100-117.
- [6] 张旗,苏湮,汤明杰,等. 双黄连粉针剂的化学成分研究[J]. 中医药学报, 2014, 42(1):12-15.
- [7] 李静,岳淑梅,李健,等. 文本挖掘注射用双黄连不良反应的相关因素[J]. 中国药事, 2013, 27(11):1213-1217.
- [8] 张旗,崔秀荣,马海波,等. 双黄连冻干粉针剂不良反应的研究进展[J]. 世界中医药, 2013, 8(3):357-359.
- [9] ZHANG B X, LI J, GU H, et al. Using bioinformatics approach to explore the pharmacological mechanisms of multiple ingredients in Shuang-Huang-Lian[J]. Sci World J, 2015, 291(680):352-356.
- [10] 曹子丰,唐德才,时晓霞,等. 黄芪、莪术配伍联合奥沙利铂对CT26. WT原位移植瘤小鼠中CXCR3、CCR6表达影响[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(6):477-482.
- [11] 陈亚红,刘传鑫,何涛,等. 丹参饮治疗糖尿病心肌病的网络药理学研究[J]. 中草药, 2019, 50(5):1164-1174.
- [12] 顾浩,王耘,肖斌,等. 中药功效-药性组合关联关系研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7):1568-1571.
- [13] 张伯礼,王永炎. 方剂关键科学问题的基础研究——以组分配伍研制现代中药[J]. 中国天然药物, 2005, 3(5):258-261.
- [14] 刘丽梅,张俊华,岳广欣,等. 组分中药产生背景回顾及未来展望[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(5):1-5.
- [15] 侯天将,由凤鸣,严然,等. 浅谈中医肿瘤的共性病机及治法[J]. 四川中医, 2016, 34(7):46-48.
- [16] 张俊华,樊官伟,张晗,等. 组分中药理论的发展与应用[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21):4054-4058.
- [17] 王雪雁,杨柱,龙奉玺,等. 浅谈清热解毒治则治法在肿瘤疾病中的运用[J]. 中医药临床杂志, 2018, 30(8):1409-1412.

[责任编辑 张丰丰]