

甘草附子汤对佐剂性关节炎小鼠滑膜成纤维样细胞增殖的影响

蔡悦*, 张博, 郭静

(天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

[摘要] **目的:**观察佐剂性关节炎(AA)小鼠滑膜组织成纤维样细胞(FLS)增殖的变化及甘草附子汤对其的影响。**方法:**将 48 只雄性 Balb/c 小鼠随机分为正常组,模型组,甘草附子汤组(7.8 g·kg⁻¹),雷公藤多苷组(10 mg·kg⁻¹)。采用 AA 小鼠模型,模型成功后,治疗组小鼠给予相应给药灌胃 18 d,1 次/d,正常组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水。采用足肿胀法评价药物治疗作用;苏木素-伊红(HE)染色观察各组踝关节组织病理变化;Vimentin 免疫组化法检测滑膜组织成纤维样增殖;免疫荧光法检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)表达水平以及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测滑膜组织中细胞周期蛋白 D₁(Cyclin D₁),增殖细胞核抗原(PCNA),p53 和 p21 蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组足肿胀度增加,滑膜增生和骨侵蚀明显,滑膜组织成纤维样细胞增殖率升高($P < 0.05$),滑膜组织中 TNF-α, Cyclin D₁, PCNA 蛋白表达明显升高($P < 0.05$), p53 和 p21 蛋白表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较,甘草附子汤组小鼠足肿胀,滑膜增生和骨侵蚀有所改善,滑膜组织成纤维样细胞增殖率降低($P < 0.05$),滑膜组织中 TNF-α 水平, Cyclin D₁, PCNA 蛋白表达显著降低,而 p53 和 p21 蛋白表达升高($P < 0.05$)。**结论:**甘草附子汤对 AA 小鼠关节和滑膜损伤具有明显改善作用,可能与降低局部慢性炎症,调节 AA 小鼠滑膜 Cyclin D₁, PCNA, p53 和 p21 的蛋白异常表达,抑制 FLS 增殖有关。

[关键词] 甘草附子汤; 佐剂性关节炎; 类风湿关节炎; 滑膜成纤维样细胞; 增殖

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0029-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20191003

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190206.1440.003.html>

[网络出版时间] 2019-02-12 7:00

Effect of Gancao Fuzitang on Synovial Fibroblast-like Cell Proliferation in Adjuvant Arthritis Mice Model

CAI Yue*, ZHANG Bo, GUO Jing

(First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Gancao Fuzitang on the proliferation of fibroblast-like synoviocytes (FLS) in synovial tissue of mice with adjuvant-induced arthritis (AA). **Method:** The 48 male Balb/c mice were randomly divided into 4 groups: normal control group, model group (arthritis induced through injection with adjuvant), Gancao Fuzitang group and triptolide group. The normal control group and the model control group were orally given physiological saline. After the successful modeling, the mice of the other two groups were treated with Gancao Fuzitang or triptolide orally for 18 days. Then the animals were euthanized, the paw edema of the animals was measured, and arthritic ankles were observed by histological examination. Tumor necrosis factor (TNF)-α was examined by immunoassays. The proliferation of synovial cells of foot joints was detected by immunohistochemical expressions of Vimentin. The expressions of Cyclin D₁, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p53 and p21 were detected by Western blot. **Result:** Compared with the normal control group, the mice of synovial hyperplasia and bone erosion in model group were obvious. The joint swelling degree, TNF-α level and

[收稿日期] 20181001(007)

[基金项目] 天津市科技计划项目(15ZXLCSY00020)

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

proliferation of FLS were increased ($P < 0.05$). The expressions of Cyclin D₁, PCNA were up-regulated ($P < 0.05$), but the expressions of p53 and p21 were down-regulated ($P < 0.05$). Compared with the model group, Gancao Fuzitang significantly alleviated joint swelling and injuries, reduced the level of TNF- α , cell cycles (Cyclin D₁ and PCNA), and increased protein expressions of p53 and p21 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Gancao Fuzitang has a therapeutic effect on AA mice, and the mechanism might be associated with its anti-inflammatory effect and the effects in regulating Cyclin D₁, PCNA, p53 and p21 expressions and inhibiting FLS proliferation.

[**Key words**] Gancao Fuzitang; adjuvant arthritis; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; proliferation

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性炎性、自身免疫性疾病,其特征为增生性滑膜组织、血管翳形成和关节软骨及骨的破坏^[1]。研究发现,RA 患者的增殖性滑膜组织主要由成纤维细胞样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS), 毛细血管和浸润的淋巴细胞组成。炎症环境下,FLS 产生基质金属蛋白酶导致软骨破坏以及对骨质进行降解^[2-3]。此外,过度增殖的 FLS 与巨噬细胞以及其他炎性细胞聚集促进血管新生,继而形成血管翳,加速软骨和骨质破坏。因此,FLS 在 RA 发病机制中起关键作用,抑制 FLS 增殖可能为改善 RA 的有效途径^[4]。

甘草附子汤由炮附子、炙甘草、白术和桂枝 4 味中药组成,始载于张仲景的《伤寒论》。具有祛风除湿、温经散寒、温阳补中的功效,临床治疗效果显著^[5-7]。本研究拟采用佐剂诱导关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 小鼠,通过甘草附子汤作用于 AA 小鼠,通过观察 AA 小鼠关节肿胀和踝关节病理变化,检测滑膜组织肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平和增殖相关蛋白表达,探讨甘草附子汤对改善 RA 滑膜增殖的可能机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 48 只 8 周龄雄性 Balb/c 小鼠,体质量 (18 \pm 2) g, 购买于北京维通利华实验技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2013-0051。由天津中医药大学实验动物管理委员会审核通过 (2012-058), 在实验动物中心屏障动物实验设施进行 [SYXK(津)2013-0037], 清洁级饲养,实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀照顾。

1.2 药物与试剂 甘草附子汤由炙甘草、炮附子、白术、桂枝组成,采购自天津同仁堂药店,天津中医药大学张坚教授鉴定为正品。炙甘草、炮附子 (先煎 0.5 h), 白术、桂枝各 15 g; 20 倍量水煎煮 1 次, 滤过,浓缩,4 $^{\circ}$ C 保存备用,小鼠给药量为以上各药

材 0.039 g。雷公藤多苷 (江苏美通有限公司,批号 1211242063); 完全弗氏佐剂 (美国 Sigma 公司,批号 100M8725); TNF- α 兔多抗, Vimentin 兔多抗 (美国 Abcam 公司,批号分别为 ab6671, ab45939); 驴抗兔 IgG (H + L) Alexa Fluor 488 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号 A-21206); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI, 美国 Life Technologies 公司); 细胞周期凋亡蛋白 (Cyclin) D₁, 增殖细胞核抗原 (PCNA), p53 和 p21 兔多克隆抗体和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体,山羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G 二抗 (美国 CST 公司,批号分别为 AF0931, DF6067, AF0879, AF6290, AF7021, AF0927)。

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

2 方法

2.1 造模、分组与给药 将 48 只小鼠随机分为正常组,模型组,甘草附子汤组 (7.8 g \cdot kg⁻¹, 根据成人临床日常用量折合计算) 及雷公藤多苷组 (10 mg \cdot kg⁻¹)。小鼠左后足趾皮内注射完全弗氏佐剂 50 μ L 制备 AA 模型^[8], 正常组注射等体积生理盐水。注射第 12 天后,给药组在模型成功基础上,连续灌胃相应药物 18 d, 每天 1 次,其余两组小鼠给予等体积生理盐水。造模当天、给药当天和药物治疗 18 后,测量右后足趾容积,差值作为足趾肿胀度。

2.2 苏木素-伊红 (HE) 染色观察踝关节和滑膜病理学变化 将各组小鼠处死,无菌条件下取踝关节以及滑膜组织,常规方法进行石蜡包埋、切片,脱水,苏木素染核,水洗,乙醇分化,水洗,氨水反蓝,水洗,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,制作 HE 切片,在显微镜观察各组病理情况。

2.3 免疫荧光检测滑膜组织 TNF- α 表达 将滑膜

切片与一抗(1:150)孵育过夜(含有1%马血清,0.5% Triton X-100)。PBS 洗涤后,二抗(1:800)避光温育 2 h, PBS 洗涤, DAPI 溶液(1:1 000)避光孵育 20 min, 洗涤切片, 封片, 在荧光显微镜下 × 200 放大率进行拍照, 每张切片随机选取不重叠 5 个视野, 通过 Image-Pro Plus 6.0 分析阳性像素与滑膜中总复染像素的百分比(%)。

2.4 免疫组化检测滑膜组织 Vimentin 表达 取组小鼠双膝关节滑膜, 常规石蜡切片。Vimentin 多克隆抗体标记滑膜组织 FLS(1:200), 二抗(1:500)避光温育 2 h, DAB 染色、苏木精复染、脱水、透明、封片, × 400 放大率拍摄照片。通过 Image Pro Plus 6.0 分析每个标本 5 个随机图像的蛋白表达积分吸光度 IA。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测滑膜组织 Cyclin D₁, PCNA, p53 和 p21 蛋白表达 取关节内滑膜组织, 称质量后, 加入 5 倍体积的裂解液混匀吹打。置于冰盒中, 振荡器振荡。4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集上清液, BCA 法测定蛋白含量。蛋白样品变性, 微量加样器上样, 每孔量, 电泳及转膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 孵育一抗(1:200)4 ℃ 过夜, TBST 洗涤 3 次, 加入二抗(1:1 000), 孵育 2 h, 摇床振摇。ECL 系统显影, 采用图像分析软件对条带进行分析, 以目标条带与采用 GAPDH 比值作为蛋白相对表达量, 实验重复 3 次。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 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 对 AA 小鼠足肿胀影响 与正常组比较, 模型组肿胀度明显增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 甘草附子汤可降低小鼠完全弗氏佐剂诱导的足趾肿胀的程度($P < 0.05$), 雷公藤多苷亦可明显降低足趾肿胀的程度($P < 0.05$)。见表 1。

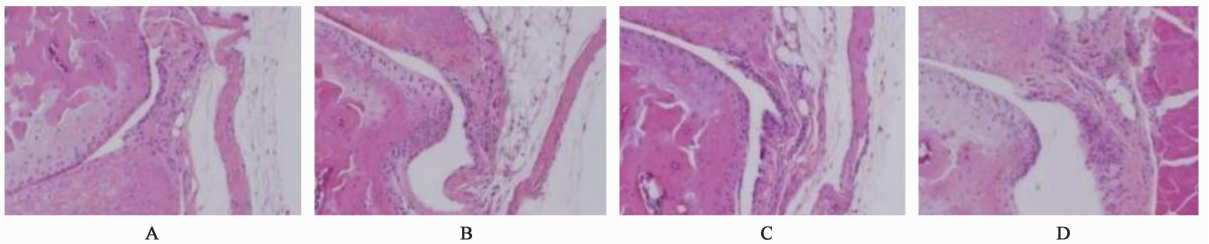
表 1 甘草附子汤对小鼠足肿胀和滑膜 Vimentin IA 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab 1 Effect of Ganciao Fuzitang on foot swelling and IA of Vimentin($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	足肿胀度/mL	IA
正常	-	0.134 ± 0.003	9 013.73 ± 1 826.15
模型	-	0.541 ± 0.032 ¹⁾	17 342.58 ± 3 619.48 ¹⁾
甘草附子汤	7.8	0.345 ± 0.024 ²⁾	12 578.98 ± 2 469.17 ²⁾
雷公藤多苷	0.01	0.274 ± 0.019 ²⁾	13 105.88 ± 3 619.42 ²⁾

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

3.2 对 AA 小鼠踝关节病理的影响 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, 滑膜细胞聚集, 结缔组织存在大量的炎细胞浸润, 血管生成, 软骨面不平整, 软骨骨赘明显; 给药后, 甘草附子汤和雷公藤多苷组对 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. 甘草附子汤组; D. 雷公藤多苷组(图 2~4 同)

图 1 甘草附子汤对 AA 小鼠踝关节病理影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Ganciao Fuzitang on pathology of ankle joint in AA mice(HE, ×100)

3.3 对 AA 小鼠滑膜组织 TNF- α 表达的影响 与正常组比较, 模型组 TNF- α 表达强度明显增强($P < 0.05$); 与模型组比较, 甘草附子汤组、雷公藤多苷组 TNF- α 的表达强度降低($P < 0.05$)。见图 2。

3.4 对 AA 小鼠滑膜 Vimentin 表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠的滑膜组织中 Vimentin 蛋白 IA 明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 甘草附子

汤组、雷公藤多苷的 Vimentin 蛋白 IA 有所降低($P < 0.05$)。见表 1 和图 3。

3.5 对 AA 小鼠滑膜组织中相关蛋白表达影响 与正常组比较, 模型组 PCNA 和 Cyclin D₁ 水平上调, 而 p53(生长抑制蛋白)及其下游靶基因 p21 水平下调($P < 0.05$)(图 4)。与模型组比较, 甘草附子汤组、雷公藤多苷组 Cyclin D₁, PCNA 表达下调, p53

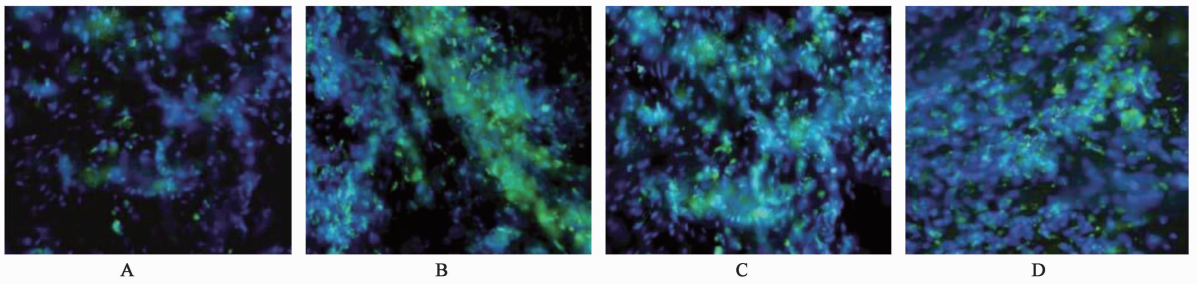


图 2 甘草附子汤对 AA 小鼠滑膜组织 TNF- α 表达影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of Gancao Fuzitang on expressions of TNF- α -labeled synoviocytes in AA mice (HE, $\times 100$)

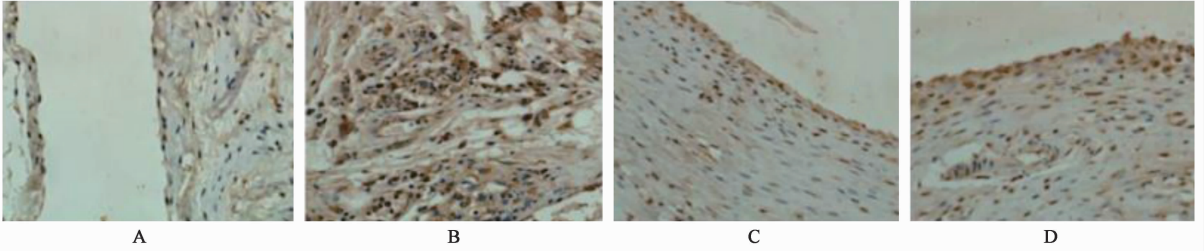


图 3 甘草附子汤对 AA 小鼠滑膜 Vimentin 蛋白表达影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of Gancao Fuzitang on expressions of Vimentin-labeled synoviocytes in AA mice (HE, $\times 100$)

和 p21 的表达水平上调 ($P < 0.05$)。见图 4, 表 2。

4 讨论

类风湿性关节炎是以关节滑膜炎为主要临床表现的慢性系统性疾病, TNF- α 与 IL-1, IL-1 β 等炎症细胞因子存在于 RA 患者的血清、关节滑膜中, 与 RA 滑膜增生和关节破密切相关, 可以诱导 FLS 增殖和迁移。增生性 FLS 群体产生炎症细胞因子, 趋化因子, 细胞外基质蛋白和细胞黏附分子促进淋巴细胞和巨噬细胞浸润和募集, 进一步刺激 FLS 迁移和侵入软骨和骨骼^[9]。TNF- α 是炎症反应过程中出现最早、最重要的炎性介质, 能激活中性粒细胞和

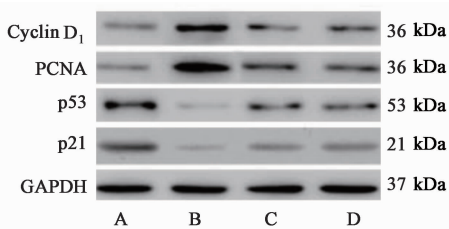


图 4 小鼠滑膜组织 Cyclin D₁, PCNA, p53 和 p21 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of expression of Cyclin D₁, PCNA, p53 and p21 protein in synovial tissues

表 2 甘草附子汤对 AA 小鼠滑膜组织中 Cyclin D₁, PCNA, p53, p21 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Gancao Fuzitang on expression of Cyclin D₁, PCNA, p53, p21 protein in synovial tissues ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Cyclin D ₁ /GAPDH	PCNA/GAPDH	p53/GAPDH	p21/GAPDH
正常	-	0.185 ± 0.004	0.193 ± 0.013	0.623 ± 0.020	0.489 ± 0.067
模型	-	0.689 ± 0.080 ¹⁾	0.942 ± 0.056 ¹⁾	0.136 ± 0.008 ¹⁾	0.147 ± 0.004 ¹⁾
甘草附子汤	7.8	0.314 ± 0.021 ²⁾	0.392 ± 0.067 ²⁾	0.362 ± 0.034 ²⁾	0.207 ± 0.021 ²⁾
雷公藤多苷	0.01	0.339 ± 0.064 ²⁾	0.383 ± 0.022 ²⁾	0.387 ± 0.028 ²⁾	0.216 ± 0.015 ²⁾

淋巴细胞, 使血管内皮细胞通透性增加, 调节其他组织代谢活性并促使其他细胞因子的合成和释放。因此, 抑制 FLS 的过度增殖同时调节炎症细胞因子可能成为潜在治疗手段。临床研究表明, 督灸联合甘草附子汤可以降低炎症指标包括血沉, C 反应蛋白, TNF- α , 白细胞介素-6 的表达, 缓解相关疼痛和晨僵时间, 治疗活动期强直性脊柱炎疗效显著^[10]。本课

题组前期研究发现, 甘草附子汤具有降低 AA 小鼠炎症因子的产生和滑膜组织的基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 及 MMP-3 表达而发挥治疗作用^[11]。以上研究表明甘草附子汤可以通过调节炎症因子治疗类风湿性关节炎。本研究进一步发现, 模型组的 TNF- α 表达升高, Vimentin 阳性表达增加即 FLS 增殖活力增强, 与模型组比较, 甘草附子汤组和雷公藤

多苷组可以降低 TNF- α 表达,降低 FLS 增殖活力,提示甘草附子汤可以通过抑制炎症因子水平和 FLS 增生,改善 AA 小鼠病理发展。

正常滑膜由具有 1~2 个细胞层的内膜衬里组成,其在 RA 中扩张,部分原因是由于 FLS 的数量增加。大量 FLS 是细胞促炎因子和基质降解酶的主要来源,加重关节炎和骨破坏^[2]。文献报道,FLS 的侵袭性与肿瘤类似^[12],其潜在机制包括异常增殖,如 Cyclin D₁, B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), Bcl-XL, MMP-2 和 MMP-9 促进 FLS 增殖并抑制细胞凋亡^[13]和肿瘤抑制基因 p53 的功能抑制^[14]。本实验中通过免疫印迹实验检测了增殖相关蛋白 Cyclin D₁ 和 PCNA,以及肿瘤抑制基因 p53 及其下游 p21 表达。结果显示,甘草附子汤显著降低 AA 小鼠中滑膜组织 Cyclin D₁ 和 PCNA 过表达,同时提高 p53 和 p21 表达,提示甘草附子汤可能通过影响滑膜 FLS 增殖表达,从而抑制 RA 病理发展。本实课题组研究发现甘草附子汤疗效与阳性对照药物雷公藤多苷疗效一致,雷公藤多苷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^[15],甘草附子汤作为传统方剂,暂未见其副作用报道。黄顺等^[16]研究发现甘草附子汤可以降低 RA 模型大鼠血清和滑膜组织中酸敏感离子通道 3 (ASIC3),乏氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 含量而发挥治疗作用。ASIC3 的激活促进滑膜炎加重,HIF-1 α 表达增加发挥聚集、黏附、浸润等作用,促进微血管新生和滑膜细胞增生。本研究主体思路与其一致,甘草附子汤作用于滑膜组织,通过抑制炎症反应和增殖而发挥疗效。

通过研究后笔者发现 AA 小鼠关节滑膜增生明显,炎性细胞聚集在滑膜血管周围。甘草附子汤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,对炎症因子及 FLS 增殖促进蛋白和肿瘤抑制蛋白表达均有不同程度的调节。结果提示,甘草附子汤可以通过减少滑膜炎症因子水平,抑制了 FLS 增殖,两方面协同作用阻断了 RA 病程进一步发展。

[参考文献]

[1] 熊江华,李艳.中药复方对类风湿性关节炎干预机制的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(9):230-234.
[2] Tolboom T C, Pieterman E, van der Laan W H, et al. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes;

correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10[J]. Ann Rheum Dis, 2002,61:975-980.
[3] 刘佳维,王永辉,李艳彦,等.黄芪桂枝五物汤对 CIA 模型大鼠关节滑膜细胞凋亡的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(14):171-176.
[4] ZONG M, LU T, FAN S, et al. Glucose-6-phosphate isomerase promotes the proliferation and inhibits the apoptosis in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther,2015,14(17):100.
[5] 冯亚兵.甘草附子汤治疗风湿病及对环瓜氨酸抗体和类风湿因子的影响研究[J].亚太传统医药,2018,14(5):191-192.
[6] 罗晓光,曾萍萍,闫兵,等.甘草附子汤治疗寒湿痹阻型急性痛风性关节炎的临床观察[J].光明中医,2018,33(4):528-530.
[7] 牛立新,何丽清.甘草附子汤和姜苓半夏汤合方治疗慢性痛风性关节炎 40 例临床观察[J].山西中医学院学报,2016,17(4):31-32.
[8] 沈彩红,刘云,余宪文,等.茜草醇提物对佐剂性关节炎大鼠肝脏、脾脏损伤及 Foxp3 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(7):147-153.
[9] LI X F, SHEN W W, SUN Y Y, et al. MicroRNA-20a negatively regulates expression of NLRP3-inflammasome by targeting TXNIP in adjuvant-induced arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Joint Bone Spine,2016,83(6):695-700.
[10] 许红娣.督灸结合甘草附子汤对强直性脊柱炎活动期炎症指标的影响[J].针灸临床杂志,2017,33(10):16-19.
[11] 蔡悦,梁红玉,王建立,等.甘草附子汤对佐剂性关节炎小鼠的治疗作用[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(14):142-146.
[12] Bartok B, Firestein G S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis[J]. Immunol Rev Immunol Rev,2010,233(1):233-255.
[13] LAO M, SHI M, ZOU Y, et al. Protein inhibitor of activated STAT3 regulates migration, invasion, and activation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. J Immunol,2016,196(2):596-606.
[14] ZHANG T, LI H, SHI J, et al. p53 predominantly regulates IL-6 production and suppresses synovial inflammation in fibroblast-like synoviocytes and adjuvant-induced arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2016,18(1):271.
[15] 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.
[16] 黄顺,林清华,王祖庆,等.甘草附子汤对类风湿关节炎大鼠 ASIC3 和 HIF-1 α 表达的影响[J].中医药导报,2018,24(18):11-14,24.

[责任编辑 周冰冰]