

白晓红,盛小丹,刘芳,等. 伏九贴膏对哮喘小鼠 NGF/TrKA 及相关炎性因子表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (6): 51 - 56,111.

Bai XH, Sheng XD, Liu F, et al. Effect of Fujiu plaster on the expression of NGF, TrKA proteins and related inflammatory factors in asthmatic mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 51 - 56,111.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.06.009

伏九贴膏对哮喘小鼠 NGF/TrKA 及相关炎性因子表达的影响

白晓红¹, 盛小丹², 刘芳¹, 杨鹤祥^{1*}

(1. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

【摘要】 目的 观察辽宁中医药大学附属医院制剂“伏九贴膏”对哮喘小鼠血清中白介素 4(interleukin-4, IL-4)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、相关免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IGE) 细胞因子以及肺组织内神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和酪氨酸激酶 A(tropomyosin receptor kinase A, TrKA)蛋白表达的影响,探讨其治疗哮喘的机制。**方法** 50 只成年 BALB/c 小鼠随机分为 A 正常对照组、B 哮喘模型组、C 地塞米松组、D 伏九贴高剂量组、E 伏九贴低剂量组 5 组。卵清蛋白(ovalbumin, OVA)腹腔注射致敏,超声雾化吸入激发,建立哮喘模型。ELISA 法检测血清中 IL-4、总 IGE、OVA 特异性 IGE 和 IFN- γ 细胞因子的表达,HE 染色和 Masson 染色观察病理改变,免疫组化观察肺组织中 NGF、TrKA 蛋白表达。**结果** 与正常组相比,模型组 NGF、TrKA 和 IL-4、总 IGE、OVA 特异性 IGE 表达均明显升高($P < 0.05$),IFN- γ 表达降低($P < 0.05$);与模型组相比,地塞米松组和伏九贴高剂量组的 NGF、TrKA 和 IL-4、总 IGE、OVA 特异性 IGE 表达均降低($P < 0.05$),IFN- γ 表达升高($P < 0.05$),伏九贴膏低剂量组改变均不明显,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 伏九贴膏通过下调 NGF、TrKA 蛋白的表达,抑制了 IL-4、IGE 的分泌,同时促进了 IFN- γ 的分泌,使 TH1 与 TH2 趋于平衡,从而缓解哮喘发作。

【关键词】 伏九贴膏;哮喘;神经生长因子;酪氨酸激酶 A;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 06-0051-06

Effect of Fujiu plaster on the expression of NGF, TrKA proteins and related inflammatory factors in asthmatic mice

BAI Xiaohong¹, SHENG Xiaodan², LIU Fang¹, YANG Dongxiang^{1*}

(1. The Affiliated Hospital of Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 11032, China.

2. Liaoning University of Chinese medicine, Shenyang 110847)

【Abstract】 Objective To explore the effects of a Chinese medicine, “Fujiu plaster” (developed by the Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine), on NGF/TrKA and related inflammatory factors in asthmatic mice and its mechanism of action. **Methods** Fifty SPF adult BALB/c mice were randomly divided into five groups: control, asthma model, dexamethasone, high-dose Fujiu plaster, and low-dose Fujiu plaster groups. To establish the asthma model, the mice were sensitized through intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA) and an asthmatic reaction was provoked through ultrasonic aerosol inhalation. Expression of IL-4, total IgE, OVA-specific IgE, and IFN- γ in serum

【基金项目】 辽宁省科学技术计划项目(2014226035)。

【作者简介】 白晓红(1965—)女,硕士生导师,主任医师,教授,研究方向:小儿肺系疾病。E-mail: lunwen200901@163.com

【通信作者】 杨鹤祥(1975—)男,博士生导师,主任医师,教授,研究方向:中医骨伤科学。E-mail: Nuonuo8896@163.com

was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. Pathological changes were examined using hematoxylin and eosin, and Masson trichrome staining. NGF and TrkA protein expression in the lung tissues was determined using immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the model group exhibited significantly increased expression of NGF, TrkA, IL-4, total IgE, and OVA-specific IgE ($P < 0.05$), but decreased IFN- γ expression ($P < 0.05$). Compared with the model group, the dexamethasone and high-dose Fujiu plaster groups exhibited significantly reduced expression of NGF, TrkA, IL-4, total IgE, and OVA-specific IgE ($P < 0.05$), and increased IFN- γ expression ($P < 0.05$). No significant changes to the aforementioned indicators were observed in the low-dose Fujiu plaster group ($P > 0.05$). **Conclusions** Fujiu plaster inhibits the secretion of IL-4 and IgE, and promotes the secretion of IFN- γ by downregulating expression of NGF and TrkA proteins to regulate the imbalance of Th1/Th2 lymphocytes, thus relieving the asthma attack.

[Keywords] Fujiu plaster; allergic asthma; nerve growth factor; tyrosine kinase A; mouse

支气管哮喘是一种以慢性气道炎症和气道高反应性为特征的异质性疾病,主要以反复发作的喘息、咳嗽、气促、胸闷为临床表现,经常会在夜间和/或凌晨发作或加剧,呼吸道症状的具体表现形式和严重程度具有随时间而变化的特点,并常伴有可变的呼气气流受限^[1]。根据 2010 年流行病学调查显示,我国儿童哮喘平均累积患病率为 3.02%^[2]。其中年龄在学龄期前后的儿童的患病率升高最为明显^[3]。对于儿童哮喘的治疗要尽早采取措施。辽宁中医药大学附属医院应用“伏九贴膏”治疗儿童哮喘已有悠久的历史,并取得了较好的临床效果^[4-5]。但其作用机制尚不明确,所以本实验目的即探讨“伏九贴膏”治疗哮喘的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周龄 BALB/c 小鼠 50 只,雌雄各半,体重 18~20 g,均购于北京斯贝福实验动物有限公司[SCXK(京)2016-0002],动物饲养于辽宁中医药大学动物中心[SYXK(辽)2013-0009],实验动物的使用过程中严格遵守 3R 原则,并得到了辽宁中医药大学实验动物伦理委员会的批准[伦理审批号:21000092017067]。

1.1.2 药物制备

“伏九贴膏”选用白芥子、延胡索、甘遂、桑白皮、酒大黄、细辛,按照一定比例共研细末,鲜姜汁调成药饼,置于 4 cm × 4 cm 大小的纱布上,中间加麝香制成。其中高剂量含生药量 0.36 g/g,低剂量含生药量 0.09 g/g。以上药物均由辽宁中医药大学分子药理实验室提供。

1.2 主要试剂与仪器

地塞米松磷酸钠注射液,购自国药集团寄生制药有限公司,国药准字 H41020036,批号 1801226;卵清蛋白(OVA, A5253-500G)购自 Sigma;氢氧化铝干粉(S30353-500 g)购自源叶生物。小鼠 IGE ELISA 试剂盒(货号:m1037602)购自酶联生物;小鼠卵清蛋白特异性 IGE 酶联免疫分析试剂盒(货号:F2291-A)购自凡科维;小鼠 IL-4 ELISA 试剂盒(货号:m1002038)购自酶联生物;小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒(货号:m002277)购自酶联生物;一抗 Rabbit Anti-NGF(货号:ABP51959)购自 Abbkine;一抗 Rabbit Anti-TRKA(货号:ABP55429)购自 Abbkine;中杉金桥 PV-6000 通用二步法检测试剂盒;DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

奥华 402AI 型超声雾化仪(广东鱼跃);离心机 Eppendorf Centrifuge 5804 R;显微镜 Olympus CX-41;数码照相机 SmartV350D;Hestion ATP 700(ST)电脑全自动脱水机;酶标仪(美国 BioTek Instruments, Inc,型号 Epoch);自制塑料雾化箱(50 × 30 × 30)cm。

1.3 实验方法

1.3.1 卵清蛋白(OVA)诱导哮喘小鼠模型

根据对前人造模方法的研究和修改,建立经由卵清蛋白(OVA)诱导的哮喘小鼠模型。除正常对照组以外,其他各组小鼠分别在第 0、7、14 天给予腹腔注射致敏液每只 0.2 mL,致敏液成分为 10 μ g OVA 和 2 mg 氢氧化铝粉末;自 21 d 到 28 d,给予 5%OVA 混悬液雾化吸入,每日一次,每次 30 min,同时观察小鼠呼吸运动情况,看是否有呼吸急促、点头呼吸、活动减少等情况。正常对照组给予同体积的生理盐水腹腔注射和雾化吸入^[6]。

1.3.2 分组给药治疗

从第 21 天开始,雾化激发哮喘的同时,C 组给

予地塞米松注射液腹腔注射,每日一次,每只 2 mg, D、E 组分别给予高低浓度药物贴敷治疗,每日一次,每次 4 h。A、B 组不做给药处理。

1.3.3 取材

在最后一次雾化吸入激发后 24 h,收集全血,静置 2 h 后,4℃,3000 r/min,离心 10 min,取血清,-80℃低温保存。取小鼠左肺,浸泡于 4% 甲醛溶液中,常温保存。取小鼠右肺,生理盐水冲洗掉血液后用滤纸吸干,放置-80℃低温保存。

1.3.4 血清中总 IGE、OVA 特异性 IGE、IFN- γ 、IL-4 的测定

血清于-80℃冰箱中取出,室温融化。ELISA 试剂盒于 4℃冰箱中取出,室温平衡 20 min,按照说明书操作步骤逐个加样,测定。

1.3.5 肺组织的病理改变(HE 染色及 Masson 染色)

取甲醛固定 24 h 后的小鼠左肺,修剪后,流水冲洗 10 min,石蜡包埋,二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,切片,烘片机 38℃烘片 0.5 h,温箱 68℃烘片 2 h,二甲苯脱蜡,酒精梯度脱水,苏木精-伊红染色,光镜下观察炎性细胞浸润情况。Masson 染色按照试剂盒说明书步骤操作。

1.3.6 免疫组化检测肺组织中 NGF、TrKA 蛋白的表达

石蜡包埋后切片,厚度 0.6 μm ,烘片机 46℃烘片 2 h,温箱 70℃烤片 3 h,余热过夜后二甲苯脱蜡,

梯度酒精脱水,抗原修复后,加内源性过氧化物酶 16 min,洗净后加 10% 胎牛血清 0.5 h,一抗 4℃孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,二抗孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,加入新鲜配置的 DAB 显色剂,显色 3 min 后,蒸馏水冲洗终止显色,自来水中浸泡 10 min,苏木素复染 2 min,盐酸酒精分化 1 s,自来水浸泡 10 min,梯度酒精、二甲苯脱水透明,中性树胶封片后光镜下观察。

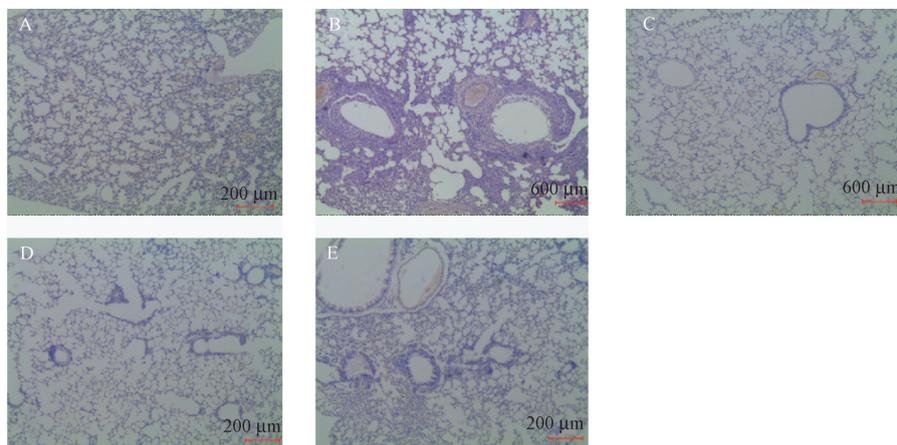
1.4 统计学方法

采用统计软件 SPSS 16.0 进行数据处理,实验数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间两两比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病理改变(HE 染色和 Masson 染色)

正常对照组肺组织内各级支气管、肺泡壁、粘膜上皮形态较完整,偶见个别炎性细胞浸润和胶原沉积;哮喘模型组可见支气管粘膜及肺泡周围有较多炎性细胞浸润和蓝色胶原纤维形成。部分肺泡破坏、融合,气道上皮组织多处断裂;地塞米松组、伏九贴高剂量组及伏九贴低剂量组较模型组相比,肺组织炎性细胞浸润程度以及胶原沉积数量均有所减轻,其中伏九贴高剂量组优于伏九贴低剂量组,地塞米松组与伏九贴高剂量之间无明显差异。(见图 1-2)

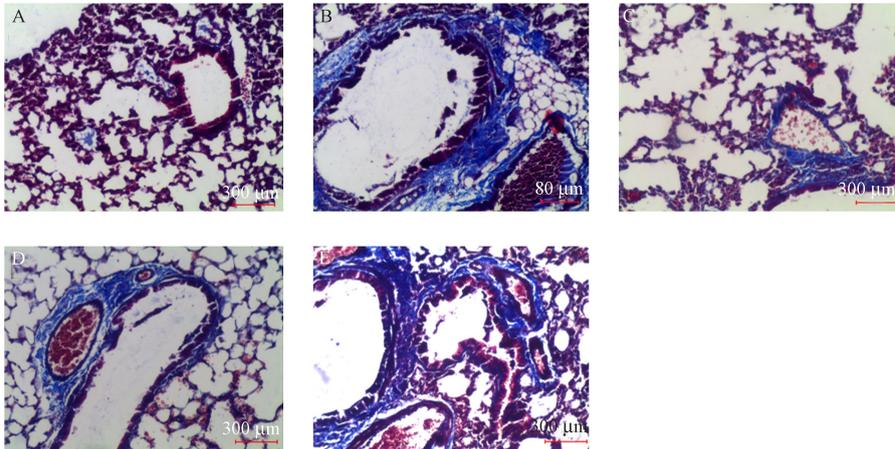


注:A:正常组小鼠肺组织;B:哮喘模型组小鼠肺组织;C:地塞米松组小鼠肺组织;D:伏九贴高剂量组小鼠肺组织;E:伏九贴低剂量组小鼠肺组织。

图 1 小鼠肺组织的病理改变(HE 染色)

Note. Lung tissue of mice in (A) control group, (B) model group, (C) dexamethasone group, (D) high-dose Fujiu plaster group, and (E) low-dose Fujiu plaster group.

Figure 1 Pathological changes of the mouse lung tissues. HE staining



注:A:正常组小鼠肺组织;B:哮喘模型组小鼠肺组织;C:地塞米松组小鼠肺组织;D:伏九贴高剂量组小鼠肺组织;E:伏九贴低剂量组小鼠肺组织。

图2 小鼠肺组织的病理改变(Masson染色)

Note. Lung tissue of mice in (A) control group, (B) model group, (C) dexamethasone group, (D) high-dose Fujiu plaster group, and (E) low-dose Fujiu plaster group.

Figure 2 Pathological changes of the mouse lung tissues. Masson staining

2.2 ELISA 检测血清中总 IGE、OVA 特异性 IGE、IFN- γ 、IL-4 细胞因子含量

与正常对照组相比较,哮喘模型组小鼠血清中总 IGE、OVA 特异性 IGE、IL-4 浓度明显升高,IFN- γ 浓度明显降低,均有显著差异($P < 0.05$)。与模型组相比较,地塞米松组和伏九贴高剂量组小鼠血清中总 IGE、OVA 特异性 IGE、IL-4 浓度降低,IFN- γ 浓度升高,均有显著差异($P < 0.05$)。与模型组比,伏九贴低剂量组小鼠血清中的 IL-4 浓度降低,差异显著($P < 0.05$),但总 IGE、OVA 特异性 IGE 和 IFN- γ 浓度改变不明显,差异无显著意义($P > 0.05$)。(见表 1)

2.3 免疫组化法检测 NGF 和 TrKA 在肺组织内的表达

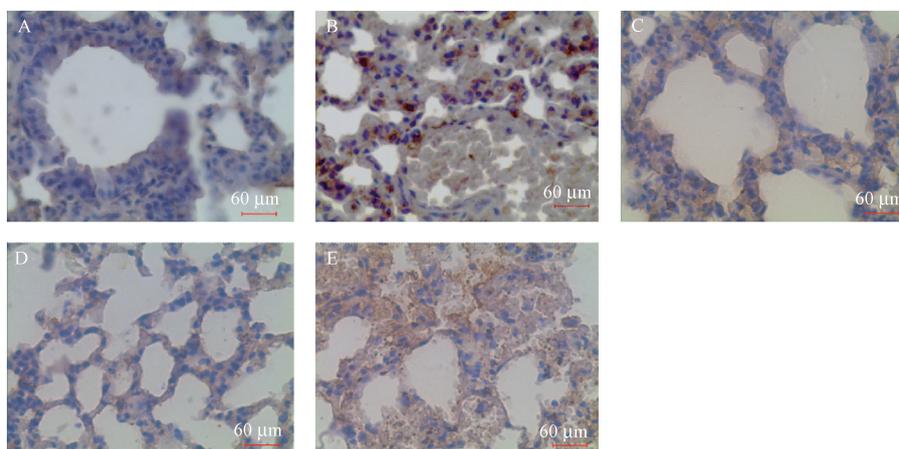
如图 3 所示,胞浆内的棕黄色颗粒为神经生长因子(NGF)的阳性表达,图 4 中,胞浆内棕黄色颗粒为 TrKA 蛋白的阳性表达。与正常对照组相比,模型组细胞数量以及胞浆中 NGF 和 TrKA 表达明显增多;与模型组相比,地塞米松组和伏九贴高剂量组细胞数量明显减少,而且 NGF 和 TrKA 蛋白的表达减少的也很明显;伏九贴低剂量组与模型组相比,NGF 和 TrKA 蛋白的表达棕黄色颗粒有所减少,但差异不明显。(见表 2)

表 1 小鼠血清中总 IGE、OVA 特异性 IGE、INF-r、IL-4 含量分析($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Total IgE, OVA-specific IgE, INF-r, and IL-4 contents in serum of the mice

组别 Groups	血清总 IGE($\mu\text{g/mL}$) Serum total IGE	OVA 特异性 IGE($\mu\text{g/mL}$) OVA-specific IGE	血清 IFN- γ (pg/mL) Serum IFN- γ	血清 IL-4(pg/mL) Serum IL-4
正常对照组 Normal group	13.49 \pm 0.61	3.07 \pm 1.46	1444.34 \pm 130.92	121.62 \pm 19.27
哮喘模型组 Model group	15.39 \pm 1.37*	9.55 \pm 3.36*	1024.95 \pm 262.92*	146.34 \pm 9.84*
地塞米松组 Dexamethasone group	13.69 \pm 0.95 Δ	6.53 \pm 1.01 Δ	1336.94 \pm 246.94 Δ	124.93 \pm 17.75 Δ
伏九贴高剂量组 Fujiu plaster high dose group	14.22 \pm 0.64 Δ	6.73 \pm 1.10 Δ	1274.16 \pm 159.23 Δ	121.93 \pm 20.94 Δ
伏九贴低剂量组 Fujiu plaster low dose group	15.16 \pm 0.61#	7.94 \pm 1.08#	1071.16 \pm 285.77#	125.44 \pm 11.92 Δ

注:与正常组比,* $P < 0.05$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$.

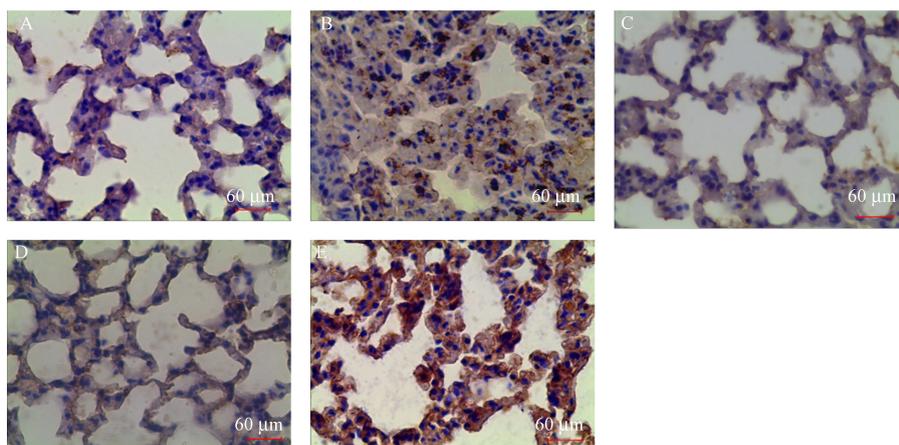


注: A: 正常对照组; B: 模型组; C: 地塞米松组; D: 伏九贴高剂量组; E: 伏九贴低剂量组。

图 3 各组肺组织的病理改变

Note. A, Normal control group. B, Asthma model group. C, Dexamethasone group. D, Fujiu plaster high dose group. E, Fujiu plaster low dose group.

Figure 3 Histological changes in the lung tissues of the mice. NGF immunohistochemical staining



注: A: 正常组; B: 模型组; C: 地塞米松组; D: 伏九贴高剂量组; E: 伏九贴低剂量组。

图 4 各组小鼠肺组织中 TrkA 的表达 (TrkA 免疫组化染色)

Note. A. Normal group. B. Model group. C. Dexamethasone group. D. Fujiu plaster high dose group. E. Fujiu plaster low dose group.

Figure 4 TrkA expression in the lung tissues of the mice. TrkA immunohistochemical staining.

表 2 小鼠肺组织 NGF, TrkA 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Expression levels of NGF and TrkA proteins in lung tissues of the mice

组别 Groups	NGF (μm^2)	TrkA (μm^2)
正常组 Normal group	209 882. 23±25 401. 53	165 186. 90±42 661. 72
模型组 Model group	507 470. 06±63 666. 94*	441 977. 57±67 111. 40*
地塞米松组 Dexamethasone group	279 163. 83±56 882. 24 Δ	242 579. 78±39 613. 13 Δ
伏九贴高剂量组 Fujiu plaster high dose group	261 871. 30±43 252. 94 Δ	298 163. 18±27 995. 59 Δ
伏九贴低剂量组 Fujiu plaster low dose group	416 661. 94±216 620. 16	416 999. 19±158 971. 14

注: 与正常组比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$.

3 讨论

祖国医学认为,哮喘的发作是由于外感风寒之邪诱发患者素体伏痰,导致肺失宣肃,痰气搏结,壅阻气道,因病之根本属于本虚标实,故治疗原则为发作期以祛邪为主,缓解期以扶正为主。伏九贴膏中白芥子治皮里膜外、胸膈间之痰涎,甘遂善行逐水湿,元胡活血利肺气,细辛生姜温散而宣肺,麝香走窜,开窍通闭,帮助药物透皮吸收,结合穴位,调畅全身气机,药穴同用,祛邪同时扶正固本,长期以来应用于防治支气管哮喘。现有的关于穴位贴敷治疗哮喘的动物实验研究显示,应用白芥子等药物的穴位贴敷可逆转卵清蛋白诱导的哮喘小鼠 TH1/TH2 失衡,从而减轻气道炎症反应^[7-8]。但关于穴位贴敷是否是通过 NGF/TrKA 途径来调节 TH1/TH2 失衡的研究,目前未见相关报道。因此,本研究观察了伏九贴膏穴位贴敷对哮喘小鼠肺组织 NGF/TrKA 的表达量以及对 TH1/TH2 失衡的影响,探讨其抑制哮喘小鼠肺部炎症的可能机制。

目前的研究认为,在哮喘发病机制中 TH1/TH2 的失衡占有重要地位。其中,TH2 型细胞因子分泌增多在哮喘的免疫失衡机制中具有关键作用^[9]。IL-4 作为 TH2 型细胞因子,可募集多种炎症因子,其中包括嗜酸性粒细胞、肥大细胞等,从而加重炎症反应。并且通过促进免疫球蛋白的转换,使 IGE 的分泌增多^[10]。TH2 型细胞因子增多的同时,抑制了 TH1 型细胞因子的分泌,IFN- γ 属于 TH1 型细胞因子,可以增强中性粒细胞吞噬能力,促进巨噬细胞吞噬免疫复合物、抗体包被的病原体等^[11]。

在本实验研究中,对比观察了小鼠生存状态;肺组织切片 HE 染色和 Masson 染色的病理变化;ELISA 分别检测 TH1 型细胞因子 IFN- γ 和 TH2 型细胞因子 IL-4、IGE 以及 OVA 特异性 IGE 表达水平。结果显示,卵清蛋白诱导的哮喘小鼠活动明显减少,呼吸频率加快,并且呼吸时伴有点头和喘鸣音,肺组织炎性细胞浸润明显,并且细支气管周围可见胶原纤维的沉积,血清中 IL-4、IGE、OVA 特异性 IGE 表达显著升高,IFN- γ 表达降低,TH1/TH2 失衡,说明 OVA 诱导成功建立小鼠哮喘模型。相比于哮喘模型小鼠,经伏九贴膏干预后,小鼠肺组织炎症减轻,气道胶原纤维减少,血清中 IL-4、IGE、OVA 特异性 IGE 表达降低,IFN- γ 表达升高,说明伏九贴膏通过降低 TH2 型细胞因子表达水平,升高

TH1 型细胞因子水平,使 TH1/TH2 趋于平衡,缓解哮喘相关症状。

近年来,关于神经生长因子(NGF)做为介导哮喘免疫源性炎症的重要物质受到人们的关注。NGF 除了可由神经细胞分泌外,还可由非神经细胞(如免疫细胞、组织细胞等)分泌^[12]。大量研究证实,哮喘小鼠肺组织内存在 NGF 和 TrKA 的高表达^[13,14]。酪氨酸激酶 A(TrKA)做为 NGF 的高亲和力受体,主要表达在巨噬细胞和 T 细胞中,尤其是在活化的 CD4⁺T 细胞^[15]。在与 NGF 结合后,形成二聚体,经磷酸化,发挥后续生物学效应^[16]。欧阳若云等^[17]研究认为,NGF 通过上调 TH2 型细胞因子的表达,下调 TH1 型细胞因子的表达,促进并放大了 TH1/TH2 的免疫失衡,从而介导哮喘的免疫源性炎症反应。为了进一步研究伏九贴膏调控 TH1/TH2 平衡的机制,应用免疫组化法检测伏九贴膏治疗后的哮喘小鼠肺组织内 NGF 和 TrKA 的表达情况。结果显示,哮喘小鼠 NGF 和 TrKA 的表达量明显升高,经伏九贴膏治疗后,NGF 和 TrKA 的表达量均有不同程度的降低,说明伏九贴膏可能是通过调控 NGF/TrKA 蛋白的表达使 TH1/TH2 趋于平衡从而缓解哮喘的发作。

综上所述,本研究结果显示,伏九贴膏通过下调 NGF/TrKA 蛋白的表达,促进 TH1 型细胞因子的分泌,抑制 TH2 型细胞因子的释放,使 TH1/TH2 趋于平衡,从而缓解了哮喘的发作。

参考文献:

- [1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016 年版) [J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(3): 167-181.
- [2] 全国儿科哮喘协作组. 第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查 [J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 729-736.
- [3] 蒋沛君,马琳. 重症哮喘治疗新进展 [J]. 医药前沿, 2018, 18(14): 38-40.
- [4] 白晓红,邵功利,王雪峰. 伏九贴膏防治小儿哮喘的临床研究探要 [J]. 中华中医药学刊, 2004, 22(9): 1637-1637.
- [5] 李杰,王雪峰. 伏九贴膏的临床研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2003, 30(9): 727-728.
- [6] Zhu BN, Dong J, Gao X, et al. Antiasthmatic effects of sanglong pingchuan decoction through inducing a balanced th1/th2 immune response [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018(14): 2629565.
- [7] 李辉,吴振宇,张云,等. 消喘膏穴位贴敷对卵蛋白诱发哮喘大鼠 Th1/Th2 的调节作用 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(9): 623-625.