

蛭元方对血小板加剧的类风湿关节炎 滑膜炎症和增生的影响

马玉琛¹, 周蕾², 陈冬志², 高伟敏², 王玉乾¹, 李春晓², 孟明^{2*}

(1. 中国人民解放军第 252 医院中医科, 河北保定 071000;

2. 河北大学基础医学院, 河北保定 071000)

[摘要] **目的:**观察蛭元方对血小板加剧的类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)大鼠滑膜细胞炎症和增生反应的影响。**方法:**将常规培养的大鼠类纤维母样滑膜细胞株 RSC364 随机分为正常对照组、RA 模型组、活化血小板干预组和蛭元方干预组。在不同浓度 TNF- α 诱发的大鼠 RA 滑膜细胞模型的基础上,以牛 II 型胶原蛋白刺激血小板活化,用蛭元方含药血清作用于活化血小板干预下的 RA 模型细胞,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法分别检测 RSC364 细胞培养上清中白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)的生成量和 P-选择素的表达情况,采用 MTT 比色法观察 RSC364 细胞增殖的情况。**结果:**①牛 II 型胶原蛋白活化血小板 5 h 时,血小板表达 P-选择素最多;②在不同浓度肿瘤坏死因子- α (TNF- α)存在下,RA 模型组 RSC364 细胞培养上清中 IL-6 和 IL-8 的生成量均增加,与同一浓度的正常对照组相比均有显著性差异($P < 0.05$);RSC364 细胞增殖率也明显高于正常对照组($P < 0.05$),并呈现剂量依赖性;③与 RA 模型组相比,活化血小板干预组 RSC364 细胞生成 IL-6 和 IL-8 的量均明显增加($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),滑膜细胞增殖率显著升高($P < 0.05$);④与血小板干预组相比,蛭元方干预组 RSC364 细胞的 IL-6 和 IL-8 生成量均显著降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),增殖率亦有明显下降($P < 0.05$),同时 P-选择素的表达量显著降低($P < 0.05$)。**结论:**活化血小板能加剧 RA 滑膜细胞的炎症和增生反应;蛭元方能有效缓解血小板对 RA 大鼠滑膜炎症及增生的促进作用,其机制可能与抑制 P-选择素的表达有关。

[关键词] 类风湿关节炎(RA);活化血小板;蛭元方;白细胞介素-6;白细胞介素-8;P-选择素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0182-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1200.011.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 12:00

Effects of Zhiyuanfang on Activated Platelets Amplify Inflammation and Proliferation of Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis

MA Yu-chen¹, ZHOU Lei², CHEN Dong-zhi², GAO Wei-min², WANG Yu-qian¹, LI Chun-xiao², MENG Ming^{2*}

(1. Division of traditional Chinese Medicine, No. 252 Hospitl of PLA, Baoding 071000, China;

2. College of Basic Medical Science, Hebei University, Baoding 071000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Zhiyuanfang inhibiting platelets amplified inflammation and proliferation of synovial cells in the rheumatoid arthritis (RA) rats. **Method:** Normal cultured RSC364 cells were divided into normal control group, RA model group, activated platelet intervention group and Zhiyuanfang group. The different concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) were used to induce RA rat cell models,

[收稿日期] 20120311(006)

[基金项目] “十一五”全军中医药重大临床攻关课题(2006011003);河北省医学科学研究重点课题(20100450);河北大学医学部博士研究生基金(200906001)

[第一作者] 马玉琛,主任医师,博士生导师,从事中医临床风湿免疫性疾病治疗, Tel:18931258650, E-mail:myc252@126.com

[通讯作者] *孟明,博士,教授,研究生导师,从事中西医结合治疗自身免疫性疾病及免疫学研究与教学, Tel:15832213318, E-mail:mengming127@163.com

stimulate platelets activating by bovine type II collagen, and interfere platelet intervention group with Zhiyuanfang containing serum. The expression of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and P-selecting were assayed respectively by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the proliferation of RSC364 cells were determined by MTT colorimetric assay. **Result:** ①The expression of P-selecting was at peak when platelets were activated by bovine type II collagen for 5 h. ②the expression of IL-6 and IL-8 on synovial cells in RA model group was increased, which was compared with the same concentration of normal group showed a significant difference ($P < 0.05$); the rate of RSC364 cells proliferation was also higher than normal group ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. ③Compared with RA model group, the expression of IL-6 and IL-8 on synovial cells in platelets intervention group was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the rate of synovial cells proliferation was also higher ($P < 0.05$). ④Compared with platelets intervention group, the expression of IL-6 and IL-8 on synovial cells in Zhiyuanfang group was significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the proliferation rate of synovial cells was declined ($P < 0.05$), and the expression of P-selecting was also lower. **Conclusion:** Activated platelets amplify the inflammation and proliferation of synoviocytes; Zhiyuanfang effectively can relieve the amplification of platelets on the inflammation and proliferation in RA rats probably by the inhibition of P-selecting expression.

[**Key words**] rheumatoid arthritis (RA); activated platelet; Zhiyuanfang; IL-6; IL-8; P-selecting

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜慢性炎症病变为主的自身免疫性疾病^[1]。RA软骨和关节破坏的主要原因是成纤维样滑膜细胞的类肿瘤样增生、新生血管翳侵蚀、过量分泌的炎性细胞因子及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)^[2]。临床观察发现不少活动期甚至部分缓解期的RA患者血小板升高,血液黏稠度增加;而伴有血小板升高的RA患者往往治疗效果较差,病情易反复发作,同时出现血栓性疾病的风险也很高^[3]。已有文献报道,血小板活化颗粒具有加重RA关节滑膜炎症、促进滑膜细胞增殖作用^[4]。因此,抑制血小板活化,缓解血小板的活化颗粒对RA关节滑膜炎症及增生的促进作用,将有利于控制该病的疾病进展。本研究旨在体外建立大鼠RA细胞模型的基础上,以牛II型胶原蛋白活化血小板,通过检测RSC364细胞白细胞介素(IL-6), IL-8的生成量和细胞增殖情况,以及P-选择素的表达量,来观察血小板加剧RA大鼠滑膜炎症和细胞增生的作用及蛭元方干预血小板作用的疗效,并对蛭元方的作用机制进行初步探讨,为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级SD大鼠,体重(300 ± 20)g,由河北医科大学动物中心提供,动物许可证号SCXK(冀)2010-1-003。

1.2 RSC364细胞 大鼠类纤维母样滑膜细胞株RSC364由河北医科大学惠赠。

1.3 试剂及仪器 DMEM/F12和胎牛血清(GIBCO公司),牛II型胶原蛋白、MTT(Sigma公司),胰酶(Solarbio公司),TNF- α (Peprotech公司),ELISA Kit IL-6(欣博盛公司),ELISA Kit IL-8(Cusabio公司),ELISA Kit p-选择素(博士德公司)。Airtech超净台(日本Sanyo公司),CO₂的培养箱(日本),Olympus显微镜,低温低速离心机(美国Beckman),微量振荡器(上海创发仪器有限公司),酶标仪(美国宝特公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 大鼠RSC364细胞用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,于37℃5%CO₂的培养箱中常规培养^[5]。

2.2 蛭元方溶液的制备 蛭元方组成:水蛭、土鳖虫、红花、川芎按质量比1:3:3:3比例混合。第1次加10倍水,浸泡2h,煎煮30min,滤过,第2次加8倍水,煎煮30min,滤过,滤液合并浓缩至生药为1.34g·mL⁻¹(中剂量药液),4℃保存,给药前复温至25~30℃。

2.3 蛭元方含药血清制备 参照罗琳等的方法稍加改进^[6]。SD大鼠6只,每天ig给药6.7g·kg⁻¹(5mL·kg⁻¹)1次,连续7d,第7天给药1次1h后,以乙醚麻醉大鼠,按无菌操作进行颈动脉插管放血,分离血清,每瓶1mL分装血清封口后,低温-20℃保存,备用。

2.4 活化血小板 SD大鼠内眦取抗凝血,参照Eric等[7]方法:将全血600×g,离心3min,取上层

液为富血小板血浆;再将上层液以 $400 \times g$, 离心 2 min, 吸取上层液, 去除红细胞;最后将上清液以 $1\ 300 \times g$, 离心 5 min, 弃上层液, 加入 pH 7.4 Tyrode-Hepes 缓冲液, 以 $5\ \mu\text{g}$ 牛 II 型胶原蛋白于 $37\ ^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中分别诱导 30×10^6 个血小板活化 1, 5, 10 h, 并在血小板活化 5 h 时, 加入 10% 蛭元方含药血清, 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱继续培养 5 h。

2.5 分组及处理

2.5.1 正常对照组(Z) 用 0.25% 胰酶消化常规培养的大鼠 RSC364 细胞, 然后分别以 3×10^3 个及 5×10^4 个接种于 96 孔板中, 待其贴壁用无血清 DMEM/F12 冲洗 2 次后, 于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中分别继续培养 5 h 和 24 h (细胞密度是 3×10^3 个, 用于检测大鼠 RSC364 细胞上清液 IL-6 及 IL-8 的含量; 细胞密度是 5×10^4 个, 用于检测大鼠 RSC364 细胞增殖情况)。

2.5.2 RA 模型组(M) 常规培养的大鼠 RSC364 细胞, 分别加入 ($0.5, 1, 2, 5\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) $\text{TNF-}\alpha$ ^[8,9], 于 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中分别继续培养 5, 24 h。

2.5.3 活化血小板干预组(XG) 在已培养的 RA 滑膜细胞中加入活化血小板 (30×10^6 个), 于 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中分别继续培养 5, 24 h。

2.5.4 蛭元方干预组(ZG) 在已培养的 RA 滑膜细胞中加入活化血小板 (30×10^6 个), 于 10% 含药血清 DMEM/F12 培养基中分别继续培养 5, 24 h。

2.6 细胞因子的测定 分别收集血小板及大鼠 RSC364 细胞培养上清液, 按照 ELISA Kit 操作说明, 分别检测血小板 p-选择素和 大鼠 RSC364 细胞培养上清液 IL-6 及 IL-8 的含量。

2.7 滑膜细胞增殖检测 实验组中每一条件下均设 3 个以上复孔, 于培养 20 h 时, 每孔加入 $5\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 液 $20\ \mu\text{L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 4 h 后, 弃取上清液, 每孔加 $150\ \mu\text{L}$ DMSO 溶液, 震荡 5 min, 于酶标仪 490 nm 处检测吸光度(A)。结果以增殖率表示。

$$\text{增殖率} = (\text{实验组 } A - \text{正常对照组 } A) / \text{正常对照组 } A \times 100\%$$

2.8 统计学处理 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

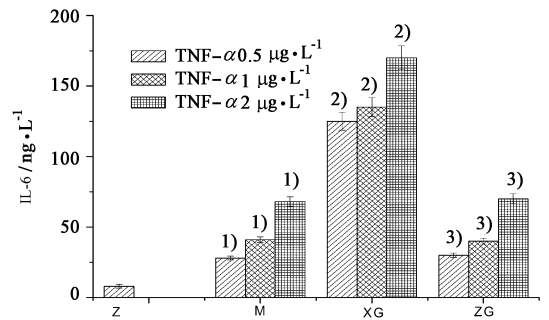
3.1 血小板的活化 运用 ELISA 法检测血小板活化标志 P-选择素发现, 牛 II 型胶原蛋白活化血小板

1 h 时, 血小板表达 P-选择素的量是 $83.5\ \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 10 h 时血小板表达 P-选择素的量是 $62.2\ \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 5 h 时血小板表达 P-选择素量达最高, 即 $142.3\ \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 与 1, 10 h 比较, 差异显著 ($P < 0.05$)。

3.2 大鼠 RA 滑膜细胞模型的建立 以 $0.5, 1.0, 2.0\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{TNF-}\alpha$ 分别刺激 RSC364 细胞 5 h 时, 发现模型组 RSC364 细胞 IL-6 和 IL-8 的生成量明显增加, 呈现剂量依赖性, 与正常对照组相比, 差异均具有显著性 ($P < 0.05$), 结果见图 1、图 2; 以 $5\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{TNF-}\alpha$ 刺激 RSC364 细胞 24 h 时, 与正常对照组相比, RSC364 细胞增殖率是 110.93%, 表明体外建立大鼠 RA 细胞模型成功。

3.3 活化血小板对 RA 滑膜细胞生成 IL-6 和 IL-8 的量及增殖的影响 用活化的血小板干预 RA 大鼠 RSC364 细胞发现, RSC364 细胞 IL-6 和 IL-8 的生成量均显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), 结果见图 1 和图 2; RSC364 细胞增殖率为 128.94%, 与 RA 模型组相比显著升高 ($P < 0.05$)。

3.4 蛭元方对 RA 滑膜细胞 IL-6, IL-8 的生成量及增殖的影响 不同浓度 $\text{TNF-}\alpha$ 存在下, 将活化的血小板及蛭元方含药血清同时加入 RA 模型大鼠 RSC364 细胞并继续培养, 结果显示, 与活化血小板干预组相比, 5 h 时 RSC364 细胞生成 IL-6 和 IL-8 的量均显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 结果见图 1 和图 2; 24 h 时 RSC364 细胞增殖率是 125.51%, 明显低于血小板干预组 ($P < 0.05$)。



Z. 正常对照组, M. 模型组, XG. 活化血小板干预组, ZG. 10% 蛭元方 $6.7\ \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 含药血清干预组; 与正常对照组比较 ¹⁾ $P < 0.05$; 与 RA 模型组比较 ²⁾ $P < 0.05$; 与活化血小板干预组比较 ³⁾ $P < 0.05$ (图 2 同)

图 1 蛭元方含药血清对活化血小板干预的 RSC364 细胞上清 IL-6 含量影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.5 蛭元方活化血小板 P-选择素表达的影响 蛭元方含药血清干预活化的血小板 5 h 后, P-选择素的表达量为 $42.8\ \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 与活化血小板干预组相比显著降低 ($P < 0.01$)。

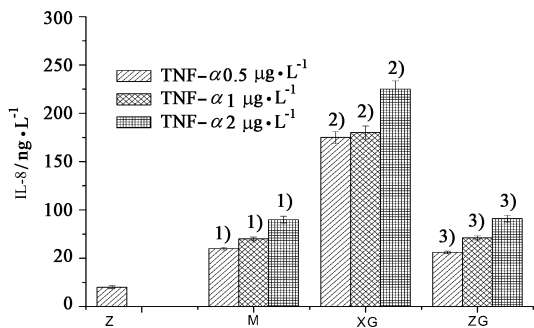


图2 蛭元方含药血清对活化血小板干预的RSC364细胞上清IL-8含量的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

4 讨论

RA发病机制目前尚不明确。在本病的发病过程中,滑膜炎是最具特征性的病理改变。滑膜组织表现为侵蚀性增生,其生长性质及病理学行为在许多方面类似于肿瘤组织的特性^[10]。多数研究者认为,RA关节内炎性细胞聚集、滑膜组织增生和骨及软骨降解和破坏的主要因素是免疫网络失衡,以及成纤维样滑膜细胞的类肿瘤样生长及其分泌的大量促炎性细胞因子、趋化因子和金属蛋白酶^[11]。本室前期应用CFA诱发大鼠AA实验性关节炎模型研究发现,在致炎因子(TNF-α, IL-1β)或某些理化因子的刺激下,RA滑膜细胞呈类肿瘤样增生,不仅生长性质及病理学特征在许多方面类似于肿瘤样变,同时伴有原癌基因C-myc和鸟氨酸脱羧酶ODC的mRNA转录水平明显增高^[12-13]。

新近研究证实^[7],血小板活化颗粒具有加重RA关节滑膜炎症、促进滑膜细胞增殖的作用。血小板虽不是RA发病的使动因素,但其在炎症等因素的作用下,可被细胞外基质(ECM)中的四型胶原活化,进而向RA患者关节腔内释放吸附分子(P-选择素)、MPS颗粒、炎性递质(血小板-内皮细胞黏附因子、血小板源性生长因子和血小板活化因子)等血小板活化颗粒^[7,14]。这些血小板活化颗粒通过促进滑膜细胞分泌IL-6和IL-8、活化中性粒细胞和单核细胞、诱导抗凋亡激酶的激活,从而加重RA关节滑膜炎症、促进滑膜细胞增殖^[15-17]。P-选择素存在于血小板α颗粒,是血小板活化的标志之一。在静止期,血小板不表达或少量表达P-选择素;血小板活化时,颗粒膜蛋白与血小板膜蛋白融合,使P-选择素暴露于血小板表面^[18]。本实验采用ELISA法和MTT法分别检测胶原蛋白作用于血小板后P-选择素的表达、RA模型RSC364细胞中IL-6和IL-8的生成量及增殖情况,结果显示:牛II型胶原蛋白

活化血小板5h时,血小板表达P-选择素最多,与文献^[7]的报道相同;在不同浓度TNF-α存在下,大鼠RSC364细胞生成IL-6和IL-8的量均显著增加,其增殖率均明显升高,并呈现剂量依赖性,与文献^[8-9]的报道相同,表明体外建立大鼠RA滑膜细胞模型成功。在此基础上,检测活化的血小板对RA大鼠RSC364细胞生成IL-6、IL-8及增殖的影响,结果显示:活化的血小板具有促进RA大鼠RSC364细胞生成IL-6和IL-8,以及刺激其增殖的作用,而未活化的血小板对RA大鼠RSC364细胞IL-6、IL-8的生成量及增殖均无显著影响,表明活化的血小板具有加重RA大鼠滑膜炎症、促进滑膜细胞增殖的作用。

传统医学认为RA属“痹证”的范畴,风、寒、湿等邪气侵袭关节、肌肉、筋骨,阻滞经络,气血运行不畅,血瘀为“痹证”的重要病机^[18-20]。本课题组以往临床研究发现,RA患者血瘀症状与血小板升高、血黏稠度增加相兼并存。选用具有逐瘀血,破血瘀积聚,活血通经,散瘀止痛之功效的蛭元方(水蛭、土鳖虫、红花、川芎组成)作为活血化瘀的代表方,以辩证施治原则加减,治疗血小板升高的患者,取得了较好效果,并表现出能提高RA疗效的倾向^[5]。本课题通过体外建立RA的大鼠滑膜细胞模型,研究了蛭元方含药血清对血小板加重RA大鼠滑膜炎症和细胞增生作用的干预效果及可能的机制。结果表明,蛭元方含药血清不仅能明显减少RSC364细胞IL-6和IL-8的生成,降低RSC364细胞的增殖率,还可抑制血小板P-选择素的表达,提示蛭元方有可能通过抑制P-选择素的表达,降低血小板活化水平来缓解血小板对RA滑膜炎症及增生的促进作用,从而调控疾病进程,具体作用机制尚需进一步研究。由于复方药物作用具有多靶点、多层次的疗效,因而在RA的治疗中较单味药有一定优势^[21-23]。应用科学方法筛选出针对血小板加剧RA关节炎症、促进滑膜细胞增殖、提高血液黏稠度等多方面具有调控作用的中药方剂进行临床和基础研究,将成为治疗RA中药研发的新方向。

[参考文献]

[1] Pap T, Muller landerH, Gay R E, et al. Fibroblast biology; role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res, 2000, 2 (16):361.
 [2] 孟明,顾立刚,张前,等. 类风湿关节炎大鼠滑膜细胞的类肿瘤样增生与相关基因表达的关系[J]. 细胞与

- 分子免疫学杂志, 2005, 21(4):411.
- [3] 王志中, 方勇飞, 罗彦, 等. 322 例湿热痹阻型及寒湿痹阻型类风湿关节炎. 中医证型的客观化研究. [J] 中国中西医结合杂志, 2011, (4):466.
- [4] McNicol A, Israels S J. Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection [J]. Thromb Haemost, 2007, 36(4):311.
- [5] 马玉琛, 王红, 刘娟娟. 类风湿关节炎血小板升高辨证特点和化痰祛邪治疗研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17:153.
- [6] 罗琳, 窦志华, 丁安伟, 等. 多指标正交试验优选复方五仁醇胶囊含药血清的制备方法 [J]. 中草药, 2009(2):26.
- [7] Eric Boilard E, Nigrovic P A, Larabee K, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production [J]. Science, 2010, 26(20):322.
- [8] 赵占胜, 金玉怀, 丛斌, 等. 八肽胆囊收缩素对 TNF- α 诱导的大鼠滑膜细胞株 RSC-364 IL-6 的作用及其可能的分子机制 (英文) [J]. 中国病理生理学杂志, 2007, 23(7):1396.
- [9] Inoue H, Takamor Mi, Nagata N, et al. An investigation of cell proliferation and soluble medators induced by interleukin-1beta in human synovial fibroblasts; comparative response in osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. Inflamm Res, 2001, 50(2):65.
- [10] 刘巧红, 沈凌汛, 滕云, 等. 甲氨蝶呤对类风湿关节炎滑膜细胞增生及细胞周期的影响 [J]. 中华风湿病学杂志, 2004, 4:223.
- [11] Pap T, Muller lander H, Gay R E, et al. Fibroblast biology; role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res, 2000, 2:361.
- [12] 孟明, 顾立刚, 张前, 等. 复方木防己汤对 AA 大鼠滑膜细胞的类肿瘤样增生与相关基因表达影响的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(6):370.
- [13] 孟明, 顾立刚, 杨菁, 等. 加味木防己汤对类风湿关节炎大鼠滑膜的基质金属蛋白酶生成的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(8):748.
- [14] Nurden A T, Fiore M, Nurden P, et al. Platelets, inflammation and tissue regeneration [J]. Thromb Haemost, 2011, 50(1):21.
- [15] Stitham J, Midgett C, Martin K A, et al. Prostacyclin: an inflammatory paradox [J]. Front Pharmacol, 2011, 11(7):517.
- [16] Dasgupta B, Chew T, Roche A, et al. Blocking platelet/ endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM) inhibits disease progression and prevents joint erosion in established collagen antibody-induced arthritis [J]. Exp Mol Pathol, 2010, 88(1):210.
- [17] Edwards L J, Constantinescu C S. Platelet activating factor/platelet activating factor receptor pathway as a potential therapeutic target in autoimmune diseases [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009, 8(3):182.
- [18] 陈守中, 袁强, 张爱国, 等. 麝香乌龙丸对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织病理形态及 TNF- α , IL-6 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):234.
- [19] 黄明进, 罗春丽, 郭刚, 等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):174.
- [20] 王连荣, 吴伟康. 大防风汤治疗 II 型胶原纤维诱导小鼠类风湿性关节炎的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2):100.
- [21] 齐海宇, 阴赅宏, 段婷, 等. 常见风湿性疾病的中成药治疗概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):91.
- [22] 涂胜豪. 雷公藤治疗类风湿性关节炎的困境与对策 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(2):104.
- [23] 高会丽, 于成瑶, 李连达. 中药复方配伍规律研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(9):60.

[责任编辑 聂淑琴]