

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.24.014

地黄苦苣元对多囊卵巢综合征模型大鼠 卵巢功能的影响*

韩体微¹, 袁凤玲¹, 王艳鹏¹, 曾 彬²

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九八一医院妇产科, 河北 承德 067000; 2. 河北省唐山市妇幼保健院
生殖遗传科, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 探讨地黄苦苣元对多囊卵巢综合征(PCOS)模型大鼠卵巢功能的影响。方法 将 50 只雌性 SD 大鼠随机分为对照组(A 组)、模型组(B 组)、二甲双胍组(C 组)、地黄苦苣元低剂量组(D₁组)、地黄苦苣元高剂量组(D₂组),各 10 只。A 组大鼠用 1% 羧甲基纤维素灌胃(10 mg/kg),其余各组大鼠以 0.1 mg/mL 来曲唑灌胃,每日 1 次,连续 21 d,以复制 PCOS 模型。建模成功后,C 组大鼠灌胃二甲双胍(270 mg/kg),D₁组和 D₂组分别灌胃地黄苦苣元(50,200 mg/kg),A 组和 B 组大鼠灌胃等体积 0.9% 氯化钠溶液,均每日 1 次,连续 21 d。采用苏木素-伊红(HE)染色,观察大鼠卵巢组织的病理形态学;检测空腹血糖(FBG)及空腹胰岛素(FINS);采用放射免疫法检测血清睾酮(T)、促黄体生成素(LH)和促卵泡生成素(FSH)水平,并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);采用 Western blot 法及聚合酶链反应(PCR)法检测卵巢中磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)和细胞外信号调节激酶(ERK)蛋白及相应 mRNA 表达水平。结果 B 组大鼠卵巢大多数卵泡严重闭锁,闭锁卵泡直径增大,颗粒细胞层被挤压,排列稀疏,甚至消失;C 组、D₁组、D₂组大鼠闭锁卵泡的数量明显减少,次级卵泡及黄体数量增加,颗粒细胞层增厚且聚集紧密。与 B 组比较,C 组、D₁组、D₂组大鼠 FBG,FINS,HOMA-IR,T,LH,FSH 水平,以及 ERK 蛋白及 mRNA 表达水平均明显降低,PI3K 和 AKT 蛋白及 mRNA 水平均明显升高($P < 0.05$)。结论 地黄苦苣元可减轻 PCOS 模型大鼠的胰岛素抵抗,恢复卵巢形态,其机制可能与调控 PI3K/ERK 通路有关。

关键词:地黄苦苣元;多囊卵巢综合征;大鼠;卵巢功能;PI3K/ERK 通路;胰岛素抵抗

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)24-0050-05

Effect of Rehmapicroside on Ovarian Function in Model Rats with Polycystic Ovary Syndrome

HAN Tiwei¹, YUAN Fengling¹, WANG Yanpeng¹, ZENG Bin²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The 981th Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Chengde, Hebei, China 067000; 2. Department of
Reproductive Genetics, Tangshan Maternal and Child Health Hospital, Tangshan, Hebei, China 063000)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of rehmapicroside on ovarian function in model rats with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods** A total of 50 female SD rats were randomly divided into the control group (group A), model group (group B), metformin group (group C), rehmapicroside low-dose group (group D₁) and rehmapicroside high-dose group (group D₂), 10 rats in each group. Rats in group A were gavaged with 1% carboxymethyl cellulose (10 mg/kg), and rats in other groups were gavaged with 0.1 mg/mL of letrozole once a day for 21 d to replicate the PCOS model. After successful modeling, rats in group C were gavaged with metformin (270 mg/kg), rats in groups D₁ and D₂ were gavaged with rehmapicroside (50,200 mg/kg), rats in group A and group B were gavaged with equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution. All rats were administered once a day for 21 d. The pathomorphology of rat ovary was observed by the hematoxylin-eosin(HE) staining, the fasting blood glucose (FBG) and the fasting insulin (FINS) were detected, testosterone(T), luteinizing hormone(LH) and follicle stimulating hormone(FSH) were measured by radioimmunoassay, and homeostasis model assessment-insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. The expression levels of phosphatidylinositol 3 kinases (PI3K), protein kinase B (AKT) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) proteins and corresponding mRNA in the ovarian tissues were detected by Western blot and polymerase chain reaction (PCR). **Results** In group B, most of the ovarian follicles were severely atresia, the diameter of atretic follicles increased, and the granular cell layer was squeezed, arranged sparsely, or even disappeared. In groups C, D₁ and D₂, the number of atretic follicles decreased significantly, the number of secondary follicles and corpus luteum increased, and the granular cell layer thickened and gathered tightly. Compared with those in group B, the levels of FBG, FINS, HOMA-IR, T, LH, FSH, the expression levels of ERK protein and mRNA in groups C, D₁ and D₂ decreased significantly, while the expression levels of PI3K and AKT protein and mRNA in groups C, D₁ and D₂ increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Rehmapicroside can reduce insulin resistance and restore ovarian morphology in PCOS model rats, and its mechanism may be related to the regulation of the PI3K/ERK pathway.

Key words: rehmapicroside; polycystic ovary syndrome; rats; ovarian function; PI3K/ERK pathway; insulin resistance

*基金项目:河北省医学科学研究课题[20201471]。

第一作者:韩体微,女,大学本科,在读硕士研究生,主治医师,研究方向为妇产科疾病的诊治,(电子信箱)173386262@qq.com。

多囊卵巢综合征(PCOS)是女性不孕症的主要原因,其特征为性激素失衡(高雄激素血症),常伴高胰岛素血症、胰岛素抵抗(IR)等代谢疾病^[1]。60%~70%的PCOS患者会出现葡萄糖代谢异常^[2]。二甲双胍为治疗2型糖尿病常用降糖药,可恢复PCOS患者的排卵,降低循环雄激素水平及流产和妊娠糖尿病的风险^[3]。同时,激素疗法可能引起卵巢过度活化,但缓解代谢改变的效果欠佳^[4]。六味地黄丸中的地黄苦昔元具有雌激素样活性,能与雌激素受体ER α 和GPR30结合,调节下丘脑-垂体-卵巢轴而抑制促黄体生成素(LH)、促卵泡生成素(FSH)的分泌^[5]。研究表明,磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/细胞外信号调节激酶(ERK)通路参与了葡萄糖代谢异常的调控^[6]。同时,ERK缺陷型模型小鼠颗粒细胞(次级卵泡)的增殖减少,成熟卵泡量的减少,闭锁卵泡的增加,均会导致生育力下降^[7]。本研究探讨了地黄苦昔元对PCOS模型大鼠卵巢功能的改善作用及其机制,为地黄苦昔元治疗PCOS提供了理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:ASP300S型组织脱水机、EG1150型包埋机、RM2255型全自动轮转切片机(德国Leica公司);CX43型显微镜(日本Olympus公司);TCX1-FMQ9013型放射免疫分析仪(北京中西远大科技有限公司);ELITE 200型电泳仪、E-Blotter型湿转仪(美国Wealtec公司);Gls型数码凝胶图像处理系统(上海天能科技有限公司);CFX96Touch型实时荧光定量PCR仪(美国BD公司)。

试剂:地黄苦昔元(河南中医药大学,批号为135447-39-1,含量为95%);二甲双胍(中国深圳中联药业有限公司,批号72106064);来曲唑(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号22009132);羧甲基纤维素(广州逸明化工有限公司,批号为177317-30-5);苏木素染色液(上海碧云天生物技术有限公司,批号为C0107);大鼠空腹胰岛素(FINS)、睾酮(T)、LH、FSH放射免疫检测试剂盒(中国原子能同位素研究所,批号分别为07451228,0670R95,0452R72,0592R90);RIPA裂解液(生工生物工程(上海)有限公司,批号为P0028);PI3K、蛋白激酶B(PKB,又称AKT)、ERK、 β -actin和山羊抗鼠IgG二抗(武汉艾美捷科技有限公司,批号分别为A1937,A1427,A0356,A2140,A0281);Trizol试剂盒(美国Qiagen公司,批号为DD421);mRNA反转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒(美国Promega公司,批号分别为RR047A,TK08045);

动物:6月龄雌性SD大鼠50只,购自山东大学实验

动物中心,体质量(200 ± 20)g,实验动物生产许可证号SCXK(鲁)2020-0013,动物合格证编号2020051786。在温度为(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为60%~70%,光照12 h明暗交替的环境中饲养1周后进行实验。

1.2 分组及建模

将50只大鼠分为对照组(A组)、模型组(B组)、二甲双胍组(C组),以及地黄苦昔元低、高剂量组(D₁组、D₂组),各10只。A组大鼠用1%羧甲基纤维素灌胃(10 mg/kg),其余各组大鼠用等量0.1 mg/mL来曲唑灌胃,每日1次,连续21 d,以复制PCOS大鼠模型。灌胃第7天开始,每天取大鼠阴道分泌物,碱性美蓝染液染色,若阴道脱落细胞连续10 d呈角化状态,且检测胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) > 2.8,证明模型复制成功。建模成功后,C组灌胃二甲双胍(270 mg/kg)^[8],D₁组、D₂组大鼠灌胃地黄苦昔元50 mg/kg或200 mg/kg^[9],A组和B组大鼠灌胃等体积0.9%氯化钠溶液,均每日1次,连续21 d。

1.3 观察指标

卵巢组织病理形态学:末次给药后,麻醉大鼠,分离卵巢组织。卵巢组织经脱水、包埋、切片(3 μm),苏木素-伊红(HE)染色,中性树胶封固,在显微镜观察大鼠卵巢组织病理形态学变化。

血液学指标:本次给药禁食12 h后麻醉大鼠,心脏采血。测定FINS及空腹血糖(FBG)水平,计算HOMA-IR($\text{HOMA-IR} = \text{FBG} \times \text{FINS} / 22.5$);采用放射免疫法测定T、LH、FSH水平。

mRNA水平:取卵巢组织,Trizol法提取总RNA,逆转录为cDNA后扩增,反应体系体积20 μL ,反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s、95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 扩增44 s,40个循环;61 $^{\circ}\text{C}$ 采集荧光。以 β -actin作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算PI3K、AKT、ERK mRNA的相对表达量。

蛋白水平:取卵巢组织,研碎后加入RIPA裂解液,冰浴2 h,12 000 g离心10 min,取上清液,进行电泳(30 μg /孔),将印迹转移到聚偏氟乙烯膜上,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,清洗3次,将膜与PI3K(1:300)、AKT(1:400)、ERK(1:400)、 β -actin(1:1 000)抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,回收一抗,清洗3次将膜与山羊抗鼠IgG(1:5 000)在室温下孵育30 min,显色,采集图像并分析,以 β -actin作为内对照。

1.4 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

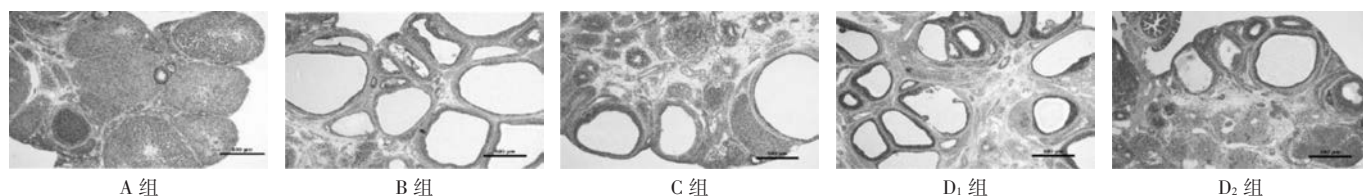


图1 大鼠卵巢组织病理形态学(HE, ×40)

Fig.1 Histopathology of rat's ovary (HE, ×40)

2 结果

2.1 卵巢组织病理形态学

A组大鼠卵巢结构正常,可见各期卵泡、成熟卵母细胞、黄体,细胞层呈粗大颗粒状,排列紧密;B组大鼠多数卵泡严重闭锁,闭锁卵泡直径增大,颗粒细胞层被挤压,排列稀疏,甚至消失。C组、D₁组、D₂组,闭锁卵泡的数量明显减少,次级卵泡黄体数量增加,颗粒细胞层增厚且聚集紧密。详见图1。

2.2 血浆FBG, FINS, HOMA-IR水平

与A组比较,B组大鼠血浆FBG, FINS, HOMA-IR水平均明显升高($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₁组、D₂组大鼠上述指标水平均明显降低($P < 0.05$),且D₂组降幅低于D₁组。详见表1。

表1 各组大鼠血浆中FBG, FINS, HOMA-IR水平比较($\bar{X} \pm s, n=10$)

Tab.1 Comparison of plasma FBG, FINS and HOMA-IR levels of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	FBG(mmol/L)	FINS(mU/L)	HOMA-IR
A组		4.27 ± 0.28	23.71 ± 4.52	3.94 ± 0.60
B组		5.95 ± 0.73 ^a	45.18 ± 7.23 ^a	6.58 ± 0.72 ^a
C组	270	4.87 ± 0.62 ^b	29.45 ± 3.31 ^b	4.37 ± 0.50 ^b
D ₁ 组	50	5.40 ± 0.70 ^b	34.83 ± 6.74 ^b	5.12 ± 0.63 ^b
D ₂ 组	200	4.83 ± 0.45 ^b	29.53 ± 2.49 ^b	4.39 ± 0.48 ^b

注:与A组比较,^a $P < 0.05$;与B组比较,^b $P < 0.05$ 。下表同。

Note: Compared with those in group A, ^a $P < 0.05$; compared with those in group B, ^b $P < 0.05$, as well as the following tables.

2.3 血清T, LH, FSH水平

与A组比较,B组大鼠血清T, LH和FSH水平均明显升高($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₁组、D₂组大鼠上述指标水平均明显降低($P < 0.05$),且D₂组降幅低于D₁组。详见表2。

表2 各组大鼠血清中T, LH, FSH水平比较($\bar{X} \pm s, n=10$)

Tab.2 Comparison of serum T, LH and FSH levels of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	T(ng/dL)	LH(mIU/mL)	FSH(mIU/mL)
A组		5.12 ± 0.67	8.43 ± 0.52	5.18 ± 0.72
B组		20.48 ± 3.41 ^a	64.28 ± 8.13 ^a	23.67 ± 3.48 ^a
C组	270	8.06 ± 0.92 ^b	19.37 ± 3.42 ^b	7.80 ± 1.05 ^b
D ₁ 组	50	15.40 ± 1.28 ^b	43.84 ± 6.33 ^b	16.52 ± 2.27 ^b
D ₂ 组	200	8.15 ± 1.20 ^b	20.16 ± 5.70 ^b	7.75 ± 0.98 ^b

2.4 卵巢组织中PI3K, AKT, ERK的mRNA水平

与A组比较,B组大鼠卵巢中PI3K和AKT mRNA表达水平明显降低,ERK mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₁组、D₂组大鼠卵巢中PI3K和AKT mRNA表达水平明显升高,ERK mRNA表达水平明显降低($P < 0.05$),且D₂组变化幅度大于D₁组。详见表3和图2。

表3 各组大鼠卵巢组织中PI3K, AKT, ERK的mRNA水平比较($\bar{X} \pm s, n=10$)

Tab.3 Comparison of expression levels of PI3K, AKT and ERK mRNA in ovarian tissues of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	PI3K	AKT	ERK
A组		1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.09
B组		0.43 ± 0.07 ^a	0.30 ± 0.05 ^a	1.73 ± 0.25 ^a
C组	270	0.69 ± 0.10 ^b	0.56 ± 0.04 ^b	1.26 ± 0.16 ^b
D ₁ 组	50	0.49 ± 0.03 ^b	0.41 ± 0.08 ^b	1.64 ± 0.22 ^b
D ₂ 组	200	0.70 ± 0.08 ^b	0.58 ± 0.06 ^b	1.26 ± 0.37 ^b

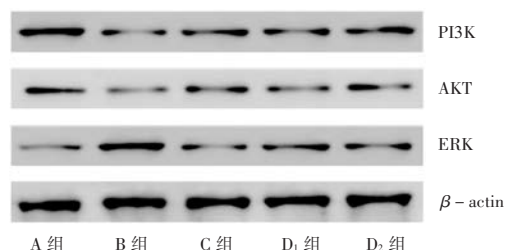


图2 各组大鼠卵巢组织中PI3K, AKT, ERK的mRNA水平

Fig.2 The expression levels of PI3K, AKT and ERK mRNA in ovarian tissues of rats in each group

2.5 卵巢组织中PI3K, AKT, ERK蛋白表达水平

与A组比较,B组大鼠卵巢组织中PI3K和AKT蛋白表达水平均明显降低,ERK蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₁组、D₂组大鼠卵巢中PI3K和AKT蛋白表达水平均明显升高,ERK蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$),且D₂组变化幅度大于D₁组。详见表4。

3 讨论

PCOS主要表现为激素(T和LH)水平紊乱,IR增强^[10]。既往也有胰岛素增敏剂(如二甲双胍或罗格列酮)可减轻PCOS-IR发生的报道^[11]。但PCOS患者多患有高胰岛素血症、IR和其他代谢性病理症状,并非全

表4 各组大鼠卵巢组织中PI3K,AKT,ERK蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s, n=10$)

Tab.4 Comparison of expression levels of PI3K, AKT and ERK protein in ovarian tissues of rats in each group($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	PI3K	AKT	ERK
A组		0.83 ± 0.10	0.62 ± 0.07	0.21 ± 0.04
B组		0.24 ± 0.05 ^a	0.18 ± 0.04 ^a	0.80 ± 0.09 ^a
C组	270	0.49 ± 0.08 ^b	0.46 ± 0.05 ^b	0.40 ± 0.06 ^b
D ₁ 组	50	0.34 ± 0.05 ^b	0.25 ± 0.04 ^b	0.69 ± 0.08 ^b
D ₂ 组	200	0.51 ± 0.09 ^b	0.45 ± 0.08 ^b	0.43 ± 0.06 ^b

部适合使用二甲双胍治疗^[12]。

六味地黄丸可通过调节下丘脑-垂体-性腺轴,降低雄激素水平并诱导排卵^[13]。同时,IR和葡萄糖代谢异常在PCOS患者中很常见,地黄对IR的作用可能还归因于B细胞功能的改善,这直接与胰岛素分泌有关^[14]。因此,作为地黄主要活性成分的地黄苦苣元可能对PCOS具有一定治疗作用。本研究结果显示,地黄苦苣元可降低PCOS模型大鼠血清中T,LH,FSH,HOMA-IR水平,同时减少闭合卵泡的数量,增加黄体数量,增厚颗粒细胞层,其治疗PCOS的效果堪比二甲双胍,临床应用前景广阔。

作为调节代谢的重要途径,PI3K/ERK通路也是将PCOS与IR连接的关键途径^[15]。PI3K/ERK通路是胰岛素作用的主要转导途径之一,而PI3K/ERK通路的改变与糖尿病、肥胖症和其他代谢性疾病中的IR密切相关^[16]。作为跨膜胰岛素受体蛋白,胰岛素受体底物-1(IRS-1)具有双向调节位点(丝氨酸和苏氨酸残基),丝氨酸的过度磷酸化对随后的PI3K/ERK通路产生负调节作用^[17]。AKT作为PI3K/ERK通路的下游靶蛋白,是调节能量代谢的重要因子,在促进糖异生中起着至关重要的作用。PI3K激活可导致AKT从细胞核转移到细胞质中,从而增强AKT的转录活性^[18]。研究显示,PCOS-IR患者子宫内膜的IRS-1水平显著升高^[19]。IRS-1(S307)的磷酸化升高导致PI3K/ERK通路功能障碍,随后调节了葡萄糖转运子4的转运,破坏了葡萄糖稳态,这是PCOS-IR模型大鼠HOMA-IR指数升高的原因^[20]。在PCOS-IR模型大鼠中,颗粒细胞中卵巢颗粒细胞特异性表达基因CYP19A1的表达降低与血清T,LH,FSH的广泛上调和雌激素的下调有关。雌二醇和FSH水平的降低一定程度下调了AKT,进一步促进了PCOS-IR模型大鼠的多囊发育^[21]。考虑到PI3K/ERK通路在PCOS与IR连接中的重要性,可望通过阻断治疗药物的信号转导来缓解PCOS-IR。PI3K/ERK通路相关基因的缺失可能导致卵巢早衰甚至不孕。AKT在卵巢发育中起关键作用,密切参与FSH诱导的颗粒细

胞分化,影响卵巢颗粒细胞的增殖和卵泡发育^[22]。在AKT缺陷小鼠中,继发性颗粒细胞增殖和成熟卵泡减少,闭锁卵泡增加,延长了小鼠的发情周期,最终导致其不孕^[23]。本研究结果显示,地黄苦苣元能升高PI3K和AKT蛋白及mRNA的表达水平,同时降低ERK蛋白及mRNA的表达水平。

综上所述,地黄苦苣元可减轻PCOS模型大鼠的胰岛素抵抗,恢复卵巢形态,其机制可能与调控PI3K/ERK通路有关。

参考文献

- [1] 赵晓苗,杨冬梓. 多囊卵巢综合征的临床症状及远期影响[J]. 实用妇产科杂志,2018,34(8):566-570.
- [2] 黄金华. 多囊卵巢综合征与糖代谢异常[J]. 中国社区医师,2016,32(26):15-16.
- [3] FURAT RENCBER S, KURNAZ OZBEK S, ERALDEMIR C, et al. Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultra-structure in PCOS: an experimental study[J]. J Ovarian Res, 2018,11(1):55.
- [4] 史晓雪,任秀朋,闫冰. 炔雌醇环丙孕酮联合二甲双胍或吡格列酮治疗育龄期多囊卵巢综合征并胰岛素抵抗效果比较[J]. 中国药业,2018,27(10):32-35.
- [5] 梁秋峰,陈奇,毛红芳,等. 雌孕激素替代治疗联合六味地黄丸在肾阴虚型卵巢早衰治疗中的作用[J]. 蚌埠医学院学报,2020,45(5):588-592.
- [6] ZHANG N, LIU X, ZHUANG L, et al. Berberine decreases insulin resistance in a PCOS rats by improving GLUT4: Dual regulation of the PI3K/AKT and MAPK pathways[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2020,110:104544.
- [7] ZHENG Q, LI Y, ZHANG D, et al. ANP promotes proliferation and inhibits apoptosis of ovarian granulosa cells by NPR1/PCRM1/EGFR complex and improves ovary functions of PCOS rats[J]. Cell Death Dis, 2017,8(10):e3145.
- [8] 王婧. 黄芩苷联合二甲双胍对多囊卵巢综合征大鼠的影响及机制[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(14):1467-1469.
- [9] 赵莹莹,陈燕,韩杜苑,等. 地黄苦苣元的雌激素样活性筛选研究[J]. 药科学报,2019,54(2):138-142.
- [10] THANNICKAL A, BRUTOCAO C, ALSAWAS M, et al. Eating, sleeping and sexual function disorders in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): A systematic review and meta-analysis[J]. Clin Endocrinol, 2020,92(4):338-349.
- [11] 赵晓兰,冯琳. 二甲双胍联合维格列汀对多囊卵巢综合征合并糖代谢异常的临床疗效研究[J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(6):517-519.
- [12] 刘伟,杨明兰. 二甲双胍在多囊卵巢综合征合并妊娠妇女中应用的利与弊[J]. 中国内分泌代谢杂志,2018,34(10):809-813.
- [13] 马渊,周文霞,程军平,等. 六味地黄汤对皮质酮所致小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴紊乱的调节作用及其拆方研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(2):28-32.
- [14] 刘玉兰,宋春侠,暴宏伶,等. 地黄丸合芎归二陈汤加减治