

本文引用:余晓愉,熊辉,齐新宇,向黎黎,曾朋,张娟. 基于以方测证的膝骨关节炎风寒湿痹证模型大鼠构建研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022,42(7): 1091-1095.

基于以方测证的膝骨关节炎风寒湿痹证 模型大鼠构建研究

余晓愉¹,熊辉^{2*},齐新宇²,向黎黎³,曾朋³,张娟⁴

(1.湖南省胸科医院,湖南长沙410005;2.湖南中医药大学,湖南长沙410208;

3.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙410005;4.湖南中医药大学湘杏学院,湖南湘阴414600)

[摘要] 目的 基于“以方测证”思维,模拟人膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)风寒湿痹证的发病机制,以期建立稳定的KOA病证结合动物模型。方法 将50只大鼠随机分为空白(A)组、单纯风寒湿刺激(B)组、单纯KOA造模(C)组、KOA造模+风寒湿刺激(D)组、乌头汤灌胃(E)组,共5组,每组10只。采用膝关节腔注射木瓜蛋白酶复合风寒湿外环境造模,基于“以方测证”思维运用乌头汤进行验证,灌胃结束后观察大鼠一般情况、膝关节软骨HE染色及Mankin评分、膝关节Micro-CT检测、血清肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)浓度。结果 Mankin评分显示,A、B组得分为0~1分,属于正常软骨;C、E组为4~7分,属KOA早中期;D组为7~11分,属于KOA中晚期。C、D、E组Mankin评分及TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A浓度较A组及B组均明显升高($P<0.05$),C、E组Mankin评分及TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A浓度较D组均明显降低($P<0.05$),B组TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A浓度较A组明显升高($P<0.05$)。结论 与单纯KOA模型比较,采用膝关节腔注射木瓜蛋白酶复合风寒湿外环境刺激,KOA病情的进展更快,程度更严重,模型大鼠出现类似人体KOA风寒湿痹证的表现,并且乌头汤能够减轻复合模型风寒湿干预因素的影响,缓解疾病的进程。

[关键词] 膝骨关节炎;风寒湿痹证;乌头汤;病证结合模型;Mankin评分;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-1 β ;白细胞介素-17A

[中图分类号]R255.6

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.007

Study on establishment of knee osteoarthritis model rats with wind-cold-dampness syndrome based on testing syndrome by formula

YU Xiaoyu¹, XIONG Hui^{2*}, QI Xinyu², XIANG Lili³, ZENG Peng³, ZHANG Juan⁴

(1. Hunan Chest Hospital, Changsha, Hunan 410005, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China; 4. Xiangxing College of Hunan University of Chinese Medicine, Xiangyin, Hunan 414600, China)

[Abstract] **Objective** To simulate the pathogenesis of human knee osteoarthritis (KOA) with wind-cold-dampness syndrome based on the thinking of "testing syndrome by formula", so as to establish a stable animal model of KOA combination of disease and syndrome. **Methods** Fifty rats were randomly divided into blank (A) group, simple wind-cold-dampness stimulation (B) group, simple KOA model (C) group, KOA model+wind-cold-dampness stimulation (D) group and Wutou Decoction intragastric administration (E) group, with 10 rats in each group. The model was made by injecting papain into the knee cavity combined with the external environment of wind, cold and dampness, and verified by Wutou Decoction based on the thinking of testing syndrome by formula.

[收稿日期]2021-12-14

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(2019JJ40224,2020JJ5420);湖南省研究生教育创新工程和专业能力提升工程项目(CX20200768);湖南省中医药管理局科研计划项目(2021002,2021249);湖南省教育厅科学研究项目(21A0248,21B0377);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2018ZYX62);长沙市科技计划项目(kh2201056)。

[第一作者]余晓愉,男,医师,硕士研究生,研究方向:筋伤与骨病的中医药防治研究。

[通信作者]*熊辉,男,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,E-mail:xh_hn@hnuem.edu.cn。

After the end of ingastric administration, the general situation of the rats, HE staining of knee cartilage, the Mankin score, the knee micro-CT detection and the tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-17A (IL-17A) concentration were observed. **Results** Mankin score showed that the scores of group A and B were 0-1, belonging to normal cartilage; the scores of group C and E were 4-7, belonging to early and middle KOA; the score of group D was 7-11, belonging to the middle and late KOA. Mankin score and the content of TNF- α , IL-1 β and IL-17A of group C, D and E were higher than those of group A and B ($P<0.05$), Mankin score and the content of TNF- α , IL-1 β and IL-17A of group C and E were lower than those of group D ($P<0.05$). The content levels of TNF- α , IL-1 β and IL-17A of group B were higher than those of group A ($P<0.05$). **Conclusion** Compared with the simple KOA model, the progress of KOA disease is faster and more serious by injecting papain into the knee cavity combined with the external environment of wind, cold and dampness. The model rats appear similar to the performance of human body KOA with wind-cold-dampness syndrome, and Wutou Decoction can reduce the influence of wind, cold and dampness intervention factors in the composite model and alleviate the process of disease.

[**Keywords**] knee osteoarthritis; wind-cold-dampness syndrome; Wutou Decoction; model of combination of disease and syndrome; Mankin score; tumour necrosis factor- α ; interleukin-1 β ; interleukin-17A

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是在生物学和力学等各种因素的影响下,致使膝关节软骨细胞、细胞外基质及软骨下骨三者结构和功能失衡所引起的一种临床常见的退行性病变^[1-3]。随着经济的进步、人的预期寿命增加及超重等原因,KOA的患病率逐年增加,65岁以上者发病率达50%以上,已成为中老年人慢性疼痛和下肢残疾的主要原因之一^[4]。不仅导致患者个人的生活质量下降,且增加了社会的经济负担。“以方测证”的原理是依据方剂的药物构成及功效,观察应用该方剂后所出现的药效反应,从而推测研究对象的所属证型,是中医学认识病证、用于证候动物模型研究的一种重要方法^[5]。近年来,许多学者从不同角度对KOA进行了研究,当前关于KOA的研究主要以临床观察为主,其实验研究尚不全面,关于KOA病症结合模型的研究较少^[6]。本实验基于“以方测证”思维,模拟人KOA风寒湿痹证的发病机制,以期建立稳定的KOA病证结合动物模型,为KOA发病机制的研究提供便利条件。

1 材料

1.1 动物

健康SPF级雄性SD大鼠50只,体质量(180 \pm 5)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证号:430727201101634326。分笼饲养于湖南中医药大学科技创新实验动物中心,室内温度20~25℃,湿度50%~70%,昼夜各12h,使用许可证号:SYXK(湘)2019-0009。本实验符合动物伦理委员会要求,湖南中医药大学伦理委员会审批号:LL2020120203。

1.2 药物与试剂

乌头汤按《金匱要略》原方比例制备。制川乌6g、

麻黄9g、白芍9g、甘草9g均购自亳州市京皖中药饮片厂(批号分别为201001、211001、200101、210102),黄芪9g(湖南聚仁中药饮片有限公司,批号:21051801)。

木瓜蛋白酶(上海源叶生物科技有限公司,批号:P15J11B118475);水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:Q/12HB4218-2017);4%多聚甲醛(广州赛国生物科技有限公司,批号:70111800);鼠肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)、鼠白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)、鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)ELISA试剂盒均购自上海泛柯实业有限公司(批号分别为21022535N、21022531N、21022526N)。

1.3 仪器

无菌操作台(苏州市苏杭科技器材有限公司,型号:SQ-120);电子天平(日本AND公司,型号:ER-182A);智能人工气候箱(上海汗诺仪器有限公司,型号:PRX-150B);Micro-CT(美国PerkinElmer-Caliper LS公司,型号:Quantum GX2);电热恒温培养箱(太仓市华利达实验设备有限公司,型号:DHP-9082);高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司,型号:5810R)。

2 方法

2.1 药物制备

先将蜂蜜及制川乌置于多功能提取罐中(采用1g制川乌与66.67mL蜂蜜的比例混合),加入蒸馏水先煎1.5h,然后加入其他4味药再煎煮1.5h。滤出药液,药渣加蒸馏水再煎煮1.5h,滤出药液。将两次药液合并,60℃减压浓缩制成乌头汤100%标准汤剂(15g/kg),灭菌、密封备用。

2.2 动物分组、造模及给药

50只大鼠称量后编号,按照随机数字表法分为5组,即空白(A)组、单纯风寒湿刺激(B)组、单纯KOA造模(C)组、KOA造模+风寒湿刺激(D)组、乌头汤灌胃(E)组,每组10只。除A、B组外,其余组均采用10%水合氯醛腹腔麻醉(3 mL/kg),麻醉满意后将大鼠左膝关节向后屈曲 $95^{\circ}\sim 100^{\circ}$,使关节腔间隙充分打开,关节腔处于最大位置,然后分别于第1、3、7天注入2%木瓜蛋白酶溶液0.2 mL,A、B组同法注射0.2 mL生理盐水。造模2周后,A、C组随机各取5只大鼠,采用测量大鼠膝关节红肿度及关节评分的方法进行模型判定^[7-9]。造模成功后,除A、C组外,其余组于造模后1 d开始置于改良的智能人工气候箱中进行风寒湿刺激(风速5 m/s,温度 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$,湿度90%~95%,4 h/d),直至实验结束。在第1次造模后14 d开始,E组进行乌头汤灌胃,直至实验第45天结束,灌胃量为每天15 g/kg,分2次灌胃,每次2 mL,其余组以等量生理盐水灌胃。

2.3 标本采集

末次灌胃后禁食不禁水12 h,采用10%水合氯醛腹腔麻醉(30 mL/g)各组大鼠,麻醉满意后经腹主动脉采血,静置离心(4°C ,3500 r/min,10 min,离心半径7 cm)后取上层淡黄色血清1.5~2 mL,于 -80°C 冰箱内保存,用于测定TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A的浓度。采血完毕后将大鼠放置于鼠板操作台上,用刀片划开膝关节周围皮肤组织,逐层切开,充分暴露整个膝关节,剔除股骨上的肌肉组织,切断内外侧副韧带及前后交叉韧带,使股骨下端游离,用咬骨钳在股骨近端离股骨髁约1.5 cm处将其咬断取下。将取出的股骨髁清理干净后固定、脱钙。

2.4 指标检测

2.4.1 一般情况 参照文献[9-11],结合风寒湿痹证模型大鼠的一般临床表现特征,观察各组大鼠精神状态、日常活动量、毛发光泽度、摄食进水情况以及大小便等情况。

2.4.2 病理学检测分析及Mankin评分 样本脱钙完成后,进行石蜡包埋、切片并行HE染色观察。PBS冲洗玻片3次,每次15 min;乙醇梯度脱水,各5 min;二甲苯透明3次,每次15 min,透明过程中每3 min观察1次组织状态;苏木素染色5 min;流水冲洗、盐酸乙醇分色10 s,自来水浸泡,返蓝5 min,置于伊红溶液中染色3 min;乙醇梯度脱水,各2 min,再予以二甲苯透明,中性树胶封片,常温晾干;在光学显微镜下观察各组大鼠膝关节玻片标本的软骨结构、细胞、基质及潮线情况。

根据软骨结构完整性、细胞数量、基质染色、潮线完整性进行评分及分期。Mankin评分标准^[12]以软骨结构、软骨细胞、基质染色、潮线4个方面为主。软骨结构:结构正常为0分,软骨表面不规则为1分,有血管翳形成且表面不规则为2分,出现裂隙且达到软骨过渡层为3分,裂隙达软骨辐射层为4分,裂隙达软骨钙化层为5分,软骨完全破坏为6分。软骨细胞:数量正常为0分,弥漫性细胞增加为1分,局部细胞数量增加为2分,细胞数量减少为3分。基质染色:正常为0分,轻度减少为1分,中度减少为2分,重度减少为3分,无着色为4分。潮线:完整为0分,不完整、有血管穿过为1分。软骨退变程度分期^[13]:0~1分为正常软骨,2~6分为早期,7~9分为中期,晚期为10~14分。最终评分分值越高,则说明关节软骨的损伤越严重。

2.4.3 Micro-CT检测分析 灌胃结束后,麻醉并固定大鼠左膝关节,使用Micro-CT(分辨率为8.8 μm ,每层厚度为9 μm)扫描大鼠膝关节位置,进行三维重建分析并评价关节骨组织损伤程度。

2.4.4 ELISA法测定血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A浓度 标准加样和样本加样完成后在 37°C 温度下孵育30 min,用配好的洗涤液进行洗涤,加入酶标试剂后再次温育、洗涤,完成后加入显色剂避光显色15 min,然后加入终止液以终止反应,并在15 min以内,以空白孔为基础调零,450 nm波长依序测量各孔的吸光度。

2.5 统计学方法

采用SPSS 25.0统计学软件对所得的实验结果进行数据分析。计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,符合正态分布及方差齐性的采用单因素方差分析,两两比较则采用LSD法分析;若不符合方差齐性,则用Games-Howell检验;不符合正态分布的采用多样本秩和检验分析。均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

在造模前,各组大鼠精神状态良好,日常活动自如,摄食饮水及大小便均正常。造模后,C组大鼠精神状态及毛发光泽度尚可,日常活动减少,造模侧膝关节屈伸不利,未见明显肢体肿胀现象,喜卧懒动,摄食饮水量及二便正常。B、D、E组较A组出现不同程度精神萎靡、摄食饮水减少、日常活动量减少、毛发光泽度差、喜扎堆静卧、大便质稀等风寒湿痹证临床表现,D、E组还伴随造模侧膝关节屈伸不利症状。E组大鼠精神状态、摄食饮水量、活动度及毛发光泽

度等较D组明显改善。

3.2 病理学检测分析及Mankin评分

HE染色结果:A、B组软骨浅表层完整无缺损,细胞形态数量正常,排列分布均匀,无簇集成团现象,基质染色正常,潮线完整;C、D、E组软骨浅表层均出现不同程度破损、软骨形态数量改变、排列紊乱、细胞成簇聚集;C、E组表层破坏,见少量受损,移行层相对完整,细胞增生且排列相对紊乱,基质染色轻度减少,潮线相对完整;D组关节软骨表层及切线层破损、裂隙达软骨过渡层及软骨质辐射层,细胞成簇聚集,排列紊乱无序,基质染色重度减少,潮线不完整。详见图1。

Mankin评分结果:A、B组为0~1分,C、E组4~7分,为KOA早中期;D组为7~11分,属于KOA中晚期。C、D、E组Mankin评分较A组及B组均明显升高($P<0.05$),C、E组Mankin评分较D组均明显降低($P<0.05$)。B组Mankin评分与A组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。C、E组间Mankin评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表1。

表1 各组大鼠Mankin评分比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	评分/分
A组	0
B组	0.30±0.48
C组	5.70±1.06* [▲]
D组	9.00±1.25* [▲]
E组	5.30±1.16* [▲]

注:与A组比较,* $P<0.05$;与B组比较,[▲] $P<0.05$;与D组比较,[#] $P<0.05$ 。

3.3 Micro-CT检测分析

与A、B组比较,C、D、E组膝关节骨组织出现不同程度破坏、关节间隙变窄、关节出现变形,D组膝关节骨组织破坏及关节间隙变窄严重,关节出现变形。C、E组膝关节软骨及骨侵蚀较D组轻,关节结构也相对完整。详见图2。

3.4 血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A浓度

B、C、D、E组TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A浓度较A组均明显升高($P<0.05$),C、D、E组TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A浓度较B组均明显升高($P<0.05$),C、E组TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A浓度较D组均明显降低($P<0.05$)。C、E组间TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表2。

表2 各组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A浓度比较
($n=10, \bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-17A
A组	382.61±7.50	39.87±0.79	14.99±0.43
B组	403.31±3.92*	41.47±0.65*	16.62±0.39*
C组	440.88±6.79* [▲]	51.41±0.65* [▲]	20.38±0.84* [▲]
D组	486.45±11.59* [▲]	54.35±0.90* [▲]	23.08±0.70* [▲]
E组	414.78±4.16* [▲]	51.56±1.16* [▲]	20.00±0.58* [▲]

注:与A组比较,* $P<0.05$;与B组比较,[▲] $P<0.05$;与D组比较,[#] $P<0.05$ 。

4 讨论

KOA属中医学“痹痛”“骨痹”“膝痹”范畴,以肝、脾、肾亏虚为本,以风、寒、湿、痰、瘀之实为标,病位在膝,属本虚标实、本痿标痹之证^[14]。从发病学角

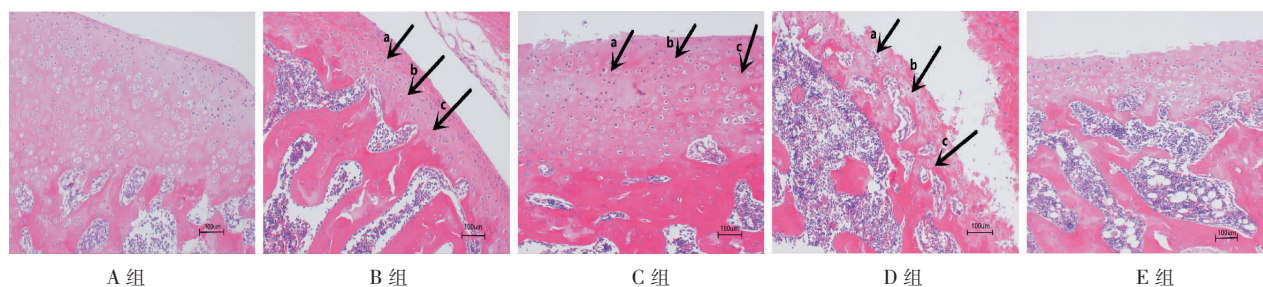


图1 各组大鼠膝关节软骨病理图片(HE染色,×100)

注:a.软骨细胞;b.软骨基质;c.潮线。

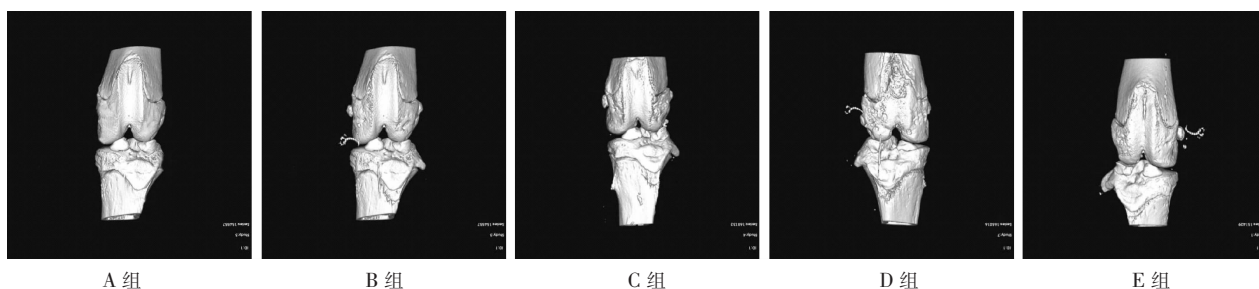


图2 各组大鼠膝关节Micro-CT图像

度来看,可将膝痹概括为“正虚”“邪侵”“痰饮瘀血”。引发三者出现的原因即是膝痹病的病因,而风寒湿痹则属于外邪侵袭人体诱发的痹病。为模拟临床 KOA 病证结合模型,病因病理造模是运用最多的方式,中医证型的评价主要是以遵循《医学实验动物学》中临床表现与证型的对应为主^[15]。中医证型模型成功与否,最主要的评价标准为模型的整体状态与临床症状表现的一致性,因此,四诊相关信息的表达可以作为中医特色模型的评价标准。然而,动物模型的四诊信息采集难度较大,且没有统一、规范的评价标准,单纯的病理病因造模不能完整体现中医证候的病因或诱因,难以依据正向思维来辨析证型,更为适合的方式应是在现代医学建模基础上施加中医病因,并找到科学评价病证结合模型的各项指标,结合“病”+“证候”2项指标进行综合评估,结合多学科,如基因组学、代谢组学和蛋白组学等,从宏观+微观入手,运用药方对模型的证候属性进行反证和推测,这也是“以方测证”思维成为证候模型研究重要手段之一的原因^[16]。

乌头汤首见于张仲景《金匮要略》,有温经散寒、除湿止痛之效,主治寒湿痹阻关节证。研究表明,乌头汤可显著改善寒湿证患者关节疼痛、肿胀、晨僵等症状,延缓关节骨破坏,改善患者生活质量^[17-19]。

因此,本实验在综合考虑 KOA 模型建立的对象、造模方法的优缺点以及当前关于 KOA 模型及风寒湿痹证各种经典的评价指标后,采用膝关节腔注射木瓜蛋白酶(2%,0.2 mL)+风寒湿外环境(风速 5 m/s、温度 0~2 ℃、相对湿度 90%~95%,人工智能气候箱 4 h/d)、“病”+“证候”的造模方式,通过观察大鼠一般情况、Mankin 评分、膝关节 Micro-CT、关节软组织的组织形态学变化及血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A 的检测,并基于“以方测证”思维运用乌头汤作为风湿寒痹证病证结合动物模型的“方证对应”论证方剂,具备一定的理论和临床依据。结合“病”+“证候”2项指标进行综合评估各项观察指标。结果显示,在 KOA 模型的基础上施加风寒湿外环境干预,造模大鼠表现出精神萎靡、日常活动减少、关节屈伸不利等类似人体 KOA 风寒湿痹证的表现,风寒湿外邪干预后,复合模型大鼠较单纯 KOA 模型大鼠的病情进展更快,程度更严重。使用治疗寒湿痹痛的经方乌头汤进行灌胃佐证发现,风寒湿外邪能够使大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A 浓度升高($P<0.05$);经灌胃后,D 组血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A 浓度下降,与 C 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本实验各项结果均提示,在现代医学建模基础上联合中医基础

理论思想,将风寒湿外环境作用于 KOA 模型大鼠,能够模拟人 KOA 风寒湿痹证的发展进程。

参考文献

- [1] ZHENG L L, ZHANG Z J, SHENG P Y, et al. The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis[J]. Ageing Research Reviews, 2021, 66: 101249.
- [2] CHARLIER E, DEROYER C, CIREGIA F, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis[J]. Biochemical Pharmacology, 2019, 165: 49-65.
- [3] MESSINA O D, VIDAL WILMAN M, VIDAL NEIRA L F. Nutrition, osteoarthritis and cartilage metabolism[J]. Aging Clinical and Experimental Research, 2019, 31(6): 807-813.
- [4] CORYELL P R, DIEKMAN B O, LOESER R F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2021, 17(1): 47-57.
- [5] 卢林竹,胡志希,李琳,等.“以方测证”法在动物模型研究中的运用[J].湖南中医药大学学报,2017,37(5):570-573.
- [6] 卢启贵,谢平金,罗臻,等.microRNA-20b-5p 对早期膝骨关节炎模型大鼠软骨和软骨下骨血管新生的影响[J].中国组织工程研究,2022,26(29):4658-4665.
- [7] 张应生.化湿补肾法对木瓜蛋白酶诱导的大鼠膝骨关节炎模型软骨修复机制的研究[D].福州:福建中医药大学,2019.
- [8] 赵林灿,李薇薇,吴毅明,等.独活寄生汤对膝骨关节炎模型大鼠 PERK/Bip 信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(9): 18-24.
- [9] 陈小野.实用中医证候动物模型学[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1993:130-136.
- [10] 张玲,申松希,朱世鹏,等.寒凝证动物模型的建立[J].山东中医药大学学报,2013,37(3):248-250.
- [11] 杨威,郭斯印,易志勇,等.膝骨关节炎中医证候动物模型的研究进展[J].风湿病与关节炎,2021,10(9):68-72.
- [12] 宋威江,周丽,杜梦梦,等.肾虚对骨关节炎大鼠软骨退变的影响[J].风湿病与关节炎,2020,9(11):1-4,13.
- [13] BOBINAC D, SPANJOL J, ZORICIC S, et al. Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans[J]. Bone, 2003, 32(3): 284-290.
- [14] 中国中医药研究促进会骨科专业委员会,中国中西医结合学会骨伤科专业委员会关节工作委员会.膝骨关节炎中医诊疗专家共识:2015年版[J].中医正骨,2015,27(7):4-5.
- [15] 杨威,郭斯印,易志勇,等.膝骨关节炎病证结合动物模型的研究进展[J].中国比较医学杂志,2021,31(3):139-143.
- [16] 钟森杰,李静,李琳,等.“以方测证”在中医证候模型研究中的应用述评[J].中华中医药学刊,2021,39(2):48-50.
- [17] 林也,李鑫,徐智慧,等.乌头汤联合化学药物治疗类风湿关节炎有效性及安全性的 Meta 分析[J].中华中医药学刊,2018,36(11):2685-2689.
- [18] 王涛,林静,狄舒男,等.乌头汤及其拆方对 116 例寒湿型类风湿性关节炎临床疗效观察[J].时珍国医国药,2016,27(1):145-146.
- [19] 魏红涛,郭会卿.乌头合剂治疗类风湿性关节炎 26 例[J].中国民族民间医药,2017,26(5):95-96.