

牛大力水提物对斑马鱼药物性肝纤维化损伤的保护作用

周楚莹, 赖裕玲, 谢凌鹏, 刘强, 高磊, 吕志平

南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515

[摘要] 目的: 探讨牛大力水提物对斑马鱼药物性肝纤维化损伤的作用及其机制。方法: 以3月龄野生型AB品系斑马鱼为研究对象, 用二乙基亚硝胺(DEN)刺激4周构建斑马鱼药物性肝纤维化模型, 后用高、中、低浓度牛大力水提物进行干预。取肝组织做病理HE染色、天狼星红苦味酸染色、I型胶原蛋白(Collagen I)免疫组化染色, 检测斑马鱼肝脏匀浆中 α -平滑肌激动蛋白(α -SMA)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达水平。结果: 与模型组比较, 牛大力水提物各给药组斑马鱼肝脏纤维化程度、病理损伤、胶原纤维沉积均有不同程度的减轻, 其中以牛大力高浓度组(100 mg/L)效果最为显著; 牛大力高浓度组斑马鱼肝脏中Collagen-1、细胞凋亡相关基因 α -SMA、TNF- α 、Bax的表达均明显下降, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论: 牛大力水提物对药物性肝纤维化损伤的保护作用是通过抑制肝细胞凋亡、减少胶原纤维沉积实现的。

[关键词] 牛大力水提物; 药物性肝纤维化; 动物实验; 斑马鱼

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 12-0012-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.12.004

Aqueous Extract of *Millettia Speciosa* Champ Has Protective Effect on Drug-induced Liver fibrosis in Zebrafish

ZHOU Chuying, LAI Yuling, XIE Lingpeng, LIU Qiang, GAO Lei, LYU Zhiping

Abstract: **Objective:** To discuss the effect and mechanism of aqueous extract of *millettia speciosa* champ for drug-induced liver fibrosis in zebrafish. **Methods:** Selected a 3-month-old wild-type zebrafish in AB strain as a research object, and made a zebrafish model of drug-induced liver fibrosis by stimulating with diethylnitrosamine (DEN) for 4 weeks, followed by intervention of high-, medium- and low-concentrations of aqueous extract of *millettia speciosa* champ. Taken liver tissue for pathological HE staining, sirius red picric acid staining, and Collagen I (Collagen I) immunohistochemical staining, detected expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Bcl-2-associated X Protein (Bax) in zebrafish liver homogenate. **Results:** Compared with the model group, the degree of drug-induced liver fibrosis, pathological injury and collagen fiber deposition in each group received administration of aqueous extract of *millettia speciosa* champ was all reduced to some extent, and the effect was most significant in the group of high-concentration of *millettia speciosa* champ (100 mg/L); The expressions of Collagen-1 and apoptosis-related genes α -SMA, TNF- α and Bax in the liver of zebrafish in the group of high-concentration of *millettia speciosa* champ were significantly decreased, difference being significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** The protective effect of aqueous extract of *millettia speciosa* champ for drug-induced liver fibrosis is achieved by inhibiting hepatocellular apoptosis and reducing collagen fiber deposition.

Keywords: Aqueous extract of *millettia speciosa* champ; Drug-induced liver fibrosis; Animal experiment; Zebrafish

肝纤维化(Hepatic fibrosis, HF)是由慢性肝病所致的持续或反复的肝实质炎症坏死引起的纤维结缔组织大量增生, 其降解失衡导致肝内过多胶原沉积形成HF, 是肝硬化早期阶段。HF是一种多病因引起且发病机制极其复杂的病理过程, 其发病机

制以肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)激活的分子机制为中心环节, 通过多种病因、细胞因子、细胞信号转导共同激活HSC产生过多细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)沉积于肝脏, 导致肝脏结构或(和)功能异常的病理变化^[1]。HF是几乎所

[收稿日期] 2018-07-10

[基金项目] 广州市科技计划项目 (201508020014)

[作者简介] 周楚莹 (1992-), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗肝脏疾病。

[通信作者] 吕志平, E-mail: lzp48241@126.com。

有慢性肝病发展的共同病理环节并具有可逆性,故在慢性肝病的机制研究和临床治疗中具有非常重要的地位^[2]。

迄今为止,现代医学在临床上仍没有能够逆转肝纤维化过程的治疗药物^[3]。西药治疗只针对某一方面或某一环节,单独治疗达不到整体抗纤维化疗效,因而常常需联合治疗。中医药由于其独特的理论体系和丰富的中药资源,在HF的治疗方面更有优势,可作为HF研究的重要方向。本课题组前期研究发现有多种岭南中药如红背叶根^[4-5]、白背叶根^[6]等具有确切的抗HF作用。牛大力,又称九龙串珠、甜牛大力、山莲藕、血藤、牛古大力等,为豆科蝶形花亚科崖豆藤属植物美丽崖豆藤(*Millettia speciosa* Champ.)的干燥根,主产于广东、广西等地。牛大力味甘性平,有强筋活络、补虚润肺的功能,现代药理研究表明牛大力具有抗炎镇痛^[7]、祛痰、镇咳平喘^[8]、抗氧化^[9]、保肝^[10]等作用。但牛大力对药物性肝纤维化的影响,既往并无相关研究。因此,本实验旨在探讨岭南中药牛大力对药物性肝纤维化斑马鱼的作用及其机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 野生型 AB 品系斑马鱼由南方医科大学广东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选重点实验室提供,斑马鱼国家资源中心种质证明证书编号 4972,饲养并繁殖于该实验室。养殖于北京爱生公司净水系统,温度为 28℃,昼夜光照控制为 14 h : 10 h,即 14 小时光照和 10 小时黑暗。AB 品系斑马鱼所产后代培育至 3 月龄用于本实验。

1.2 药物制备 牛大力水提物干粉由南方医科大学中药药学院中药制剂教研室提供,使用前分别取 600 mg、300 mg、150 mg 干粉研碎溶于 6 mL 养鱼系统水配置成牛大力水提物高、中、低浓度。

1.3 主要试剂 二乙基亚硝胺(DEN)(Sigma 公司);多聚甲醛、无水乙醇、二甲苯(广东光华化工厂);苏木素、伊红、中性树脂(广州化学试剂厂);天狼星红饱和苦味酸液、天青石蓝液(谷歌生物公司);磷酸缓冲盐溶液粉剂(Phosphate buffer saline, PBS)(武汉博士德生物工程有限公司),Anti-Collagen-1 抗体(Abcam 公司),GTVision III 型免疫组化检测试剂盒(含 DAB)(上海基因科技公司);异丙醇、三氯甲烷(广东光华化工厂),Trizol(Thermo 公司),DEPC H₂O、PrimeScript™ RT-PCR 逆转录试剂盒、SYBR 试剂盒(Takara 公司)。

1.4 模型的制备及动物分组 将 250 条 3 月龄斑马鱼随机分为空白组、模型组、牛大力低浓度组(25 mg/L)、牛大力中浓度组(50 mg/L)、牛大力高浓度组(100 mg/L),每组 50 条。参考王坤元等^[11]构建斑马鱼药物性肝纤维化模型的方法,本课题组选用 200 mg/L DEN 刺激 4 周的方法构建斑马鱼药物性肝纤维化模型。模型组与各用药组均给予 200 mg/L DEN 刺激 4 周,在第 3 周时往各用药组鱼缸分别加入高、中、低浓度的牛大力溶液干预 1 周。结束造模和给药后于冰上处死斑马鱼并分别取肝脏。

1.5 检测指标及方法 肝脏组织用 4%多聚甲醛于 4℃冰箱浸

泡过夜后依次投入 85%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇、二甲苯、石蜡中进行脱水,包埋盒装好标本并浸蜡包埋完成石蜡标本的制作,石蜡切片机切取石蜡切片厚度为 4 μm。HE 染色:将石蜡切片常规脱蜡,接着进行 HE 染色。将切片放至苏木素染液浸染 10 min、流水冲洗 5 min、1%盐酸酒精分化 10 s、流水冲洗 10 min 后,再用伊红溶液复染 2 min 后继续流水冲洗,再进行常规梯度酒精脱水、二甲苯透明,最后用中性树脂封片。

天狼星红苦味酸染色:石蜡切片常规脱蜡至水,放于天青石蓝液中浸染 10 min,流水冲洗 3 次,再以天狼星红饱和苦味酸液染 20 min 后,直接用无水乙醇分化与脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。天狼星红饱和苦味酸染液是一种很强的酸性染料,它能与胶原纤维反应产生明显的双折光现象。在普通光学显微镜下,经天狼星红苦味酸染色后胶原纤维呈红色。

免疫组化法检测肝脏 Collagen-1 的表达:石蜡切片 65℃烘烤 25 min,常规脱蜡,PBS 洗涤 3 次,枸橼酸钠缓冲溶液中煮沸 10 min,自然冷却;一抗 4℃过夜孵育;二抗常温孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次;DAB 染色 10 min,冷水终止反应;流水冲洗 5 min,苏木素染色 3 min,流水冲洗;1%盐酸酒精分化 2 s,流水冲洗;再进行常规梯度酒精脱水、二甲苯透明,最后用中性树脂封片。

实时荧光定量核酸扩增检测(Real-time Quantitative PCR, qPCR):从斑马鱼的肝脏中提取总 RNA,根据标准程序纯化,随后使用 PrimeScript™ RT-PCR 逆转录试剂盒逆转录为 cDNA。使用 SYBR Green 试剂盒在罗氏 LightCycler 96 仪器上进行 qPCR。目标基因表达通过比较扩增循环数(Cycle Threshold, CT)方法计算。使用基因 β-actin 作为参考,每种基因的引物见表 1。

表 1 β-actin、α-sma、TNF-α 和 Bax 的引物设计

基因名称	上下游引物序列(5'-3')
β-actin	β-actin-F: AGAGCTATGAGCTGCCTGACG
	β-actin-R: CCGCAAGATTCCATACCCA
α-SMA	α-sma-F: AGAGGAACACCCCACTCTGT
	α-sma-R: GATGAAGGACGGCTGGAACA
TNF-α	TNF-α-F: GCTGGATCTTCAAAGTCGGGTGTA
	TNF-α-R: TGTGAGTCTCAGCACACTTCCATC
Bax	Bax-F: GGCTATTTCAACCAGGGTTCC
	Bax-R: TGCGAATCACCAATGCTGT

1.6 统计学方法 采用 SPSS16.0 统计学软件分析数据。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果比较 见图 1。空白组斑马鱼肝脏组织结构稳定,肝细胞排列整齐。与空白组斑马鱼比较,模型组斑马鱼

肝脏结构紊乱，肝细胞出现肿胀、变性、坏死，并有疑似纤维结节形成。与模型组比较，牛大力中、低浓度组斑马鱼肝细胞损伤有不同程度的改善，肝组织结构紊乱有所改善，肝细胞肿

胀、变性、坏死程度减轻。牛大力水提物高浓度组肝脏组织结构趋于稳定，肝细胞排列较整齐，鲜见肝细胞肿胀、变性、坏死。

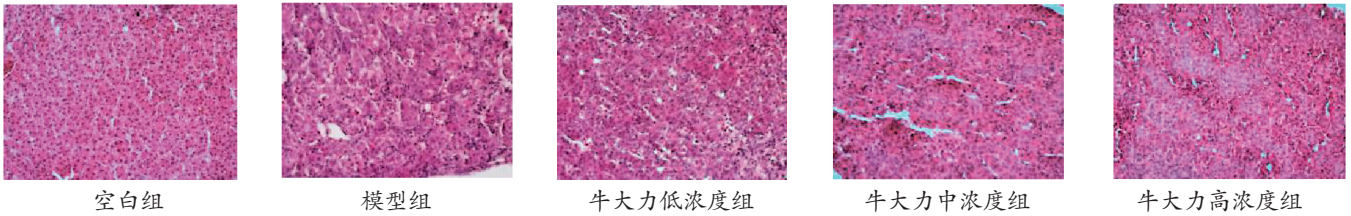


图1 各组斑马鱼肝脏组织病理切片 HE 染色结果比较 (×400)

2.2 天狼星红苦味酸染色结果比较 见图2。空白组斑马鱼肝脏组织未见胶原纤维分泌增多。与空白组比较，模型组斑马鱼肝脏组织中可见胶原纤维沉积明显增多。与模型组比较，各

牛大力各浓度组斑马鱼肝脏组织中胶原纤维沉积情况均有不同程度的减少，其中牛大力高浓度组未见明显增多的胶原纤维，与 HE 染色结果吻合，提示牛大力高浓度组疗效最佳。

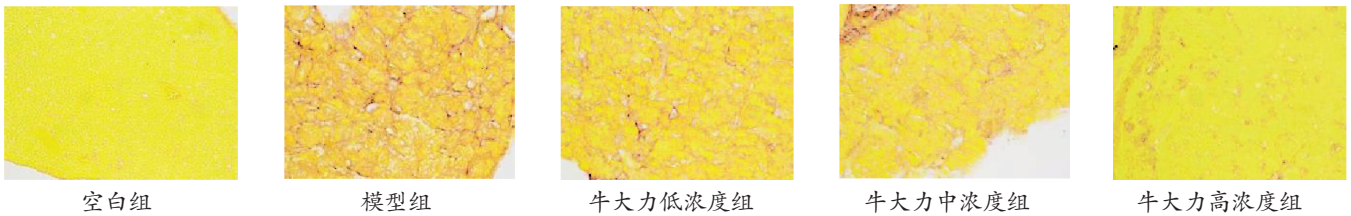


图2 各组斑马鱼肝脏组织病理切片天狼星红苦味酸染色结果 (×400)

2.3 空白组、模型组、牛大力高浓度组斑马鱼肝脏组织病理切片 Collagen-1 免疫组化染色结果比较 见图3。与空白组比较，模型组斑马鱼肝脏Collagen-1 表达明显增加。与模型组比较，牛大力高浓度组斑马鱼肝脏中 Collagen-1 的表达明显下降，提示牛大力高浓度组能有效逆转斑马鱼肝脏中胶原纤维过度沉积的情况。

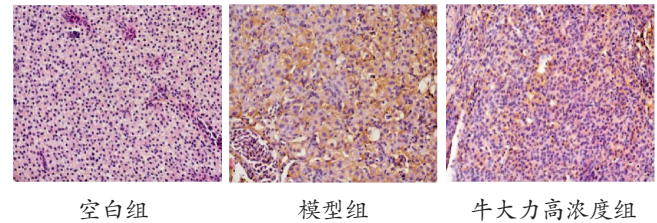
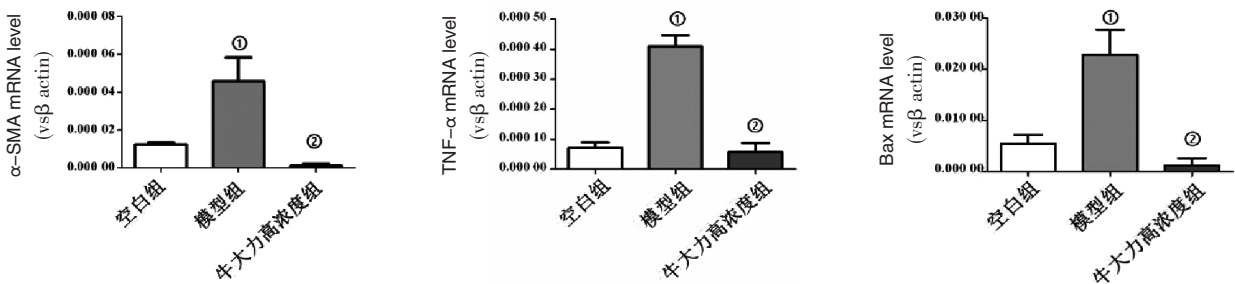


图3 空白组、模型组、牛大力高浓度组斑马鱼肝脏组织病理切片 Collagen-1 免疫组化染色结果比较 (×400)

2.4 空白组、模型组、牛大力高浓度组斑马鱼肝脏组织 α-SMA、TNF-α、Bax 基因表达水平比较 见图4。与空白组比较，模型组斑马鱼肝脏中 α-SMA、TNF-α、Bax 的表达显著上调(P<0.05)。与模型组比较，牛大力高浓度组斑马鱼肝脏中 α-SMA、TNF-α、Bax 的表达显著下调(P<0.01)。



与空白组比较，①P<0.05；与模型组比较，②P<0.01

图4 空白组、模型组、牛大力高浓度组斑马鱼肝脏组织 α-SMA、TNF-α、Bax 基因表达水平比较

3 讨论

斑马鱼是1种小型的热带淡水鱼,其基因与人类相似度高达87%^[12],且有与哺乳动物相似的心血管、造血、神经及代谢等系统,大量高度一致的活性代谢产物,并呈现出与人类十分相似的生理学特征,为进一步研究各种人类疾病提供了重要的材料^[13]。斑马鱼作为1种脊柱动物模式生物,具有养殖成本低、生长发育迅速、繁殖周期短、后代多、给药方法简便、高通量筛选易实现等优势。王坤元等^[14]采用150 mg/L DEN刺激斑马鱼成鱼6周诱导中毒性肝损伤能成功地构建稳定的斑马鱼成鱼药物性肝纤维化模型。本研究中3月龄斑马鱼浸泡于200 mg/L DEN中4周后,其肝细胞变性坏死,肝脏组织结构紊乱、胶原纤维过量沉积,肝脏Collagen-1表达增加,亦成功地建立了稳定的斑马鱼药物性肝纤维化模型^[15]。

HF是由各种致病因素导致ECM在肝脏组织内过量沉积,汇管区大量纤维组织异常增生的过程^[16]。而Collagen-1为肝脏ECM的重要组成部分,在ECM过度增生的过程中起着关键的正向调节作用^[15]。HF的发生发展与肝细胞凋亡增加、HSC活化有着密切的联系^[16]。为了进一步研究药物性肝纤维化中细胞凋亡诱导效应,本实验检测了细胞凋亡相关基因 α -SMA、TNF- α 、Bax在斑马鱼肝脏组织中的表达情况。 α -SMA在ECM异常增生的过程中发挥着关键的正向调节作用,同时 α -SMA是HSC激活的标志,激活态的HSC分泌转化生长因子- β 1(TGF- β 1)增多,此细胞因子具有促进ECM产生、抑制ECM降解、诱导肝细胞凋亡等作用^[17-18]。炎症是HF发展过程中的重要病理因素,TNF- α 是其中较为重要的炎症因子,其表达增加可促进ECM的产生、HSC的增生与活化以及肝细胞凋亡^[19-20]。Bcl-2家族则是细胞凋亡的线粒体途径中的重要调节因子,而Bax则是Bcl-2家族的1种促凋亡的代表蛋白^[16]。当受到某种致病因素的损伤和刺激后,激活的Bax会引起细胞色素C的释放,从而诱导细胞凋亡^[21-22]。本实验中,与模型组比较,牛大力高浓度组斑马鱼肝脏中Collagen-1及细胞凋亡相关基因 α -SMA、TNF- α 、Bax表达水平均显著降低,表明100 mg/L牛大力水提物给药干预1周后能有效改善肝细胞凋亡情况,提示牛大力可能是通过阻断细胞凋亡途径以减轻肝细胞凋亡,最终减缓斑马鱼HF病变程度的。

综上,3月龄斑马鱼浸泡于200 mg/L DEN中4周能成功地建立稳定的斑马鱼药物性肝纤维化模型。而不同浓度牛大力水提物干预1周能够促进斑马鱼成鱼肝纤维化恢复,减轻肝损伤与肝细胞凋亡,同时可减轻肝脏组织胶原纤维的过度沉积,其中以牛大力高浓度组效果最为显著。表明牛大力对斑马鱼药物性肝纤维化有明显的治疗作用,其抗肝纤维化的作用可能与其通过调控细胞凋亡相关基因 α -SMA、TNF- α 、Bax的表达有关,最终实现其抗肝纤维化的治疗作用。

[参考文献]

- [1] Mallat A, Lotersztajn S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis 5 Novel insights into liver fibrosis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305(8): C789-C799.
- [2] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease[J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1028-1040.
- [3] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 425-456.
- [4] 吕小燕, 刘强, 陈育尧, 等. 红背叶根拮抗酒精性肝纤维化大鼠模型的作用机制[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(2): 153-155.
- [5] 吕小燕, 刘强, 陈育尧, 等. 红背叶根抗四氯化碳致大鼠肝纤维化作用研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2007, 34(5): 668-669.
- [6] 赵进军, 吕志平, 王晓东, 等. 白背叶根在肝纤维化动物模型中抗氧化作用的实验研究[J]. *中药材*, 2002, 25(3): 185-187.
- [7] 刘丹丹, 魏志雄. 牛大力水提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. *中国现代中药*, 2014, 16(7): 538-541.
- [8] 刘丹丹, 唐立海, 王艳, 等. 牛大力祛痰、镇咳和平喘作用的实验研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2009, 26(3): 266-269.
- [9] 王呈文, 纪明慧, 舒火明, 等. 牛大力总黄酮提取工艺及不同萃取物的抗氧化活性研究[J]. *化学研究与应用*, 2013, 25(5): 713-717.
- [10] 周添浓, 刘丹丹, 唐立海, 等. 牛大力对四氯化碳及酒精所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(10): 2585-2587.
- [11] 王坤元, 刘莉, 戴文聪, 等. 二乙基亚硝胺诱导建立斑马鱼肝纤维化模型[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(6): 777-782.
- [12] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [13] 何嘉玲, 刘静, 王天奇, 等. 斑马鱼的质量标准化[J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6): 99-102.
- [14] 付洪彦, 龚作炯. 肝纤维化的发生机制及其诊疗研究进展[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2018, 28(2): 125-128.
- [15] Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis The origin of myofibroblasts in liver fibrosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27(Suppl 2): 65-68.
- [16] 靳雅玲, 欧士钰, 罗伟生. Bcl-2、Bax与肝纤维化关系的研究进展[J]. *临床医学工程*, 2013, 20(1): 124-126.
- [17] Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic

- stellate cells: new insights and prospects for therapy [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999, 14(7): 618-633.
- [18] Roulot D, Sevcik AM, Coste T, et al. Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats[J]. *Hepatology*, 1999, 29(6): 1730-1738.
- [19] Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1): 55-64.
- [20] Jaeschke H. Inflammation in response to hepatocellular apoptosis[J]. *Hepatology*, 2002, 35(4): 964-966.
- [21] 朱玉山, 卢铁元, 王蕊, 等. Bcl-2 家族蛋白调控线粒体膜通透性和细胞色素 C 释放的新机制[J]. *生命科学*, 2011, 23(11): 1076-1080.
- [22] 赵和平, 解燕茹. Bcl-2、Bax 蛋白表达在非酒精性脂肪性肝病中的作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(23): 2409-2412.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)

丹参酮 IIA 对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤时低氧诱导因子 1 α 基因表达的影响

陈晨, 王利玲

浙江中医药大学附属第一医院儿科, 浙江 杭州 310000

[摘要] 目的: 观察丹参酮 IIA (Tanshinone IIA, TSA) 对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤 (Hypoxia ischemic brain damage, HIBD) 时低氧诱导因子-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α , HIF-1 α) 基因表达的影响。方法: 7 日龄的 SD 大鼠随机分 5 组: 假手术组、模型组、低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组, 每组 12 只, 假手术组游离左颈总动脉不结扎, 其余组均建立围产期 HIBD 大鼠模型, 低、中、高剂量治疗组 TSA 用量分别为 40 mg/kg、80 mg/kg、160 mg/kg, 通过行为学指标观察新生大鼠造模后行为改变, 用荧光定量 PCR 方法检测各组 HIF-1 α 的表达, HE 染色方法观察脑组织病理变化, HIF-1 α 原位免疫组织化学标记染色, 显微镜下进行阳性表达对比。结果: 假手术组大鼠前后行为无差别, 其余各组均出现行为异常, 与模型组比较, 治疗组的行为恢复快, 且 TSA 剂量越高, 恢复越好。与假手术组比较, 模型组 HIF-1 α 基因表达明显增多 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 治疗组 HIF-1 α 基因表达更多, 且剂量越高, HIF-1 α 表达量越多, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: TSA 可能通过上调 HIF-1 α 的表达来保护脑组织, 且保护作用和 HIF-1 α 的表达量呈正相关; 在一定范围内增加 TSA 的剂量, 可以提高 HIF-1 α 的表达。

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤 (HIBD); 丹参酮 IIA (TSA); 低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 12-0016-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.12.005

Tanshinone IIA Has Effect on Gene Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 α in Neonatal Rats with Hypoxic-ischemic Brain Damage

CHEN Chen, WANG Liling

Abstract: **Objective:** To observe the clinical effect of tanshinone IIA (Tanshinone IIA, TSA) for gene expression of hypoxia-inducible factor-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α , HIF-1 α) in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (Hypoxia ischemic brain damage, HIBD). **Methods:** Divided seven-day-old SD rats randomly into 5 groups: the sham operation group, the model group, the low-dose treatment group, the medium-dose treatment group, the high-dose treatment group, 12 rats in each group. The sham operation group was given no ligature for free left common carotid artery, while other groups were built HIBD model. The doses of TSA in the low-, medium- and high-dose treatment groups were

[收稿日期] 2018-05-06

[作者简介] 陈晨 (1988-), 女, 住院医师, 研究方向: 中医儿科。

[通信作者] 王利玲, E-mail: wangliling721008@163.com。