

通络止痛凝胶治疗膝骨关节炎的实验研究

陈谱¹ 阮安民¹ 周俊¹ 张晓哲¹ 宗晨钟¹ 王庆甫^{1△}

[摘要] **目的:**观察对比通络止痛方两种不同制剂对膝骨关节炎家兔模型滑膜炎的影响。**方法:**取 32 只成年雄性家兔随机分为 4 组,即空白对照组、膝骨关节炎(KOA)模型组、超声促透通络止痛方治疗组及通络止痛凝胶外敷组,每组 8 只。空白对照组不予处理,其余 3 组均予改良 Hulth 法建立 KOA 模型。8 周后开始超声促透通络止痛方及外敷通络止痛凝胶治疗,每周治疗 3 次,连续治疗 3 周,随后处死家兔收集各组家兔血清、滑膜。使用 ELISA 法检测各组血清中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 PGE2 含量;qPCR 及 Western Blot(WB)法检测各组滑膜中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 的表达量;苏木精-伊红(HE)染色观察各组家兔滑膜炎性程度变化。**结果:**HE 结果显示 KOA 模型组相较于空白对照组,其滑膜炎性浸润明显;超声促透组与凝胶外敷组在治疗后滑膜炎性程度均有明显减轻,滑膜厚度减少。ELISA 提示模型组血清中炎性致痛因子 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 PGE2 显著提高,差异有统计学意义($P<0.01$),而予以超声促透及凝胶外敷后均呈明显下降趋势,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);qPCR 及 WB 结果显示模型组 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 显著高表达,差异有统计学意义($P<0.01$),而超声促透及凝胶外敷治疗可以显著逆转其表达,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**通络止痛凝胶外敷可有效抑制 KOA 家兔滑膜炎,并与超声促透通络止痛方疗效相似,是治疗 KOA 的潜在治疗方式。

[关键词] 通络止痛方;凝胶外敷;膝骨关节炎;滑膜炎

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)09-0001-05

Research Study of Tongluo Zhitong Gel for Synovial Inflammation of Rabbit Knee Osteoarthritis

CHEN Pu¹ RUAN Anmin¹ ZHOU Jun¹ ZHANG Xiaozhe¹ ZONG Chenzhong¹ WANG Qingpu^{1△}

¹Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100009, China.

Abstract Objective: To observe and compare the effects of two different preparations of Tongluo Zhitong on synovial inflammation in rabbits knee osteoarthritis(KOA). **Methods:** Thirty-two adult male rabbits were randomly and averagely divided into the control group, the KOA model group, the ultrasound penetration Tongluo Zhitong recipe treatment group and the Tongluo Zhitong gel external application group. Except for the control group, others were all established with the Hulth method for the KOA model. After 8 weeks, ultrasound penetration Tongluo Zhitong recipe treatment group and Tongluo Zhitong gel external application group were treated 3 times per week for 3 weeks. Then all rabbit serum and synovium were collected. ELISA method was used to detect the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2 in serum of each group; qPCR and WB methods were used to detect the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and TLR4 in synovium of each group. HE staining was used to check the degree of synovitis. **Results:** The HE results showed that the synovial inflammatory infiltration was more obvious in the KOA model group than that in the control group. The synovial inflammation was significantly reduced and the synovial thickness was reduced in the ultrasound penetration group and the gel external application group. ELISA showed that the serum inflammatory pain factors IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2 in the model group

were significantly increased ($P<0.01$), and these cytokines were significantly decreased after ultrasound penetration and gel external application ($P<0.01$). qPCR and WB results showed that IL-1 β , IL-6, TNF- α , and TLR4 were significantly overexpressed in the KOA model group ($P<0.01$), while ultrasound penetration and gel external application could sig-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373662)

北京中医药大学自主课题项目(2019-JYB-XS-232)

¹ 北京中医药大学第三附属医院(北京,100009)

[△]通信作者 E-mail: qingfu-wang@sohu.com

nificantly inhibit their expression($P<0.01$). **Conclusion:** Tongluo Zhitong gel external application can effectively inhibit the inflammation of KOA rabbit synovium, and it is similar to the effect of ultrasonic penetration Tongluo Zhitong recipe, and is a potential treatment measure for KOA.

Keywords: Tongluo Zhitong; gel external application; knee osteoarthritis; synovial inflammation

膝骨关节炎(KOA)是常见的肌肉骨骼退行性疾病^[1-4],有研究指出滑膜炎可视作 KOA 的先兆病症^[5]。通络止痛方是北京中医药大学三附院王庆甫教授治疗 KOA 的经验方,但其在临床中需要超声电导仪配合使用,不利于患者携带。通络止痛凝胶是在原方基础上结合现代制药技术制成一种凝胶,可直接外敷患处,而其是否可替代超声促透用于临床,目前仍不明确。故本实验在兔 KOA 模型中验证通络止痛方凝胶的疗效并与超声促透进行对比,探索治疗 KOA 的新剂型。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

本实验所需家兔均于中国中医科学院医学动物实验中心饲养,由北京科宇动物养殖中心提供雄性成年家兔 32 只,体质量(2.5 ± 0.5)kg,合格证号为 SCXK(京)2018-0010。适应性喂养 1 周随机将家兔分为 4 组,每组 8 只,即空白对照组、KOA 模型组、超声促透通络止痛方治疗组以及通络止痛凝胶外敷组。所有家兔均以同样饲养条件喂养,饲养实验室采取无菌通风,温度(21 ± 3)℃,相对湿度 $55\%\pm5\%$,12 h 照明。

1.2 动物造模与干预

空白对照组不予处理;其余 3 组家兔均使用 10% 水合氯醛(北京拜尔迪生物公司)麻醉,予以改良 Hulth 法^[6]制作 KOA 家兔模型,切断右膝关节内侧副韧带、内侧半月板及前交叉韧带,术后逐层缝合,连续注射抗生素 3 d 以预防感染。造模后每日驱赶家兔 30 min,8 周后以空气栓塞法处死空白对照组及 KOA 模型组家兔,其余两组分别使用超声促透通络止痛方剂及通络止痛凝胶外敷治疗 3 周,每周治疗 3 次。超声促透时用胶带将家兔固定于兔台上以避免麻药对血液动力学指标的影响。超声促透参数及计量参见文献^[7]。通络止痛凝胶所需计量采取人与动物体表面积换算公式计算得出,每次为 1 mL。超声促透通络止痛方及通络止痛凝胶制备所需药物均由北京中医药大学第三附属医院中药房提供,超声促透及凝胶外敷操作图片见附件材料 1。治疗结束后处死 2 组家兔。

1.3 样本采集及检测指标

1.3.1 样本采集 收集各组家兔血液及滑膜,使用低温离心机以 3 000 r/min 离心 5 min 后收集血清;将滑膜组织随机分为 2 份,一份滑膜组织置于 10% 福尔马

林溶液固定,随后进行石蜡包埋、切片;一份用于检测各组滑膜组织中炎性因子 mRNA 及蛋白含量。将血清及另一份滑膜组织均放入-80℃冰箱冻存备检。

1.3.2 滑膜组织苏木精-伊红染色 取于福尔马林溶液中固定的滑膜组织,包埋切片后予以苏木精-伊红染色,光镜下观察滑膜组织中炎症浸润情况。

1.3.3 血清中炎性致痛因子表达量 使用 ELISA 法检测各组血清中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 PGE2 含量,操作步骤严格按照 ELISA 法试剂盒(江苏酶标,中国)中操作说明书执行。

1.3.4 qPCR 法检测家兔滑膜中炎性因子 mRNA 表达量 使用 qPCR 法检测各组家兔膝关节滑膜组织中炎性因子 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 的 mRNA 表达水平。各组家兔取 10 mg 滑膜组织,眼科剪剪碎后加入 1 mL 的 TRIzol,匀浆机匀浆后于 4℃静置 10 min 并加入 200 μ L 氯仿,混匀后 12 000 r/min 离心 15 min,取上层水相并加入相同体积的异丙醇,再次离心 15 min 后弃上清,加入 1 mL 的 85% 乙醇,7 500 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入 20 mL DEPC 水,混匀后 60℃金属浴 5 min,随后用分光光度仪检测各组滑膜中 mRNA 浓度。按逆转录试剂盒(南京诺唯赞)说明书程序设定将 mRNA 逆转录为 cDNA,加入上下游引物、水及 mix 荧光染料(南京诺唯赞)后以 10 μ L 体系上级检测各组滑膜炎性因子 mRNA 表达量。所需引物序列参见表 1,使用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法对检测数据进行处理。

表 1 引物序列

炎性因子	引物序列	碱基数
IL-1 β	F:CCGTGGACCTTCCAGGATGA	20
	R:GGGAACGTCACACACCAGCA	20
IL-6	F:ACCAACAGTTTGTGGAGGAGTT	25
	R:GTACACTTGCAGACCCCGAC	23
TNF- α	F:CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	20
	R:TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	20
TLR4	F:CAGAAATCTGGGAGCCCTGT G	21
	R:CAGTTTCTTGGTTGAGAAGG GA	22
β -Actin	F:GCATCCCCAAAGTCCCCAAA	20
	R:GTCACATGGCATCTCACGAT	20

注:F 为上游引物;R 为下游引物。

1.3.5 Western Blot 法检测滑膜组织中炎性因子蛋白表达变化 使用 WB 检测各组家兔膝关节滑膜组织中炎性因子 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 的蛋白表

达水平。各组滑膜取 10 mg 滑膜组织,剪碎后加入 200 μ L 蛋白裂解液和 PMSF 混合液(北京索莱宝),匀浆机匀浆后于 4 $^{\circ}$ C 静置 30 min,于 12 000 r/min 离心 15 min,取上清。使用 BCA 蛋白浓度试剂盒(Thermo Scientific,美国)对各组滑膜蛋白浓度进行测定,向各组上清中加入四分之一体积的 Loading Buffer(Thermo Scientific,美国),混匀后 95 $^{\circ}$ C 金属浴 5 min,分装保存。根据目的蛋白分子量大小选取合适浓度(8%~12%)的分离胶,加入各组蛋白进行电泳,随后进行半干转,5%奶粉封闭 1 h 后使用 TBST 清洗,加入一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,再次清洗后加入二抗,随后加入 ECL 上机显影。IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 一抗均买自于美国 CST 公司。

1.4 统计学方法

使用 SPSS22.0 软件对数据进行分析,使用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料。两组间比较,若数据正态分布且方差齐性

使用非配对 t 检验;正态分布但方差不齐用 Welch's 校正非配对 t 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

在整个实验过程中,KOA 模型组因造模过程中麻醉不耐受死亡 1 只,其余各组正常,造模三种家兔伤口愈合良好,无感染、伤口红肿等不良反应。超声促透组与凝胶外敷组家兔均未见皮肤红肿等过敏现象。

2.2 各组家兔滑膜苏木精-伊红染色结果

如图 1 所示,正常组滑膜较薄,只有 1~3 层细胞,细胞数较少,分布规则,无明显毛细血管增生;KOA 模型组滑膜细胞显著增多,细胞排列紊乱,毛细血管增生,滑膜厚度加大,其内大量滑膜炎性细胞浸润。超声促透组与凝胶外敷组治疗后膝关节滑膜较 KOA 模型组滑膜厚度明显减少,毛细血管增生减少,细胞排列较规则,滑膜炎性程度明显减轻。

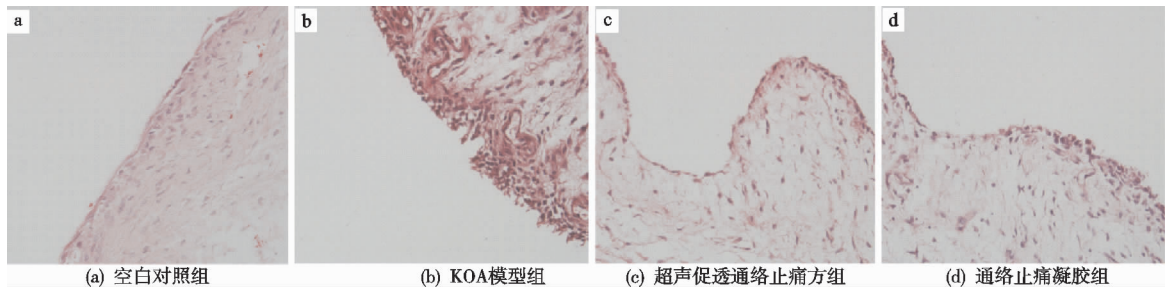


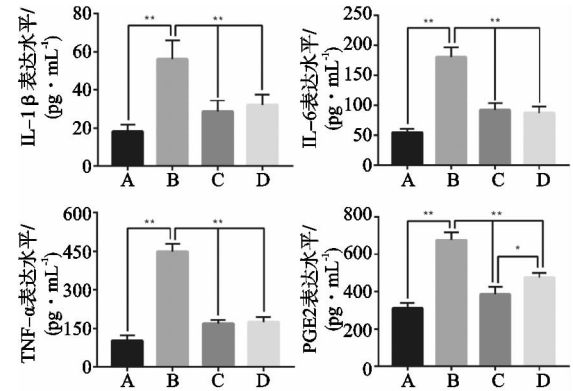
图 1 各组家兔右膝关节滑膜组织苏木精-伊红染色结果(400 \times)

2.3 各组家兔血清 ELISA 检测结果

使用 ELISA 法检测各组家兔血清中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 PGE2 含量,结果如图 2 所示。相比于空白对照组,KOA 模型组造模后血清中炎症致痛因子 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 PGE2 显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。在予以超声促透通络止痛方及外敷通络止痛凝胶后,两组血清中炎症致痛因子均较 KOA 模型组低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。超声促透通络止痛方及外敷通络止痛凝胶两组间在 IL-1 β ,IL-6 及 TNF- α 上未见明显差异;而在 PGE2 上,超声促透组优于凝胶外敷组($P < 0.05$)。

2.4 各组家兔滑膜 qPCR 检测结果

使用 qPCR 法检测各组家兔滑膜中炎症因子 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 的 mRNA 表达水平,结果如图 3 所示。KOA 模型组中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 的 mRNA 表达显著高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);而超声促透通络止痛方及通络止痛凝胶外敷可以逆转 KOA 模型中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 的 mRNA 表达量($P < 0.01$);超声促透组与凝胶外敷组在抑制炎症因子表达上无明显差异。



注: A 空白对照组; B KOA模型组; C 超声促透通络止痛方组; D 通络止痛凝胶组。 $P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$ 。

图 2 各组家兔血清中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 PGE2 含量

2.5 各组家兔滑膜 Western Blot 检测结果

使用 Western Blot 法检测各组家兔滑膜中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 的蛋白表达水平,结果见图 4。相比于空白对照组,KOA 模型组滑膜中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 的蛋白水平显著高表达($P < 0.01$);在予以超声促透通络止痛方及通络止痛凝胶外敷治疗后,IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 含量明显降低($P < 0.01$),且两治疗组间无明显差异。

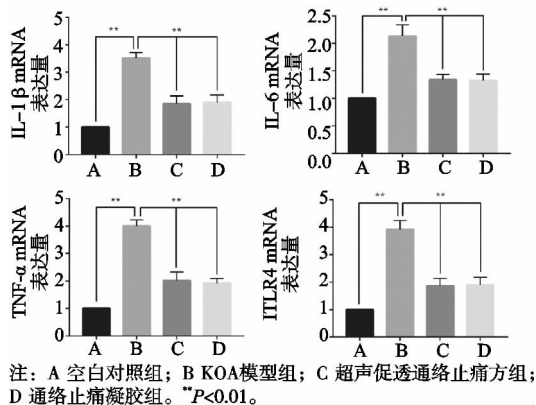


图3 各组家兔滑膜中 IL-1β, IL-6, TNF-α 及 TLR4 mRNA 表达量

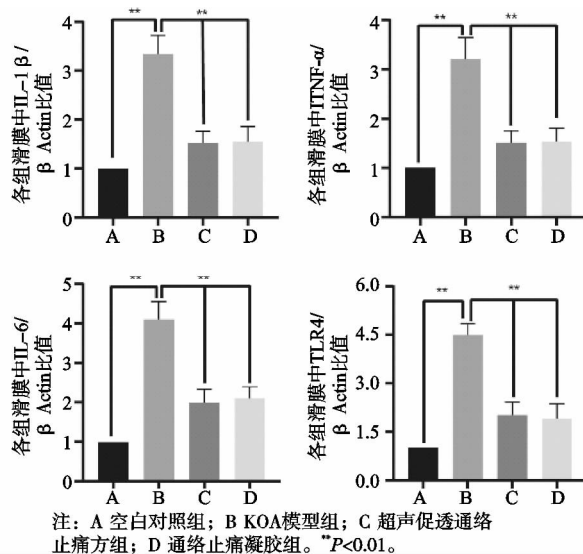
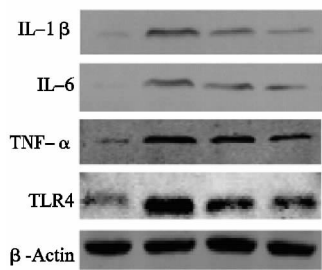


图4 各组家兔滑膜中 IL-1β, IL-6, TNF-α 及 TLR4 蛋白含量

视^[11-13]。有研究指出滑膜以及脂肪垫在关节内可以视为一个解剖功能单位,在外界的刺激下,两者可以相互作用刺激炎症因子的释放,进而加速软骨退变^[14]。另有研究显示髌下滑膜垫与滑膜会刺激膝关节周围神经敏化,进而在膝关节介导疼痛^[15]。Athkorala 等^[5]对 133 例 Kellgren-Lawrence 分级为 0 级的膝关节炎高危患者进行了长达 4 年的随访,所有患者每年均进行放射学和非 MRI 检查膝关节,4 年后膝关节正侧位 X 线片显示 K-L 分级 ≥ 2 的膝关节记为阳性,结果发现在出现软骨损伤的影像学特征之前均先出现滑膜炎,提示滑膜炎是 KOA 的先兆病征。Guermazi 等^[16]进行了一项多中心研究,对 444 例患者膝关节通过增强磁共振(CEMRI)扫描,观察滑膜炎与软骨损伤之间的关系,结果发现滑膜炎与软骨损伤具有极强的相关性。此外,本团队前期^[4,13]通过观察不同大鼠膝骨关节炎滑膜及软骨损伤程度,并测定先天免疫受体分子 TLRs/NF-κB 信号通路关键因子 TLR2, TLR4, MyD88, NF-κB 等表达量,推测滑膜可以通过先天免疫系统引起软骨损伤,从而加重 OA 病理变化,因此如何抑制 OA 过程中的滑膜炎可能是治疗 OA

3 讨论

尽管目前治疗膝骨关节炎的方法众多,但并无一种有效的治疗方法可以逆转或中止 KOA 的发展趋势。膝关节置换作为治疗终末期 KOA 的金方法,仍然存在术后疼痛、功能康复不理想、假体磨损、返修等并发症^[1,8-10]。因此,如何延缓 KOA 发展,阻止中早期 KOA 过早发展为终末期 KOA,一直是骨科医师的研究重点。

软骨损伤曾经被认为是导致 OA 进展的关键病因,然而随着研究的深入,滑膜以及脂肪垫等膝关节周围软组织在 OA 进程中发挥的作用越来越受到重

的关键要素。IL-1β, IL-6 和 TNF-α 在 OA 的进展过程中起重要作用。IL-1β 和 IL-6 是白介素家族中的成员,会刺激 PGE2 和 NO 等炎症致痛因子的生成^[17]。TNF-α 会刺激基质金属蛋白酶(MMPs)的合成,从而诱导软骨细胞 II 型胶原蛋白降解,加速软骨细胞外基质丢失^[18]。TLRs 介导的滑膜细胞固有免疫应答是导致 OA 滑膜炎进展的关键环节^[4]。因此,观察家兔滑膜中 IL-1β, IL-6, TNF-α 及 TLR4 的表达以观察通络止痛凝胶对 KOA 滑膜炎的疗效。

通络止痛凝胶是本团队将通络止痛方结合现代制药技术研制所得,将通络止痛方包含的中药浓缩液、细粉、桂皮醛脂质体与卡波姆基质等按规定比例混匀制成的一种新型治疗 KOA 制剂,并成功申请专利(ZL201810315891.8)。通络止痛方是北京中医药大学第三附属医院治疗关节炎的经验方,方含桂枝、白芍、桃仁、红花、制草乌、细辛、乳香、没药、牛膝、川椒,具有通络止痛、祛风利湿、补益肝肾之效。前期研究结果显示桂枝、白芍有效成分桂皮醛、白芍总苷可以抑制人滑膜成纤维细胞增殖并促进其凋亡^[19-21];可以抑制滑膜成纤维细胞中 TLR2, TLR4, IL-1β, MMP-13 的

表达从而达到抑制滑膜炎的作用^[22]。动物实验证明超声促透通络止痛方可以抑制大鼠 KOA 模型中滑膜炎症,延缓软骨退变,减少 KOA 模型膝关节液中 IL-1 β ,TNF- α ,NO 等炎症因子的含量^[7,23]。临床实验也证明超声促透通络止痛方相较于传统中药热敷组可以更加有效地提高患者功能评分,减轻患者疼痛^[24]。然而由于超声促透通络止痛方需要电导仪配合使用,患者很难携带及自行使用,限制了其在临床中的应用。而通络止痛凝胶可以直接外敷于患处,极大方便患者携带与使用,解决了因使用困难导致通络止痛方难以应用于临床的难题,且动物实验证明通络止痛凝胶外敷可以延缓软骨退变,改善 KOA 模型膝关节肿胀程度,抑制滑膜炎症^[25]。但与超声促透通络止痛方相比,通络止痛凝胶外敷是否有类似的治疗 KOA 疗效,并代替超声促透通络止痛方应用于临床,增加便携性,方便患者使用,促进中医药在临床中的应用,目前仍不明确。

本研究在动物层面对比了超声促透通络止痛方与通络止痛凝胶外敷治疗 KOA 滑膜炎症的疗效,结果显示两者均可抑制 KOA 模型滑膜炎症,降低血清中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 PGE2 含量,同时抑制滑膜中 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 表达。虽然超声促透组在 PGE2 上稍优于凝胶外敷组,但在 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 及 TLR4 上两者未见明显差异,提示通络止痛凝胶外敷具有与超声促透通络止痛方类似的治疗 KOA 疗效,延缓 KOA 病程进展。

综上所述,通络止痛凝胶外敷可抑制 KOA 家兔滑膜炎症,且与超声促透通络止痛方相比,两者疗效相当,是潜在的治疗 KOA 的新型制剂。

参考文献

- [1] HAWKER G A. Osteoarthritis is a serious disease[J]. Clin Exp Rheumatol,2019,37(Suppl):3-6.
- [2] 阮安民,陈谱,周俊,等.聚乙二醇沉淀法提取关节液来源外泌体实验研究[J].中国中医骨伤科杂志,2020,28(3):1-4.
- [3] 王欢,王庆甫,张栋,等.微小 RNA 网络控制及其在骨关节炎中的分子机制研究进展[J].中国中医骨伤科杂志,2017,25(3):77-82.
- [4] 王欢,王庆甫,石鑫超,等.TLRs 与 NF-kB 在大鼠骨关节炎滑膜中的表达及意义[J].中国中医骨伤科杂志,2016,24(6):4-8.
- [5] ATUKORALA I,KWOH C K,GUERMAZI A,et al. Synovitis in knee osteoarthritis: a precursor of disease? [J]. Ann Rheum Dis,2016,75(2):390-395.
- [6] ROGART J N,BARRACH H J,CHICHESTER C O. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage,1999,7(6):

- 539-547.
- [7] 戚晴雪,马玉峰,吴忌,等.低频超声促透通络止痛方对大鼠不同程度膝骨关节炎的影响[J].南京中医药大学学报,2014,30(3):244-248.
- [8] CHEN P,HUANG L,MA Y,et al. Intra-articular platelet-rich plasma injection for knee osteoarthritis: a summary of meta-analyses[J]. J Orthop Surg Res,2019,14(1):385.
- [9] GIOE T J,NOVAK C,SINNER P,et al. Knee arthroplasty in the young patient:survival in a community registry [J]. Clin Orthop Relat Res,2007,464:83-87.
- [11] D'APUZZO M,WESTRICH G,HIDAKA C,et al. All-cause versus complication-specific readmission following total knee arthroplasty[J]. J Bone Joint Surg Am,2017,99(13):1093-1103.
- [11] LIU-BRYAN R. Synovium and the innate inflammatory network in osteoarthritis progression[J]. Curr Rheumatol Rep,2013,15(5):323.
- [12] BHATTARAM P,CHANDRASEKHARAN U. The joint synovium:a critical determinant of articular cartilage fate in inflammatory joint diseases[J]. Semin Cell Dev Biol,2017,62:86-93.
- [13] WANG H,WANG Q,YANG M,et al. Histomorphology and innate immunity during the progression of osteoarthritis:does synovitis affect cartilage degradation? [J]. Journal of Cellular Physiology,2018,233(2):1342-1358.
- [14] MACCHI V,STOCCO E,STECOCO C,et al. The infrapatellar fat pad and the synovial membrane: an anatomofunctional unit[J]. J Anat,2018,233(2):146-154.
- [15] BELLUZZI E,STDCCO E,POZZUOLI A,et al. Contribution of infrapatellar fat pad and synovial membrane to knee osteoarthritis pain [J]. Biomed Res Int,2019:6390182.
- [16] GUERMAZI A,HAYASHI D,ROEMER F W,et al. Synovitis in knee osteoarthritis assessed by contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI) is associated with radiographic tibiofemoral osteoarthritis and MRI-detected widespread cartilage damage:the MOST study[J]. J Rheumatol,2014,41(3):501-508.
- [17] CHEN P,RUAN A,ZHOU J,et al. Extraction and identification of synovial tissue-derived exosomes by different separation techniques[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research,2020,15(1):97.
- [18] WANG Y Y,XU J J,ZHANG X D,et al. TNF-alpha-induced LRG1 promotes angiogenesis and mesenchymal stem cell migration in the subchondral bone during osteoarthritis[J]. Cell Death Dis,2017,8(3):e2715.
- [19] 王欢,王庆甫,唐学章,等.白芍总苷对滑膜成纤维细胞增殖、凋亡及周期影响的实验研究[J].天津中医药,2017,34(12):841-844.