

加味开心散对多因素神经损伤痴呆小鼠学习记忆能力的影响

史乙伟, 陈云, 刘梦秋, 刘培, 宿树兰, 段金赓, 钱大玮*, 朱悦*

(南京中医药大学药学院江苏省方剂研究重点实验室, 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 研究加味开心散对多因素神经损伤痴呆小鼠学习记忆能力的影响及作用机制。方法 利用多因素神经损伤构建痴呆小鼠模型, 给以加味开心散水提物与水醇共提物, 以石杉碱甲(0.05 mg/kg)作为阳性对照药物, 连续灌胃 10 d; 采用 Morris 水迷宫与主动避暗实验等行为学实验, 评价加味开心散对多因素神经损伤痴呆小鼠学习记忆能力的影响。同时测定受试小鼠大脑皮层中胆碱酯酶(ChE)、超氧化物歧化酶(SOD)活力, 神经生长因子(NGF)及其前体蛋白表达水平, 探索其作用机制。结果 行为学测试结果显示加味开心散可明显缩短小鼠 Morris 水迷宫定位导航潜伏期, 增加空间探索中穿越平台次数, 减少上台前游泳距离; 降低主动回避实验中明暗箱穿梭错误次数。降低 ChE 活性, 提高 NGF 的表达水平。水醇共提物效果优于水提物。结论 加味开心散可明显增强多因素神经损伤痴呆小鼠的学习记忆能力, 其作用的机制可能与抑制乙酰胆碱降解, 提升神经因子表达有关。

关键词:加味开心散; 多因素神经损伤痴呆小鼠模型; 学习记忆

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2017)01-0044-05

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0044

Research of Jiawei Kaixin San on Improving Learning and Memory Abilities of Multiple Neuronal Damage Induced Dementia Mice

SHI Yi-wei, CHEN Yun, LIU Meng-qiu, LIU Pei, SU Shu-lan, DUAN Jin-ao, QIAN Da-wei*, ZHU Yue*

(School of Pharmacy, Key Laboratory for Modern Research of Traditional Chinese Medicine of Jiangsu, Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nation and Local Union Project Research Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Innovative Drug from TCM Formulae and Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effect of Jiawei Kaixin San(JWKXS) on learning and memory abilities of multiple neuronal damage induced dementia mice and explore its mechanism. **METHODS** Dementia mice model was established via multiple neuronal damages, then the model mice were treated with water extracts, and water and ethanol combined extracts of JWKXS for 10 d, while huperzine (0.05 mg/kg) was applied as positive drug. The abilities of learning and memory were evaluated by behavioral tests, such as Morris water maze test and active avoidance test. In addition, cholinesterase(ChE) activities, superoxide dismutase(SOD) and protein expression levels of nerve growth factor(NGF) with its precursor in cerebral cortex of model mice were detected. **RESULTS** Behavioral tests showed JWKXS obviously shortened the incubation time of navigation and positioning, increased the times across platform and decreased swimming distances in Morris water maze test. In active avoidance test, the shuttle error numbers of model mice decreased with the treatment of JWKXS. In cerebral cortex, ChE activities were down-regulated while NGF levels were up-regulated. The effects of water and ethanol combined extract were better than the water extracts. **CONCLUSION** JWKXS can significantly improve the learning and memory ability of dementia mice induced by multiple neuronal damage. Its mechanism might be related to the inhibition of acetylcholine degradation and up-regulation of nerve factor expression.

KEY WORDS: Jiawei Kaixin San; the multi-factor damage dementia mice model; learning and memory

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD), 又称老年痴呆症, 在老龄化疾病中, 发病率与死亡率日渐

增高。临床早期最显著的症状为记忆力受损、掌握运用新知识与社交能力下降等认知障碍, 并伴随有

收稿日期: 2016-05-27; 修稿日期: 2016-09-28

基金项目: 江苏省高校自然科学重大项目(15KJA360002); 国家自然科学基金(81303190); 江苏省自然科学基金(BK20141462); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A070); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(YSXK-2014); 江苏省大学生创新训练计划项目(201510315086x); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心资助项目(FJGJS-2015-10)

作者简介: 史乙伟(1989—), 女, 山东烟台人, 南京中医药大学 2014 级硕士研究生。* 通信作者: qiandw@163.com; zhuky@njucm.edu.cn

抑郁、情感淡漠或焦躁不安、注意力涣散等精神障碍^[1]。发病机制可归结为因衰老所致脑内损伤因素,如氧化损伤、铁中毒、铝中毒导致胆碱能神经系统损害,产生意识障碍^[2]。目前,阿尔茨海默症尚无彻底根治,有效的前期预防,或延缓疾病进程,显得尤其重要。临床药物主要有胆碱酯酶抑制剂、谷氨酸受体阻断剂、自由基清除剂、抗氧化剂、雌激素等。这些药物均有较为严重的副作用,限制了其临床应用。

加味开心散由人参、远志、石菖蒲、茯苓、郁金、麦冬、五味子、栀子、银杏叶提取物等组成,在古代治疗“好忘”的高频率应用方剂“开心散”与“生脉散”的基础上合方加味形成用治老年痴呆症的实验方剂^[3]。因此,我们拟建立多因素神经损伤小鼠痴呆模型,从行为学与生化指标评价加味开心散对动物学习记忆能力的影响,比较不同提取方法获得提取物的效用差异,为进一步探索功效物质基础与新药开发提供方向。

1 材料

1.1 实验动物

健康 SPF 级昆明小鼠,雄性,体质量(35±5)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2016-0016。

1.2 实验药物

人 参 (*Panax ginseng* C. A. Mey., 批号:140927)、远志 (*Polysgal tenuifolia* Willd., 批号:141220)、石菖蒲 (*Acorus tatarinowii* Schott, 批号:140908)、茯苓 (*Poria cocos* (Schw.) Wolf, 批号:150414)、麦冬 (*Ophiopogon japonicus* (L.f) Ker-Gawl., 批号:150422)、五味子 (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.)、郁金 (*Curcuma wenyujin* Y.H. ChEn et C. Ling, 批号:150418)、栀子 (*Gardenia jasminoides* Ellis, 批号:150412) 购自苏州市天灵中药饮片有限公司,经南京中医药大学中药鉴定教研室严辉副教授鉴定。银杏叶提取物购自邳州金龙化工有限公司。

1.3 实验试剂

无水氯化铝 (D1503115), 七水合硫酸亚铁 (E1508057), D-半乳糖 (GJ01JBOH), 东莨菪碱 (P1096858), 石杉碱甲 (F1517037), 均购自阿拉丁试剂有限公司。小鼠胆碱酯酶 (ChE) 试剂盒 (A023)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (A001-3), 均购自南京建成生物工程研究所。BCA 试剂盒购

自 Thermal Fischer 公司。NGF 抗体 (H-20) 购自 Santa Cruz 公司。 α -tubulin 抗体 (T9026) 购自 Sigma-Aldrich 公司。Bradford 试剂盒 (T9310A) 购自 TAKARA 公司。ECL 化学发光试剂盒购自 Promega 公司。其余试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.4 实验仪器

Morris 水迷宫视频跟踪分析系统与主动避暗分析系统购自上海吉量软件科技有限公司。蛋白印迹分析系统购自 Bio-RAD 公司。酶标仪 (Inspire) 购自 Perkin Elmer 公司。

2 方法

2.1 药物制备

加味开心散药材提取物的制备:分别取适量人参、远志、石菖蒲、茯苓、郁金、麦冬、五味子、栀子药材,加入 8 倍量纯水,浸泡 1 h,同时提取挥发油,回流提取 2 h,滤过。再加入 6 倍量纯水,继续回流提取 2 h,滤过,合并 2 次滤液。将滤液浓缩至密度为每 1 mL 含 1.8 g 生药的浸膏,动物给药前将浸膏加入银杏叶提取物与挥发油,混悬均匀制成加味开心散水提物 (JK-W)。水提后药渣用 70% 乙醇重复上述操作继续提取 2 次,合并水提液与醇提液,浓缩至密度为每 1 mL 含 1.8 g 生药的浸膏。动物给药前将浸膏加入银杏叶提取物,混悬均匀制得加味开心散水醇共提物 (JK-WE)。两种均利用高效液相串联阵列二极管检测器 (HPLC-DAD),选择方中药材具有活神经活性的指标性成分,参照 2015 版《中国药典》与《香港中药材标准》(第五册)相关标准^[4-5]建立了含量测定方法与提取物质控标准。其中,JK-W 含京尼平苷 2.381 mg/g,远志口山酮 0.835 mg/g,3,6-二芥子酰基蔗糖酯 0.877 mg/g,五味子醇甲 0.306 mg/g, β -细辛醚 0.319 mg/g, α -细辛醚 0.022 mg/g;JK-WE 含京尼平苷 3.597 mg/g,远志口山酮 1.004 mg/g,3,6-二芥子酰基蔗糖酯 1.240 mg/g,五味子醇甲 0.426 mg/g, β -细辛醚 0.319 mg/g, α -细辛醚 0.022 mg/g。

2.2 小鼠多因素损伤痴呆模型建立与给药

取健康雄性昆明小鼠 70 只,适应性饲养 5 d 后,随机分为 7 组,每组 10 只。分为空白组、模型组、阳性组、JK-W 低剂量组、JK-W 高剂量组、JK-WE 低剂量组、JK-WE 高剂量组。除空白组外,其余各组小鼠每日灌胃和腹腔注射无水氯化铝 ($AlCl_3$, 3.3 mg/kg)、七水合硫酸亚铁 ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)。

O, 50 mg/kg)、D-半乳糖(D-gal, 120 mg/kg)、东莨菪碱(SCOP, 0.33 mg/kg), 空白组给予常规饮水和饲料, 连续 4 周^[6]。实验动物用相同饲料喂养, 所使用的器皿均为非铝制品。造模 4 周后, 空白组和模型组小鼠每天灌胃 0.9% 的生理盐水, 阳性组给予石杉碱甲(0.05 mg/kg), 加味开心散各给药低剂量组为 6 g/kg、银杏叶提取物 13.3 mg/kg, 高剂量组为 18 g/kg、银杏叶提取物 40 mg/kg。给药 10 d。

2.3 行为学测试

给药 3 d 后, 进行连续 6 d 的 Morris 水迷宫实验, 测试其空间记忆能力。水温控制在(20±1)℃, 水深 30 cm, 水面高出站台 0.5 cm。将小鼠背对站台放入水池, 自由游泳 60 s。60 s 内若小鼠找不到平台, 引导其找到平台, 并保持 10 s。小鼠每天从 4 个不同象限入水训练, 保持平台和周围物体位置固定不变, 连续训练 4 d。第 5 天进行定向航行试验, 时间设定为 90 s, 未找到平台者按 90 s 算。第 6 天进行空间探索试验, 撤除站台, 时间设定为 90 s, 拍摄记录小鼠游泳轨迹全过程。以各组小鼠潜伏期、上台前路程、站台穿越次数等作为衡量学习与记忆指标成绩。每项测试进行 2 次, 取平均值作为成绩。

水迷宫试验结束 24 h 后, 进行明暗箱实验, 以光作为条件刺激, 以电(50 Hz, 36 V, 1 s)作为非条件刺激, 以小鼠潜伏期、错误次数和穿梭次数为指标来衡量小鼠学习与记忆能力。

2.4 小鼠大脑皮层 ChE、SOD 活力测定

行为学测试结束后, 处死小鼠, 解剖获得大脑, 分取完整皮层, 液氮迅速冷冻, 粉碎。称取相应质量的组织, 制备匀浆, 按照 ChE 与 SOD 试剂盒所列步骤, 测定 ChE 与 SOD 活力。

2.5 Western blot 检测 NGF 及其前体蛋白的表达

取解剖所得小鼠大脑皮层, 加入组织裂解液(10 mmol/L HEPES, pH7.5, 1 mol/L NaCl, 1 mmol/L

EDTA, 1 mmol/L EGTA, 0.5% Triton X-100, 5 mmol/L benzamidine HCl, 10 mol/L aprotinin, 10 mol/L leupeptin)裂解并抽提总蛋白。利用 Bradford 试剂盒测定蛋白浓度后, 取总蛋白 60 mg 上样, 利用 15% SDS-PAGE 电泳分离后, 转至 PVDF 膜(4℃, 40 min)。0.5% BSA 室温封闭 2 h 后, 分别用 NGF 抗体(1:2 000)与 α -tubulin 抗体(1:10 000)4℃孵育过夜。再与 HRP 偶联第二抗体(1:5 000)室温孵育 1 h 后, ECL 化学发光显色, 凝胶成像检测, 利用 ImageJ 软件分析条带的光度值, 以 α -tubulin 作为样品内参。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计分析, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 加味开心散提取物对多因素神经损伤痴呆小鼠学习与记忆行为的影响

多因素神经损伤造模 4 周后, 小鼠出现食欲不振、精神萎靡、毛皮失去弹性与光泽等现象。给药 10 d 后, Morris 水迷宫行为学测试显示, 与正常组小鼠比较, 模型组小鼠潜伏期与上台路程显著高于正常组($P < 0.05 \sim 0.01$), 站台穿越次数明显少于正常组($P < 0.05$); 主动回避实验显示模型小鼠穿梭次数、错误次数较正常组显著增加($P < 0.01$)。说明多因素神经损伤造成了小鼠记忆与学习能力下降。给予加味开心散提取物后, 与模型组比较, 小鼠潜伏期与上台路程均明显降低($P < 0.05 \sim 0.01$), 站台穿越次数显著提升($P < 0.05 \sim 0.01$), 说明加味开心散可以显著改善损伤小鼠的学习和记忆能力。2 种提取物中, 以 JK-WE 高剂量组效果为好($P < 0.01$)。各组行为学指标比较见表 1~2。

表 1 加味开心散对多因素神经损伤痴呆小鼠 Morris 水迷宫行为学的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	潜伏期/s	站台穿越次数	上台前路程/m
正常组	—	43.99±7.62	1.35±0.27	5.54±0.72
模型组	—	60.56±7.27 [△]	0.85±0.24 [△]	10.24±0.95 ^{△△}
石杉碱甲组	5×10 ⁻⁵	34.93±7.15**	2.05±0.50**	7.81±0.76*
JK-W 组	6	40.76±8.18*	1.30±0.26*	7.13±1.11*
	18	54.87±4.64	1.20±0.42*	7.69±0.76*
JK-WE 组	6	46.28±1.32*	1.85±0.34**	5.85±0.69**
	18	26.39±3.24**	2.15±0.24**	2.40±0.65**

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 2 加味开心散对多因素神经损伤痴呆小鼠主动回避行为学的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	潜伏期/s	穿梭次数	错误次数
正常组	—	55.58±3.36	5.38±0.85	2.54±0.19
模型组	—	12.17±1.41 ^{△△}	14.00±1.41 ^{△△}	6.67±0.47 ^{△△}
石杉碱甲组	5×10 ⁻⁵	43.27±1.61 [*]	8.06±1.50 [*]	3.78±0.84 [*]
JK-W 组	6	28.23±4.40 [*]	10.76±0.63 [*]	5.19±0.38
	18	43.44±4.05 [*]	9.94±1.98 [*]	4.83±0.71 [*]
JK-WE 组	6	65.17±5.19 ^{**}	7.76±1.71 [*]	3.76±0.67 [*]
	18	71.07±4.07 ^{**}	6.38±1.58 ^{**}	3.10±0.33 ^{**}

注:与正常组比较,△△*P*<0.01;与模型组比较,**P*<0.05,***P*<0.01。

3.2 加味开心散提取物对多因素神经损伤痴呆小鼠大脑皮层 ChE 与 SOD 活力的影响

模型组小鼠大脑皮层 ChE 活力明显高于正常组,SOD 活力明显低于正常组(*P*<0.05)。阳性药石杉碱甲可显著降低 ChE 活力(*P*<0.01)。加味开心散提取物中,JK-WE 高剂量组显著降低 ChE 活力(*P*<0.01)。JK-W 高剂量组可提高 SOD 活力。提示水提物与水醇共提物的作用靶点各有侧重。结果见图 1~2。

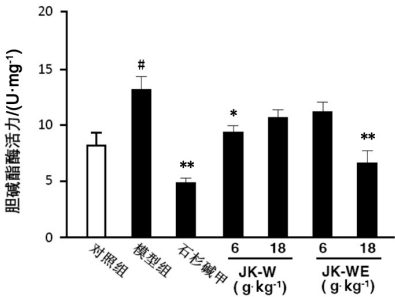


图 1 加味开心散对多因素神经损伤痴呆小鼠大脑皮层 ChE 活力的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

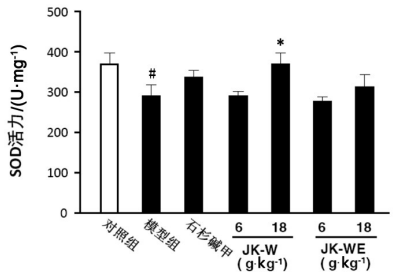


图 2 加味开心散对多因素神经损伤痴呆小鼠大脑皮层 SOD 活力的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.3 加味开心散提取物对多因素损伤痴呆小鼠大脑皮层 NGF 及其前体表达的影响

模型组小鼠 proNGF 表达较正常组升高,而 mNGF 表达下降(*P*<0.05)。此趋势可被石杉碱甲给药逆转。与模型组相比,JK-WE 提取物可显著下调 proNGF 表达而上调 mNGF 表达(*P*<0.05)。计

算成熟体与前体蛋白的表达比值,可以发现,多因素神经损伤可阻碍 proNGF 转变为 NGF,此趋势可被石杉碱甲与 JK-WE 提取物逆转,提示加味开心散可影响 NGF 的合成过程。结果见图 3。

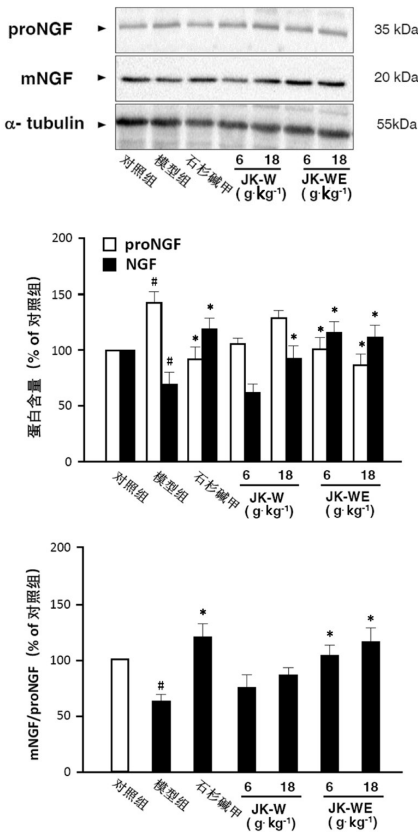


图 3 加味开心散对 NGF 合成的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

4 讨论

AD 是一种多因素复杂性疾病,其具体机理尚未完全得到揭示。本研究综合应用东莨菪碱阻断胆碱受体、D-半乳糖致脑老化、铝和铁损伤等多种造模方式,模拟 AD 乙酰胆碱分泌不足、神经元氧化损伤、金属摄入损伤等病理环节,避免了单一损伤造模的偏颇。行为学测评上采用水迷宫实验与主动回避实验,可全面评价动物空间学习记忆能力与非陈述性

记忆能力。先进行水迷宫实验,后进行主动回避实验,可将主动回避实验电击干扰动物学习记忆成绩的可能降至最低程度。

抗神经氧化损伤与抑制 ChE 活性是开发 AD 治疗药物的常用评价指标。近年研究证实,提升神经生长因子水平也是 AD 治疗药物开发的重要评价指标。AD 患者脑内神经生长因子合成受阻,水平下降,神经生长因子前体蛋白表达增加,引发神经凋亡,妨碍胆碱能神经健康生长^[7]。前期研究发现,开心散可以显著提升神经生长因子及其相关受体的表达^[8-10]。加味开心散亦具有较好的作用,结合其抗氧化以及抑制 ChE 活性能力,充分体现了复方多环节、多靶点综合效用特点。同时,受试动物海马区上述指标检测的变化趋势与皮层检测结果一致。

中医典籍描述的“痴呆”“好忘”,与 AD 极为相似。中医与神志有关的疾病,多从“心”论治。AD 病位在脑,也与五脏之首的心密切相关。中医认为,“心者,君主之官,神明出焉”“脑为元神之府”,心脑相关,共主神明^[7]。老年痴呆患者多由年老体弱,导致心气虚损,痰浊上阻,日久化瘀,清窍被蒙,渐致智力不复,神志不宁。加味开心散在开心散(人参、远志、石菖蒲、茯苓)与生脉散(人参、麦冬、五味子)基础上加味形成,取开心散补益心气,逐痰开窍,益智安神之功;采生脉散益气生津,敛阴止汗之长;辅以郁金、银杏叶化瘀通脉,活血醒脑;栀子泻火除烦^[3,11]。诸药相协,能奏益气养阴,化痰祛瘀,益智安神之功。

加味开心散传统以汤剂形式给药,但方中郁金中的姜黄素,五味子中的五味子甲素与五味子乙素,银杏叶中黄酮类成分等对神经系统具有显著活性的效用成分,均为脂溶性成分。比较水提物与水提醇提混合物效用后发现,水提醇提混合物较水提物在行为学评测、抑制 ChE 活性与神经生长因子表达方面效用更强。但 SOD 活力,水提醇提混合物效用不及水提物,提示水提物与醇提物成分在此指标方面可能存在拮抗。我们将继续优化全方的提取方式,尤其是提取溶剂的水醇比例,来加以改善。此外,我们将方中的银杏叶药材替换为银杏叶标准提取物进行研究。该提取物是 AD 患者常用推荐用药,且其质控标准为现行 2015 版《中国药典》收载,将为加味

开心散后续的新药开发提供便利。

参考文献:

- [1] CHAN KY, WANG W, WU JJ, et al. Epidemiology of alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis[J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2016-2023.
- [2] 王维治. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 249-251. WANG WZ. Neurology[M]. Beijing: People's medical publishing house, 2001: 249-251.
- [3] 谢娟. 基于数理统计的老年期痴呆方组方配伍规律研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009. XIE J. Formulating Rules of Senile Dementia Based on Statistical Analysis[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2009.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015. Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: Volume I [S]. Beijing: China medical science press, 2015.
- [5] 香港卫生署. 香港中药材标准[S]. 香港: 中华人民共和国香港特别行政区卫生署, 2015. Hong Kong Department of Health. Hong Kong Chinese Materia Medica Standards[S]. Hong Kong: The department of health of the Hong Kong special administrative region of the People's Republic of China, 2015.
- [6] 魏伟. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 320-321. WEI W. Experimental Methodology of Pharmacology[M]. Beijing: People's medical publishing house, 2010: 320-321.
- [7] CUELLO AC, BRUNO MA. The failure in NGF maturation and its increased degradation as the probable cause for the vulnerability of cholinergic neurons in Alzheimer's disease[J]. Neurochem Res, 2007, 32(6): 1041-1045.
- [8] ZHU KY, MAO QQ, IP SP, et al. KXS alleviating the depression-like symptoms of chronic stress induced rats by modulating the neurotransmitters and neurotrophic factor systems[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 149256.
- [9] ZHU KY, XU SL, CHOI RC, et al. Kai-Xin-San, a Chinese herbal decoction containing ginseng radix et rhizoma, polygalae radix, acori tatarinowii rhizoma, and poria, stimulates the expression and secretion of neurotrophic factors in cultured astrocytes[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 731385.
- [10] 段袖珠, 段金厥, 朱悦, 等. 开心散配伍比例对慢性压力应激抑郁小鼠皮层与海马神经营养因子系统调控的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(2): 142-148. DUAN XZ, DUAN JA, ZHU Y, et al. Research of compatible ratio of Kai-Xin-San on regulation of neurotrophic factor system in cortex and hippocampus on chronic unpredictable mild stress induced depressive mice[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2016, 32(2): 142-148.
- [11] 姚耿训, 安宜沛, 潘光明, 等. 浅析开心散在双心疾病治疗中的应用[J]. 成都中医药大学学报, 2015, 38(4): 83-85. YAO GZ, AN YP, PAN GM, et al. Experience of using Kai-xin Powder to treat double heart disease[J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 2015, 38(4): 83-85.

(编辑: 杨巍敏)