

大黄附子汤含药血清对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞 JAK2/STAT3 信号通路的影响

吴丽^{1,2,3}, 蔡宝昌^{1,2,3*}, 刘晓^{1,2,3}, 蔡皓^{1,2,3}, 郑仕中¹, 李媛^{1,2,3}

1. 南京中医药大学药学院 药理学教研室, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023

3. 南京中医药大学 国家中医药管理局中药炮制标准重点研究室, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 探讨大黄附子汤含药血清对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响及其机制。**方法** 制备小鼠重症急性胰腺炎模型, 取其腹腔巨噬细胞分成模型组、大黄附子汤含药血清(2.5%、5.0%、10.0%)组、酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490 (10 $\mu\text{mol/L}$) 阳性对照组, 细胞继续培养 2 h 后, 各给药组给予相应含药血清、对照组给予空白血清 0.5 mL, 培养 24 h, 收集上清液。ELISA 法检测细胞上清液中肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)水平, Western blotting 法检测 pJAK2、pSTAT3 基因和蛋白表达水平。**结果** 大黄附子汤能显著减少大鼠腹腔巨噬细胞分泌的 IL-6、TNF- α , 抑制 pJAK2、pSTAT3 基因及蛋白的表达。**结论** 大黄附子汤含药血清可能通过降低 pJAK2、pSTAT3 基因和蛋白的表达, 阻断 JAK2/STAT3 信号转导通路, 抑制腹腔巨噬细胞分泌 IL-6、TNF- α , 从而减轻机体过度的炎症反应和重症急性胰腺炎的病情。

关键词: 大黄附子汤; 重症急性胰腺炎; 腹腔巨噬细胞; JAK2/STAT3 信号转导通路; IL-6; TNF- α

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)22-3195-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.018

Effects of serum containing Dahuang Fuzi Decoction on JAK2/STAT3 signal pathway in mice with severe acute pancreatitis

WU Li^{1,2,3}, CAI Bao-chang^{1,2,3}, LIU Xiao^{1,2,3}, CAI Hao^{1,2,3}, ZHENG Shi-zhong¹, LI Huan^{1,2,3}

1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract Objective To study the effects of serum containing Dahuang Fuzi (Rhubarb and Aconite) Decoction (DFD) on JAK2/STAT3 signal pathway in mice with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** SAP model in mice was constructed, and then the peritoneal macrophages were vaccinated into the culture plate to set model group, serum containing DFD groups (2.5%, 5%, and 10%), AG490 (10 $\mu\text{mol/L}$) positive group, and peritoneal macrophages of normal mice acted as normal control group. After an incubation of 2 h, cells were added with serum containing DFD at different concentration or AG490 0.5 mL, 24 h later, the concentration of TNF- α and IL-6 in supernatant were determined by quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, mRNA and protein expression levels of JAK2 and STAT3 in cells were evaluated by Western blotting. **Results** DFD could significantly decrease the levels of cytokines TNF- α and IL-6 in the supernatants, inhibit the mRNA and protein expression levels of JAK2 and STAT3 in peritoneal macrophages of SAP mice. **Conclusion** DFD could inhibit the JAK2/STAT3 signal pathway and inflammatory responses in peritoneal macrophages of SAP mice.

Key words: Dahuang Fuzi Decoction; severe acute pancreatitis; peritoneal macrophage; JAK2/STAT3 signal pathway; IL-6; TNF- α

收稿日期: 2013-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073022); 江苏省中医药局科技项目(LZ11190); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(2011ZYYX4-006); 江苏省研究生科研创新计划项目(CXZZ11_0788)

作者简介: 吴丽(1976—), 女, 硕士, 讲师。E-mail: wuli87107@163.com

*通信作者 蔡宝昌 E-mail: bccai@126.com

重症急性胰腺炎是胰酶提前激活引起自身消化所致的急性化学炎症性疾病。该病起病急、进展快,其并发症发生率达65%,病死率达34%~53%,全胰坏死率>90%^[1]。在重症急性胰腺炎进展过程中,病变胰腺组织作为抗原或炎症刺激物激活腹腔巨噬细胞,腹腔巨噬细胞作为机体免疫系统的重要组成部分,其持续激活后产生的大量活性氧及多种细胞因子,不仅是加重胰腺损伤的直接原因,也是疾病从胰腺局部迅速发展为全身炎症反应综合征甚至多器官功能衰竭的关键所在^[2]。

Janus 激酶2/信号转导与转录激活子3(JAK2/STAT3)信号通路是肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)介导炎症反应共有的细胞内信号通路^[3-4],其通过启动一系列炎性介质基因转录及蛋白表达的变化,形成炎症反应瀑布效应,被认为是机体炎症反应启动的“总开关”。有效调节该信号通路,可能遏制炎症反应早期的瀑布式放大,防止组织急性炎症损伤的发生。

大黄附子汤由大黄、附子、细辛组成,具有温阳止痛、通腑化瘀的功效。方中大黄性苦寒,可荡涤肠胃、推陈出新、通利水谷;附子、细辛性温热,散寒止痛、温运脾胃。三者合用,寒热并投,刚柔并用,使脏腑通畅、气血调和、邪去正安、危病得愈,是中医临床治疗重症急性胰腺炎等急危重症的常用方剂。本课题组前期研究显示,大黄附子汤能抑制胰酶释放、保护腺泡细胞、抑制多种细胞因子释放,减轻胰腺损伤^[5-6]。然而上述作用是否与调节腹腔巨噬细胞功能、减轻机体炎症反应有关鲜见报道。本实验探讨大黄附子汤含药血清对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞JAK2/STAT3信号通路的影响,为明确大黄附子汤治疗重症急性胰腺炎的作用机制提供实验依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

大黄,产地甘肃,批号001004495;附子(黑顺片),产地四川,批号101232825;细辛,产地辽宁,批号101002533,均购自北京同仁堂饮片有限责任公司,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定分别为药用大黄 *Rheum officinale* Baill.的根茎,毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 干燥母根,马兜铃科华细辛 *Asarum sieboldii* Miq.全草。参照《中国药典》2010年版I部检查或测定项下的方法,测定饮片中指标成分的量或限量成分。结果大黄按干

燥品计算,含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的总量不少于1.5%;附子中生物碱不少于1.0%;细辛中细辛脂素不少于0.05%、马兜铃酸I不超过0.001%。

RPMI 1640 培养粉、胎牛血清, Gibco 公司;雨蛙素、脂多糖(LPS)、酪氨酸磷酸化抑制剂AG490, Sigma 公司; Trizol, Invitrogen 公司; cDNA 第一链合成试剂盒、Taq DNA Polymerase, Fermentas 公司; TNF- α 、IL-6 试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司; pJAK2、pSTAT3 多克隆抗体, 美国 Santacruz 公司产品。

1.2 动物

Balb/c 小鼠, 雄性, 清洁级, 体质量 18~22 g, 由南京中医药大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(沪)2007-0005。SD 大鼠, 雄性, 清洁级, 体质量 180~220 g, 由南京中医药大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(沪)20080033。

1.3 仪器

SW—CJ—1G 型超净工作台, 苏州净化设备有限公司; MCo—20AIC 型 CO₂ 培养箱, 日本 Sanyo 公司; A1301026 型低温高速离心机, 上海艾测电子科技有限公司; Synekgy HT 型酶联免疫检测仪, 美国 BIO-Tek 公司; CKX—31 型生物显微镜, 日本 Olympus 公司; DYY—6B 型核酸电泳仪, 北京六一公司; Gel Doc XR 型凝胶成像仪, 美国 BIO-RAD 公司。

2 方法

2.1 大黄附子汤制备

50 g 附子加 500 mL 水浸泡 30 min 后先煎煮 30 min; 在煎煮附子的同时将大黄 37.5 g 与细辛 12.5 g 加 8 倍量水浸泡 30 min, 然后同附子共同煎煮 15 min, 滤过, 滤渣加 8 倍量水煎煮 30 min, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩至 100 mL, 相当于生药 1.0 g/mL, 经南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心进行 HPLC 分析, 建立指纹图谱确认其主要化学成分^[7]。

2.2 大黄附子汤含药血清的制备

SD 大鼠适应环境 7 d 后, ig 给予大黄附子汤(生药 2.4 g/kg), 给药体积 10 mL/kg, 每天给药 2 次, 第 2 天晚上给药后, 大鼠禁食不禁水, 第 3 天早上给药后 2 h 颈总动脉取血, 分离血清, 0.45 μ m 滤膜滤过, 56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 30 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3 模型制备^[8]

取 Balb/c 小鼠 10 只, 禁食 18 h, 连续 6 次 ip

雨蛙素 20 $\mu\text{g/kg}$, 每次间隔 1 h, 在末次 ip 雨蛙素的同时 ip 脂多糖 10 mg/kg 。另取 2 只小鼠作空白对照, 用生理盐水代替雨蛙素和脂多糖, 同法 ip 给药。造模 6 h 后取腹腔巨噬细胞进行后续实验。

2.4 腹腔巨噬细胞的制备与分组和给药

小鼠眼眶放血后颈椎脱臼处死(减少血细胞干扰), 放入 75%乙醇中浸泡 2~3 min, 腹腔注入 6~8 mL 冰中预冷的无菌磷酸盐缓冲液(PBS, 含肝素 10 U/mL、10%胎牛血清), 轻揉腹部 1~2 min, 静置 5 min。无菌条件下打开腹腔, 吸取腹腔液于离心管中, 1 000 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清液收集巨噬细胞, 用上述 PBS 洗涤细胞 2 次, 用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞至 $5\times 10^5/\text{mL}$, 以每孔 1 mL 接种于 24 孔板。细胞设模型组(10.0%空白血清)、大黄附子汤含药血清(2.5%、5.0%、10.0%, 以空白血清稀释)组、AG490(10 $\mu\text{mol/L}$, 以 10.0%空白血清稀释)阳性对照组、对照组(正常小鼠的腹腔巨噬细胞, 空白血清 10.0%), 每组 3 个复孔, 细胞置 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养 2 h, 各组加入相应的含药血清的或空白血清, 继续培养 24 h, 收集上清液, 待测。

2.5 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6 水平

按照 ELISA 试剂盒说明书方法操作, 检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 水平。

2.6 RT-PCR 法检测 pJAK2 和 pSTAT3 基因表达

Trizol 法提取腹腔巨噬细胞总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 RNA 纯度及完整性。28S 亚基 RNA 的量为 18S 亚基 RNA 量的 2 倍, 且 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0 内较理想。根据 A_{260} 的值计算样品总 RNA 质量浓度。从每个完整的总 RNA 样本中分别取 10 μL , 稀释成 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 经 Quant 逆转录酶逆转录成 cDNA 第一条链。

以适量 cDNA 为模板, 以 GAPDH 为内参照, PCR 扩增 pJAK2 和 pSTAT3 基因片段。根据文献及应用 Primer Primer Design 5.0 软件进行引物设计。各基因序列: pJAK2 正向引物 5'-TTTGGATCCCTGGATACATACCTGA-3', 反向引物 5'-TGGCACACACATTCCCATGA-3'; pSTAT3 正向引物 5'-TGGGTCTGGCTAGACAAT-3', 反向引物 5'-CGTTGGTGTACACAGAT-3'; GAPDH 正向引物 5'-GGTATGGGTCAGAAGGACTCC-3', 反向引物 5'-TGATCTTCATGGTGCTAGGAGCC-3。循环参数: pJAK2, 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 65 $^\circ\text{C}$

退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; pSTAT3, 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, 64 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环。取 5 μL PCR 产物, 在 Tris-硼酸缓冲液(TBE)缓冲液中进行 1%琼脂糖凝胶电泳(制胶时在 20 mL 琼脂糖溶液中滴入 10 mg/mL 溴化乙锭 2 μL), 电泳结束后凝胶成像仪拍照并进行图像分析, 以 GAPDH 的灰度比值表示各基因的相对表达量。

2.7 Western blotting 法检测 pJAK2 和 pSTAT3 蛋白表达

向细胞中加入 1 mL 细胞裂解液(含 50 mmol/L Tris Cl, 150 mmol/L NaCl, 0.125%去氧胆酸钠, 1% NP240, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 1 $\mu\text{g/mL}$ 抑肽酶, 1 $\mu\text{g/mL}$ 亮抑蛋白肽酶, 1 $\mu\text{g/mL}$ 胃蛋白酶抑制剂), 冰上放置 40 min, 待细胞充分裂解后, 4 $^\circ\text{C}$ 、15 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为蛋白样本, Bradford 法测定蛋白的量。

取等量的蛋白样本, 进行 10% SDS-PAGE 电泳(分离胶 8%, 浓缩胶 3%), 电泳结束后将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 依次加兔抗小鼠 pJAK2 和 pSTAT3 多克隆抗体、 β -actin 单抗, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜, 加辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(1:5000), 室温避光孵育 60 min, TBS 洗; DAB 显色。用 Odyssey 双色红外荧光扫描系统进行检测及灰度分析, 以目标蛋白显色条带与 β -actin 条带的灰度比值作为目标蛋白的相对表达量。

2.8 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞分泌 IL-6 和 TNF- α 的影响

与对照组相比, 模型组小鼠腹腔巨噬细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6 水平显著升高($P<0.01$)。与模型组相比, 大黄附子汤含药血清组 TNF- α 和 IL-6 分泌量显著减少($P<0.05$ 、0.01), AG490 也具有较弱的抑制 TNF- α 和 IL-6 分泌的作用($P<0.01$)。结果见表 1。

3.2 对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞 pJAK2 和 pSTAT3 基因表达的影响

与对照组相比, 模型组小鼠腹腔巨噬细胞 pJAK2 和 pSTAT3 基因表达明显上调($P<0.01$)。

与模型组相比, 大黄附子汤含药血清减少小鼠腹腔巨噬细胞 pJAK2 和 pSTAT3 基因的表达, 其中大黄附子汤 10.0% 含药血清的作用尤为显著 ($P < 0.01$), 且作用强度与 AG490 相当。结果见图 1、表 2。

表 1 大黄附子汤含药血清对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of serum containing DFD on TNF- α and IL-6 content in peritoneal macrophage in mice with SAP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数 / %	TNF- α / (ng·L ⁻¹)	IL-6 / (ng·L ⁻¹)
对照	—	10.70 ± 2.68	95.22 ± 28.62
模型	—	19.53 ± 2.83 ^{▲▲}	363.45 ± 50.98 ^{▲▲}
大黄附子汤	2.5	15.35 ± 1.84	314.63 ± 76.87
含药血清	5.0	12.58 ± 2.89*	250.74 ± 70.67*
	10.0	10.79 ± 3.66**	222.78 ± 41.87*
AG490	10 μ mol·L ⁻¹	11.60 ± 3.36**	158.17 ± 82.82**

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下表同

^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

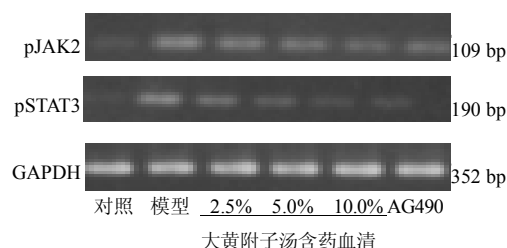


图 1 大黄附子汤含药血清对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞 pJAK2 和 pSTAT3 基因表达的影响

Fig. 1 Effects of serum containing DFD on mRNA Expression of pJAK2, pSTAT3 in peritoneal macrophage in mice with SAP

表 2 大黄附子汤含药血清对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞 pJAK2 和 pSTAT3 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of serum containing DFD on mRNA expression of pJAK2, pSTAT3 in peritoneal macrophage in mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数 / %	pJAK2/GAPDH	pSTAT3/GAPDH
对照	—	0.12 ± 0.04	0.07 ± 0.02
模型	—	0.40 ± 0.03 ^{▲▲}	0.30 ± 0.08 ^{▲▲}
大黄附子汤	2.5	0.35 ± 0.05	0.22 ± 0.03*
含药血清	5.0	0.29 ± 0.05*	0.19 ± 0.06*
	10.0	0.23 ± 0.04**	0.10 ± 0.03**
AG490	10 μ mol·L ⁻¹	0.20 ± 0.07**	0.07 ± 0.02**

3.3 对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞 pJAK2 和 pSTAT3 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组小鼠腹腔巨噬细胞中 pJAK2 和 pSTAT3 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 大黄附子汤 10.0% 含药血清组小鼠腹腔巨噬细胞中 pJAK2 蛋白表达显著下调 ($P < 0.05$); 而大黄附子汤含药血清 2.5%、5.0%、10.0% 组小鼠腹腔巨噬细胞中 pSTAT3 蛋白表达均显著下调 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见图 2、表 3。

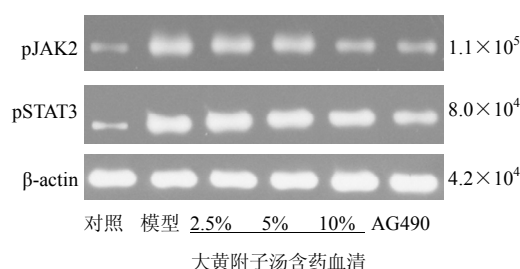


图 2 大黄附子汤含药血清对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞 pJAK2 和 pSTAT3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of serum containing DFD on protein expression of pJAK2, pSTAT3 in peritoneal macrophage of mice with SAP

表 3 大黄附子汤含药血清对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞 pJAK2 和 pSTAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of serum containing DFD on protein expression of pJAK2, pSTAT3 in peritoneal macrophage of mice with SAP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数 / %	pJAK2/β-actin	pSTAT3/β-actin
对照	—	0.21 ± 0.06	0.20 ± 0.07
模型	—	1.43 ± 0.34 ^{▲▲}	0.76 ± 0.14 ^{▲▲}
大黄附子汤	2.5	1.26 ± 0.15	0.71 ± 0.10
含药血清	5.0	1.04 ± 0.19	0.54 ± 0.11*
	10.0	0.99 ± 0.29*	0.32 ± 0.78**
AG490	10 μ mol·L ⁻¹	0.82 ± 0.16**	0.28 ± 0.08**

4 讨论

大黄附子汤治疗胰腺炎的效果显著, 一项 206 例患者的多中心、随机、对照临床研究结果显示, 大黄附子汤能显著缩短重症急性胰腺炎患者住院时间, 减少 28 d 内患者的死亡率, 并且降低住院医疗费用^[9]。

路小光等^[10-11]进行大黄附子汤治疗重症急性胰腺炎的动物体内实验, 探讨大黄附子汤对重症急性胰腺炎大鼠血清中细胞促炎因子与抗炎因子的影

响,结果显示,大黄附子汤通过下调 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-18 等促炎细胞因子的释放,清除循环中已产生的炎性因子,打断重症急性胰腺炎的“瀑布式”反应,重建促炎和抗炎细胞因子的平衡,进而减轻组织损伤,阻止重症急性胰腺炎的发生、发展。还有研究显示,大黄附子汤通过增加肠黏膜屏障功能、抑制内毒素及细菌移位等多种途径,达到治疗重症急性胰腺炎的目的^[12]。

本实验考察了大黄附子汤对重症急性胰腺炎小鼠腹腔巨噬细胞 JAK2/STAT3 信号通路的影响,结果显示,大黄附子汤能显著降低 pJAK2 和 pSTAT3 基因和蛋白的表达,抑制 JAK2/STAT3 信号通路的激活,进而减少 TNF- α 、IL-6 等炎症细胞因子的释放,减轻机体炎症反应。

大黄附子汤抑制炎症反应依赖于其吸收入血的主要药效成分,本课题组前期研究结果显示,大黄附子汤中吸收入血的主要成分包括大黄素、大黄酸、单酯型乌头生物碱等成分^[8,13]。因此影响腹腔巨噬细胞 JAK2/STAT3 信号通路的主要物质基础及量效、时效关系有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] 汪浩,郑海文,赵之青,等. 柴胡四黄汤对重症急性胰腺炎血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1582-1584.
- [2] Shrivastava P, Bhatia M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute ancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(32): 3995-4002.
- [3] 万劲松. CRP、IL-6 和 TNF- α 检测在急性胰腺炎中的临床意义 [J]. 当代医学, 2011, 17(7): 30-31.
- [4] Ivanenkov Y A, Balakin K V, Lavrovsky Y. Small molecule inhibitors of NF- κ B and JAK/STAT signal transduction pathways as promising anti-inflammatory therapeutics [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(1): 55-78.
- [5] 吴丽,刘 晓,蔡 皓,等. 大黄附子汤对重症急性胰腺炎大鼠 STAT3 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 933-937.
- [6] 吴丽,蔡 皓,吕高虹,等. 大黄附子汤对 BALB/c 细胞功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 176-179.
- [7] Li H, Guo H, Wu L. Comparative pharmacokinetics study of three anthraquinones in rat plasma after oral administration of *Radix et Rhei Rhizoma* extract and Dahuang Fuzi Tang by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2013, 76(25): 215-218.
- [8] Nakada S, Tsuneyama K, Kato I, et al. Identification of candidate genes involved in endogenous protection mechanisms against acute pancreatitis in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(3): 1342-1347.
- [9] Lu X G, Zhan L B, Kang X, et al. Clinical research of Dahuang Fuzi Decoction in auxiliary treatment of severe acute pancreatitis: a multi-center observation in 206 patients [J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(12), 723-728.
- [10] 路小光,战丽彬,曲明阳,等. 大黄附子汤对重症急性胰腺炎大鼠细胞因子的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(6), 352-354.
- [11] 路小光,战丽彬,康 新,等. 重症急性胰腺炎并发肺损伤促/抗炎症因子的变化及大黄附子汤的干预研究 [J]. 中华临床医师杂志, 2010, 4(11): 2098-2103.
- [12] 吴丽,吕高虹,刘 晓,等. 大黄附子汤对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障的影响 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2679-2681.
- [13] 郭 辉,刘 晓,蔡 皓,等. 大黄附子汤血清药物化学初步研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 528-531.