

· 临床论著 ·

慢性萎缩性胃炎薄白苔微生物的群落结构组成分析

王慧雯¹ 郭春荣¹ 李 莉² 李福凤¹ 周小芳¹ 邹 璐¹ 李 雪¹ 李 娜³ 孙祝美³

摘要 目的 分析慢性萎缩性胃炎(CAG)薄白苔微生物群落结构组成。**方法** 选择 CAG 患者组(30 例,均为薄白苔)和健康人对照组(健康组,30 名,均为薄白苔),采用 16S rRNA 基因测序技术对 CAG 患者薄白苔的菌群结构进行研究和分析。**结果** (1)健康人组和 CAG 患者组薄白苔中微生物优势菌结构组成相似。其中,在属分类水平上(相对含量 > 0.5%),薄白苔中优势菌属依次为链球菌属(21.85% ± 4.00%)、奈瑟氏菌属(14.98% ± 1.21%)、韦荣球菌属(6.30% ± 1.10%)、普雷沃菌属(3.92% ± 0.14%)、纤毛菌属(3.89% ± 1.53%)、莫拉菌属(0.64% ± 0.21%)等;(2)5 种菌属的含量在 CAG 患者组和健康组中存在显著差异。CAG 患者中的莫拉菌属、韦荣球菌属、纤毛菌属含量明显增加($P < 0.05$),链球菌属和拟普雷沃菌属显著减少($P < 0.01$, $P < 0.05$);(3)将优势菌群的含量前 35 名的菌属绘成热图发现,健康人组薄白苔中链球菌属、拟普雷沃菌属、普雷沃菌属-7 属、轮生菌属、糖化菌属含量明显居高;CAG 组薄白苔则以梭菌属、劳特罗普氏菌属、嗜沫杆菌属、口腔杆菌属、巨球形菌属、弯曲菌属、口腔毛绒厌氧杆菌属、纤毛菌属、韦荣球菌属的含量明显居高。**结论** CAG 患者薄白苔与健康人薄白苔具有相似的核心菌群骨架,但也存在一定的菌群结构差异,其可能与疾病发生有密切关系。

关键词 慢性萎缩性胃炎;薄白苔;16S rRNA

The Compositions of Thin White Tongue Coating Microorganisms in Chronic Atrophic Gastritis Patients WANG Hui-wen¹, GUO Chun-rong¹, LI Li², LI Fu-feng¹, ZHOU Xiao-fang¹, ZOU Lu¹, LI Xue¹, LI Na³, and SUN Zhu-mei³ 1 Teaching Experimental Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203); 2 Department of Gastroenterology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200021); 3 Department of Biology, College of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203)

ABSTRACT Objective To observe the compositions of microbial community of thin white tongue coating in chronic atrophic gastritis (CAG) patients. **Methods** Authors collected thin white tongue coating from CAG patients (30 cases) and healthy controllers (HC, 30 cases). The 16S rRNA gene sequencing technology was used to study the bacterial flora of thin white tongue coating. **Results** (1) The thin white tongue coating had similar compositions of advantageous microbial community in the two groups. Of them, the dominant bacteria of tongue coating at the genus level (the comparative content > 0.5%) were *Streptococcus* (21.85% ± 4.00%), *Neisserian* (14.98% ± 1.21%), *Veillonella* (6.30% ± 1.10%), *Prevotella* (3.92% ± 0.14%), *Leptotrichia* (3.89% ± 1.53%), and *Moraxella* (0.64% ± 0.21%). (2) Significant differences existed in the contents of 5 bacteria genera between the two groups. The relative contents of *Moraxella*, *Veillonella*, and *Leptotrichia* in CAG patients were significantly increased ($P < 0.05$) and the relative contents of *Streptococcus* and *Alloprevotella* in CAG patients were significantly reduced ($P < 0.01$, $P < 0.05$). (3) According to top 35 of the genus heatmap, the dominant bacteria were different between the HC group and the CAG group. The dominant bacteria in the HC group were *Streptococcus*,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81403273, 81373555); 上海市卫计委青年基金资助项目(No. 2014JQ028A)

作者单位: 1. 上海中医药大学教学实验中心(上海 201203); 2. 上海中医药大学附属曙光医院脾胃科(上海 200021); 3. 上海中医药大学基础医学院生物教研室(上海 201203)

通讯作者: 孙祝美, Tel: 021-51322585, E-mail: sunzhumei2000@126.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20190227. 127

Alloprevotella, *Prevotella-7*, *Oribacterium*, and unidentified-saccharibacteria. And the dominant bacteria in the CAG group were *Solobacterium*, *Lautropia*, *Aggregatibacter*, *Stomatobaculum*, *Megasphaera*, *Campylobacter*, *Lachnoanaerobaculum*, *Leptotrichia*, and *Veillonella*. Conclusions CAG patients and healthy people had similar basic bacterial structure of the thin white tongue coating. The different structure of microflora might be closely related to the occurrence and development of CAG.

KEYWORDS chronic atrophic gastritis; thin white tongue coating; 16S rRNA

舌诊是中医传统的诊疗方法,中医学理论认为“舌为心之外候,苔乃胃之明徵”,“凡肠胃有病,必现于舌苔”^[1]。舌苔是观察脾胃变化的“窗口”,可以通过观察舌质、舌苔的变化来了解人体的生理功能和病理变化^[2,3]。中医历来重视舌苔在辨证中的作用,因此舌苔的研究越来越受到人们的重视。中医诊断认为薄白苔指舌苔薄白而润,可为正常舌象,或为表征初起,或是里证病轻的舌象。吴正治等^[4]在对薄白苔的细胞化学研究中发现,虽然同为薄白苔,但是正常薄白苔和虚寒薄白苔在舌上皮细胞内化学成分含量具有显著差异,说明不同状态下薄白苔的物质基础并不相同。近年来,随着现代新的实验技术发展,对舌象的研究越来越深入,但是关于薄白苔的研究却非常少。慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)属于中医学“胃脘痛”的范畴,此病舌苔以薄白、黄腻或舌红少苔为主。CAG是由多种病因引起的以胃黏膜的慢性炎症和固有腺体萎缩,伴有胃黏膜上皮和腺体的肠化生为主要病理特征,以上腹部饱胀、疼痛、嗳气及食欲不振等为主要临床表现的一种慢性胃部疾病^[5]。本研究采用 16S rRNA 基因测序技术以 CAG 为切入点,对薄白舌苔的菌群进行基因测序并分析,以了解薄白舌苔菌落结构组成与特征。

资料与方法

1 诊断标准 参照 2012 年中华医学会消化病学分会制定的《中国慢性胃炎共识意见(2012 年,上海)》^[6],结合胃镜诊断与病理组织学诊断结果确诊为 CAG。

2 纳入和排除标准 纳入标准:(1)符合 CAG 西医诊断标准;(2)年龄 18~80 岁。排除标准:(1)合并胃息肉、胃出血、胃癌及肠道疾病患者;(2)合并严重的肝、心、肾、肺、脑等脏器疾病或精神病患者;(3)妊娠或准备妊娠妇女,哺乳期妇女;(4)过敏体质或多种药过敏的患者。剔除标准:(1)资料采集数据有缺失者;(2)DNA 提取量不足,无法支持后续测序者;(3)1 个月内服用抗生素者。

健康对照组纳入标准:选择无全身各系统器质性

病变,并排除近 1 个月内舌、口、鼻、咽等局部病变,舌质淡红、舌苔薄白而润者为健康人对照组。

3 舌苔分类标准 参照《中医诊断学》舌苔分类标准^[7]。于上海中医药大学附属曙光医院脾胃科病房及胃镜室进行样本采集,由 2 位中医师采用盲法判读舌象;同时采用 DKF-II 型舌面诊数字化分析仪(上海中医药大学自行研制)自动检测判读舌象。最后选用判读一致者。

4 一般资料 2015 年 9 月—2016 年 12 月在上海中医药大学附属曙光医院、岳阳医院就诊并确诊为 CAG 患者,舌苔为薄白苔者 30 例。健康人对照组 30 名,来源于上海中医药大学在校教师及学生。其中,CAG 薄白苔组(简称 CAG 组),男性 14 例,女性 16 例,年龄 32~74 岁,平均(48.23±15.53)岁;健康人对照组(简称 HC 组),男性 13 名,女性 17 名,年龄 27~56 岁,平均(44.21±8.72)岁。两组之间男女比例和年龄分布比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经上海中医药大学伦理委员会批准(No.2014 科研备一号)。

5 舌苔样本采集 嘱患者用 100 mL 生理盐水漱口 2~3 次后,使用消毒的金属小匙在患者舌苔较厚部位刮取适量舌苔样本,采集后立即置于碎冰中保存,待全部采样结束后,统一放置于 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。

6 Illumina HiSeq 测序方法 对舌苔微生物总 DNA 进行抽提,抽提后的 DNA 进行纯化,1% 琼脂糖电泳的方法对 DNA 进行定量, DNA 样品储藏在 -20℃ 冰箱待用。对细菌 16S rRNA 基因 V4 高变区进行扩增,引物序列如下:515F (GTGCCAGC-MGCCGCGGTAA) 和 806R (GGACTACHVGGGT-WTCTAAT), PCR 的设置如下:变性温度 95℃, 30 s, 30 循环,退火温度 55℃, 30 s, 30 循环,延伸温度 72℃, 30 s, 30 循环,最后终末延伸 72℃, 5 min。PCR 扩增后用 2% 琼脂糖电泳检测,然后上机后采用 Illumina HiSeq 平台进行测序。

7 数据的分析与统计

7.1 测序数据处理 采用 Illumina HiSeq 测序

平台得到原始数据,称为 **Raw PE**,进行拼接、质控、嵌合及过滤,得到可用于后续分析的有效数据,对所有样品的有效数据进行聚类,以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs,用 **GraphPad Prism5** 软件统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

对 OTUs 的代表序列进行物种注释,将样品中的 OTUs 按相对丰度由大到小排序得到对应的排序编号,利用 R 语言工具制作曲线图,以 OTUs 的排序编号为横坐标, OTUs 中的相对丰度为纵坐标,将这些点用折线连接,绘制得到等级聚类曲线 (**Rank Abundance** 曲线),可直观地反映样品中物种的丰富度和均匀度^[8]。

7.2 物种注释和相对丰度 根据 OTUs 得到物种注释结果,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据其结果,选取每个样品属水平 (**Genus**) 上丰度排名前 10 的物种,基于 **tax_summary_a** 文件夹中的数据表,利用 R 语言工具作图,生成物种相对丰度柱形累加图,以便直观查看各样品在不同分类水平上相对丰度较高的物种及其比例。

7.3 舌苔样本优势菌群对比 用 **GraphPad-Prism5** 软件统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,比较两组优势菌属含量。

7.4 分析物种丰度 根据物种注释的结果,通过 R 语言 **Vegan** 包来绘制 **Heatmap** 图。**Heatmap** 图是根据样本间丰度的相似性进行聚类,以颜色梯度不同来表征数据大小,在 **Heatmap** 图上,可见高丰度与低丰度物种分块聚集,直观地呈现群落物种组成信息。本研究 **Heatmap** 图的绘制,将优势菌群的数量扩大到前 35 名的菌属,根据样本在属水平的物种丰度信息,从物种和样本两个层面聚类,绘制成热图,越接近蓝色表示丰度越小,越接近红色则表示丰度越大。

结 果

1 舌苔样本的 Illumina HiSeq 测序数据及分析结果(图 1,表 1) **Illumina HiSeq** 测序中,7 例舌苔样本的 DNA 提取量不够无法支撑测序而剔除。53 例舌苔样本中 **CAG** 组 28 例和 **HC** 组 25 名。两组所测

得的原始数据数和总 OTUs 数相仿,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而有效数据两组略有不同,其中 **HC** 组的有效数据数比较多,但两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

采用 **Rank Abundance** 曲线直观反映舌苔菌落的丰富度和均匀度(图 1)。在水平方向上,物种曲线在横轴上的跨度逐渐扩大;在垂直方向上,曲线渐趋平缓,表明舌苔样本物种分布均匀,抽样充分,采集数量足够识别大多数舌苔中的细菌种类,可以进行数据分析。

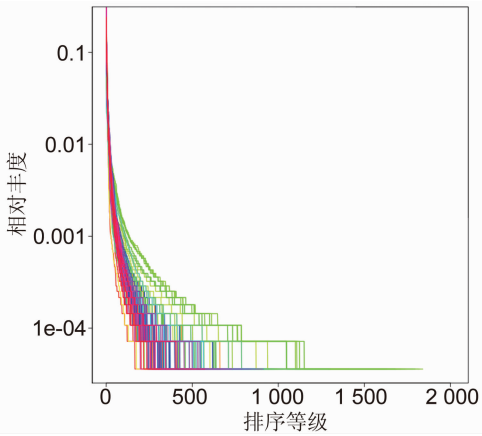


图 1 等级聚类曲线

2 苔样本优势物种相对丰度(图 2) 在属分类水平上(相对含量 $> 0.5\%$),薄白苔中优势菌属依次为链球菌属 ($21.85 \pm 4.00\%$)、奈瑟氏菌属 ($14.98 \pm 1.21\%$)、普雷沃菌属 ($3.92 \pm 0.14\%$)、莫拉菌属 ($0.64 \pm 0.21\%$)、韦荣球菌属 ($6.30 \pm 1.10\%$)、纤毛菌属 ($3.89 \pm 1.53\%$) 等。每个样品中的菌属含量不太相同,舌苔菌落结构中的优势菌属主要为链球菌属、奈瑟氏菌属、普雷沃菌属、韦荣球菌属、莫拉菌属等,构成了舌苔微生物菌落骨架结构。

3 舌苔样本优势菌群含量比较(表 2) 对比优势菌属在两组中的含量,结果显示有 5 种菌属的含量发生明显变化,分别为链球菌属、拟普雷沃菌属、莫拉菌属、韦荣球菌属、纤毛菌属。其中链球菌属属于在健康人口腔的定植菌所占比例最大。与 **HC** 组比较, **CAG** 组链球菌属和拟普雷沃菌属含量明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$);莫拉菌属、韦荣球菌属、纤毛菌

表 1 两组 Illumina HiSeq 测序数据预处理统计及质控数据预处理统计结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	原始数据数	有效数据数	总片段数	总 OTUs 数
HC	25	70 939 ± 6 658	67 081 ± 5 992	62 252 ± 9 518	827 ± 142
CAG	28	68 550 ± 9 816	61 624 ± 8 832	61 778 ± 9 130	803 ± 111

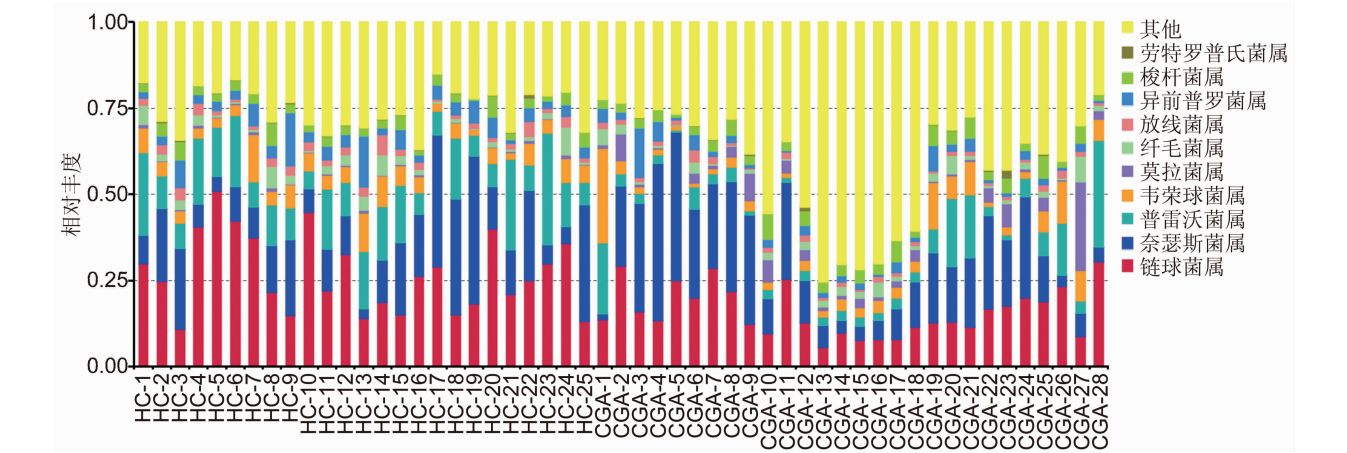


图2 属水平物种相对丰度表

表2 两组属水平优势菌群分布比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	链球菌属	奈瑟氏菌属	拟普雷沃菌属	莫拉菌属	韦荣球菌属	纤毛菌属
HC	25.18 ± 6.71	14.24 ± 1.24	4.15 ± 0.92	0.48 ± 0.01	4.62 ± 2.65	1.91 ± 0.84
CAG	18.76 ± 7.10 **	15.10 ± 2.78	3.82 ± 0.85 *	0.82 ± 0.10 *	7.46 ± 4.81 *	5.43 ± 1.41 *

注:与 HC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

属含量显著增加($P < 0.05$)。

4 舌苔样本最大丰度排名 Top35 的物种相对丰度(图3) 两个组别中丰度最大前 35 种菌属的表达量明显不同,HC 组以拟普雷沃菌属、链球菌属、普雷沃菌-7、轮生菌属、糖化菌属含量明显居高,且与 CAG 组差异明显;CAG 组则以梭菌属、劳特罗普氏菌属、嗜沫杆菌属、口腔杆菌属、巨球形菌属、弯曲菌属、口腔毛绒厌氧杆菌属、纤毛菌属、韦荣球菌属的含量明显居高并与 HC 组差异明显。

讨 论

在中医学四诊中,舌诊是最具有代表性的诊断方法之一,通过舌苔、舌质及舌态等方面的各种现象来获取诊断资料,从中发现规律,为辨证论治提供科学依据。

近些年来,随着宏基因组学的兴起,对微生态和疾病的联系的研究不断涌现出结果,人体微生物在心血管疾病^[9]与胰腺癌^[10]等疾病的发生与发展中起到不同程度的作用。有研究者认为,人体的生理病理代谢特性是人体基因与体内微生物种群的基因共同作用的结果^[11]。如赵立平课题组^[12,13]发现肠道菌群失调与肥胖息息相关,并成功分离出导致肥胖的细菌;Hullar MA 等^[14]及 Wong SH 等^[15]认为肠道微生物与癌症有密切关系,某些细菌菌种直接启动胃肠道恶性肿瘤。作为人体四大细菌聚集地之一的口腔,携带最为多样化的微生物族群,包括 Bacteroidetes, Spiro-

cheates, Firmicutes 等^[16],在人体的健康、疾病、药物代谢等过程中都起着重要作用。孙静华等^[17]则发现,包括 CAG 患者的胃癌前病变患者的口腔中龈下菌斑的细菌多样性略高于健康人。研究表明,舌苔中的微生物族群结构特征与疾病密切相关^[18],中医薄白苔指舌苔薄白而润,可为正常舌象,或为病症初起或病症较轻的舌象。那么同为薄白苔,在健康状态(HC 组)和疾病状态(CAG 组)的菌群结构有何不同?在本研究中采用 16S rRNA 基因测序方法来研究薄白苔群落结构组成,分析健康人和 CAG 患者的薄白苔的菌群差异。

16S rRNA 位于原核细胞核糖体小亚基上,包括 10 个保守区域和 9 个高变区域,其中高变区具有属或种的特异性,随亲缘关系不同而有一定的差异。因此,通过对 16S rRNA 进行扩增和测序,可以揭示生物物种的特征核酸序列,通常是选择某个高变区域,利用通用引物进行 PCR 扩增,然后对高变区进行测序分析和菌种鉴定,16S rRNA 基因测序技术是研究细菌群落组成结构的重要手段^[19,20]。16S rRNA 扩增子测序技术可以做作为揭示生物物种的特征核酸序列,被认为是最适于细菌系统发育和分类鉴定的指标^[21]。该技术被证实是研究菌群结构的一种有效手段,在揭示菌群遗传多样性和种群差异方面具有独特优势;以 DNA 的序列多样性反映物种的多样性,从而克服培养方法的局限性,可以比较客观、全面、快速地分析菌群的结构组成,可以实现对同一菌群结构随着疾病发生发

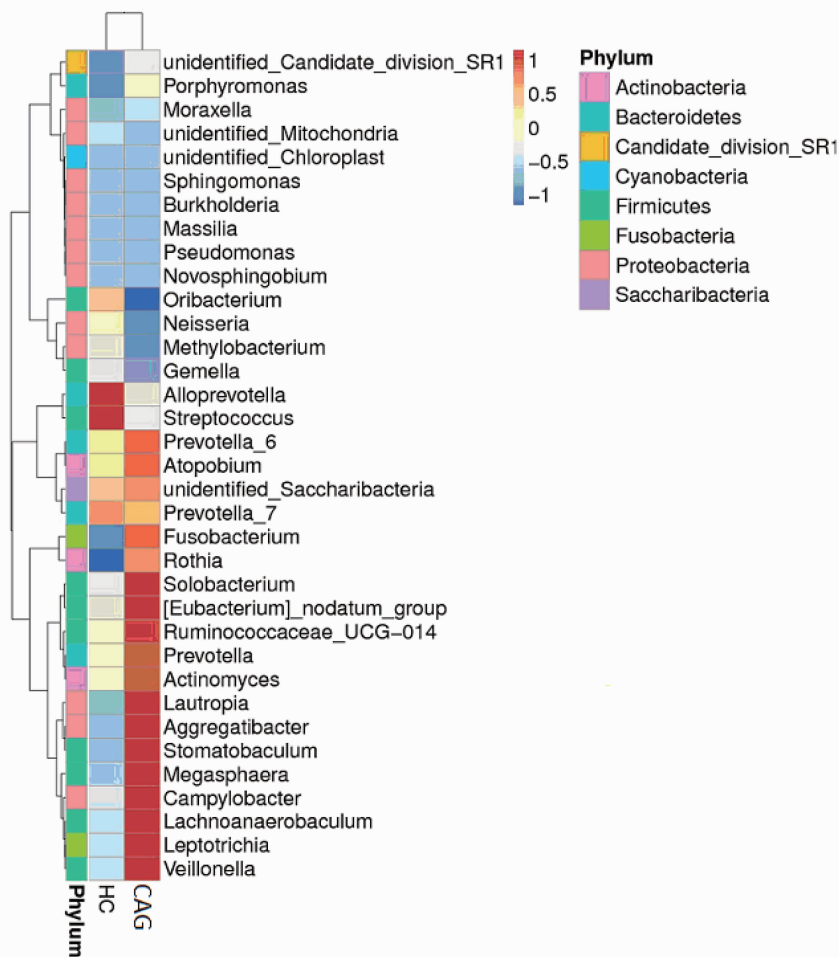


图3 在属分类水平上的最大丰度排名 Top35 的物种相对丰度热图

展而变化的动态跟踪,也可以对健康和疾病患者进行比较。

本研究结果表明,薄白苔中微生物优势菌结构组成相似。在属分类水平上,薄白苔中优势菌属为链球菌属、奈瑟氏菌属、普雷沃菌属、莫拉菌属、韦荣球菌属、纤毛菌属等,与以往的文献报道相似^[22]。这说明薄白苔中的微生物组成具有核心的菌群骨架,构成薄白苔的最基本的组成。同为薄白苔,通过统计分析可知,5种优势菌的含量在健康人和CAG患者中具有显著差异。如链球菌属和拟普雷沃菌属在CAG含量显著下降;莫拉菌属、韦荣球菌属、纤毛菌属在CAG组中含量显著增加。这些充分说明,薄白舌苔中的优势菌属的核心菌群骨架组成类似,但健康状态和疾病状态下舌苔的优势菌含量并不相同,这可能跟疾病的发展有密切的关系。这也与吴正治等^[4]在对薄白苔的细胞化学研究中发现类似。随着疾病的产生,舌苔菌群的组成和含量也会发生相应的变化,但究竟是疾病引起菌群的变化,还是菌群的变化导致疾病的产生,这需要后期的进一步研究。

利益冲突:无。

(致谢:感谢岳阳中西医结合医院在本课题采样过程中给予的支持与帮助)

参 考 文 献

- [1] 曹炳章主编. 辨舌指南[M]. 福州: 福建科技出版社, 2005: 1.
- [2] 施斌, 徐海珍, 谢建群. 浅谈中医舌诊在慢性胃炎治疗中的意义[J]. 国医论坛, 2008, 23(6): 22-24.
- [3] 赵洁, 李福凤, 钱鹏. 生态生物信息研究方法与技术概况[J]. 中医杂志, 2011, 52(7): 612-615.
- [4] 吴正治, 周小青, 郭振球, 等. 虚寒薄白苔的细胞化学初步研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(11): 649-651, 643.
- [5] 朱永钦, 朱永苹, 黄连梅, 等. 慢性萎缩性胃炎中医病因病机和辨证分型的临床研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(2): 322-325.
- [6] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见(2012年, 上海)[J]. 中华消化杂志, 2013, 33(1): 5-16.
- [7] 朱文峰主编. 中医诊断学[M]. 北京: 中国中医药出版

- 社, 2002: 35 – 50.
- [8] Lundberg DS, Yourstone S, Mieczkowski P, et al. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing [J]. *Nature Methods*, 2013, 10 (10): 999 – 1002.
- [9] Umemura K, Wada K. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases – from molecular mechanisms to clinical cases: preface [J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 113(1): 101 – 102.
- [10] Anastasi JK, Chang M, Quinn J, et al. Tongue inspection in TCM: Observations in a study sample of patients living with HIV [J]. *Med Acupunct*, 2014, 26(2): 15 – 22.
- [11] Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(5): 1513 – 1524.
- [12] Fei N, Zhao LP. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice [J]. *Int Society Microbial Ecology*, 2013, 7(4): 880 – 884.
- [13] 张晨虹, 赵立平. 肠道菌群在肥胖及相关代谢性疾病发生发展中的地位和作用. *前沿科学*, 2007, 1(3): 75 – 80.
- [14] Hullar MA, Burnett-Hartman AN, Lampe JW. Gut microbes, diet, and cancer [J]. *Cancer Treat Res*, 2014, 159(1): 377 – 399.
- [15] Wong SH, Zhao LY, Zhao X, et al. Gavage of fecal samples from patients with colorectal cancer promotes intestinal carcinogenesis in germ-free and conventional mice [J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(6): 1621 – 1633.
- [16] Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(5): 1513 – 1524.
- [17] 孙静华, 陈玉, 李仪红, 等. 胃癌前病变患者口腔细菌多样性分析 [J]. *北京口腔医学*, 2014, 22(2): 70 – 74.
- [18] Chen H, Jiang W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease [J]. *Frontiers Microbiol*, 2014, 5(10): 508.
- [19] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2011, 108(15): 4516 – 4522.
- [20] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen [J]. *Science*, 2011, 332(6039): 463 – 467.
- [21] Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(8): 5227 – 5236.
- [22] Ye J, Cai XT, Yang J, et al. *Bacillus* as a potential diagnostic marker for yellow tongue coating [J]. *Sci Reports*, 2016, 6(8): 32496.
- (收稿: 2017 – 11 – 17 在线: 2019 – 05 – 17)
- 责任编辑: 李焕荣
英文责编: 张晶晶

(上接第 690 页)

- [15] Hui Y, Li L, Qian J, et al. Efficacy analysis of three-year subcutaneous SQ—standardized specific immunotherapy in house dust mite-allergic children with asthma [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7 (3): 630 – 634.
- [16] 明溪, 薛征, 李利清, 等. 虞坚尔“三阶序治法”辨治小儿哮喘经验 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(6): 467 – 469.
- [17] 朱盼, 杨程, 李泽庚. 黄芪治疗支气管哮喘研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(12): 59 – 61.
- [18] 刘双利, 姜程曦, 赵岩, 等. 防风化学成分及其药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(10): 2146 – 2152.
- [19] 宋保兰. 陈皮药理作用 [J]. *实用中医内科杂志*, 2014, 28(8): 132 – 133, 160.
- (收稿: 2018 – 10 – 10 在线: 2019 – 05 – 29)
- 责任编辑: 李焕荣
英文责编: 张晶晶