

· 基础研究 ·

2 种冷冻时长进行液氮冷冻法犬股骨头坏死造模的效果比较

楼鹏强, 邓小磊, 魏波, 汤朔, 侯德才

(辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032)

摘 要 **目的:**比较 2 种冷冻时长进行液氮冷冻法犬股骨头坏死造模的效果。**方法:**将 12 只 SPF 级健康成年雄性比格犬随机分为 2 组, 每组 6 只。均采用液氮冷冻法进行股骨头坏死造模, 液氮冷冻时长分别为 8 min(冷冻 8 min 组)和 4 min(冷冻 4 min 组)。造模手术后观察并记录动物的一般情况。造模后 9 周, 进行 X 线和 MRI 检查, 并以 MRI 影像作为判断股骨头坏死的标准。影像学检查结束后, 处死动物, 取出造模侧股骨头, 进行大体观察和病理学检查(HE 染色)。**结果:**①一般情况。至最终处死前, 2 组均无动物死亡。造模手术后 2 d 内, 所有动物均开始出现饮食减少、精神萎靡、活动减少等表现。冷冻 4 min 组动物的上述表现均在 1 周内改善; 冷冻 8 min 组动物的上述表现约在 2 周后逐步恢复正常, 切口愈合缓慢, 而且均出现了跛行现象。冷冻 8 min 组的 1 只动物在造模手术后第 3 天出现术区皮肤红肿, 造模手术后 1 周时出现对应部位皮肤组织坏死及化脓, 造模手术后 4 周时愈合。②影像学检查结果。X 线片显示, 冷冻 8 min 组动物造模侧股骨头均出现了不同程度的变化, 如骨质硬化、关节间隙变窄, 但变化不明显, 且部分动物的股骨头出现了囊性变; 冷冻 4 min 组仅 2 只动物的股骨头出现了轻微的骨质硬化。MRI 显示, 冷冻 8 min 组所有动物 T2WI 上均可见股骨头骨髓水肿和关节腔积液表现, T1WI 上均可见线样低信号, 均达到股骨头坏死标准; 冷冻 4 min 组 4 只动物 T2WI 上可见股骨头骨髓水肿和关节腔积液表现, 其余 2 只动物的 T2WI 上仅可见关节腔积液表现, T1WI 上均无明显改变。③大体观察结果。冷冻 8 min 组股骨头扁平、表面较粗糙, 部分股骨头出现软骨裂纹, 部分股骨头软骨磨损严重; 冷冻 4 min 组股骨头形态无明显改变, 表面较光滑, 仅部分动物的股骨头出现了软骨裂纹或轻微软骨磨损。④病理学检查结果。冷冻 8 min 组股骨头组织骨陷窝内大部分骨细胞核消失, 同时可见骨小梁断裂; 冷冻 4 min 组股骨头组织大部分骨陷窝内可见骨细胞核, 骨小梁完整。冷冻 8 min 组股骨头组织空骨陷窝率高于冷冻 4 min 组 $[(20.21 \pm 2.6)\%, (13.51 \pm 3.1)\%, t = 4.055, P = 0.002]$ 。**结论:**以液氮冷冻法进行犬股骨头坏死造模时, 液氮冷冻 8 min 的造模成功率高于液氮冷冻 4 min。

关键词 股骨头坏死; 模型; 动物; 犬; 液氮

A comparative analysis of canine femur head necrosis models induced by liquid nitrogen freezing with two freezing durations

LOU Pengqiang, DENG Xiaolei, WEI Bo, TANG Shuo, HOU Decai

The Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China

ABSTRACT **Objective:** To compare the effects of canine femur head necrosis(FHN) models induced by liquid nitrogen freezing(LNF) with two freezing durations. **Methods:** Twelve SPF - grade healthy adult male beagle canines were selected and randomly assigned to 2 groups, 6 ones in each group, and they were subjected to LNF for 8 minutes(8 - min freezing group) and 4 minutes(4 - min freezing group) respectively for inducing FHN. The general conditions of the model canines were then observed and recorded after the modeling surgery. At 9 weeks after the modeling, all model canines underwent X - ray examination and magnetic resonance imaging(MRI) examination and the MRI images were used as the standard for confirming whether the FHN models were built successfully. After the end of imaging examination, the model canines were sacrificed and their femur heads were harvested from the modeling side for gross observation and pathological examination(HE staining). **Results:** ①No model canine died in the 2 groups before the final execution. Within 2 days after the modeling surgery, all model canines began to exhibit such symptoms as decreased food intake, mental fatigue and reduced movement, which was improved within 1 week in 4 - min freezing group, and gradually returned to normal about 2 weeks later in 8 - min freezing group with the symptoms of slow wound healing and claudication. One model canine in 8 - min freezing group exhibited the symptoms as skin redness and swelling on the 3rd day after the modeling surgery, skin tissue necrosis and pyosis at the corresponding site at 1 week after the modeling surgery, and healed at 4 weeks after the modeling surgery. ②The results of X - ray examination showed that the unremarkable changes in

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(2017225043)

通讯作者: 侯德才 E-mail: lnzyhdc@163.com

different degrees, manifesting as osteosclerosis and joint space narrowing, were observed in femur heads at the modeling side of model canine in 8-min freezing group, and cystic changes in the femur heads were further observed in some model canines; while the slight osteosclerosis in femur heads was observed in only 2 model canines in 4-min freezing group. As revealed by MRI images, the bone marrow edema (BME) of femur heads and articular cavity effusion on T2WI and cord-like low signals on T1WI were observed in all model canines of 8-min freezing group, which met the diagnosis criteria of FHN; while, for model canines in 4-min freezing group, the BME of femur heads and articular cavity effusion on T2WI were observed in only 4 ones, and articular cavity effusion alone on T2WI were observed in the other 2 ones, and no significant changes on T1WI was found in all model canines. ③The flattened femur heads with rough surfaces were observed in model canines of 8-min freezing group, furthermore, some ones presented with cartilage cracks and the other ones with severely worn cartilage; while, for model canines in 4-min freezing group, the femur heads were comparatively smooth without obvious changes in the morphology, just cartilage cracks or slight cartilage wear were observed in only some ones. ④Most of the osteocyte nuclei disappeared within the bone lacunae of femoral head tissues in model canines of 8-min freezing group, and the bone trabeculae fractures was observed; while the osteocyte nuclei was observed within most of the bone lacunae of femoral head tissues in model canines of 4-min freezing group, and the bone trabeculae were intact. The percentage of empty bone lacunae in femoral head tissues was higher in 8-min freezing group compared to 4-min freezing group (20.21 ± 2.6 vs $13.51 \pm 3.1\%$, $t = 4.055$, $P = 0.002$). **Conclusion:** The success rate is higher in canine FHN model induced by LNF for 8 minutes compared to the ones for 4 minutes.

Keywords femur head necrosis; models, animal; canis familiaris; liquid nitrogen

股骨头坏死是骨科常见的难治性疾病^[1]。建立有效的动物模型,对于探索股骨头坏死的发生机制和新的治疗方法均有重要意义。目前用于股骨坏死造模的实验动物和造模方法较多,其中以液氮冷冻法制备的犬股骨头坏死模型应用最为广泛^[2-5]。但对于造模过程中液氮冷冻的最佳时长,目前尚未见到相关研究。因此,本研究选择文献报道的 4 min^[6]和 8 min^[7]2 种冷冻时长进行了对比研究,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 试验动物 SPF 级健康成年雄性比格犬 12 只,年龄 17~23 个月,体质量 10.1~12.2 kg。所有犬均购自沈阳康平实验动物研究所,实验动物许可证号 SCXK(辽)2014-0003。所有犬均在面积 3 m² 的犬舍中单独饲养,允许自由活动。实验方案通过辽宁中医药大学附属医院动物实验伦理委员会批准(21000092019051)。

1.2 主要试剂 硫酸阿托品注射液(安徽长江药业有限公司,国药准字 H34021900),盐酸塞拉嗪注射液(长沙拜特生物科技有限责任公司,兽药字 180121777),舒泰 50(法国维克,批号:83887902),注射用头孢美唑钠(山东罗欣药业集团股份有限公司,国药准字 H20103440),戊巴比妥钠(德国默克,批号:W-20180223),乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)脱钙液(北京索莱宝科技有限公司),HE 染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

1.3 主要设备 GE-D8000 X 线机,GE Signa 1.5T 超导 MRI 系统, Nikon MODEL YS100 生物显微镜。自制液氮冷冻装置,该装置由包纳股骨头、保护周围组织的工作套筒和引流液氮的导轨 2 部分组成;其中工作通道由去除针头端的 5 mL 注射器外套制成,导轨由去除针头端的 5 mL 注射器外套纵向剖开后制成;使用时将导轨插入工作通道内(图 1);使用前,将液氮冷冻装置于液氮中进行预冷;以上操作均在无菌条件下完成。

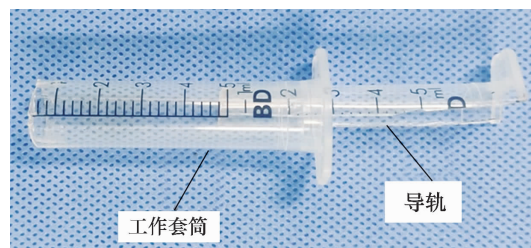


图 1 自制液氮冷冻装置

2 方法

2.1 动物分组及造模 将 12 只动物随机分为冷冻 8 min 组和冷冻 4 min 组,每组 6 只。按 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌肉注射硫酸阿托品注射液,以减少麻醉过程中动物呼吸道腺体分泌;15 min 后,按 $0.05 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌肉注射盐酸塞拉嗪注射液进行诱导麻醉;15 min 后,按 $0.05 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌肉注射舒泰 50,术中按 $0.025 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药维持麻醉。麻醉成功后,消毒,剃除犬左髌部约 $10 \text{ cm} \times 16 \text{ cm}$ 的毛发,以碘伏消毒后,铺无菌手术单及洞巾。以大转子为中心在股骨干前缘弧形切开,切

口近端始于近背中线处,远端止于股骨近端 $1/3 \sim 1/2$ 处。分离皮下组织,在股骨干前外侧找到股二头肌与股筋膜、阔筋膜张肌的结合部,沿着股二头肌前缘切开,将阔筋膜张肌切断。分离暴露“股三角区”(背侧为臀中肌、臀深肌,外侧为股外侧肌,内侧为股直肌)^[8],向后拉开臀中肌和股二头肌,向上拉开阔筋膜和阔筋膜张肌,部分分离臀中肌和股外侧肌的附着部。钝性分离关节囊上附着的脂肪,暴露关节囊。顺着股骨颈方向剪开关节囊,向远端分离,暴露股骨头。向外旋转股骨,用弯剪伸到关节囊内剪断圆韧带,将预制好的液氮冷冻装置套在股骨头上,用纱布包绕冷冻装置以保护周围组织。沿导轨缓慢注入液氮,2 组分别持续冷冻 4 min 和 8 min。冷冻结束后,以生理盐水复温 3 min 左右,以肉眼观察到的股骨头表面颜色从苍白恢复至接近冷冻前状态作为复温结束的标志。闭合关节囊,将分离的肌肉恢复至原位并逐层缝合,关闭切口,术区覆盖无菌敷料后送回犬舍。术后 7 d 内,每天按 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌肉注射头孢美唑钠。造模手术由 2 名有丰富髋关节手术经验的医生完成。

2.2 造模结果评价 造模手术后观察并记录动物的饮食、活动、精神状态、切口愈合等一般情况。造模后 9 周,进行 X 线和 MRI 检查,并以 MRI 影像作为判断股骨头坏死的标准,即 T1WI 上股骨头出现线样低信号区或 T2WI 上股骨头出现“双线征”^[9]。影像学检查结束后,按 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 静脉注射戊巴比妥钠处死动物,取出造模侧股骨头,观察股骨头表面软骨及股骨头塌陷情况。股骨头标本大体观察结束后,将股骨头样本置于 10% 多聚甲醛中固定 2 d,以 14% EDTA 脱钙 4 周,石蜡包埋后冠状位切片,厚度 $3 \mu\text{m}$,HE 染色后在显微镜下观察。

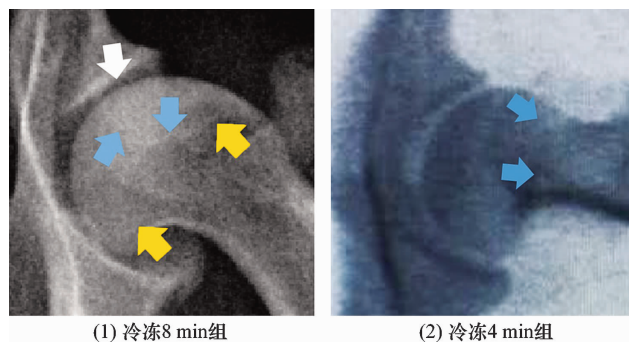
3 结果

3.1 一般情况 至最终处死前,2 组均无动物死亡。造模手术后 2 d 内,所有动物均开始出现饮食减少、精神萎靡、活动减少等表现。冷冻 4 min 组动物的上述表现均在 1 周内改善;冷冻 8 min 组动物的上述表现约在 2 周后逐步恢复正常,切口愈合缓慢,而且均出现了跛行现象。冷冻 8 min 组的 1 只动物在造模手术后第 3 天出现术区皮肤红肿,造模手术后 1 周时出现对应部位皮肤组织坏死及化脓,造模手术后 4 周时愈合。

3.2 影像学检查结果

3.2.1 X 线检查结果 冷冻 8 min 组动物造模侧股

骨头均出现了不同程度的变化,如骨质硬化、关节间隙变窄,但变化不明显,且部分动物的股骨头出现了囊性变[图 2(1)];冷冻 4 min 组仅 2 只动物的股骨头出现了轻微的骨质硬化[图 2(2)]。



(1) 冷冻 8 min 组 (2) 冷冻 4 min 组
白色箭头指示处显示关节间隙变窄;蓝色箭头指示处为骨质硬化区域;黄色箭头指示区域为囊性变。

图 2 2 组动物造模侧髋关节 X 线片

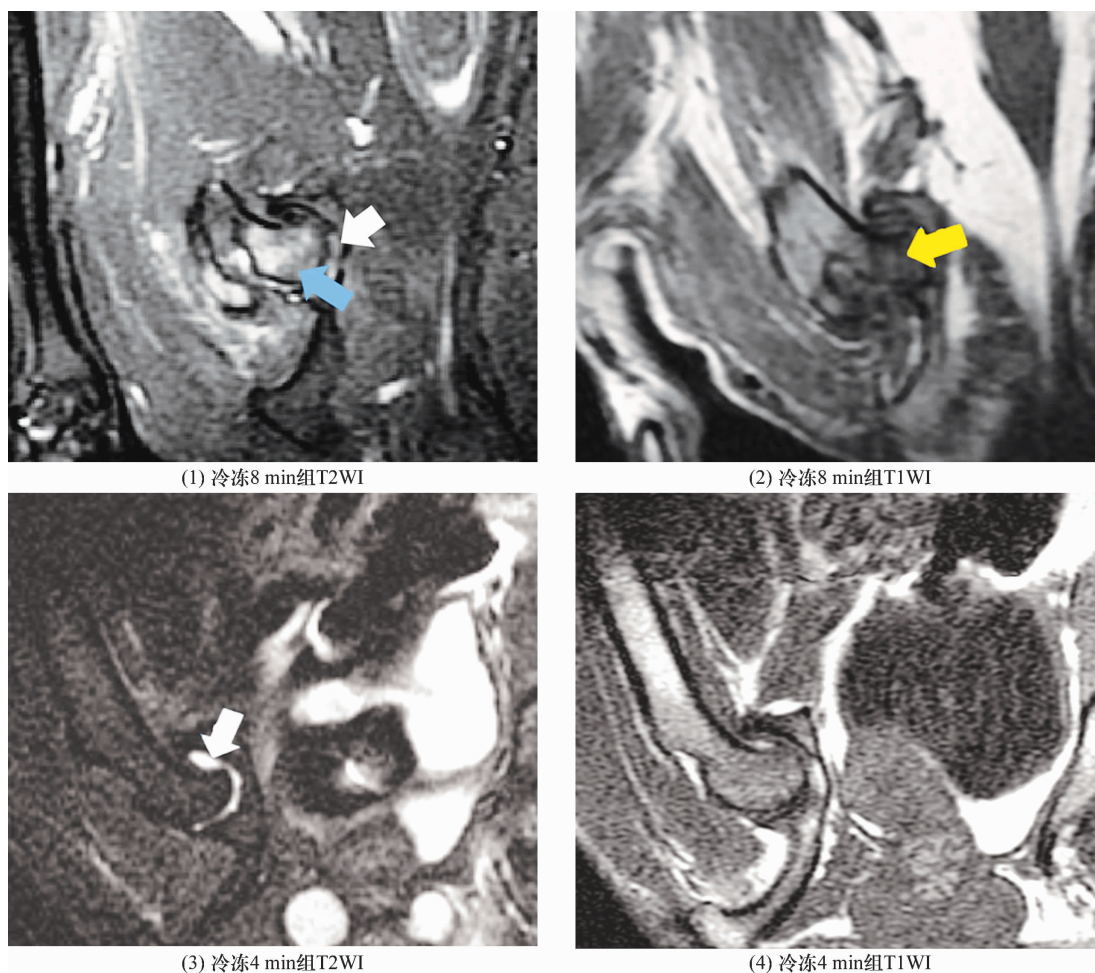
3.2.2 MRI 检查结果 冷冻 8 min 组所有动物 T2WI 上均可见股骨头骨髓水肿和关节腔积液表现[图 3(1)],T1WI 上均可见线样低信号[图 3(2)],均达到股骨头坏死标准;冷冻 4 min 组 4 只动物 T2WI 上可见股骨头骨髓水肿和关节腔积液表现,其余 2 只动物的 T2WI 上仅可见关节腔积液表现[图 3(3)],T1WI 上均无明显改变[图 3(4)]。

3.3 大体观察结果 冷冻 8 min 组股骨头扁平、表面较粗糙,部分股骨头出现软骨裂纹,部分股骨头软骨磨损严重[图 4(1)];冷冻 4 min 组股骨头形态无明显改变,表面较光滑,仅部分动物的股骨头出现了软骨裂纹或轻微软骨磨损[图 4(2)]。

3.4 病理学检查结果 冷冻 8 min 组股骨头组织骨陷窝内大部分骨细胞核消失,同时可见骨小梁断裂[图 5(1)];冷冻 4 min 组股骨头组织大部分骨陷窝内可见骨细胞核,骨小梁完整[图 5(2)]。冷冻 8 min 组股骨头组织空骨陷窝率高于冷冻 4 min 组[(20.21 ± 2.6)%, (13.51 ± 3.1)%, $t = 4.055$, $P = 0.002$]。

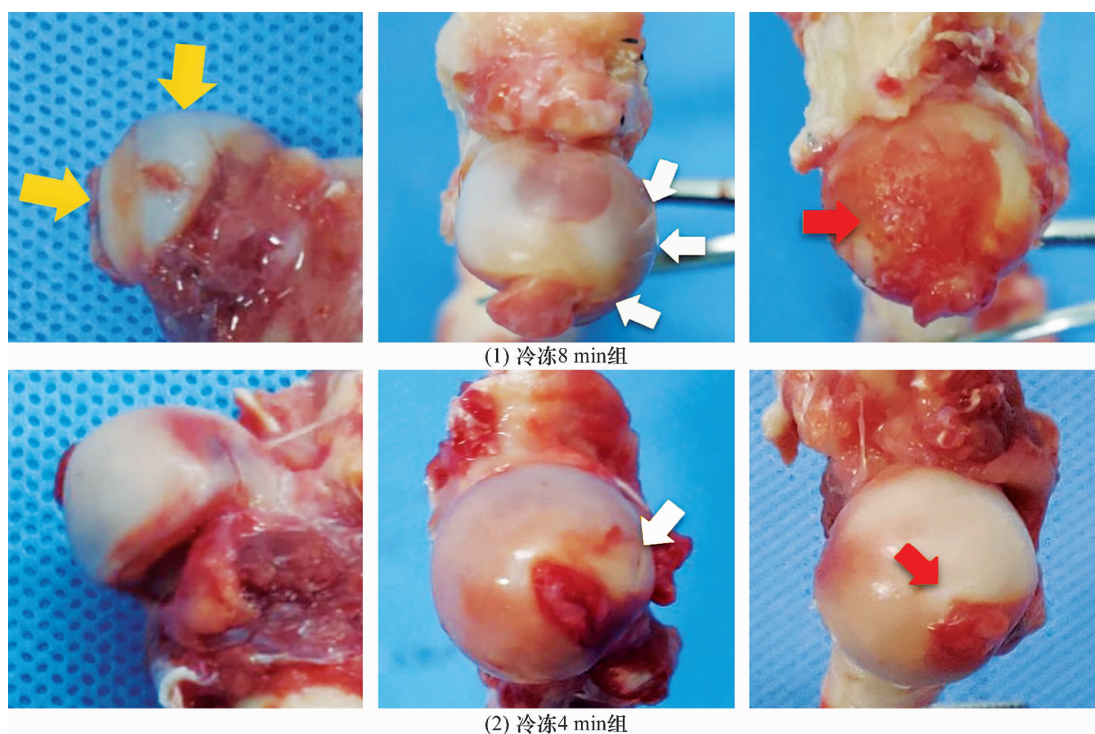
4 讨论

目前,进行犬股骨头坏死造模的方法很多。激素法易导致犬出现全身并发症,且造模成功率较低^[10],因此较少应用。创伤法通过造成股骨基底部骨折,阻断股骨头血供诱导股骨头坏死,但造模手术操作困难,可重复性较差^[11]。酒精法通过从股骨大转子向股骨头建立通道,并向股骨头内注射乙醇,以诱导股骨头坏死的发生,但该方法需破坏股骨头的结构,



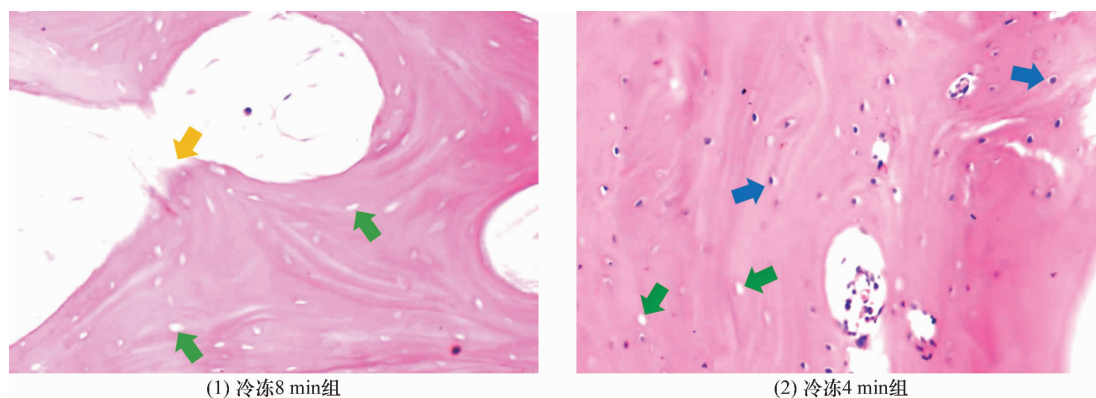
蓝色箭头指示处为骨髓水肿;白色箭头指示处为关节腔积液;黄色箭头指示处为线样低信号区域。

图 3 2 组动物造模侧膝关节 MRI



黄色箭头指示处可见股骨头扁平;白色箭头指示处为软骨裂纹;红色箭头指示处为软骨磨损处。

图 4 2 组动物造模侧股骨头外观



绿色箭头指示处为空骨陷窝;黄色箭头指示处为断裂的骨小梁;蓝色箭头指示处为含有细胞核的骨陷窝。

图 5 2 组动物股骨头组织切片镜下图像(HE 染色 ×40)

同时操作较为困难^[12-13]。液氮冷冻法与人类股骨头坏死的病理生理学过程相似,而且具有较好的可重复性^[14]。

股骨头局部经液氮冷冻后,骨细胞发生坏死,同时液氮冷冻也导致股骨头毛细血管内皮细胞受损、内外源性凝血机制激活,引起毛细血管微血栓形成,最终导致股骨头区域内小血管发生梗阻^[15]。此外,液氮冷冻后,血管通透性增加,进而发生血液黏度增加、血液流速减缓等一系列变化,导致股骨头内静脉淤滞,骨内压增高,并加重股骨头内缺血。而股骨头复温后,血管再通,也可导致股骨头发生缺血性再灌注损伤^[16]。

本研究中冷冻 8 min 组 1 只动物出现了术区皮肤坏死,这可能是液氮冷冻时间较长,导致周围皮肤组织冻伤所致。因此在进行液氮冷冻的操作时,应当注意保护好周围组织。我们在实验中用注射器制作的液氮冷冻装置,其工作通道的半径略大于犬股骨头的半径,正好容纳犬的股骨头,可以控制液氮冷冻的范围,同时以纱布包绕冷冻装置,很好地保护了周围组织。感染是髋关节手术中最严重的并发症之一。实验中使用的冷冻装置均在无菌条件下完成,从而有效避免了感染的发生。

本研究的结果提示,以液氮冷冻法进行犬股骨头坏死造模时,液氮冷冻 8 min 的造模成功率高于液氮冷冻 4 min。

参考文献

[1] 中国医师协会骨科医师分会骨循环与骨坏死专业委员会,中华医学会骨科分会骨显微修复学组,国际骨循环学会中国区. 中国成人股骨头坏死临床诊疗指南(2020)[J]. 中华骨科杂志,2020,40(20):1365-1376.

[2] 楼鹏强,魏巍,侯德才. 股骨头坏死动物模型评价方法的

优缺点及展望[J]. 中国组织工程研究,2021,25(32):5210-5214.

[3] 汤朔,侯德才. 股骨头坏死动物模型构建:如何更接近临床应用[J]. 中国组织工程研究,2021,25(29):4691-4696.

[4] JIN H, XIA B, YU N, et al. The effects of autologous bone marrow mesenchymal stem cell arterial perfusion on vascular repair and angiogenesis in osteonecrosis of the femoral head in dogs[J]. Int Orthop, 2012, 36(12):2589-2596.

[5] 闫宇龙,侯德才,邓小磊,等. 液氮冷冻制备犬股骨头坏死模型研究进展[J]. 海南医学院学报,2019,25(15):1196-1200.

[6] JIN H, XU T, CHEN Q, et al. The fate and distribution of autologous bone marrow mesenchymal stem cells with intra-arterial infusion in osteonecrosis of the femoral head in dogs[J/OL]. Stem Cells Int, 2016[2021-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4686726>.

[7] GAO R, JI W, XIA T, et al. Three-dimensional-printed titanium alloy porous scaffold combined with trans-cinnamaldehyde for repairing osteonecrosis of the femoral head in a dog model[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(3):1070-1079.

[8] 袁占奎,陈宏武,彭勃,等. 犬双侧股骨头和股骨颈切除术[J]. 中国兽医杂志,2007,43(7):2.

[9] 李子荣. 股骨头坏死成功保髋新理念[J]. 中医正骨, 2018, 30(10):1-3.

[10] XU J, GONG H, LU S, et al. Animal models of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head - a comprehensive research review up to 2018[J]. Int Orthop, 2018, 42(7):1729-1737.

[11] YAN Z, HANG D, GUO C, et al. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head[J]. J Orthop Res, 2009, 27(4):442-446.

(下转第 31 页)

观察及及相关实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.

- [25] 赵程锦, 冯阳阳, 周煜虎. 髓芯减压植骨术结合富血小板血浆治疗股骨头缺血性坏死的疗效及术后并发症临床观察[J]. 中国临床研究, 2017, 30(7): 878 - 882.
- [26] 杨富强, 杨晓明, 葛建健, 等. 髓芯减压植骨联合富血小板血浆治疗股骨头缺血性坏死的前瞻随机对照研究[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2016, 10(2): 22 - 25.
- [27] HONG Y C, ZHONG H M, LIN T, et al. Comparison of core decompression and conservative treatment for avascular necrosis of femoral head at early stage: a meta - analysis[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(4): 5207 - 5216.
- [28] LANDGRAEBER S, WARWAS S, CLABEN T, et al. Modifications to advanced core decompression for treatment of avascular necrosis of the femoral head[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2017, 18(1): 479.
- [29] HUA K C, YANG X G, FENG J T, et al. The efficacy and safety of core decompression for the treatment of femoral head necrosis: a systematic review and meta - analysis[J]. J Orthop Surg Res, 2019, 14(1): 306.
- [30] KEIZER S B, KOCK N B, DIJKSTRA P D, et al. Treatment

of avascular necrosis of the hip by a non - vascularised cortical graft[J]. J Bone Joint Surg Br, 2006, 88(4): 460 - 466.

- [31] ISRAELITE C, NELSON C L, ZIARANI C F, et al. Bilateral core decompression for osteonecrosis of the femoral head[J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 441: 285 - 290.
- [32] RIBOH J C, SALTZMAN B M, YANKE A B, et al. Effect of leukocyte concentration on the efficacy of platelet - rich plasma in the treatment of knee osteoarthritis[J]. Am J Sports Med, 2016, 44(3): 792 - 800.
- [33] ORYAN A, ALIDADI S, MOSHIRI A. Platelet - rich plasma for bone healing and regeneration[J]. Expert Opin Biol Ther, 2016, 16(2): 213 - 232.
- [34] HAN J, GAO F, LI Y, et al. The Use of platelet - rich plasma for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a systematic review[J/OL]. Biomed Res Int, 2020[2021 - 05 - 01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7081027>.
- [35] 张长青, 袁霆. 富血小板血浆在临床应用中的争议与研究进展[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2016, 10(6): 588 - 591.

(收稿日期: 2021-06-15 本文编辑: 李晓乐)

(上接第 7 页)

- [12] WANG C, WANG J, ZHANG Y, et al. A canine model of femoral head osteonecrosis induced by an ethanol injection navigated by a novel template[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(11): 1451 - 1458.
- [13] ZHU Z H, GAO Y S, LUO S H, et al. An animal model of femoral head osteonecrosis induced by a single injection of absolute alcohol: an experimental study[J]. Med Sci Monit, 2011, 17(4): 97 - 102.
- [14] HUFFMAN K M, BOWERS J R, DAILIANA Z, et al. Syno-

vial fluid metabolites in osteonecrosis[J]. Rheumatology(Oxford), 2007, 46(3): 523 - 528.

- [15] 朱建龙, 赵红昌. 液氮冷冻法诱导犬股骨头缺血性坏死模型 MRI 影像与病理观察[J]. 中医正骨, 2011, 23(6): 21 - 24.
- [16] 徐俊, 张长青, 孙建琪, 等. 计算机辅助下低温手术建立三足犬股骨头坏死模型的初步报告[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(3): 276 - 280.

(收稿日期: 2021-11-14 本文编辑: 李晓乐)

(上接第 25 页)

- [15] 莫琼, 郝二伟, 覃文慧, 等. 平性活血化瘀中药物质基础与药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 205 - 216.
- [16] 高樱, 杨龙飞, 翟阳, 等. 具有活血化瘀功效的中药药理作用及机制研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 5053 - 5056.
- [17] 周鸿, 黄含含, 张静泽, 等. 川芎 - 当归药对研究进展[J]. 中成药, 2015, 37(1): 184 - 188.
- [18] 蒋海峰, 宿树兰, 欧阳臻, 等. 乳香、没药提取物及其配伍对血小板聚集与抗凝血酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 160 - 165.
- [19] 刘陆, 安玉芳. 中药川乌与草乌的研究进展[J]. 黑龙江

中医药, 2019, 48(2): 175 - 177.

- [20] 蒋燕萍, 甘彦雄, 严鑫, 等. 自然铜的研究进展[J]. 中药与临床, 2016, 7(1): 62 - 64.
- [21] 林远茂, 施荣聪, 孙诚攻, 等. 基于网络药理学分析北刘寄奴的活性成分及其药效作用机制[J]. 中医药导报, 2020, 26(10): 46 - 51.
- [22] 张晓娟, 张燕丽, 左冬冬. 川芎的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(6): 128 - 133.
- [23] 林俊涛, 刘俊, 徐紫丹, 等. 降真香不同溶剂萃取物对口腔常见菌的抑菌活性研究[J]. 生物化工, 2021, 7(1): 40 - 43.

(收稿日期: 2021-06-16 本文编辑: 时红磊)