

黄连类寒热药对体外抗流感病毒的影响

俞程玲, 吴巧凤*

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: **目的** 探究黄连类寒热药对体外抗流感病毒的影响。**方法** 通过对含黄连类寒热药对的古方进行 Apriori 关联规则分析, 筛选方剂中与黄连配伍频率较高的热、温性中药, 确定黄连类寒热药对。采用细胞病变效应 (CPE) 与 MTT 法考察 7 个药对对流感病毒感染的 MDCK 细胞活性的影响。**结果** 经 Apriori 关联规则分析筛选出 7 个使用频率较高的黄连类寒热药对, 分别为黄连-厚朴、黄连-紫苏叶、黄连-干姜、黄连-吴茱萸、黄连-肉桂、黄连-附子、黄连-半夏。MTT 法显示上述 7 个药对及单味药均具有体外抗流感病毒作用, 在各药对的最大无毒浓度 (TC₀) 范围内, 对 H1N1 流感病毒的抑制率分别为 69.18%、67.54%、61.23%、60.00%、52.19%、43.57%、39.33%, 抑制作用的强弱依次为黄连-厚朴>黄连-紫苏叶>黄连-干姜>黄连-吴茱萸>黄连-肉桂>黄连-附子>黄连-半夏, 且各药对药效优于单味药。**结论** 黄连-厚朴药对的抗流感病毒作用最强, 可为含黄连类寒热药对的复方的临床应用及流感治疗提供参考。

关键词: 黄连类寒热药对; 体外抗流感病毒; 方剂研究

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)03-0787-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.044

流感是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 其发病率、死亡率及造成的经济损失均位列各种传染病之首^[1]。中医药防治流感历史悠久, 优势独特, 具有辨证施治, 不易耐药等特点, 中药可通过多成分、多途径、多靶点、多效应地发挥抗流感药效^[2]。流感在中医属温病范畴, 并倡导“寒热并用”的治则^[3]。黄连为典型的苦寒中药, 黄连及其主要活性成分盐酸小檗碱均具有显著的抗流感病毒作用^[4-5], 黄连也常以寒热配伍的方式出现在黄连香薷饮, 半夏泻心汤和苏叶黄连汤等诸多方剂中^[6-8], 黄连亦可与诸多热性和温性中药 (如干姜、厚朴等) 配伍形成寒热药对, 并作为最小的复方发挥疗效^[9-12]。项目组前期发现, 黄连类寒热药对黄连-干姜、黄连-紫苏叶和黄连-厚朴^[6]均具有抗流感病毒作用, 且药对的抗流感药效优于单味药。但黄连类寒热药对抗流感作用的系统研究未见报道。本文通过查阅含黄连类寒热药对的古方, 采用 Apriori 关联规则分析法筛选与黄连关联度较高的热、温性中药, 配伍成寒热药对, 进一步采用细胞病变效应 (CPE) 与 MTT 法, 以流感病毒抑制率为评价指标, 考察黄连类寒热药对的体外抗流感病毒作用强弱, 筛选抗流感病毒作用最强的药对, 为含黄连类寒热药对的复方的临床应用及流感治疗提供参考。

1 材料

1.1 药物与试剂 黄连 (四川, 批号 20170501) 为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 半夏 (浙江, 批号 20180701) 为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit., 厚朴 (浙江, 批号 20180701) 为木兰科

植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rend. Et Wils. 的干燥干皮、根皮和枝皮, 附子 (四川, 批号 20180301) 为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品, 肉桂 (广西, 批号 20180601) 为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮, 吴茱萸 (浙江, 批号 20180701) 为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实, 紫苏叶 (浙江, 批号 20171001) 为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶 (或带嫩枝), 干姜 (四川, 批号 20171101) 为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎, 所有药材均购自浙江中医药大学中药饮片厂, 经浙江中医药大学中药资源与鉴定教研室张水利教授鉴定为正品。磷酸奥司他韦胶囊 (瑞士罗氏有限公司, 批号 M1025); MEM 培养液 (批号 1898620)、胎牛血清 (批号 1808455)、谷氨酰胺 (批号 1677185)、0.25% EDTA-胰酶 (批号 1846496)、PBS (批号 1864553)、青/链霉素母液 (批号 92SLBB76) 均购自美国 Gibco 公司。

1.2 仪器 705 型 -80 °C 超低温冰箱 (美国 Thermo 公司); A2 型生物安全柜 (美国 Thermo 公司); 3111 型 CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司); R-4100 型酶标仪 (美国 Dynatech 公司); DC-300 型倒置显微镜 (德国 Leica 公司)。
1.3 病毒和细胞株 甲型流感病毒 A/PR/8/34 鼠适应株 (H1N1) 及 MDCK 细胞株均由浙江省疾病预防控制中心病毒所提供, 于 -80 °C 冰箱超低温保存。流感病毒株经鸡胚传代后, 经测定血凝效价为 1:1 024。

2 方法

收稿日期: 2019-06-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81473335/H2803); 浙江省自然科学基金项目 (LY18H2800070)

作者简介: 俞程玲 (1994—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药效物质。Tel: 15990182262, E-mail: 1104139448@qq.com

* 通信作者: 吴巧凤 (1963—), 女, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质。E-mail: wqfyjm@sina.com

2.1 黄连类寒热药对数据库建立 从中国方剂数据库中搜索出含有黄连类寒热药的方剂共 193 首, 排除标准为单味药方剂、组成重复的方剂、未含黄连类寒热药对的方剂, 数据录入 Microsoft Excel 2010 软件中。为确保数据的准确性, 必须进行双人核对。

2.2 数据分析 采用 Excel 2010、SPSS Modeler 18.0 软件, 对数据库中的数据进行 Apriori 关联规则分析。

2.3 药液的制备 检索文献中各药对的临床常用配比发现, 黄连-半夏药对为 1:1 和 1:3^[13], 黄连-紫苏叶药对为 1:1、2:1、3:1 和 4:1^[14], 黄连-干姜药对为 1:1 和 1:3^[13], 黄连-附子药对为 2:1、3:2、2:3、1:1 和 4:1^[15], 黄连-肉桂药对为 10:1、4:1 和 2:1^[16], 黄连-吴茱萸为 1:1、2:1 和 6:1^[17], 黄连-厚朴药对为 1:1、1:2、2:1 和 2:3^[18]。结合文献数据, 经预实验及前期研究结果, 确定黄连-厚朴^[19]、黄连-半夏、黄连-紫苏叶、黄连-干姜、黄连-附子、黄连-肉桂和黄连-吴茱萸各药对配比为 1:1、1:3、1:1、1:1、2:1、10:1 和 6:1 时体外抗流感作用最强。取上述配比的药对及单味药 (黄连、半夏、紫苏叶、干姜、附子、肉桂、吴茱萸和厚朴), 各加 10 倍量水回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 浓缩至相当于含生药量 0.4 g/mL, 即得相应提取药液, 4℃ 冷藏。临用时, 用 PBS 稀释至所需浓度。

2.4 药物对 MDCK 细胞毒性的测定 将黄连类寒热药对及各单味药提取液倍比稀释成 9 个质量浓度 (25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.781、0.391、0.195、0.098 mg/mL), 分别加至 96 孔细胞培养板 (浓度约 1.5×10^5 /mL, 下同) 中, 每孔 100 μL, 平行设 4 个复孔, 同时设正常细胞对照组, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 于倒置显微镜下逐日观察各组的细胞形态, 48 h 后终止培养, 观察各组的细胞病变效应 (CPE)。

2.5 流感病毒半数细胞感染量 (TCID₅₀) 的测定 取贴壁且长成单层的 96 孔细胞培养板, PBS 轻洗 2~3 次。取流感病毒原液用细胞维持液以 10 倍比梯度稀释, 稀释液浓度为 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 。取不同浓度的病毒稀释液, 以每孔 100 μL 依次接种于细胞 (每个浓度稀释液平行设置 8 个复孔), 设置正常对照组 (只加细胞维持液, 不加流感病毒)。将接毒后的培养板置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 待流感病毒感染细胞 1 h 后弃病毒液, PBS 轻洗 2~3 次, 加入细胞维持液 (每孔 100 μL), 常规培养 72 h^[20-21], 并于倒置显微镜下逐天观察细胞病变效应 (CPE), 记录各孔细胞病变状况及孔数。采用 Reed-Muench 法, 计算流感病毒半数细胞感染量 (TCID₅₀)。

2.6 药物对流感病毒感染 MDCK 细胞活性的影响 取细胞维持液将黄连类寒热药对及各单味药提取液倍比稀释成 3 个浓度梯度, 与 50TCID₅₀ 的流感病毒液等体积混合, 将药液与病毒混合液接种于 MDCK 细胞培养板中, 100 μL/孔, 各浓度设 3 个平行复孔, 设置阳性对照组 (每孔加 100 μL 0.01 mg/mL 奥司他韦稀释液)、病毒对照组 (每孔加 100 μL

的病毒生长液) 和正常对照组 (只加细胞维持液), 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 每孔加 20 μL 的 MTT 试剂, 培养 4 h 后加入 150 μL/孔的 DMSO, 振荡 10 min, 酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔的 OD₄₉₀, 并计算药物对病毒的抑制率, 公式如下。

$$\text{病毒抑制率} = \frac{OD_{\text{药物}} - OD_{\text{病毒}}}{OD_{\text{正常}} - OD_{\text{病毒}}} \times 100\%$$

2.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行处理, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组数据先进行正态性检验和方差分析, 若符合正态分布和方差齐性, 则采用 ANOVA 分析; 若方差不齐性, 则进行非参数秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Apriori 关联规则分析 使用 SPSS Modeler 18.0 软件对 193 首含黄连类寒热药对的方剂中黄连与热、温性中药进行关联规则挖掘, 构建“数据源→类型→Apriori→网络”的关联规则数据流, 并设置条件 (支持度 $\geq 15.0\%$, 置信度 $\geq 90\%$, 前项数 ≤ 2), 得到药物关联规则 7 条。由表 1、图 1 可见, 与黄连高频配伍的热、温性中药分别是半夏、厚朴、附子、肉桂、吴茱萸、紫苏叶和干姜, 故确定黄连-半夏、黄连-厚朴、黄连-附子、黄连-肉桂、黄连-吴茱萸、黄连-紫苏叶、黄连-干姜作为研究对象。

表 1 黄连类寒热药对的关联规则分析

序号	后项	前项	支持度/%	置信度/%
1	黄连	吴茱萸	16.58	95.54
2	黄连	半夏	19.69	93.66
3	黄连	紫苏	21.76	94.78
4	黄连	厚朴	17.62	94.52
5	黄连	干姜	20.21	97.44
6	黄连	肉桂	17.10	93.94
7	黄连	附子	16.58	93.75

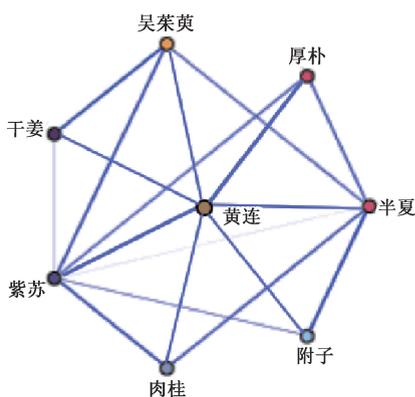


图 1 黄连类寒热药对的关联规则网状图

3.2 药物对 MDCK 细胞的毒性测定结果 由表 2 可知, 黄连、肉桂、吴茱萸、半夏、附子、紫苏叶、干姜、厚朴最大无毒质量浓度分别为 0.391、0.39、0.39、1.56、3.125、6.25、6.25、12.5 mg/mL。由表 3 可知, 黄连-半夏, 黄连-厚朴, 黄连-附子, 黄连-肉桂, 黄连-吴茱萸, 黄连-紫苏叶、黄连-干姜最大无毒质量浓度分别为 1.56、6.25、

1.56、0.195、0.195、0.781、1.56 mg/mL, 对细胞的毒性依次为黄连-吴茱萸=黄连-肉桂>黄连-紫苏叶>黄连-半夏=黄连-附子=黄连-干姜>黄连-厚朴, 即黄连-厚朴药对的细胞毒性最小。

表3 黄连类寒热药对的最大无毒浓度 (n=4)

药对	黄连-半夏	黄连-厚朴	黄连-附子	黄连-肉桂	黄连-吴茱萸	黄连-紫苏叶	黄连-干姜
TC ₀ /(mg·mL ⁻¹)	1.56	6.25	1.56	0.195	0.195	0.781	1.56

3.3 细胞半数感染量 (TCID₅₀) 的测定结果 根据病毒感染 MDCK 细胞引起的细胞病变情况, 采用 Reed-Muench 法测得细胞半数感染量 TCID₅₀ 为 1.0×10^{-4.1}/0.1 mL。

3.4 对流感病毒感染的 MDCK 细胞活性的影响 由表 4 可知, 在细胞最大无毒质量浓度范围内, 7 个药对对流感病毒的抑制率均随其质量浓度的增大而递增, 即抗病毒活性逐渐加强, 呈现显著的量效关系。在最大无毒质量浓度时, 黄连-半夏、黄连-厚朴、黄连-附子、黄连-肉桂、黄连-吴茱萸、黄连-紫苏叶、黄连-干姜对流感病毒的抑制率分别为 39.33%、69.18%、43.57%、52.19%、60.00%、67.54%、61.23%, 与病毒对照组比较, 差异均具有统计学意义 (P<0.01)。黄连、厚朴、干姜、紫苏叶、肉桂、附子、吴茱萸、半夏单味药在最大无毒质量浓度时对流感病毒的抑制率分别为 37.67%、33.95%、49.05%、61.72%、32.57%、40.62%、44.71%、34.76%, 与病毒对照组比较, 差异均具有统计学意义 (P<0.01)。综上所述, 各药对的抗流感病毒作用均优于配伍的两单味药。

4 讨论

关联规则挖掘可从数据背后发现事物之间可能存在的关联, 适用于在大量方剂中挖掘潜在的药物组合, 其中 Apriori 算法是关联规则中最经典和最有影响力的算法, 其余算法 (DHP 算法, Partition 算法和 Samping 算法等) 大多以 Apriori 算法为核心, 是 Apriori 算法的变体或扩展^[22-23]。本文采用关联规则挖掘, 结合 Apriori 算法对含黄连类寒热药对古方中黄连和热, 温性中药进行关联性分析, 挖掘隐含的用药规律, 结果显示, 半夏, 厚朴, 附子, 肉桂, 吴茱萸, 紫苏叶和干姜等 7 味中药与黄连关联度较高, 且黄连-半夏、黄连-厚朴、黄连-附子、黄连-肉桂、黄连-吴茱萸和黄连-紫苏叶均为经典的黄连类寒热药对^[22-25], 与 Apriori 关联性分析结果一致。据报道, 厚朴丸、黄连香薷饮和连朴饮等经典方均包含黄连-厚朴药对, 厚朴丸和连朴饮临床常用于治疗脾胃疾病, 而黄连香薷饮 (仅有黄连、厚朴和香薷组成) 用于治疗暑湿感冒、时疫感冒等症状, 项目组首次发现其具有抗 H1N1 流感病毒作用, 且拆方研究显示, 黄连-厚朴药对的抗流感药效优于全方及各单味药^[6]。6 个经典方如半夏泻心汤 (含黄连-半夏)、附子汤 (含黄连-附子)、交泰丸 (含黄连-肉桂)、左金丸 (含黄连-吴茱萸)、苏叶黄连汤 (含黄连-紫苏叶) 和乌梅丸 (含黄连-干姜) 常用于脾胃疾病的治疗, 其中半夏泻心汤和附子汤也可用于治疗外感病^[26-29], 但 6 个方剂 (包括各所含的黄连类寒热药对) 的抗流感作用研究未见报道。本文研

表2 单味药的最大无毒浓度 (n=4)

单味药	黄连	半夏	厚朴	附子	肉桂	吴茱萸	紫苏叶	干姜
TC ₀ /(mg·mL ⁻¹)	0.391	1.56	12.5	3.125	0.39	0.39	6.25	6.25

表4 黄连类寒热药对对流感病毒感染 MDCK 细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	OD ₄₉₀	抑制率/%
正常对照组	-	1.035±0.037**	-
病毒对照组	-	0.335±0.037	-
阳性对照组	0.01	0.890±0.009**	76.23
黄连组	0.391	0.599±0.029**	37.67
	0.195	0.407±0.029	10.29
	0.097 5	0.345±0.026	1.38
半夏组	1.56	0.587±0.040	34.76
	0.78	0.561±0.016	32.29
	0.391	0.543±0.008	29.76
厚朴组	12.5	0.573±0.050**	33.95
	6.25	0.515±0.046**	25.76
	3.125	0.451±0.018**	16.57
附子组	3.125	0.619±0.026	40.62
	1.56	0.580±0.023	35.00
	0.78	0.424±0.007	12.76
肉桂组	0.39	0.563±0.046	32.57
	0.195	0.555±0.019	31.38
	0.097 5	0.536±0.033	26.78
吴茱萸组	0.39	0.648±0.017**	44.71
	0.195	0.545±0.032**	29.95
	0.097 5	0.541±0.046**	29.43
紫苏叶组	6.25	0.802±0.019**	61.72
	3.125	0.590±0.012**	27.05
	1.56	0.535±0.023**	18.03
干姜组	6.25	0.678±0.022**	49.05
	3.125	0.662±0.034**	46.67
	1.56	0.657±0.055**	46.00
黄连-半夏组	1.56	0.610±0.010**	39.33
	0.78	0.588±0.027**	36.14
	0.39	0.580±0.017**	35.05
黄连-厚朴组	6.25	0.847±0.045**	69.18
	3.125	0.784±0.023**	58.34
	1.563	0.732±0.021**	50.36
黄连-附子组	1.56	0.640±0.033**	43.57
	0.78	0.590±0.021**	36.36
	0.39	0.554±0.044**	31.29
黄连-肉桂组	0.195	0.801±0.051**	52.19
	0.097 5	0.700±0.054**	43.57
	0.048 75	0.626±0.024**	41.62
黄连-吴茱萸组	0.195	0.755±0.025**	60.00
	0.097 5	0.699±0.036**	52.00
	0.048 75	0.600±0.049**	37.86
黄连-紫苏叶组	0.781	0.837±0.022**	67.54
	0.391	0.739±0.044**	51.48
	0.195	0.577±0.048**	24.92
黄连-干姜组	1.56	0.799±0.026**	61.23
	0.78	0.748±0.010**	52.95
	0.39	0.666±0.033**	39.51

注:与病毒对照组比较,**P<0.01。

究显示7个黄连类寒热药对均有体外抗流感病毒作用,且黄连-厚朴药对的抗流感病毒作用最强。

药对的配伍比例不同,将导致药效的差异。本文根据7个药对的文献常用配比^[13-19],并结合抗流感预实验,确定各药对抗流感作用的最佳配比(黄连-半夏、黄连-紫苏叶、黄连-干姜、黄连-附子、黄连-肉桂和黄连-吴茱萸的配比分别为1:3、1:1、1:1、2:1、10:1、6:1),这些配比均为临床常用经方中的经典配比之一,体现了经典方剂中药对配比的科学性。根据此配比进一步考察各药对的抗流感作用强弱,较为科学。

本实验采用MTT法比较了7个黄连类寒热药对体外抗流感病毒作用的强弱,确定黄连-厚朴为抗流感药效最佳的黄连类寒热药对,为下一步继续开展体内抗流感作用研究奠定了基础,也可为含黄连类寒热药对复方的临床应用及流感治疗提供参考。

参考文献:

[1] 邵雨萌, 杨景青. 抗流感药物应用现状及展望[J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(9): 143-145.

[2] 王佳佳, 谢洋, 李建生. 中医药防治急性病毒性呼吸道传染病的现状与思考[J]. 中医学报, 2015, 30(8): 1095-1098.

[3] 刘园, 吴巧凤, 严云良, 等. 黄芩-干姜药对的体外抗流感病毒作用[J]. 中成药, 2017, 39(11): 2386-2389.

[4] Han X, Zhang D K, Guo Y M, et al. Screening and evaluation of commonly-used anti-influenza Chinese herbal medicines based on anti-neuraminidase activity[J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(10): 794-800.

[5] Yan Y Q, Fu Y J, Wu S, et al. Anti-influenza activity of berberine improves prognosis by reducing viral replication in mice[J]. *Phytotherapy Res*, 2018, 32(12): 2560-2567.

[6] 吴巧凤, 宓嘉琪, 吴新新, 等. 黄连香薷饮抗流感病毒作用的拆方研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(9): 2057-2059.

[7] 王江, 周永学, 谢勇波. 半夏泻心汤及其拆方对胃溃疡大鼠胃黏膜 bFGF、PDGF 表达的影响及方中寒热并用配伍意义的研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(7): 2728-2731.

[8] 王守军. 连花清瘟胶囊抗流感病毒药理机制研究[J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(5): 53-54.

[9] 许燕妮, 吴江峰, 丁舸, 等. 谈黄连, 吴茱萸药对在方剂配伍中的意义[J]. 光明中医, 2018, 33(14): 2003-2004.

[10] 李金莲, 丁舸. 试述黄连-半夏对药配伍作用[J]. 江西中医药, 2019, 50(2): 17-18.

[11] 周长征. 黄连-肉桂药对的组方和配比研究[J]. 齐鲁药事, 2011, 30(5): 294-295.

[12] 宋捷民, 洪寅, 钱旭武, 等. 寒热错杂证模型建立及附子、黄连对其的影响[J]. 湖北中医杂志, 2013, 35(12): 22-24.

[13] 施岚尔. 《伤寒杂病论》中黄连的应用规律研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.

[14] 姬李岩, 张建伟. 浅析苏叶黄连汤在妊娠恶阻中的应用[J]. 江西中医药, 2017, 48(10): 78-80.

[15] 张媛. 黄连与附子减毒增效配伍关系的初步研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.

[16] 朱雪梅, 陈永财, 王晓芬. 黄连和肉桂不同配比对交泰丸中总生物碱含量的影响[J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(12): 922-923.

[17] 周晟, 陈澈, 孟庆刚. 黄连吴茱萸药对配伍结构及应用规律[J]. 中医杂志, 2017, 58(19): 1646-1649.

[18] 陈高, 吴巧凤, 严云良, 等. 黄连-厚朴药对配伍的应用数据分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14): 211-216.

[19] 陈高, 吴巧凤, 张小霞, 等. 黄连-厚朴药对9个配伍比例对抑制神经氨酸酶活性的影响[J]. 中成药, 2017, 39(7): 1394-1397.

[20] 杨德森, 钱凯, 干国平. 人中黄不同提取部位体外抗甲型流感病毒活性的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(15): 1586-1589.

[21] 魏文扬, 万海同, 虞立, 等. 麻黄汤体外抗甲型H1N1流感病毒作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 563-570.

[22] 周凯, 顾洪博, 李爱国. 基于关联规则挖掘 Apriori 算法的改进算法[J]. 陕西理工大学学报(自然科学版), 2018, 34(5): 40-44.

[23] 文拯. 关联规则算法的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2009.

[24] 王付. 经方附子药对临床应用探讨[J]. 中医药通报, 2009, 8(4): 28-31.

[25] 张达坤, 杨永和, 蔡敏. 林天东教授寒热并用黄连药对的经验[J]. 海南医学, 2014, 25(23): 3564-3565.

[26] 刘宝恒, 陈燕, 张哲浩. 黄连药对配伍应用六则[J]. 吉林中医药, 1999(5): 54.

[27] 曹生沅, 杨爱萍. 半夏泻心汤在外感疾病中的应用[J]. 中国中医药信息杂志, 1999(6): 32-32.

[28] 刘述梅, 吕书勤. 桂枝加附子汤治疗感冒验案[J]. 新疆中医药, 2017, 35(5): 112-113.

[29] 陈晓辉, 李晓宇, 刘兴兴, 等. 《伤寒论》发热证治[J]. 河南中医, 2017, 37(5): 745-748.