

腰痛宁胶囊药材活性部位不同组合对大鼠软骨细胞的影响

张立国¹, 欧阳霄雯¹, 吴婷婷¹, 史万忠², 倪力军^{1*}

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237; 2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的: 评价腰痛宁胶囊中各活性部位对白介素 1β (IL- 1β) 诱导大鼠软骨细胞的影响及其相互作用。方法: 根据腰痛宁组方原则, 将腰痛宁组方药材中的黄酮、皂苷、挥发油(含水提液)、多糖等活性部位依次加入马钱子与麻黄生物碱中, 得到 6 个腰痛宁拆方及全方样品。取 7 日龄 SD 大鼠 6 只, 采用 II 型胶原酶消化法分离大鼠软骨细胞, 接种 24 h 后随机分空白对照组(含 5% 小牛血清(FBS)及 0.02% 吐温-80 的 DMEM 培养基)、模型组(含 5% FBS, 0.02% 吐温-80 及 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL- 1β 的 DMEM 培养基)及受试药物组(含 5% FBS, 0.02% 吐温-80, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL- 1β 及 $9.77\sim 0.08 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 受试药物的 DMEM 培养基), 给药 48 h 后用 CCK8 及亚甲基蓝染色法测定各样品对大鼠软骨细胞增殖及葡萄糖胺聚糖蛋白(GAG)合成的影响。同时采用最小二乘优化方法, 计算各样品的半数有效浓度(EC_{50})叠加值, 将其与 EC_{50} 实验值进行比较, 以分析各活性部位间的相互作用关系。结果: 较腰痛宁拆方样品, 腰痛宁组方及全方在考察浓度范围内均对 IL- 1β 诱导的软骨细胞具有较显著的促增殖及促进 GAG 合成的作用。各拆方样品中可观察到不同程度的协同、拮抗和叠加作用, 其中腰痛宁全方样品中各活性部位间的协同及叠加作用更为显著。结论: 药引黄酒可显著提高腰痛宁药材组方对大鼠骨关节炎的治疗作用, 显示了腰痛宁处方的合理性及其促进软骨细胞增殖及 GAG 合成的优势。

[关键词] 增殖; 葡萄糖胺聚糖蛋白; 骨关节炎; 腰痛宁胶囊; 活性部位; 黄酒

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0151-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100151

Effect and Interactions of Active Fractions in Yaotongning Capsule on Chondrocytes in Rat *in vitro*

ZHANG Li-guo¹, OUYANG Xiao-wen¹, WU Ting-ting¹, SHI Wan-zhong², NI Li-jun^{1*}

(1. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the *in vitro* effects and interactions of active fractions in Yaotongning capsule (YTNC) by utilizing interleukin- 1β (IL- 1β) activated chondrocytes. **Method:** Six samples were prepared by mixing different active fractions including alkaloids, flavonoids, saponins, volatile oil, hydrous extract and polysaccharides according to the formulating principle and the ratio of materials in YTNC. Chondrocytes were obtained from six seven-day rats using collagenase II, before they were divided into three groups: control group (Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco (DMEM) containing 5% fetal bovine serum (FBS) and 0.02% Tween-80), model group (DMEM containing 5% FBS, 0.02% Tween-80 and $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL- 1β) and sample group (DMEM containing 5% FBS, 0.02% Tween-80, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL- 1β and $9.77\sim 0.08 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ samples). After 48 h, the proliferations of chondrocytes were examined through cell counting kit-8 (CCK8) assay, when the intracellular level of glycosaminoglycan (GAG) was detected by 1, 9-dimethylmethylene blue staining

[收稿日期] 20131215(014)

[基金项目] 上海市科学技术委员会支撑项目(13401901100)

[第一作者] 张立国, 博士, 副教授, 从事新药研发研究, Tel:021-64253694, E-mail: zlgfyt@sina.com

[通讯作者] * 倪力军, 博士, 教授, 从事天然药物研究, Tel:021-64253045, E-mail: nljfyf@163.com

using a glycosaminoglycans (GAG) assay kit. A quantitative evaluation method was exerted to investigate the effect of each sample on IL-1 β activated chondrocytes. **Result:** The comparison of EC₅₀ of YTNC sample and its partial prescriptions indicated that YTNC prescription had the most significant therapeutic effect on promoting proliferation and GAG synthesis in chondrocytes. Synergistic, antagonistic and additive action all could be observed followed by adding alkaloids, flavonoids, saponins, volatile oil, hydrous extract and polysaccharides to each partial prescription. Synergistic and additive effects between active fractions in YTNC prescription were observed, respectively. **Conclusion:** The therapeutic effect on osteoarthritis (OA) of YTNC without Chinese rice wine was obviously improved after the addition of Chinese rice wine, which indicated that the combination of active fractions in YTNC was reasonable.

[**Key words**] proliferation; glycosaminoglycans; osteoarthritis; Yaotongning capsule; active fractions; Chinese rice wine

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是最常见的一种退行性关节疾病,其发病机制十分复杂^[1],迄今没有特别有效的药物治疗手段^[2]。目前西医主要以非甾体类抗炎药缓解症状,往往会带来明显的胃肠道毒副作用,而中医药在治疗 OA 疗效良好,毒副反应小^[3-4]。腰痛宁胶囊以马钱子为君药,并与麻黄、甘草、苍术、乳香、没药、川牛膝及土鳖虫、全蝎、僵蚕 9 味药材,按照一定比例打粉制成胶囊,伴以黄酒吞服,已有几十年临床治疗腰椎间盘突出等症^[5]的历史。最近临床研究发现,腰痛宁对骨性关节炎也有疗效^[6],但腰痛宁中的多药材及多成分使得其现代药理研究难以深入。

近年有学者对由 2~3 种药材的提取物或几种活性成分不同组合构成的中药样品进行细胞水平药理学研究,揭示了不同配伍所产生的协同、拮抗作用^[7],为现代中药药理研究提供了新的途径。但相关研究只是根据测试数据的显著性差异分析来评估样品的活性,而缺乏半数有效浓度 (EC₅₀) 这样的定量评价,样品的真实活性易被掩盖;而几种活性成分的组合难以体现实际中药复方的物质组成。本文以腰痛宁组方药材的活性部位为基础,根据各原料药材在腰痛宁组方中的重要性并借鉴组合化学思想,构造了以马钱子与麻黄生物碱为主、其他 9 味药材的黄酮、皂苷、挥发油 (水提物)、多糖等活性部位为辅的 6 个腰痛宁拆方及全方样品,以软骨细胞增殖情况及细胞内葡糖胺聚糖蛋白 (glycosaminoglycans, GAG) 合成水平作为评价指标,比较各样品在该模型中的 EC₅₀ 值,量化考察各腰痛宁活性部位在不同组合的 OA 治疗作用与其相互影响,探究腰痛宁处方的药效物质基础及其作用机制。

1 材料

1.1 动物 6 只健康清洁级 SD 大鼠,7 日龄,雌雄

各半,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号 SCXK (沪) 2008-0016。

1.2 试剂 PBS 片剂 (Medicago AB, 批号 173106), 大鼠白介素-1 β (IL-1 β), Prospec, 批号 Cyt-394-b), 小牛血清 (Gibco, 批号 619559), 0.25% 胰酶 (批号 S09990L0931), 两性霉素 (批号 S08498L0009), 双抗 (批号 S09965L0022) 及 DMEM 高糖培养基 (批号 S09971L0103) 由美国 Biowest 公司提供, II 型胶原酶 (批号 C6885-100 mg), 木瓜蛋白酶 (批号 P3125, SLBC212V), 乙酸钠 (批号 S2889, SLBD4179V), EDTA 二钠盐 (批号 C5134, SLBFT102V) 及半胱氨酸盐酸盐 (批号 C1276, BCBH6387V) 购自美国 Sigma 公司上海分公司, CCK8 试剂盒 (批号 ES781) 及葡萄糖胺聚糖蛋白 (GAG) 检测试剂盒 (批号 B3000, JK 43) 分别购自日本同仁化学和英国 Biocolor 公司。

1.3 仪器 ML104 型分析天平 (德国 Metter Toledo 公司), QL-901 型漩涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), S10-3 型恒温磁力搅拌器 (上海司乐仪器有限公司), DS-3510DTH 型超声仪 (上海生析超声仪器有限公司), CELL 150 型 CO₂ 培养箱 (Thermo), CKX41 型倒置显微镜 (Olympus), TDZ4-WS 型离心机 (湖南赛特湘仪), CLASS II 型生物安全柜 (LABCONCO), EL-340 型酶标仪 (Biotek), DK-S26 型电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司), TS-1 型脱色摇床 (江苏海门市其林贝尔仪器制造公司)。

1.4 药材及样品 制马钱子 (批号 Y302-09091-10)、苍术 (批号 Y002-101001-2)、麻黄 (批号 Y412-100601-12)、土鳖虫 (批号 Y803-110101-5)、川牛膝 (批号 Y012-110401-1)、僵蚕 (批号 Y805-1011054)、甘草 (批号 Y013-110301-1)、乳香 (批号 110301-2)、

没药(批号 110401-1)、全蝎(批号 Y804-11302-4)、黄酒(批号 291110)均由承德颈复康药业集团有限公司提供,经该公司执业药师王春民鉴定(表 1),样本保存于华东理工大学化学与分子工程学院分析化学实验室。各中药活性部位由本实验室自行提取、配制。根据腰痛宁组方原则及组合化学理念按照表 2 构造腰痛宁拆方及组方样品,以保证每个活性部位至少被评价一次。马钱子及麻黄生物碱作为腰痛宁中君药及较主要成分所对应的活性部位,出现在每个样品组合中并进行反复评价。

其他活性部位则按照各药材在腰痛宁组方中的功效及其重要性,按黄酮、皂苷、挥发油(水提取物)及多糖的顺序依次分别叠加。表 2 列出了所设计的样品组合,各样品中所含的生物碱类、黄酮类、皂苷类、挥发油类(含水提液)和多糖类活性部位的配比均按照腰痛宁胶囊中各药材的投料比例混合而成,样品 I 到样品 VI 为以上五大类有效成分依次叠加而配成,其中腰痛宁全方样品是在所有 10 味药材活性部位混合的基础上加黄酒浓缩物溶解配制。

表 1 腰痛宁胶囊中活性部位质量标准

药材	来源 & 拉丁名	活性部位	相对生药得率/%	含量/%	提取方法 ^[8-10]
制马钱子	马钱科植物马钱 <i>Strychnos nux-vomica</i> L.	总生物碱	3.95	89.70	加热回流法
麻黄	麻黄科植物草麻黄 <i>Ephedra sinica</i> Stapf.	总生物碱	0.99	49.50	加热回流法
		总多糖	3.12	35.30	水煮醇沉法
甘草	豆科植物甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	总黄酮	0.58	44.93	加热回流法
		总皂苷	23.38	78.27	加热回流法
		总多糖	2.70	33.00	水煮醇沉法
川牛膝	苋科植物川牛膝 <i>Cyathula officinalis</i> Kuan.	总皂苷	1.17	15.74	加热回流法
		总多糖	35.49	96.46	水煮醇沉法
苍术	菊科植物茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC.	挥发油	1.32	-	提取-精馏耦合
		总多糖	7.22	62.84	水煮醇沉法
乳香	橄榄科植物乳香树 <i>Buswellia carterii</i> Birdw.	挥发油	1.08	-	提取-精馏耦合
没药	橄榄科植物没药树 <i>Commiphora myrrha</i> Engl.	挥发油	1.24	-	提取-精馏耦合
土鳖虫	鳖蠊科昆虫地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	水提取物	-	10.00	超声水提法
全蝎	钳蝎科动物东亚钳蝎 <i>Buthus martensii</i> Karsch	水提取物	-	10.00	超声水提法
僵蚕	蚕蛾科昆虫家蚕 <i>Bombyx mori</i> L. 4~5 龄的幼虫感染(或人工接种)白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. 而致死的干燥体	水提取物	-	10.00	超声水提法
黄酒	腰痛宁胶囊药引	总多糖	3.98	-	旋转蒸发提取法

2 方法^[11-12]

2.1 受试样品的配置 精密称取表 1 中所列的各中药活性部位,先取热稳定性部位置于烧杯中,加入适量 PBS 搅拌使之初步溶解,沸水浴加热 10 min,待其完全溶解后,冷却并加入热不稳定性部位进行混合(混合方案见表 2),一并超声 20 min,冷却,定容,配成 2500 mg·L⁻¹母液,0.22 μm 滤膜过滤并稀释至各质量浓度(9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.61, 0.31, 0.15, 0.08 mg·L⁻¹),备用。

2.2 软骨细胞培养 采用原代大鼠软骨细胞进行实验,取 7 日龄 SD 大鼠脱颈处死,浸泡于 95% 乙醇数分钟后取出,剪开表皮及肌肉组织,取出股骨头、

肩关节及膝关节软骨组织,小心弃去周边结缔组织并置于 PBS 中,PBS 冲洗数次并剪碎,用 0.2% 的 II 型胶原酶 37 ℃ 消化分离软骨细胞,1 h 后加入等体积全培养基终止消化,混匀并吸取上清,即获得单个细胞悬液,接种于培养皿中培养,隔天换液。

2.3 细胞增殖检测 待细胞基本长满后传代培养,传至第 2 代时,调整细胞密度为 1 × 10⁷/L,接种于 96 孔培养板内用于实验。每孔接种 200 μL 细胞悬液,接种 24 h 后把培养孔分为空白对照组、IL-1β 对照组、受试样品组,每样 3 复孔,分别更换相应的培养液:①空白对照组:换 DMEM(含 5% FBS, 0.02% 聚山梨醇-80)。②模型组:换 DMEM(含 10 μg·L⁻¹

的 IL-1 β , 0.02% 聚山梨醇-80 及 5% FBS)。③受试药物:换 DMEM(含 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IL-1 β , 0.02% 吐温-80, 5% FBS 及各浓度药物),放入培养箱中继续培养 48 h。软骨细胞增殖检测按照 CCK8 试剂盒说明书进行操作,结果所得吸光度(A)均换算为 EC_{50} 。

表 2 腰痛宁胶囊药材活性部位拆方及组方

样品编号	样品组合
I	A
II	A + Fg
III	A + Fg + Sl + Sc
IV	A + Fg + Sl + Sc + Vfm + Va + Ve + Vsb
V	A + Fg + Sl + Sc + Vfm + Va + Ve + Vsb + Pc + Pg + Pa + Peph
VI	A + Fg + Sl + Sc + Vfm + Va + Ve + Vsb + Pc + Pg + Pa + Peph + Crw

注:A. alkaloids; Ae. 麻黄碱; As. 马钱子碱; F. flavonoids; Fg. 甘草黄酮; S. saponins; Sl. 甘草皂苷; Sc. 川牛膝皂苷; V. volatile oils/Water extracts; Vfm. 乳香、没药挥发油; Va. 苍术挥发油; Ve. 土鳖虫水提物; Vsb. 全蝎、僵蚕水提物; P. polysaccharides; Pc. 川牛膝多糖; Pg. 甘草多糖; Pa. 苍术多糖; Peph. 麻黄多糖; Crw. 黄酒提取物; 样品编号 I-V、样品编号 VI 分别是腰痛宁拆方样品及腰痛宁全方。由于挥发油及虫类水提液同为液体提取物,故本研究将其归为“挥发油(含水提液)”一类一并进行实验分析。

2.4 细胞内 GAG 含量检测 待细胞基本长满后传代培养,传至第 2 代时,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{L}$,接种于 24 孔培养板内用于实验。每孔接种 800 μL 细胞悬液,接种 24 h 后按 2.3 叙述对细胞进行分组,放入培养箱中继续培养 48 h。细胞内 GAG 含量检测采用 DMB 染色法,按照试剂盒说明书进行操作。结果所得蛋白多糖浓度均换算为 EC_{50} 。

2.5 数据处理 数据均以 EC_{50} 表示,该值为各指标增长率达到 50% 所对应的药物浓度,由各样品量效曲线结合 Origin7.5 软件作图计算得到。为进一步探讨腰痛宁胶囊各药材或者部位间的相互作用,本文通过比较相关样品的 EC_{50} 实验值及其叠加值来判断各活性部位间的相互作用:设活性部位 i 在样品 j 中的质量比及其 EC_{50} 分别为 X_{ij} 与 $\text{EC}_{50}(i, j)$,将样品 j 的实验 EC_{50} 与标准差分别记为 $\text{EC}_{50}(E_j)$ 与 $\text{SD}(j)$ 。设样品 j 的各活性部位间无相互作用,则 $\text{EC}_{50}(i, j)$ 可通过求解方程 $\| \sum_i X_{ij} \text{EC}_{50}(i, j) - \text{EC}_{50}(E_j) \|$ 的最小值获得。定义样品 j 中各活性部位的 EC_{50} 之和为样品 j 的 EC_{50} 叠加值并记为 $\text{EC}_{50}(N_j)$,即 $\text{EC}_{50}(N_j) = \sum_i X_{ij} \text{EC}_{50}(i, j)$ 。若 $\text{EC}_{50}(E_j) - \text{SD}(j) > \text{EC}_{50}(N_j)$,则样品 j 的 EC_{50} 叠加值小于

EC_{50} 实验值,说明其活性部位间发生了拮抗作用;若 $\text{EC}_{50}(E_j) + \text{SD}(j) < \text{EC}_{50}(N_j)$,说明样品 j 的各活性部位间发生了协同作用;若 $\text{EC}_{50}(E_j) - \text{SD}(j) < \text{EC}_{50}(N_j) < \text{EC}_{50}(E_j) + \text{SD}(j)$,表明样品 j 中各活性部位间存在叠加作用。以上计算过程通过 MATLAB 7.0 实现。

3 结果

3.1 各样品对软骨细胞的促增殖作用 6 个样品对 IL-1 β 诱导的软骨细胞均有显著的促增殖作用。其中样品 VI 的 EC_{50} 明显小于其他样品且较样品 V 的 EC_{50} 有所降低,说明腰痛宁全方的促增殖作用最佳且药引黄酒的加入加强了腰痛宁药材组方的活性。拆方样品 I 的 EC_{50} 实验值与 SD 之和小于其 EC_{50} 叠加值,说明麻黄总生物碱与马钱子总生物碱间发生了协同作用。拆方样品 II 及 III 则呈现出截然相反的趋势,可见在样品 I, II 中分别加入甘草黄酮,甘草及川牛膝皂苷后,新加入的活性部位与初始样品中的活性部位间发生了拮抗作用。在样品 III 中加入挥发油/水提物(Va, Vh, Vr and Ve)所得样品 IV 的实验 EC_{50} 值与 SD 的和略小于 EC_{50} 叠加值,说明拆方样品 IV 中的活性部位间有轻微的协同作用。然而,在样品 IV 中加入各多糖部位所得腰痛宁药材组方样品 V 中,其活性部位间存在微弱的拮抗作用。YTNC 的全方样品 VI 的 EC_{50} 叠加值落在实验 EC_{50} 与 SD 和差范围内,说明样品 VI 的活性部位间产生了叠加作用。见表 3。

表 3 各中药样品对 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖作用的影响
($\bar{x} \pm s$) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

样品/ EC_{50}	EC_{50} 叠加值	EC_{50} 实际值 ($n=3$)
I	8.508	8.180 \pm 0.257
II	6.482	8.173 \pm 0.063
III	7.958	9.860 \pm 0.016
IV	12.480	11.840 \pm 0.314
V	6.963	7.499 \pm 0.189
VI	6.971	7.123 \pm 0.180

3.2 各中药样品对软骨细胞内 GAG 合成的促进作用 6 个样品对大鼠软骨细胞内的 GAG 合成均有不同程度的促进,其中由两种生物碱与甘草黄酮组合的拆方样品 II(A + Fg) 作用最佳,其次是全方样品 VI(腰痛宁药材组方 + 黄酒)。全方样品 VI 的 EC_{50} 较样品 V 有显著下降,说明药引黄酒可明显增强腰痛宁药材组方对软骨细胞内 GAG 合成的促进作用,这一结果对骨关节炎的治疗具有现实意义。

样品 I 和 II 的 EC_{50} 实验值与 SD 之和远小于 EC_{50} 叠加值,可见麻黄总生物碱与马钱子总生物碱之间、这两种生物碱与甘草黄酮间发生了显著的协同促进软骨细胞内 GAG 合成的作用。与此相反,拆方样品 III 和 IV 的实验值与 SD 之差大于 EC_{50} 叠加值,说明在样品 II 与样品 III 中分别加入皂苷及挥发油/水提物后,皂苷与样品 II 中的生物碱 + 黄酮组合间产生了拮抗作用。挥发油(水提物)与样品 III 中的生物碱 + 黄酮 + 皂苷组合间也发生了类似的拮抗作用,因此样品 III, IV 的活性较样品 II, III 有所降低。对于腰痛宁药材组方 V 和腰痛宁全方 VI,其 EC_{50} 实验值 + SD 均远小于对应样品的 EC_{50} 叠加值,可见多糖活性部位与生物碱 + 黄酮 + 皂苷 + 挥发油(水提物)组合间存在很强的协同增效作用。样品 V 与 VI 的实验 EC_{50} 显著小于样品 IV 的值,表明在加入多糖(Pc, Pg, Pa, Peph)及黄酒提取物后,大大提高了腰痛宁拆方样品 IV 对软骨细胞内 GAG 合成的促进作用。见表 4。

表 4 各中药样品对 IL-1 β 诱导的软骨细胞内 GAG 合成的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$) $mg \cdot L^{-1}$

样品	EC_{50} 叠加值	EC_{50} 实验值
I	3.082	0.956 \pm 1.055
II	0.997	0.127 \pm 0.015
III	2.143	4.508 \pm 0.309
IV	3.404	5.808 \pm 2.387
V	1.938	0.405 \pm 0.415
VI	1.938	0.188 \pm 0.134

4 结论

含腰痛宁全方在内的 6 个腰痛宁活性部位组合样品对 IL-1 β 诱导的软骨细胞具有较强的促增殖及促 GAG 合成作用,其中腰痛宁全方的作用最强,表明了腰痛宁处方的合理性及其在促进软骨细胞增殖与 GAG 合成方面的优势,药引黄酒有助于腰痛宁药效的发挥。不同的腰痛宁药材活性部位组合在两个模型下的相互作用不同。

活性部位的提取纯化剔除了非活性成分及许多有限制性、抑制作用的干扰因素,使复方中药的物质基础更加清晰。本文根据药材活性部位的药理活性及其在腰痛宁组方中的“君臣佐使”地位,参考组合化学概念科学地组合腰痛宁中部分(或全部)活性部位,从细胞层面利用量化指标评价各样品活性及其活性部位间的作用,为中药复方药效和作用机制

的评估提供了新思路。

本文结果结合其他模型(抗炎、镇痛、免疫等)评价结果,可提供不同模型下最佳的腰痛宁组方样品,可望形成以腰痛宁为核心的风湿痹病系列药物,为医生根据病程状况选择适宜的药物提供支持。

[参考文献]

- [1] Nguyen Uyen-Sa D T, Zhang Y Q, Zhu Y Y, et al. Increasing prevalence of knee pain and symptomatic knee osteoarthritis: survey and cohort data [J]. *Ann Intern Med*, 2011, 155(11):725.
- [2] 余建华,张衡. 独活寄生汤治疗膝关节炎临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(7):215.
- [3] 高戈,吴轟,田静,等. 补肾活血祛痹方治疗膝关节炎临床疗效及其对血液流变学,抗炎,抗氧化的影响[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(3):390.
- [4] 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南(2007年版)[J]. *中国临床医生*, 2008, 36(1):28.
- [5] 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, 2010:1192.
- [6] 刘书堂. 腰痛宁胶囊“腰膝同治”[J]. *医药食疗保健*, 2012(8):29.
- [7] Wang L, Zhou G B, Liu P, et al. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12):4826.
- [8] 倪力军,盖群,陈露,等. 不同粒径马钱子粉中马钱子碱、土的宁的含量分析与比较[J]. *华东理工大学学报:自然科学版*, 2012, 38(2):195.
- [9] Zhang L G, Fang C Y, Ouyang X W, et al. Simultaneous determination of saponins in *Glycyrrhizae*, *Notoginseng* and *Ginseng* by high performance liquid chromatography [J]. *Transactions of Tianjin University*, 2013, 19(6):430.
- [10] 倪力军,王媛媛,何婉瑛,等. 八种多糖的单糖组成、活性测定及其相关性分析[J]. *天津大学学报:自然科学版*, 2014(47):1.
- [11] 谭杨,陈廖斌,汪晖,等. 黄芪多糖对体外培养大鼠软骨细胞内糖胺多糖合成的影响及其机制[J]. *武汉大学学报:医学版*, 2008, 29(2):153.
- [12] Zhou P H, Liu S Q, Peng H. The effect of hyaluronic acid on IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(12):1643.

[责任编辑 聂淑琴]