

补肾活血方中5种黄酮类成分的体外抗炎活性

孙东东, 程海波*, 沈卫星, 王卓, 晏婷婷

(南京中医药大学转化医学研究中心, 国家中医药管理局名医验方评价与转化重点实验室,
江苏省抗肿瘤验方研究与产业化工程实验室, 南京 210023)

[摘要] 目的:观察补肾活血方中槲皮素、儿茶素、淫羊藿次苷II、金丝桃苷、淫羊藿苷等5种黄酮类成分对肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6 (IL-6) 及一氧化氮 (NO) 等炎症介质释放浓度的影响作用, 探讨复方治疗骨关节炎的初步机制。方法:采取 LC-MS 技术进行定性分析, 选取补肾活血方水提液中存在的具有潜在治疗骨关节炎活性的槲皮素等5种黄酮类化合物(槲皮素、儿茶素、淫羊藿次苷II、金丝桃苷、淫羊藿苷), 采用体外脂多糖 (LPS) 刺激的 RAW 264.74 小鼠巨噬细胞为模型, 随机分为空白组, 模型组, 槲皮素低、高剂量组 (20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 儿茶素低、高剂量组 (20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 淫羊藿次苷II低、高剂量组 (20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 金丝桃苷低、高剂量组 (20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 淫羊藿苷低、高剂量组 (20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 利用酶联免疫法 (ELISA) 测定细胞释放 TNF- α , IL-6 及 NO 的抑制作用。结果:结合 LC-MS 分析, 确定补肾活血方水提液中确实存在槲皮素、儿茶素、淫羊藿次苷II、金丝桃苷以及淫羊藿苷等黄酮类化合物。与空白组比较, 模型组 TNF- α , IL-6, NO 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 槲皮素与淫羊藿苷在 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 以及淫羊藿次苷II在 20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 TNF- α 的释放具有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 儿茶素与淫羊藿次苷II在 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 槲皮素与淫羊藿苷在 20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 均对 IL-6 水平具有显著的抑制 ($P < 0.01$), 金丝桃苷在 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 槲皮素、儿茶素、淫羊藿次苷II以及淫羊藿苷在 20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 均对 NO 的释放具有显著抑制 ($P < 0.01$)。结论:补肾活血方的治疗骨关节炎活性可能是通过抑制炎症介质释放, 降低 TNF- α , IL-6, NO 等含量发挥作用, 这对验证复方药效活性, 探究效应物质基础具有重要意义。

[关键词] 补肾活血方; 骨关节炎; 黄酮; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6; 一氧化氮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0137-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070137

In Vitro Anti-inflammatory Activity of Five Flavonoids from Bushen Huoxue Recipe Based

SUN Dong-dong, CHENG Hai-bo*, SHEN Wei-xing, WANG Zhuo, YAN Ting-ting (Translational Medicine Center of Nanjing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Famous Doctors' Proved Recipe Evaluation and Transformation of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Provincial Lab of Anticarcinoma Proved Recipe Research and Engineering Industrialization, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of quercetin, cianidanol, icarisid II, hyperoside and icariin on the inflammatory mediators of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and nitric oxide (NO), and to discuss the preliminary mechanism of Bushen Huoxue recipe in treating bone arthritis. **Method:** Qualitative analysis of five flavonoids in water extract of Bushen Huoxue recipe was performed using LC-MS technology, because they may have a potential effect on osteoarthritis. RAW264.74 murine macrophages was stimulated by lipopolysaccharide (LPS) *in vitro* and divided into the blank group, the model group, the low-and high-dose of five flavonoids groups (20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The effects on IL-6, TNF- α and NO of five flavonoids were detected by ELISA. **Result:** Quercetin (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), icariin (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and icarisid II (20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) had a significant inhibition on the release of TNF- α . Cianidanol (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), icarisid II (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), quercetin (20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and icariin (20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) had a significant inhibition on IL-6. Hyperoside (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and four the other flavonoids (20, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) had a remarkable inhibition on

[收稿日期] 20140822(013)

[基金项目] 江苏省中医药局科技项目(LZ13013);江苏高校优势学科建设工程资助项目(2011ZYX6-013);江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXZZ12-0626)

[第一作者] 孙东东, 博士, 从事中药物质基础及活性研究, Tel:025-85811001, E-mail:sun_21373@163.com

[通讯作者] *程海波, 博士, 副教授, 从事中医药转化医学研究, Tel:025-85811005, E-mail:chb7197@163.com

the release of NO. **Conclusion:** The mechanism of Bushen Huoxue recipe in treating osteoarthritis may be contributed by inhibiting the release of inflammatory mediators of TNF- α , IL-6 and NO. The results are helpful for exploring the material basis of Bushen Huoxue recipe.

[Key words] Bushen Huoxue recipe; osteoarthritis; flavonoids; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6; nitric oxide

补肾活血方是南京中医药大学第一附属医院用于治疗骨关节炎(osteoarthritis, OA)的协定处方,为深入研究补肾活血方治疗OA的效应物质基础及药效分子机制,前期实验采用液质联用技术(LC-MSⁿ),围绕复方进行了定性和定量分析^[1-3],确定了复方中存在若干活性成分,并比较了某些活性成分在单味药与复方水提液中的含量变化。本研究首次选取5种在复方提取液中经LC-MSⁿ技术鉴定存在,并且文献报道有明确或潜在治疗OA活性的槲皮素^[4]、儿茶素^[5]、淫羊藿次苷II^[6]、金丝桃苷^[7]与淫羊藿苷^[8-9]作为体外炎症实验对象。肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)及一氧化氮(NO)等炎症因子在OA的发病过程中起着重要调节作用,可以加速关节软骨基质的分解代谢^[10-14]。采用ELISA法同时测定槲皮素等5种黄酮类成分,对脂多糖(LPS)刺激诱导的RAW264.74小鼠巨噬细胞释放炎症介质TNF- α ,IL-6及NO的抑制作用,方法快速、便利、准确,对于评价和验证复方治疗OA活性,阐明药效分子机制,探究效应物质基础具有重要意义。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠巨噬细胞RAW264.74细胞,上海汉博生物科技有限公司,批号13-00302。

1.2 药物及试剂 独活10g,桑寄生10g,牛膝15g,淫羊藿15g,当归15g,川芎15g,白芍15g,虎杖15g,制天南星15g,均购自安徽亳州,经南京中医药大学陈建伟教授对照2010年版药典(一部)的药材标准,进行定性和相关指标定量分析,鉴定为正品;槲皮素(批号081-9003),儿茶素(批号10144-201209),淫羊藿次苷II(批号20264-201201),金丝桃苷(批号10228-201204),淫羊藿苷(批号737-8701)等对照品均购于中国食品药品检定研究院。脂多糖(LPS,美国Sigma公司),1640培养基(美国Gibco公司),FBS(上海四季青公司),胰酶(美国Gibco公司,批号27250018),DMSO(上海凌风公司,批号20110105),小鼠TNF- α ELISA试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司,批号EM004-96),小鼠IL-6 ELISA试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司,

批号EM008-96),NO ELISA试剂盒(江苏碧云天生物技术有限公司,批号S0021-2),乙腈、甲酸(色谱纯,德国Merk公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 ACQUITY UPLC系统(四元泵溶剂系统,在线脱气机和自动进样器,美国Waters公司),Xevo TQ型质谱检测器(美国Waters公司),MassLynxTM型质谱工作站软件(美国Waters公司),BT125型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),EPED型超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司),TGL16型低温高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司),RE-52A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),SY-1220型水浴锅(美国Crystal公司),1300SeriesA2型无菌操作台(美国Thermo scientific公司)。

2 方法

2.1 LC-MS样品制备 独活等复方药材合并后加入8倍量水,煎煮3次,时限分别为1,1,0.5h,过滤合并滤液,95%乙醇沉淀,离心后取上清液浓缩至干,精密称取0.1000g浸膏用50%甲醇定容至200mL量瓶,经0.22 μ m微孔滤膜滤过,供液质连用定性分析。

2.2 LC-MS色谱条件 1860036型色谱柱C₁₈(2.1mm \times 100mm,1.7 μ m)。流动相A(0.10%甲酸溶液)以及B(乙腈),梯度洗脱(0~7min,90%~65%A;7~11min,65%~40%A;11~14min,40%~0%A;14~17min,0%~0%A;17~18min,0%~90%A)。流速0.4mL \cdot min⁻¹,柱温35 $^{\circ}$ C,进样体积2 μ L;补肾活血方水提部分的(-)ESI-MS和(+)ESI-MS的质谱总离子流图(TIC)。

2.3 LC-MS质谱条件 检测方式:多反应检测(MRM);毛细管电压3.0kV;离子源温度150 $^{\circ}$ C;脱溶剂气温度550 $^{\circ}$ C;脱溶剂气流量1000L \cdot h⁻¹;锥孔气流量50L \cdot h⁻¹;碰撞气流量0.15mL \cdot min⁻¹;取样锥孔电压及碰撞能量见表1。

2.4 细胞铺板^[15] 用RPMI-1640培养基+10%FBS培养小鼠巨噬细胞RAW264.74(培养条件:5%CO₂,37 $^{\circ}$ C恒温培养),待细胞长至适量后,用

表 1 5 种化合物的主要质谱检测参数

Table 1 Main mass spectrum detection parameters of 5 kinds of flavonoid compounds

No.	化合物	相对分子质量	多反应离子检测	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min	离子模式
1	槲皮素	302	301. 10 > 150. 89	36	22	5. 73	ES ⁻
2	儿茶素	290	289. 16 > 202. 94	32	20	1. 61	ES ⁻
3	淫羊藿次苷 II	514	513. 35 > 366. 26	38	26	9. 75	ES ⁻
4	金丝桃苷	464	487. 22 > 185. 00	38	26	3. 23	ES ⁺
5	淫羊藿苷	676	602. 38 > 302. 75	37	26	7. 99	ES ⁻

0. 25% 胰酶消化细胞, 计数, 稀释至 1×10^5 个/mL, 以 200 μ L/孔的量铺至 48 孔板中。放入无菌培养箱中, 继续培养 24 h。

2.5 给药方法 用 RPMI-1640 培养基将 LPS 稀释至 500 μ g \cdot L⁻¹, 待测药用 DMSO 溶解使其质量浓度为 1×10^5 mg \cdot L⁻¹, 而后用培养基将待测药稀释至 100, 20 mg \cdot L⁻¹。吸净孔中培养基, 将稀释后的药物依次加入 300 μ L, 设阴性空白组 (不加药), LPS 模型组 (只加 LPS), 槲皮素高、低剂量组 (100, 20 mg \cdot L⁻¹), 儿茶素高、低剂量组 (100, 20 mg \cdot L⁻¹), 淫羊藿次苷 II 高、低剂量组 (100, 20 mg \cdot L⁻¹), 金丝桃苷高、低剂量组 (100, 20 mg \cdot L⁻¹), 淫羊藿苷高、低剂量组 (100, 20 mg \cdot L⁻¹), 每组设 3 个复孔。将 48 孔板置于无菌培养箱继续培养 24 h。

2.6 检测方法 收集细胞上清液, 在 4 $^{\circ}$ C 下, 10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 2 min 后, 吸取上清液, 按照说明

书中检测步骤处理上清液, 最后用酶标仪以 450 nm 为检测波长, 检测 TNF- α , IL-6 水平; 以 540 nm 为波长, 检测 NO 水平。按照试剂盒说明书要求进行操作, 以标准品浓度为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 根据样品 A 计算样品细胞因子浓度, 并记录。

$$\text{抑制率} = 100\% - (\text{加药组 C 值} - \text{空白 C 值}) / (\text{LPS 组 C 值} - \text{空白组 C 值}) \times 100\%$$

(C 为细胞因子浓度)

2.7 统计学分析 采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析, 各组检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 补肾活血方中黄酮类化合物的检测 结合 LC-MS 分析, 确定补肾活血方水提液中确实存在槲皮素、儿茶素、淫羊藿次苷 II、金丝桃苷以及淫羊藿苷等黄酮类化合物。见图 1。

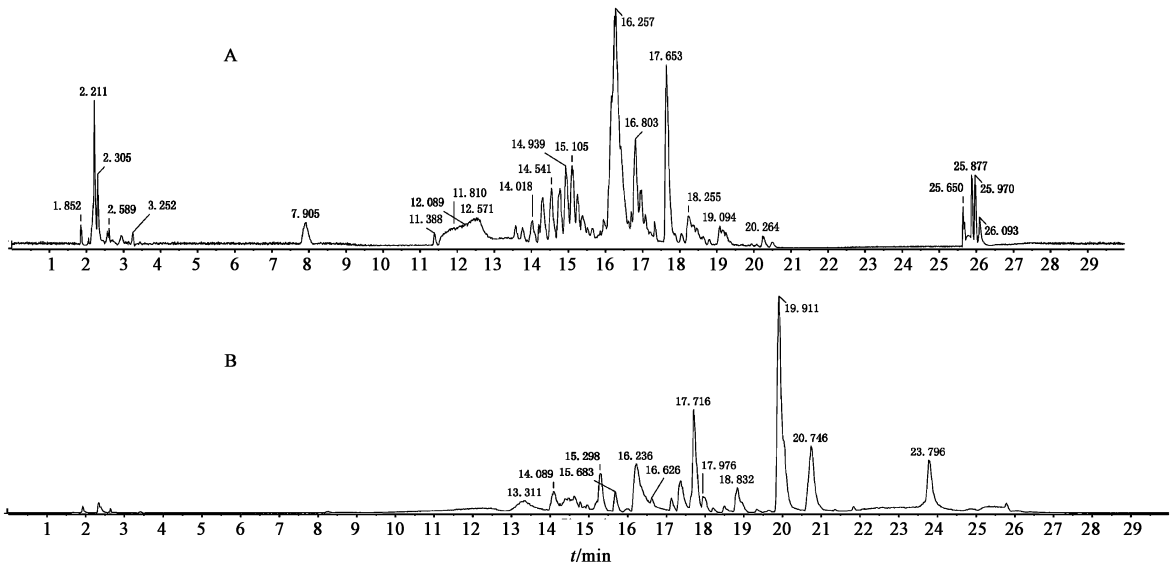


图 1 补肾活血方水提部位负离子 (A) 和正离子 (B) 模式的总离子流

Fig.1 Total ion flow chart of negative ion (A) and positive ion (B) mode in water extract of Bushen Huoxue recipe

3.2 对 LPS 诱导 RAW264. 74 细胞释放 TNF- α , IL-6 及 NO 的抑制作用 与空白组比较, 槲皮素、淫羊藿

次苷 II 及淫羊藿苷对 TNF- α 的释放具有显著的抑制作用 ($P < 0.05, P < 0.01$), 槲皮素、儿茶素、淫羊藿次

苷 II 及淫羊藿苷对 IL-6 水平具有显著的抑制 ($P < 0.05, P < 0.01$), 槲皮素等 5 种成分均对 NO 的释放具有显著抑制 ($P < 0.05, P < 0.01$)。槲皮素在 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 TNF- α 释放无明显抑制作用, 儿茶素与金丝桃苷在 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 TNF- α 释放无抑制作用; 儿茶素与金丝桃苷在 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 IL-6 释放无抑制作用, 同时在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下, 虽然淫羊藿次苷 II 与淫羊藿苷均对 IL-6 释放显示明显抑制作用, 但淫羊藿苷的抑制率小于淫羊藿次苷 II; 金丝桃苷在 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 NO 释放无明显抑制作用。见表 2~4。

表 2 复方中 5 种黄酮化合物对 LPS 诱导 RAW264.74 细胞释放 TNF- α 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Inhibiting effects of 5 kinds of flavonoid compounds on release of TNF- α in LPS-induced RAW264.74 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	抑制率 /%
空白	-	338.1 ± 24.3	-
模型	0.5	8 063.4 ± 766.8	-
槲皮素	20	7 610.5 ± 562.7	5.86
	100	3 607.4 ± 250.1	57.68 ²⁾
儿茶素	20	7 805.7 ± 655.9	3.34
	100	6 565.2 ± 573.6	19.39 ¹⁾
淫羊藿次苷II	20	3 569.6 ± 285.1	58.17 ²⁾
	100	45.1 ± 3.6	103.79 ²⁾
金丝桃苷	20	3 303.6 ± 288.1	1.76
	100	2 739.4 ± 199.2	18.57 ¹⁾
淫羊藿苷	20	7 801.5 ± 609.7	3.39
	100	3 371.3 ± 269.2	60.74 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

4 讨论

研究表明, TNF- α 以促滑膜成纤维细胞样细胞增殖作用为主, 并因其增强滑膜细胞 RNA 的表达功能, 而使滑膜组织纤维性变大及滑液中细胞因子水平异常升高, 从而改变关节的力学特征和软骨细胞的生活微环境, 而成为参与 OA 关节软骨退变的途径之一^[10]。IL-6 又称 B 细胞分化因子, 其可激活 B 细胞和 T 细胞, 通过其自分泌形式作用于软骨细胞, 促进软骨细胞的增殖^[11]。NO 是多种细胞因子的信号分子, 正常情况下, NO 起着宿主防疫作用, 但过量的 NO 可导致各种慢性炎症。OA 早期, 受损裸露的软骨细胞在周围细胞因子的作用下诱发诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 蛋白表达, 从而导致 NO 大量释放。NO 又进一步促进炎症细胞因子释放, 从而抑制软骨细胞

表 3 复方中 5 种黄酮化合物对 LPS 诱导 RAW264.74 细胞释放 IL-6 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Inhibiting effects of 5 kinds of flavonoid compounds on release of IL-6 in LPS-induced RAW264.74 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹	抑制率 /%
空白	-	7.0 ± 0.6	-
模型	0.5	3 362.1 ± 287.2	-
槲皮素	20	2 374.2 ± 199.6	29.45 ²⁾
	100	687.5 ± 56.2	79.73 ²⁾
儿茶素	20	3 215.3 ± 253.1	4.38
	100	2 052.6 ± 182.3	39.05 ²⁾
淫羊藿次苷II	20	3 307.6 ± 296.6	1.64
	100	6.0 ± 0.5	100.03 ²⁾
金丝桃苷	20	3 303.4 ± 272.7	1.76
	100	2 739.3 ± 204.1	18.57 ¹⁾
淫羊藿苷	20	995.2 ± 88.8	70.55 ²⁾
	100	1 170.6 ± 90.5	65.34 ²⁾

表 4 复方中 5 种黄酮化合物对 LPS 诱导 RAW264.74 细胞释放 NO 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Inhibiting effects of 5 kinds of flavonoid compounds on release of NO in LPS-induced RAW264.74 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	NO /μmol·L ⁻¹	抑制率 /%
空白	-	0	-
模型	0.5	10.70 ± 1.22	-
槲皮素	20	2.87 ± 0.19	73.18 ²⁾
	100	2.43 ± 0.15	77.29 ²⁾
儿茶素	20	6.35 ± 0.62	40.65 ²⁾
	100	4.17 ± 0.50	61.03 ²⁾
淫羊藿次苷II	20	4.17 ± 0.44	61.03 ²⁾
	100	1.13 ± 0.11	89.44 ²⁾
金丝桃苷	20	8.52 ± 0.77	20.37 ¹⁾
	100	3.74 ± 0.28	65.05 ²⁾
淫羊藿苷	20	2.44 ± 0.29	77.20 ²⁾
	100	3.74 ± 0.34	65.05 ²⁾

分泌细胞外基质和合成 II 型胶原, 影响软板的营养交换, 使软骨处在一个不良的微环境中, 最终导致软骨质量下降和进行性退化^[13]。所以说, 抑制 TNF- α , IL-6 及 NO 的释放水平, 对于缓解炎症症状、控制炎症进程具有重要意义。

复方中的黄酮化合物对于 TNF- α , IL-6 及 NO 的释放显示了不同程度的抑制作用, 这正验证了复方药

效的多靶点效应;复方其他的提取部位以及废弃的醇沉部位是否具有炎症因子释放抑制效应,需要进一步研究,以期复方综合药效找到科学实验依据;此外对于这些部位或成分还可以探索开展针对其他炎症因子的药效研究,为更深层次的药理药效评价、作用机制分析提供支撑;目前临床上治疗 OA,主要采用非甾体抗炎药、镇痛剂以及关节注射透明质酸钠等手段,但是实际疗效往往并不理想,经常加重 OA 的发病程度,延长病情;补肾活血方经临床实践证明其疗效确切、安全可行;OA 从中医的角度应归于痹证范畴,痹证往往伴随大量的炎症反应,所以说如何有效结合中医的病机研判,从治则、治法等角度,通过药效实验,提升完善中医的病机理论,较好地达到医药结合,中药研究与中医理论的科学呼应,这也是复方研究下一步的重点和方向。

黄酮类化合物,广泛存在于多种植物中,具有重要的生理活性;适量摄入黄酮类化合物能减少癌症、肿瘤、心血管疾病、脂质过氧化以及骨质疏松等疾病的发病率^[16-17],可见黄酮类化合物对于 OA 的治疗意义重大。目前以淫羊藿为主在临床上治疗骨质疏松症的中药复方占有很大比例,疗效显著。淫羊藿苷是淫羊藿中含量最丰富的黄酮类化合物,也是其主要有效成分,有报道称淫羊藿苷的代谢物淫羊藿次苷 II 是淫羊藿的特征活性成分,其促进骨髓间充质干细胞成骨性分化的活性高于淫羊藿苷^[18];实验结果表明淫羊藿苷在 20 mg·L⁻¹ 时对于 IL-6 与 NO 释放的抑制率大于 100 mg·L⁻¹ 时的抑制率,此外淫羊藿苷在高浓度下对炎症因子释放的抑制率均小于淫羊藿次苷 II,这也支撑了之前的报道,另外淫羊藿苷对于炎症因子的释放是否具有双向调节机制,下一步将探讨其定量构效关系。

[参考文献]

[1] 孙东东,徐晓芳,严世海,等.独活水提部位化学成分的 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析[J].天然产物研究与开发,2014,26(1):69-76.
[2] 孙东东,徐晓芳,刘丽萍,等.基于 UPLC-TQ-MS 分析法同时测定补肾活血方中 12 种活性成分含量[J].中华中医药杂志,2014,29(5):1587-1590.

[3] 孙东东,徐晓芳,崔九成,等.白芍水提部位化学成分 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析[J].中国中药杂志,2013,38(11):1760-1765.
[4] 舒毅,谭陶,张思宇,等.槲皮素的药理学研究进展[J].华西药学杂志,2008,23(6):689-691.
[5] 孙册.饮茶与健康[J].生命的化学,2003,23(1):44-45.
[6] 张林,康蓓蓓,李然,等.影响骨髓间充质干细胞骨向分化的方药研究思路探讨[J].中华中医药杂志,2012,27(8):2192-2195.
[7] 郭江扬,徐丽,郑玉忠,等.中药黄酮对促进大鼠成骨细胞形成的作用及分子机制的研究[C].广州:全国第九届天然药物资源学术研讨会,2010.
[8] 张华峰,杨晓华.淫羊藿的生物活性成分及其开发策略研究[J].中草药,2010,41(2):329-332.
[9] 周建,陈克明,葛宝丰,等.淫羊藿苷抑制体外培养的大鼠股骨组织骨吸收活性[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(24):201-205.
[10] 邓康复,柴本甫,杨庆铭.肿瘤坏死因子- α 对骨关节炎滑膜细胞增殖和 RNA 表达的影响[J].中国药理学通报,1998,11(6):506-508.
[11] 李忆农.细胞因子与关节炎[J].中华风湿病杂志,2000,4(1):56-58.
[12] 王桂芳,李晓君,杨栋慧,等.蚁龙痛痹汤对兔膝关节炎软骨细胞凋亡调控基因表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):246-250.
[13] 金大地,孙炜,王吉兴,等.一氧化氮合酶抑制剂对骨性关节炎的潜在治疗意义[J].中华骨科杂志,2002,22(6):367-371.
[14] 杨晓军,苗文丽,裴林,等.天星健骨方对佐剂性关节炎大鼠血清白介素-1 和肿瘤坏死因子- α 的影响[J].中国中医基础医学杂志,2013,19(11):1284-1286.
[15] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].第 3 版[M].北京:人民卫生出版社,2003:1785.
[16] 延玺,刘会青,邹永青,等.黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J].有机化学,2008,28(9):1534-1544.
[17] 曹长姝,刘百联,沈伟哉,等.中药臭灵丹中黄酮类化合物的体外抗肿瘤活性研究[J].中国中药杂志,2010,35(16):2171-2174.
[18] 翟远坤,葛宝丰,陈克明,等.淫羊藿苷与其代谢产物淫羊藿次苷 II 对骨髓间充质干细胞成骨性分化影响的比较研究[J].中药材,2010,33(12):1896-1900.

[责任编辑 周冰冰]