

· 药物代谢 ·

药理效应法测定穿山龙总皂苷的药动学参数

刘树民, 张宁, 周琦, 于栋华*

(黑龙江中医药大学 药物安全性评价中心, 中医药研究院, 黑龙江省高等院校中药
药性理论创新团队, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:考察穿山龙总皂苷在大鼠体内的药动学特征。方法:采用尿酸钠诱导的大鼠急性痛风性关节炎模型,以白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)作为测定指标,利用酶联免疫吸附法按试剂盒说明书测定 IL-1 β 和 TNF- α 含量,采用符合中药整体观思想的药理效应法研究穿山龙总皂苷的药动学。结果:穿山龙总皂苷口服给药后主要药动学参数为药-时曲线下面积(AUC_{0-t})121.84 ng·h·L⁻¹,药-时曲线下总面积(AUC_{0-∞})542.56 ng·h·L⁻¹,平均滞留时间(MRT_{0-t})5.92 h,平均总滞留时间(MRT_{0-∞})45.95 h,达峰时间(t_{max})1.96 h,达峰浓度(C_{max})13.21 ng·L⁻¹。结论:穿山龙总皂苷的表观动力学过程符合一室开放模型。

[关键词] 穿山龙; 总皂苷; 药理效应法; 药代动力学参数; 尿酸钠; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0075-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160075

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160628.1136.012.html>

[网络出版时间] 2016-06-28 11:36

Determination of Pharmacokinetics Parameters of Total Saponins from Dioscoreae Nipponicae Rhizoma by Pharmacological Effect Method

LIU Shu-min, ZHANG Ning, ZHOU Qi, YU Dong-hua*

(Traditional Chinese Medicine Medicinal Theory Innovation Team of Higher Educational Institutions of Heilongjiang Province, Academy of Traditional Chinese Medicine, Drug Safety Evaluation Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate pharmacokinetic characteristics of total saponins from Dioscoreae Nipponicae Rhizoma in rats. **Method:** Rat acute gout arthritis model induced by monosodium urate crystal suspension was used, taking inflammatory levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) as indexes, pharmacological effect method was adopted to estimate pharmacokinetic characteristics of total saponins from Dioscoreae Nipponicae Rhizoma in rats. **Result:** Main pharmacokinetic parameters were as following: AUC_{0-t} of 121.84 ng·h·L⁻¹, AUC_{0-∞} of 542.56 ng·h·L⁻¹, MRT_{0-t} of 5.92 h, MRT_{0-∞} of 45.95 h, t_{max} of 1.96 h, C_{max} of 13.21 ng·L⁻¹. **Conclusion:** Apparent kinetics of total saponins from Dioscoreae Nipponicae Rhizoma in rats accords with single compartment model.

[Key words] Dioscoreae Nipponicae Rhizoma; total saponins; pharmacological effect method; pharmacokinetic parameters; monosodium urate; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α

[收稿日期] 20150929(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173618;81403156);国家博士后第57批面上项目(2015M 57036);黑龙江省博士后特别项目(LBH-TZ0520);黑龙江中医药大学博士后基金项目(LBH-Z13191);黑龙江省科技计划项目(GC12C107);黑龙江中医药大学科研基金项目(2013bs05);黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”科研项目

[第一作者] 刘树民,教授,博士生导师,从事中药药性理论研究,Tel:0451-82193278,E-mail:keji-liu@163.com

[通讯作者] *于栋华,博士,副研究员,从事中药药性理论研究,Tel:0451-87266836,E-mail:yudonghua1015@163.com

穿山龙功效祛风除湿、舒筋通络、活血止痛、止咳平喘,用于风湿痹病、关节肿胀等,临床主要用于治疗类风湿性关节炎、冠心病心绞痛等^[1]。本课题组前期研究已报道穿山龙可较好地治疗高尿酸血症及痛风性关节炎^[2-5]。目前有关穿山龙的药代动力学研究大多通过监测其组分中某一具有代表性的化学成分在血浆中的动态变化来分析^[6-10],但这并不能代表穿山龙的整体作用规律,对每种成分都进行研究既无必要也不可能,同时,在体内过程中其成分的化学结构可能会发生较大改变,可能并不是该成分原型发挥药理作用,在生物体内也检测不到该成分的存在。为了更好地指导临床用药,从中医整体观出发,本实验拟建立大鼠的急性痛风性关节炎实验模型,以大鼠的炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平为观测指标,采用药理效应法对穿山龙的药动学表观参数进行研究。

1 材料

KDC-160HR 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司)。穿山龙购自黑龙江省药材公司,批号 hlj-201104,经黑龙江中医药大学中医药研究院付克教授鉴定为薯蓣科植物穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* 的干燥根茎;白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(杭州联科生物技术股份有限公司,批号分别为 93-K4796-100,93-K1052-100),穿山龙总皂苷(黑龙江中医药大学毒理学实验室提供,质量分数 > 50%),尿酸钠结晶(美国 Sigma-Aldrich 公司),水为灭菌蒸馏水。

SPF 级 SD 雄性大鼠,体重(200 \pm 20) g,购自黑龙江中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK(黑)2013-004,饲养条件为 12 h 光照,12 h 避光循环饲养,室内温度(22 \pm 1) $^{\circ}$ C,相对湿度 40% ~ 50%,饲喂标准饲料和饮用水。

2 方法与结果

2.1 实验性痛风性关节炎模型的制备 用水配制质量分数 80,160,320,480,640,800 mg \cdot kg⁻¹的穿山龙总皂苷溶液,根据每次给药前大鼠体重调整给药剂量。于每天上午 8:00 进行大鼠灌胃给药,连续 5 d。第 3 天给药后 1 h 造模。用水配成 25 g \cdot L⁻¹尿酸钠混悬液,一次性膝关节腔注射 0.2 mL。第 3 天灌胃 1 h 后,将各组大鼠仰卧固定,后肢膝关节周围剃毛,医用酒精消毒,膝关节轻度弯曲,用 6 号注射针以 45 度方向插入大鼠膝关节髌上韧带,感觉有落空感后,注入 2.5% 尿酸钠溶液 200 μ L,造成实验性痛风性关节炎模型^[6-7]。

2.2 剂量-效应关系考察 将 60 只 SD 雄性大鼠,随机分成 6 组。各组大鼠每天分别按剂量 80,160,320,480,640,800 mg \cdot kg⁻¹灌胃给予穿山龙总皂苷,连续 5 d。第 3 天给药后 1 h 造模。于造模后 48 h,取血,离心(3 500 r \cdot min⁻¹,10 min,下同),取上清液,利用酶联免疫吸附法试剂盒说明书测定 IL-1 β 和 TNF- α 。分别以 IL-1 β 和 TNF- α 为纵坐标,剂量的自然对数为横坐标,得穿山龙总皂苷量效曲线方程分别为 $Y = -44.576X + 133.73$ ($R^2 = 0.9787$), $Y = -352.22X + 1064.3$ ($R^2 = 0.9788$)。

2.3 穿山龙总皂苷调节 IL-1 β 和 TNF- α 的时间-效应关系 60 只大鼠每天上午 8:00 按剂量 480 mg \cdot kg⁻¹(临床等效剂量)灌胃给药,连续 5 d。第 3 天给药 1 h 后造模。于末次给药后 0.5,1,1.5,2,3,4,6,8,10,12 h 取血,离心,取上清液,利用酶联免疫吸附法试剂盒说明书测定 IL-1 β 和 TNF- α ,得时间-效应关系,见表 1。

表 1 穿山龙总皂苷给药后不同时间点血浆中的 IL-1 β 和 TNF- α 含量($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Values of IL-1 β and TNF- α at different times after taken total saponins from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*($\bar{x} \pm s, n = 6$)

t/h	IL-1 β /ng \cdot L ⁻¹	效应相当 体存量 /mg \cdot kg ⁻¹	TNF- α /ng \cdot L ⁻¹	效应相当 体存量 /mg \cdot kg ⁻¹
0.5	41.80 \pm 0.81	7.864	345.59 \pm 0.32	7.688
1	28.52 \pm 0.30	10.594	232.03 \pm 0.10	10.613
1.5	22.68 \pm 0.17	12.077	187.95 \pm 0.09	12.028
2	18.80 \pm 0.27	13.175	155.68 \pm 0.37	13.182
3	26.28 \pm 0.24	11.140	221.37 \pm 0.20	10.939
4	28.66 \pm 0.24	10.560	237.72 \pm 0.38	10.443
6	29.86 \pm 0.43	10.280	239.34 \pm 0.15	10.395
8	31.09 \pm 0.56	10.000	255.49 \pm 0.28	9.929
10	33.41 \pm 0.43	9.493	274.25 \pm 0.46	9.414
12	37.00 \pm 0.09	8.758	309.07 \pm 0.17	8.528

2.4 时间-体存生物相当药量曲线的绘制 将时间-效应关系试验中各时间点的 IL-1 β 和 TNF- α 带入剂量-效应关系方程,求出相应的剂量值作为体存生物相当药量,见表 1。

2.5 参数计算 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 DAS 2.0 药动学数据分析程序处理穿山龙总皂苷的相关药代动力学参数,结果见表 2~4。在使用赤池信息判据最小原则(AIC)判断模型时,必须充分考虑到不同权重系数对结果的影响。如果权重系数选择不当,就可能得出错误的结论。据表 2,3 可知,穿山龙总

皂苷的拟合效果最好的是房室数为 1, 权重系数为 1/cc, 即最简单的一室模型(或称单室模型)。

表 2 穿山龙总皂苷给药后由 IL-1 β 和 TNF- α 得到大鼠体存量的动态变化拟合效果

Table 2 Dynamic change fitting effect of remanent dose in rat derived from IL-1 β and TNF- α after taken total saponins from Dioscoreae Nipponicae Rhizoma

炎症因子	AIC	拟合度	房室数	权重系数
IL-1 β	19.813	0.851	1	1
	-4.772	0.988	1	1/c
	-29.354	0.999	1	1/cc
	19.337	0.903	2	1
	-4.754	0.991	2	1/c
	-29.575	0.999	2	1/cc
TNF- α	20.490	0.843	1	1
	-4.100	0.987	1	1/c
	-28.687	0.999	1	1/cc
	20.952	0.884	2	1
	-3.219	0.990	2	1/c
	-27.289	0.999	2	1/cc

表 3 穿山龙总皂苷给药后的一级参数及房室模型参数

Table 3 First parameters and compartment model parameters after taken total saponins from Dioscoreae Nipponicae Rhizoma

参数	符号	单位	IL-1 β	TNF- α	数值($\bar{x} \pm s$)
吸收常数	A	-	12.69	12.66	12.67 \pm 0.02
总消除速率常数	K	-	17.40	20.68	19.04 \pm 2.32
表观吸收速率常数	K _a	-	2.78	2.80	2.79 \pm 0.01
消除半衰期	t _{1/2}	h	22.46	21.75	22.10 \pm 0.50
消除一级速度常数	K _e	h ⁻¹	0.03	0.03	0.03 \pm 0
表观分布容积	V _z /F	L·kg ⁻¹	2.94 \times 10 ⁷	3.38 \times 10 ⁷	3.16 \times 10 ⁷ \pm 3.15 \times 10 ⁶
机体清除率	CL/F	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	9.07 \times 10 ⁵	1.08 \times 10 ⁶	9.92 \times 10 ⁵ \pm 1.20 \times 10 ⁵
药-时曲线下面积	AUC _{0-t}	ng·h·L ⁻¹	122.41	121.28	121.84 \pm 0.80
药-时曲线下总面积	AUC _{0-∞}	ng·h·L ⁻¹	547.63	537.49	542.56 \pm 7.17
滞后时间	T _{lag}	h	0.12	0.13	0.12 \pm 0.01

表 4 穿山龙总皂苷给药后统计矩参数

Table 4 Statistical moment parameters after taken total saponins from Dioscoreae Nipponicae Rhizoma

参数	符号	单位	IL-1 β	TNF- α	数值($\bar{x} \pm s$)
药-时曲线下面积	AUC _{0-t}	ng·h·L ⁻¹	119.99	119.17	119.58 \pm 0.58
药-时曲线下总面积	AUC _{0-∞}	ng·h·L ⁻¹	559.98	563.09	561.49 \pm 2.20
平均滞留时间	MRT _{0-t}	h	5.92	5.92	5.92 \pm 0.00
平均总滞留时间	MRT _{0-∞}	h	47.18	44.72	45.95 \pm 1.74
达峰时间	t _{max}	h	2.00	1.92	1.96 \pm 0.06
清除率	CL/F	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	9.00 \times 10 ⁵	1.08 \times 10 ⁶	9.90 \times 10 ⁵ \pm 1.28 \times 10 ⁵
表观分布容积	V _z /F	L·kg ⁻¹	4.15 \times 10 ⁷	3.96 \times 10 ⁷	4.05 \times 10 ⁷ \pm 1.37 \times 10 ⁶
药峰浓度	C _{max}	ng·L ⁻¹	13.17	13.25	13.21 \pm 0.06

据表 3,4 可知, 穿山龙总皂苷的 t_{1/2} 约 22 h, t_{1/2} 除与药物结构性质有关外, 还与机体消除器官的功能有关。总体来说, 同一药物在正常机体内的 t_{1/2} 是相同的, 而消除器官功能的变化, 将会直接导致 t_{1/2} 的变化。药物的 t_{1/2} 长, 则欲达稳态血药浓度需要相当长时间。对于 t_{1/2} 为 6~24 h 的药物, 建议临床上口服给予穿山龙的最佳方案为首剂加倍原则, 即给药间隔等于药物半衰期时, 首剂量加倍。在疾病状态下, t_{1/2} 的改变是调整给药方案的重要参考依据。

K_a > K_e 说明穿山龙总皂苷在大鼠体内起效快, 消除慢, 以消除过程为主, 可能是因为机体处于痛风性关节炎的病理状态下, 穿山龙总皂苷的代谢、排泄会受到影响, 可能会引起药物蓄积。穿山龙总皂苷的 V_z/F 大, 可能是穿山龙总皂苷在体内分布广泛, 或者药物与生物大分子结合, 或兼而有之, 也可能说明穿山龙总皂苷在某特定组织中蓄积。表示药物从机体内消除的一个重要参数是 CL/F, 说明穿山龙在机体内各个消除途径消除率大, 减少了穿山龙在机体内存在的不良反应及组织中蓄积的可能性。

t_{max} 和 C_{max} 能够反映制剂中药物吸收的速度。由于给予的是穿山龙总皂苷粉末,在胃肠道中不需要崩解,直接就能较快地被吸收,有利于穿山龙疗效的发挥。AUC 反应药物的吸收程度,AUC 数值较大说明穿山龙总皂苷在大鼠体内的利用程度较高。由于穿山龙是以血管外途径给药,往往要在吸收部位经过一段时间才能吸收。

3 讨论

中药药动学研究方法有血药浓度法和药理效应法,血药浓度测定法可直接用于研究以单体形式给药的中药,因为其体内过程、药动学参数、药物浓度及药效学之间关系的研究与西药相同。目前,大多数中药经提取得到某一类组分如总生物碱、总黄酮等常采用生物测定法和化学测定法,前者适用于有效成分不明的中药,后者用于给药后测定组分中具代表性的单一组分的药动学过程,难以完全反映中药的全部成分及整味中药的药动学规律。对于以个别有效成分为代表进行研究的中药已有较多文献报道,但只有多组分的药物动力学研究才能更客观地反映中药整体的药物动力学过程,对临床用药具有实际指导意义。众所周知,整体观思想是中药药理研究领域的特点,也是中药药动学研究的特点和应遵循的指导思想。中药本身是一个复杂的系统,若将有些中药提纯为单体成分,则其药理作用会降低甚至消失,其药效和药理作用是多种化学成分相互协同或相互拮抗作用所产生的综合效果。

药理效应法恰恰符合中药整体观思想,该方法以药效强度为指标,而药效强度是中药原型药物及其活性代谢产物所产生的药理作用及多种成分相互作用的综合结果,经剂量-时间-效应三者之间的转换关系可得到相对药物浓度,能测出药物进入其作用部位的相对速度与程度,即生物利用度,这对那些发挥局部作用的中药制剂尤为重要。故本研究采用药理效应法研究穿山龙总皂苷的药动学。药理效应法优于经典的血药浓度法,因为其可直接反映药效部位的变化规律、方法准确度高、灵敏度高且适用范围广。迄今为止,许多中药材疗效确切,化学成分仍未明确,另有不少中药制剂的现状是有效成分浓度低、缺乏适宜的定量方法,其药物动力学研究是亟待解决的问题。而药理效应法恰为这类中药研究提供了可靠手段。

药理效应法至关重要的部分是药效指标的选择,选择的指标应与该药的主要功效、药理作用、临床给药途径及用药目的相一致,同时要满足客观具

体、可量化、精准、重复性好且与中医证候特点相接近等要求。中药药动学主要研究药理上已证明有效的中药。前期研究已表明穿山龙对急性痛风性关节炎和高尿酸血症有较好的治疗作用^[2-5],本实验分别以炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α ^[11-13] 作为衡量痛风性关节炎的客观判断指标。以 IL-1 β 和 TNF- α 水平为效应指标,既能反映穿山龙总皂苷显著的药理作用及功效,又满足了药理效应法对指标选择的要求,所得药动学参数对临床用药具有指导意义。在痛风性关节炎的发生、发展过程中,炎症因子发挥关键作用^[14]。当关节腔内的尿酸盐结晶被白细胞吞噬后,细胞膜破裂,释放 IL-1 β 和 TNF- α 等细胞因子,激活环氧合酶-2 合成前列腺素 E₂,进一步扩大炎症反应,溶解侵蚀组织,呈现出急性痛风性关节炎的典型症状^[15-17]。有报道证实在前炎症网链中,IL-1 β 和 TNF- α 是一级细胞因子,加速炎症进展,释放氧自由基、白三烯和前列腺素等炎性物质,促进产生胶原酶和其他中性蛋白酶,致使软骨基质崩解、软骨吸收以及骨破坏^[18-23]。基于上述原因,在治疗痛风性关节炎时,设法抑制产生 IL-1 β 和 TNF- α 这类致炎因子,或阻断由他们所介导和激发的炎症反应过程,对病情的缓解有积极意义。

本研究从痛风性关节炎的病理特点出发,选用穿山龙为研究对象,符合中医药的整体观念和辩证论治特点,选题具有新颖性和创新性,同时对系统评价治疗痛风性关节炎药物的药效作用具有重要意义。药理效应法尚存在欠妥之处,有时很难找到灵敏且准确的药理指标用于定量疗效;中药具有多方面的药理效应,某单一效应的药动学过程并不能代表整味药的综合作用规律,同一药物在不同证型机体中选用不同的药理效应指标,可能得到具显著差异的药动学参数;药理效应可能存在反馈抑制,所得结果和实际参数有差异;使结果难以为药物代谢、排泄等研究提供有意义的依据。

[参考文献]

- [1] 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,2015:267.
- [2] 姚丽,刘树民. 穿山龙治疗急性痛风性关节炎有效部位的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(8):1724-1726.
- [3] 周琦,张翀,于栋华,等. 穿山龙总皂苷对高尿酸血症的降尿酸及细胞抗炎作用研究[J]. 中华中医药杂志,2013,28(5):1444-1448.
- [4] 周琦,张宁,卢芳,等. 穿山龙总皂苷对痛风性关节炎大鼠关节炎滑膜 IL-1 β 及其信号转导通路的影响

- [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(6): 52-57.
- [5] Lu F, Liu L, Yu D H, et al. Therapeutic effect of *Rhizoma Dioscoreae Nipponicae* on gouty arthritis based on the SDF-1/CXCR 4 and p38 MAPK pathway: an *in vivo* and *in vitro* study[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(2): 280-288.
- [6] 李柯. 薯蓣皂苷和人参皂苷 Rg₃ 动物体内药物动力学研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [7] 王铁杰. 穿龙薯蓣质量控制方法和相关成分药理学研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [8] 高晶晶. 中药提取物(薯蓣皂苷元)在肿瘤患者体内的药代动力学研究[D]. 大连: 辽宁中医药大学, 2009.
- [9] 张爱杰, 刘琦, 王长远, 等. 有机阴离子转运多肽介导薯蓣皂苷肝脏摄取的药理学研究[C]. 南京: 第十届全国药物和化学异物代谢学术会议暨第三届国际 ISSX/CSSX 联合学术会议, 2012.
- [10] 刘中博. 穿龙薯蓣质量控制方法及药物动力学研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [11] Sabina E P, Rasool M, Mathew L, et al. 6-Shogaol inhibits monosodium urate crystal-induced inflammation—An *in vivo* and *in vitro* study[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(1): 229-235.
- [12] 王爱华, 王智明, 田雪梅, 等. 清热逐风合剂对大鼠急性痛风性关节炎细胞因子 IL-1 β 、TNF、IL-4 的影响[J]. *中华实用中西医杂志*, 2010, 23(5): 11-12.
- [13] 黄敬群, 孙文娟, 王四旺, 等. 槲皮素对大鼠痛风性关节炎抗炎抗氧化活性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(2): 169-173.
- [14] Giacomelli R, Cipriani P, Maticci Cerinic M, et al. Combination therapy with cyclosporine and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis soon inhibits TNF α production without decreasing TNF- α mRNA levels. An *in vivo* and *in vitro* study[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2002, 20(3): 365-372.
- [15] Inokuchi T, Moriwaki Y, Tsutsui H, et al. Plasma interleukin (IL)-18 (interferon-g-inducing factor) and other inflammatory cytokines in patients with gouty arthritis and monosodium urate monohydrate crystal-induced secretion of IL-18[J]. *Cytokine*, 2006, 33(1): 21-27.
- [16] Mythilypriya R, Sachdanandam P S, Sachdanandam P. Ameliorating effect of *Kalpaamruthaa*, a Siddha preparation in adjuvant induced arthritis in rats with reference to changes in proinflammatory cytokines and acute phase proteins[J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 179(2/3): 335-343.
- [17] Yelin E, Wanke L A. An assessment of the annual and long-term direct costs of rheumatoid arthritis: the impact of poor function and functional decline[J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(6): 1209-1218.
- [18] Lee H S, Lee C H, Tsai H C, et al. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression by diallyl sulfide on joint inflammation induced by urate crystal and IL-1 β [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(1): 91-99.
- [19] Naraba H, Murakami M, Matsumoto H, et al. Segregated coupling of phospholipases A₂, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages[J]. *J Immunol*, 1998, 160(6): 2974-2982.
- [20] Armour K E, Grabowski P S, Grabowski P S, et al. Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis[J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(12): 2137-2142.
- [21] Farrell A J, Blake D R, Palmer R M, et al. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases[J]. *Ann Rheum Dis*, 1992, 51(11): 1219-1222.
- [22] Miyasaka N, Hirata Y. Nitric oxide and inflammation arthritides[J]. *Life Sci*, 1997, 61(21): 2073-2081.
- [23] Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, et al. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 1996, 23(2): 230-236.

[责任编辑 刘德文]