

## 升麻治疗乙型病毒性肝炎的活性部位筛选

黄贵平<sup>1</sup>, 李存玉<sup>2</sup>, 刘兰平<sup>3</sup>, 李贺敏<sup>2</sup>, 李红阳<sup>2</sup>, 彭国平<sup>2\*</sup>

(1. 江苏大学附属金坛医院, 江苏 常州 213200;

2. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 3. 南京中医药大学科技处, 南京 210023)

**[摘要]** 目的: 筛选升麻药材中治疗乙型病毒性肝炎的药用活性部位。方法: 采用树脂分离技术, 制备升麻总酚酸、总皂苷部位, 并以拉米夫定为阳性药, 选择 HBV 转基因小鼠作为受试动物, 以小鼠血清中 HBsAg 及 HBeAg 为指标; 以 HepG2-2.2.15 细胞株为模型, 检测细胞内核心颗粒 HBV DNA 的变化, 考察升麻水提液、总酚酸、总皂苷、升麻苷及阿魏酸 5 个组分对 HBsAg 及 HBeAg 的影响。结果: 5 个组别对小鼠血清中 HBsAg 及 HBeAg 均有一定的降低作用, 且总酚酸显著降低 HBsAg 及 HBeAg, 与对照组有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 且阿魏酸是其中的有效成分; 总皂苷可以降低 HBsAg, 与对照组有较显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 但是升麻苷对 HBsAg 及 HBeAg 的作用均无显著性差异; 升麻总酚酸能明显降低 HepG2-2.2.15 细胞胞浆核心颗粒 HBV DNA 水平 ( $P < 0.01$ )。结论: 升麻中的总酚酸部位是其治疗乙型病毒性肝炎的药用活性部位, 本研究为治疗乙型病毒性肝炎的药物开发提供了数据参考。

**[关键词]** 升麻; 乙型病毒性肝炎; 酚酸; 皂苷; 升麻苷; 阿魏酸

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0231-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013210231

## Screening of Potent Active Components of Cimicifugae Rhizoma for Treating Hepatitis B Virus

HUANG Gui-ping<sup>1</sup>, LI Cun-yu<sup>2</sup>, LIU Lan-ping<sup>3</sup>, LI He-min<sup>2</sup>, LI Hong-yang<sup>2</sup>, PENG Guo-ping<sup>2\*</sup>

(1. Jintan Affiliated Hospital of Jiangsu University, Changzhou 213200, China;

2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

3. Science and Technology Department, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**[收稿日期]** 20130615(017)

**[基金项目]** 南京中医药大学中药学一级学科开放课题(2011ZYX3-008); 康缘中医药科技创新基金(HZ1006KY)

**[第一作者]** 黄贵平, 副主任中药师, 从事中药成分分析及药理作用研究, Tel: 13862680867, E-mail: guolao100@sina.com

**[通讯作者]** \* 彭国平, 博士, 研究员, 从事中药成分分离、精制及制剂工艺研究, Tel: 025-86798186, E-mail: guopingpeng@sohu.com

- [3] 马以泉, 曹灵勇. 麻杏石甘汤药理作用研究[J]. 中国药业, 2005, 14(4): 32.
- [4] 王晓静, 王融冰, 李兴旺. 11 例甲型 H1N1 流感确诊病例临床特征及治疗情况分析[J]. 中医杂志, 2009, 50(7): 297.
- [5] 卢芳国, 朱应武, 田道法, 等. 12 个中药复方体外抗菌作用的研究[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(4): 9.
- [6] 李玲, 卢芳国, 熊兴耀, 等. 麻杏石甘汤加味方对 A 型流感病毒感染小鼠的免疫保护作用[J]. 中华中医药学报, 2010, 28(2): 36.
- [7] 卢芳国, 张波, 严杰, 等. 麻杏石甘汤对 A 型流感病毒感染小鼠 IL-2、IL-4 蛋白表达水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(3): 475.
- [8] 王永炎. 中医内科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 24.
- [9] 文丹丹, 王敏. 麻杏石甘汤治疗咳嗽变异性哮喘的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 285.
- [10] 南京中医学院伤寒教研组. 伤寒论译释. 上册[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 15.
- [11] 赵文颖, 于海兰, 杨澍平, 等. 麻杏石甘汤中金属元素含量的分析[J]. 中草药, 1999, 26(3): 750.
- [12] 马强, 李晓晶, 丁海东, 等. 不同配伍条件下麻杏石甘汤中钙离子溶出规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 67.

[责任编辑 邹晓翠]

**[ Abstract ] Objective:** To study the potent active components of *Cimicifugae Rhizoma* for treating hepatitis B virus (HBV). **Method:** The total phenolic acid and saponins of *Cimicifugae Rhizoma* were separated by macroporous resin, HBV DNA, HBsAg and HBeAg were observed to analyze the anti-hepatitis B virus effect of prim-o-glucosylcimifugin, ferulic acid, *Cimicifugae Rhizoma* aqueous extract solution, *Cimicifugae Rhizoma* phenolic acid and *Cimicifugae Rhizoma* saponins. **Result:** The five groups significantly reduced the concentration of HBsAg and HBeAg. Compared with the blank control group, the total phenolic acid can decrease the HBsAg and HBeAg ( $P < 0.01$ ) and the ferulic acid was the potential active component, *Cimicifugae Rhizoma* saponins can reduce the HBsAg ( $P < 0.05$ ) but prim-o-glucosylcimifugin have no obvious anti-hepatitis B virus effect. The total phenolic acid of *Cimicifugae Rhizoma* can remarkably decrease the level of viral core associated-HBV DNA in the cytoplasm. **Conclusion:** The total phenolic acid of *Cimicifugae Rhizoma* is the active part to anti-hepatitis B virus effect, and the results provide the basis of screening new drugs for treatment hepatitis B virus.

**[ Key words ]** *Cimicifugae Rhizoma*; hepatitis B virus; phenolic acid; saponin; prim-o-glucosylcimifugin; ferulic acid

乙型病毒性肝炎,简称乙肝,是一种由乙型肝炎病毒(HBV)感染机体后所引起的疾病。目前我国有近 7 亿人感染了或曾经感染过 HBV,在全球约有近 20 亿人<sup>[1]</sup>。在我国每年约有 30 万人死于与 HBV 感染相关的肝硬化和 HCC 等疾病,在全球则达到了 100 万人,目前在乙肝的临床治疗中,多采取干扰素和核苷类药物,然而核苷类药物存在停药后复发率高和耐药等问题<sup>[2-3]</sup>,不良反应严重,价格昂贵。因此开发用于预防治疗乙型病毒性肝炎的药物制剂较为迫切,如何从中药中寻找具有安全有效的抗 HBV 的候选药物也逐渐成为近年来的研究热点。

升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom.,兴安升麻 *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim. 或升麻 *Cimicifuga foetida* L. 的干燥根茎<sup>[4]</sup>。始载于《神农本草经》,列为上品,为常用中药。性辛、微甘,微寒,归肺、脾、胃、大肠经。具有清热解毒、发表透疹、升阳举陷的功能。主治时疫火毒、口疮、咽痛、斑疹、头痛寒热、痈肿疮毒、中气下陷、脾虚泄泻等症。在随着对升麻的药理作用深入研究,发现升麻中的阿魏酸和异阿魏酸具有抗炎活性,且异阿魏酸强于阿魏酸<sup>[5]</sup>,三萜类化合物抑制核苷转运从而具有抗病毒作用。此外升麻对舒张血管、降压、镇静、抗氧化等药理作用。目前已有研究发现升麻对乙型肝炎有一定的治疗作用<sup>[6-7]</sup>,但是其具体的有效部位以及抗 HBV 的作用特征尚不明确。

本文为了明确中药升麻的抗 HBV 特征,进而寻找其有效部位。首先分离制备了升麻总皂苷、升麻总酚酸、升麻其他部位,并选择升麻总皂苷中的升麻苷、升麻总酚酸中的阿魏酸为参照成分,采用 HBV

转基因小鼠作为受试动物,考察上述升麻中成分对乙型病毒性肝炎的治疗作用。连续给药 22 d,筛选升麻中治疗乙型病毒性肝炎的药用活性部位。

## 1 材料

**1.1 仪器** 高速冷冻离心机(HC-3018R,中科中佳公司);酶标仪(RT-6000,深圳雷杜生命科学股份有限公司);A2 型生物安全柜(MSC1.8,德国 Thermo 公司);动物体重电子天平(YP/0001,上海越平科学仪器有限公司);动物脏器电子天平,(AR1140,美国 Chaus 公司)。IVC 小鼠饲养笼(苏州教学笼具厂)。

**1.2 细胞与试剂** HepG2-2.2.15 细胞购于江苏斯坦福生物技术有限公司;D101 树脂(100302,沧州宝恩生物科技有限公司);阿魏酸(110773-200611,中国生物药品检定所);升麻苷(11698-200602,中国生物药品检定所);乙腈(美国 TEDIA 公司);乙酸(美国 TEDIA 公司);拉米夫定(贺普丁  $C_8H_{11}N_3O_3S$ ,葛兰素史克制药有限公司)。小鼠 48T HBsAg 酶联反应试剂盒(美国 R&D 公司产品,生产批号 08/2010),阳性界值  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;小鼠 48T HBeAg 酶联反应试剂盒(美国 R&D 公司产品,生产批号 08/2010),阳性界值  $0.03 \text{ NeU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**1.3 动物** HBV 转基因小鼠(SPF/VAF 级),体重  $(18 \pm 1) \text{ g}$ ,雌雄兼用。由北京大学医学部提供,动物许可证 SCXK(京)2006-0008。

**1.4 药材** 升麻饮片(20100130,安徽亳州市中药饮片厂),经南京中医药大学吴启南教授鉴定为毛茛科植物升麻 *Cimicifuga foetida* L.。

## 2 方法

**2.1 升麻中药用部位的供试品制备**<sup>[8-10]</sup>

**2.1.1 升麻水提物** 称取升麻药材 100 g,分别 10

倍量、8 倍量水提取 2 次,每次 2 h,合并 2 次滤液,浓缩至 40 mL,即生药量为  $2.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,取 1 mL 原液配成 64 mL 给药液,即得到质量浓度为  $55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的给药液,置冰箱  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。

**2.1.2 升麻总酚酸** 升麻药材 1 kg,加水 10 L,回流提取 2 h,滤过,药渣加水 8 L,回流提取 2 h,滤过,合并两次滤液,10% NaOH 调 pH 至 9.0。将碱性水煎液过 D101 树脂循环上样 2 次,树脂用量 1 kg。流出液用 10% HCl 调节 pH 至 3.0 成酸性水液,酸性水液循环上 D101 树脂 2 次,树脂用量 1 kg,流出液浓缩得其他成分部位,树脂吸附酸性水液成分依次以 pH 3.0 HCl 洗脱 2 L、水洗至中性、70% 乙醇洗脱 2 L,70% 乙醇洗脱 3 L 回收乙醇得总酚酸部位;

取升麻总酚酸部位药液浓缩至 220 mL,即浓度为生药  $4.55 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,取 1.21 mL 本品配成 100 mL 给药液,即得到质量浓度为  $55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的给药液,置冰箱  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。

**2.1.3 升麻总皂苷** 取 2.1.2 项下的 D101 树脂吸附碱性水液成分依次以 pH 9.0  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  洗脱 2 L,水洗至中性,10% 乙醇洗脱 2 L,70% 乙醇洗脱 3 L,回收乙醇得总皂苷部位。

取升麻总皂苷洗脱液浓缩至 200 mL,即质量浓度为生药  $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,取 1.1 mL 本品配成 100 mL 给药液,即得到质量浓度为  $55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的给药液,置冰箱  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。

**2.1.4 工艺流程图** 见图 1。

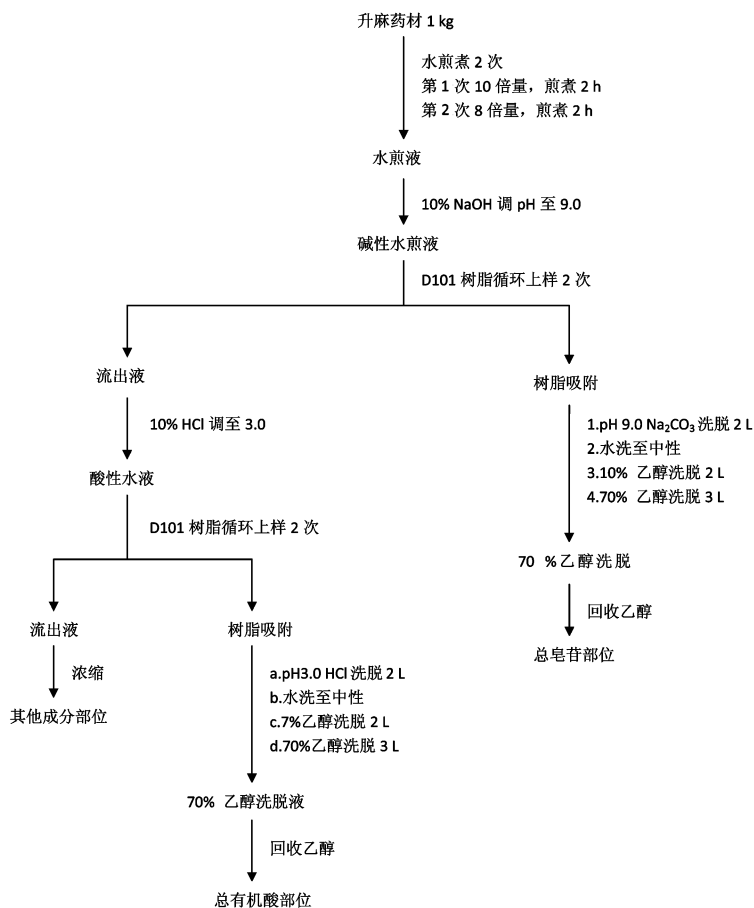


图 1 升麻有效部位的提取工艺流程

**2.2 升麻苷** 根据升麻饮片中升麻苷的含量,超纯水配制质量浓度为  $1.466 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的升麻苷溶液,置冰箱  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。

**2.3 阿魏酸** 根据升麻饮片中阿魏酸的含量,超纯水配制质量浓度为  $0.838 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的阿魏酸溶液,置冰箱  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。

**2.4 动物分组** 将转基因小鼠分为非给药模型对照组、拉米夫定阳性对照组、升麻水提液、升麻总皂苷、升麻总酚酸、升麻苷和阿魏酸 8 组,每组 6 只。分组第 2 天各组小鼠开始按  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃给药,连续给药 22 d 后,进行眼眶取血、解剖摘取肝脏,并对血清中 HBsAg, HBeAg 含量进行检测。

## 2.5 剂量设计

**2.5.1 拉米夫定剂量设定** 按照说明书提供的用法用量,本品人临床用量为  $1.43 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,参考《药理学实验指导》中人与小鼠的给药剂量换算方法<sup>[11]</sup>,小鼠给药每次剂量按  $13.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃给药,故拉米夫定配成  $0.65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,给药容积为  $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

**2.5.2 升麻提取物剂量设定** 按药典规定的升麻用量,本次实验取人用量  $0.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,小鼠的等效剂量为  $1.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,给药质量浓度为  $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,给药容积为  $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

**2.5.3 升麻中其他部位或成分剂量设定** 按照生药量及含量计算,小鼠的升麻总酚酸给药剂量为  $1.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,升麻总皂苷为  $1.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,升麻苷为  $29.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,阿魏酸为  $16.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。给药容积均为  $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

## 2.6 体外抗 HBV 活性实验

**2.6.1 细胞培养** 含 10% 小牛血清、0.03% L-谷氨酰胺、100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素、100 U·mL<sup>-1</sup> 链霉素、380 mg·L<sup>-1</sup> G418 的 DMEM 液,置于 37 °C、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

培养细胞用胰蛋白酶消化成单个细胞接种于 6 孔培养板 ( $4 \times 10^4$  细胞/孔),加入培养液 4 mL,于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 培养 48 h 后换入不同组别的含药培养液,培养液中药物浓度分别为拉米夫定:  $0.65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;升麻提取物:  $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;升麻总酚酸:  $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;升麻总皂苷:  $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;升麻苷  $1.466 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;阿魏酸  $0.838 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,同时设不含药物对照组。每 3 d 换新鲜含药培养液,共 4 次,换出的细胞上清液 -20 °C 保存待检,并收集细胞提取核心颗粒 HBV DNA。

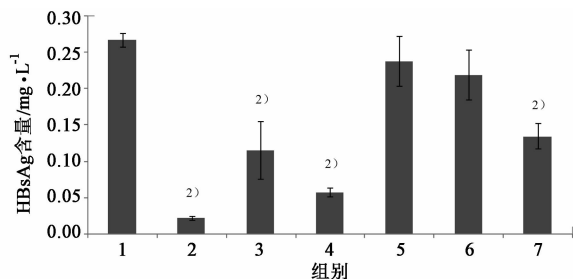
**2.6.2 细胞内核心颗粒 HBV DNA 的提取及定量检测**<sup>[12]</sup> 6 孔板干预细胞以 PBS 洗涤 2 次,用细胞裂解液 ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7.9;  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA; 1% NP-40;  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl; 8% 蔗糖) 将细胞转移至 Eppendorf 管中,离心后保留上清,加 DNase I, RNase A 37 °C 孵育 15 min 后,以 EDTA, PEG 8000 沉淀核心颗粒。然后重悬沉淀,加裂解液 ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7.5;  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA;  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl; 0.5% SDS;  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蛋白酶 K) 孵育过夜后,酚-氯仿-异戊醇抽提,1/10 体积  $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaAc 和 2 倍体积冷无水乙醇沉淀 DNA,干燥后溶于 50  $\mu\text{L}$  双蒸水中。应用 bDNA 信号扩增试验定量检测 HBV DNA 滴度,最低检测限度为 0.7 HBV DNA

$\text{MEq}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**2.7 统计学分析** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 19.0 中的 *t* 检验,通过药物组与对照组进行样本分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 升麻中成分对 HBeAg 含量的影响** 对血清中 HBeAg 含量进行检测对比,升麻提取物给药组、升麻苷组和阿魏酸组中的 HBeAg 含量均有明显降低,其中升麻水提液、升麻总酚酸及阿魏酸与模型对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),升麻总皂苷和升麻苷与模型对照组比较无显著性差异,见图 1。



1. 模型对照组; 2. 拉米夫定  $0.65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 3. 升麻水提物  $55.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 4. 升麻总酚酸  $55.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 5. 升麻总皂苷  $55.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 6. 升麻苷  $1.47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 7. 阿魏酸  $0.84 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  与模型对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (图 2 同)

图 2 升麻提取物及有效成分对 HBV 转基因小鼠 HBeAg 影响的差异性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.2 升麻中成分对 HBsAg 含量的影响** 图 2 结果显示:转基因小鼠灌胃给药,连续给药 22 d 后,各升麻提取物给药组小鼠血清中的 HBsAg 含量均有所降低,升麻总酚酸组与模型对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。此外升麻水提液、升麻总皂苷、阿魏酸与模型对照组比较有较显著性差异 ( $P < 0.05$ ),而升麻苷与模型组无显著性差异。

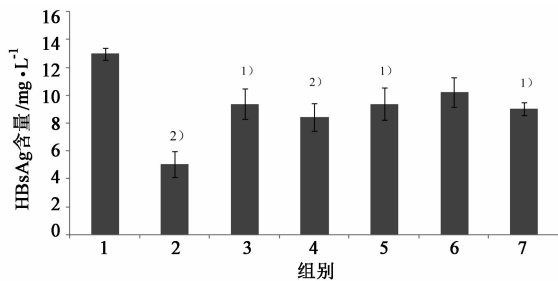


图 3 升麻提取物及有效成分对 HBV 转基因小鼠 HBsAg 影响的差异性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.3 升麻提取物对 HBV DNA 的抑制作用** 分析表 1 中数据可知,升麻水提液和总酚酸组可以显著降低 2.2.15 细胞胞浆核心颗粒 HBV DNA 水平

( $P < 0.01$ ),阿魏酸和升麻总皂苷可以降低 2.2.15 细胞胞浆核心颗粒 HBV DNA 水平( $P < 0.05$ ),升麻皂苷中的升麻苷对 2.2.15 细胞胞浆核心颗粒 HBV DNA 有轻微的抑制作用。

表 1 升麻提取物对 HepG2.2215 细胞内 HBV DNA 的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	HBV DNA/MEq·mL <sup>-1</sup>
模型对照	-	140.14 ± 5.11
拉米夫定	0.65	8.04 ± 0.87 <sup>2)</sup>
升麻水提取物	55.00	39.43 ± 1.90 <sup>2)</sup>
升麻总酚酸	55.00	31.82 ± 1.34 <sup>2)</sup>
升麻总皂苷	55.00	79.56 ± 3.73 <sup>1)</sup>
升麻苷	1.47	131.37 ± 3.95
阿魏酸	0.84	50.64 ± 1.39 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

HBV 转基因小鼠,作为一种相对方便有效的研究工具,在乙型肝炎的研究中应用广泛,本次试验采用北京大学医学部提供的 HBV 转基因小鼠动物模型 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU,试验过程中小鼠身体状况稳定,检测结果显示各组小鼠血清中的病毒抗原含量趋势明显,组间差异大、组内差异较小,非给药对照组抗原含量较高,拉米夫定阳性对照组抗原含量很低,具有良好的统计学意义。

乙肝病毒的复制是非常复杂的,目前多采用 HBeAg 和 HBsAg 作为感染 HBV 的特异性标志。通过对升麻中的成分对 HBV 转基因小鼠 HBeAg 和 HBsAg 的含量影响进行了对比分析,发现升麻中的皂苷类对 HBeAg 和 HBsAg 的影响较小,不是抗 HBV 的主要作用成分。本研究结果发现,升麻中的酚酸类成分可明显降低 Hep G 2.2.15 细胞胞浆核心颗粒 HBV DNA 的水平,说明其能抑制 HBV DNA 复制。对升麻中的不同成分进行对比分析,发现酚酸类成分对 HBV DNA 复制的抑制作用要强于皂苷类成分,同时升麻总酚酸提取物具有显著的抗 HBV 活性,且其中的阿魏酸并不能完全表征总酚酸的作

用行为,因此是多成分的组合作用结果,因此有待于对总酚酸进一步分离研究,对升麻治疗乙型病毒性肝炎的新药研发提供数据基础。

#### [参考文献]

- [1] 苏彦萍. 15 岁以下儿童乙型肝炎病毒感染率和乙型肝炎疫苗接种现状调查[J]. 现代预防医学, 2010, 37(6):1143.
- [2] Fu L, Cheng Y C. Role of additional mutations outside the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase in L(-) SddC (3TC) resistance [J]. Biochem Pharmacol, 1998(55):1567.
- [3] Lai C L, Chien R N, Leung N W Y, et al. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B [J]. N Engl J Med, 1998, 339(24):61.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社, 2010:68.
- [5] 吴沛田. 慢性肝炎 ALT、AST 升高用升麻[J]. 中医杂志, 2006, 47(4):256.
- [6] 朱树宽. 升麻善治乙型肝炎[J]. 中医杂志, 2006, 47(4):255.
- [7] 刘勇, 陈迪华, 陈雪松. 升麻属植物的化学、药理与临床研究[J]. 国外医药:植物药分册, 2001, 16(2):55.
- [8] 靳波, 刘友平, 彭月, 等. 多指标正交试验优选升麻提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):27.
- [9] 王秋红, 苏阳, 吴伦, 等. 星点设计-效应面法优化升麻提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1):24.
- [10] 苏占辉, 张滋明, 王书君, 等. 兴安升麻地上部分的提取分离工艺考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5):10.
- [11] 秦大莲, 陈美娟, 肖顺汉, 等. 药理学实验指导[M]. 泸州:泸州医学院药理学教研室, 2006:63.
- [12] Pugh J C, Yaginuma K, Koike K, et al. Duck hepatitis B virus (DHBV) particles produced by transient expression of DHBV DNA in a human hepatoma cell line are infectious *in vitro* [J]. J Virol, 1988, 62(9):3513.

[责任编辑 聂淑琴]