秦艽与龙胆挥发油的化学成分及抗炎活性研究

何希瑞[1,2], 李茂星[1], 尚小飞[1], 贾正平[1,2], 张汝学[1](1. 兰州军区兰州总医院,甘肃 兰州 730050;2. 兰州大学,甘肃 兰州 730000)

[摘要] **目的** 研究秦艽和龙胆挥发油的化学成分和体内外抗炎活性。**方法** 超临界 CO_2 萃取秦艽和龙胆地下部分的挥发油;采用气相色谱-质谱联用方法分析萃取物的成分;采用 LPS 刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞炎症和二甲苯致小鼠耳肿胀试验,观察所得挥发油体内外抗炎活性。**结果** 所得挥发油透明、橙黄、有浓郁的香味。通过 GC-MS 分析,从秦艽和龙胆挥发油中分别鉴定出 29 个和 40 个化合物。药理实验表明,秦艽和龙胆挥发油均能显著抑制由脂多糖诱导的巨噬细胞 NO 释放和二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀,且存在一定的剂量依赖性。**结论** 秦艽和龙胆挥发油在体内外均显示了出色的抗炎活性,有望从中分离新的抗炎活性成分。

[关键词] 秦艽;龙胆;挥发油;抗炎作用
[中图分类号] R284.R285 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2011)04-0274-05

Composition and anti-inflammatory activities of essential oils from *Gentiana crassicaulis* and *Gentiana scabra*

HE Xi-rui[1,2], LI Mao-xing[1], SHANG Xiao-fei[1], JIA Zheng-ping[1,2], ZHANG Ru-xue[1](1 Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China; 2 Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the anti-inflammatory activities of essential oils from the roots of *G. crassicaulis* Duthie ex Burkand *G. scabra* Bunge *in vivo* and *in vitro*. **Methods** The essential oils were extracted by supercritical fluid extraction (SFE), and the chemical components of the essential oils were analyzed by GC-MS. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activities of the essential oils were investigated with a cellular model of LPS-stimulated RAW264.7 cell and xylene-induced ear edema in mice. **Results** The essential oils were transparent and full aroma, and 29, 40 compounds were identified from *G. crassicaulis* and *G. scabra* respectively. The essential oils of *G. crassicaulis* and *G. scabra* (GCEO and GSEO) showed a good performance of inhibiting NO production and xylene-induced ear edema in mice with a dose-dependent manner. **Conclusion** GCEO and GSEO had excellent anti-inflammatory activities *in vivo* and *in vitro*, and thus had great potential to be further studied on the active anti-inflammatory ingredients.

[**Key words**] *Gentiana crassicaulis*; *Gentiana scabra*; essential oils; anti-inflammatory

龙胆科龙胆属植物全世界约有 400 余种,中国有 247 种,分布遍及全国[1]。龙胆属植物作为中国的传统药用植物具有多种药理活性。秦艽 *G. crassicaulis*,具有祛风除湿、活血舒筋、清热利尿作用,治疗风湿、痹痛、筋骨拘挛[2];龙胆 *G. scabra* 具有泻肝胆实火、清下焦湿热等功效,用于治疗肝经热盛、惊厥狂躁、黄疸等疾病[2]。环烯醚萜苷及其衍生物是秦艽和龙胆植物的主要化学成分。龙胆苦苷作为重要的有活性的环烯醚萜苷成分,具有显著地保肝、抗炎、抗菌等生物活性[3~5]。秦艽药材富含油性并具有一定的芳香气味,这一特性也常用于鉴定药材的品质。但对秦艽和龙胆的挥发油成分及其抗炎活性研究分至今未见报道。本研究采用超临界流体萃取法(SFE-CO_2)提取了秦艽和龙胆的挥发油;用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析和鉴定了挥发油的化学成分;并采用体内体外炎症实验模型研究两种挥发油的抗炎活性。

1 材料与仪器

1.1 实验药物 粗茎秦艽 *G. crassicaulis* 于 2008 年 8 月份采自青藏草原;龙胆 *G. scabra* 药材购自甘肃中医学院附属医院,两药材均经兰州大学药学院马志刚教授鉴定,符合中国药典药用标准。

1.2 细胞株与动物 巨噬细胞 RAW264.7 由第二军医大学惠赠;清洁级昆明种小鼠,雌雄兼用,体质量 22~24 g,兰州生物制品研究所提供。

1.3 主要试剂 DMEM 高糖培养基,Lipopolysac-

[基金项目] 全军中医药研发推广项目(2006032001);甘肃省科技攻关项目(2GS054-A43-014-14).
[作者简介] 何希瑞(1985-),男,硕士研究生. Tel:(0931)8994676, E-mail:xiruihe6105194@163.com.
[通讯作者] 贾正平. Tel:(0931)8994676, E-mail:limaox2005@yahoo.com.cn.

charide(LPS),四甲基偶氮唑蓝 (MTT),Griess reagent 和胰酶购自美国 Sigma 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;其它试剂均为分析纯。

1.4 主要仪器　Speed SFE 型超临界萃取仪(美国),HP-GC-6890N-5973 型 GC-MS 联用仪(美国),CO_2 细胞培养箱(美国 Forma Scientific 公司),OLMPUS IMT-2 倒置显微镜(日本 OLMPUS 公司),Multiskan MK3 酶标仪(美国),BP210S 电子天平(赛多利斯有限公司)。

2 方法

2.1 挥发油提取　超临界 CO_2 萃取(SFE-CO_2)法操作流程: CO_2气瓶→冷却系统→高压泵→萃取釜→分离釜→循环。将粉碎粒度为 40 目的秦艽、龙胆药材投入 0.5 L 萃取釜中,萃取釜压力 20 Mpa,温度 45 ~50 ℃,萃取 120 min 后收集提取物。称重后低温保存,所得挥发油为浅黄色透明油状物,具有芳香味。

2.2 气相色谱-质谱分析条件　色谱条件:Agilent DB-5MS (50 m×0.25 mm ×0.25μm) ;色谱柱程序升温条件:起始温度 40 ℃,以 3 ℃/min 的速率升温至 260 ℃并保温 10 min,载气 He。分流比 10∶1,分流流量:9.9 ml/min,省气流量:20.0 ml/min,进样量 1.0 μl。质谱条件:离子源电压 70 eV,质量分析器温度 150 ℃,离子源温度 230 ℃;离子扫描范围为 30 ~550 m/z。取 SFE-CO_2 法得到的秦艽、龙胆挥发油(简写 GCEO、GSEO)进行 GC-MS 检测,解析质谱,用面积归一化法确定各成分的相对含量。

2.3 细胞培养及分组　小鼠巨噬细胞 RAW264.7 加入含 10 %的胎牛血清(FBS)、100 U/ml 青霉素、链霉素的无酚红 DMEM 高糖培养基置于 5 % CO_2, 37 ℃培养箱中生长。细胞生长至 70% ~80%融合后进行传代。调整细胞浓度为 1×10^5 cells /well,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl。按实验要求将细胞分为正常对照组:常规 DMEM 培养;LPS 组:10 μg/ ml LPS; GCEO+LPS 组:GSEO+LPS 组;铺板 24 h 后弃掉培养液,加入新的培养液及药物和 LPS (10 μg/ml)。置 37 ℃, 5% CO_2 培养箱中继续培养 24 h。每个实验组设 6 个复孔, 所有实验均重复 3 次。

2.4 细胞活性的测定　调整细胞悬液浓度为 1×10^5 cells/well,加入 96 孔培养板内,每孔 200 μl,置 37 ℃,5% CO_2孵箱培养 24 h 后,分别加入 6、30 μg/ml 的秦艽、龙胆挥发油 (对照组加正常培养液),每组均设 6 个复孔。继续培养 24 h,弃去上清液后,每孔加入 180 μl 新鲜 DMEM 培养液,再加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml),继续培养 4 h。终止培养,小心弃去孔内培养液。每孔加入 100 μl 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解[6],用酶标仪测定 570 nm 处吸光值。

2.5 NO 含量测定　将对数生长期的细胞用胰酶消化后,调制成浓度为 1×10^5 cells/well 的细胞液,每孔 200 μl 接种于 96 孔板。培养 24 h 后加入秦艽、龙胆挥发油至终质量浓度为 6、30 μg/ml,并加入 50μl 的 10 μg/ml LPS;同时设立正常对照组和模型组,每组设 6 个平行孔,继续培养 24 h。收集各处理组培养细胞的上清液 100 μl,加入 100 μl Griess reagent 试剂,室温放置 10 min[7,8]。然后用酶标仪测定 570 nm 处各孔的吸光值。

2.6 二甲苯致耳肿胀试验　清洁级昆明种小鼠 60 只,雌雄各半。参照相关研究方法[9],按体重随机分为 6 组,秦艽、龙胆挥发油高剂量组 120 mg/kg,低剂量组 60 mg/kg,阳性对照组(地塞米松 10 mg/kg, DEX)及空白组(生理盐水 0.1 ml/g)。各组均腹腔注射给药 30 min 后分别将 30 μl 二甲苯涂于小鼠右耳正反两面,左耳不涂作为对照,1 h 后处死小鼠。用直径 6 mm 打孔器打下左右耳,称重,左耳做对照,以左右耳片重量差作为肿胀度。计算肿胀抑制百分率。

2.7 统计学处理　数据用"均数±标准差"表示,采用 SPSS 13.0 统计软件对试验结果进行 ANOVA 方差分析,检验分析不同组之间数据的差异显著性。

3 结果

3.1 秦艽、龙胆挥发油化学成分的鉴定　按照上述实验条件,进行 GC-MS 分析,得到秦艽、龙胆挥发油在 Agilent DB-5MS 柱上的总离子流程图,图 1、图 2。

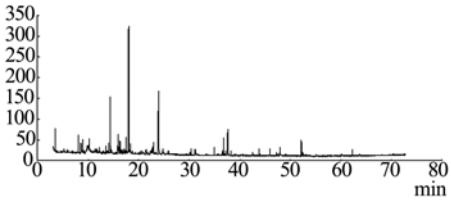

图 1　秦艽挥发油在 Agilent DB-5MS 柱上的总离子流程图

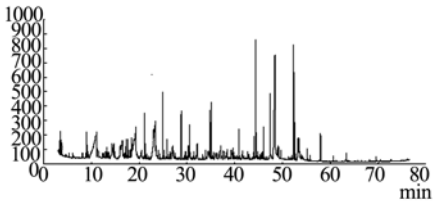

图 2　龙胆挥发油在 Agilent DB-5MS 柱上的总离子流程图

本实验采用计算机对各峰质谱图进行 NIST 标准谱库检索,根据质谱裂解规律进行核对,并参考标准图谱确定其化学成分,用峰面积归一化法计算各组分的质量分数。本实验首次从秦艽和龙胆挥发性成分中鉴定出 29 个和 40 个化合物, 定性结果和质量分数见表 1、表 2。

表 1　秦艽挥发油的化学成分

No.	化合物名称	保留时间 (min)	相对含量 (%)
1	Hexanal	3.55	1.73
2	1-Hexanol	5.17	1.28
3	Benzaldehyde	8.05	2.81
4	Pentafluoropropionic acid, 2-ethylhexylester	8.69	2.21
5	1-Octen-3-ol	9.00	1.58
6	(E, E)-2,4-Heptadienal	10.23	1.63
7	1,4-Cyclohexane dimethanol	11.64	1.57
8	(E)-2-Octenal	12.27	0.68
9	2-methoxy-3-(1-methylethyl)-Pyrazine	13.56	1.32
10	3,7,7-trimethyl-(1S)-Bicyclo [4.1.0]hept-3-ene	14.22	1.62
11	Nonanal	14.43	1.18
12	1,7,7-trimethyl-(1R)-Bicyclo [2.2.1]heptan-2-one	15.96	3.39
13	1,2-dimethoxy-Benzene	16.28	2.65
14	(+)-4-Carene	17.62	3.16
15	1-methyl-4-(1-methylethenyl)-Benzene	18.16	12.69
16	2,2-dimethyl-1-Oxaspiro[2.5]octan-4-one	20.22	1.30
17	1-ethoxy-2-methyl-Benzene	20.61	1.28
18	(Z)-2-Decenal	21.56	0.59
19	4-(1-methylethyl)-Benzenemethanol	22.81	1.54
20	(E,E)-2,4-Decadienal	22.98	4.09
21	Thymol	23.34	2.31
22	(2e,4e)-2,4-Decadienal	24.06	14.02
23	2-methyl-2-Butenal	24.82	2.41
24	Hydroquinone	31.43	3.98
25	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethylidene)-, (4aR-trans)-	36.88	3.95
26	2H-1-Benzopyran, 6,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-	37.33	4.47
27	Methyl1, 2-dihydro-2-oxoquinoline-4-carboxylate	37.66	7.86
28	Heneicosane	52.21	2.29
29	E,Z-1,3,12-Nonadecatriene	52.51	2.63

表 2　龙胆挥发油的化学成分

No.	化合物名称	保留时间 (min)	相对含量 (%)
1	Hexanal	3.48	0.79
2	(3-Methyl-oxiran-2-yl)-methanol	3.78	0.59
3	1-Octen-3-ol	8.98	0.96
4	Hexanoic acid	10.87	9.11
5	Formicacid, octylester	13.05	0.47
6	1,5-Dimethyl-1-vinyl-4-hexenyl butyrate	14.21	1.58
7	Heptanoic acid	14.42	1.66
8	Phenylethyl alcohol	14.66	0.60
9	1,7,7-trimethyl-(1R)-Bicyclo [2.2.1]heptan-2-one	15.94	0.75
10	2-ethyl-Hexanoic acid	16.42	4.11
11	Borneol	17.18	0.88
12	Menthol	17.59	0.87
13	alpha.4-trimethyl-3-Cyclohexene-1-methanol	18.37	0.66
14	Octanoic acid	19.28	5.05
15	5-butyldihydro-2(3H)-Furanone	21.13	1.97
16	Thymol	22.99	3.43
17	Nonanoic acid	23.39	4.57
18	1-ethyl-3-Piperidinone	24.79	3.15
19	dihydro-5-pentyl-2(3H)-Furanone	25.65	0.79
20	n-Decanoic acid	26.88	1.31
21	1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-Ethanone	28.71	2.22
22	1,1′-oxybis[2,3-dichloro-Propane	30.21	0.58
23	Propane, 1,2-dichloro-3-[2-chloro-1-(chloromethyl)ethoxy]	30.46	1.72
24	4-methoxy-6-(2-propenyl)-1,3-Benzodioxole	32.08	0.57
25	Diethyl phthalate	34.77	2.33
26	Cedrol	35.03	2.49
27	Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1. alpha., 7. beta., 8a. alpha.)]	37.00	0.55
28	Phenanthrene	40.81	1.40
29	6,10,14-trimethyl 2-Pentadecanone	43.96	1.38
30	Diisobutyl phthalate	44.35	5.48
31	Nonadecane	45.98	1.39
32	Di-n-butylphthalate	47.40	3.12
33	n-Hexadecanoic acid	48.39	16.50
34	Eicosane	49.16	0.53
35	Heneicosane	52.22	5.24
36	(Z,Z)-9, 12-Octadecadienoic acid	52.50	1.77
37	(Z,Z)-ethyl ester -9, 12-Octadecadienoic acid	53.16	1.39
38	Oleic acid	53.37	1.07
39	Docosane	55.12	0.49
40	Octadecane	57.93	1.19

3.2　秦艽、龙胆挥发油对 RAW264.7 细胞生长的影响　MTT 比色法测定结果显示 6、30 μg/ml 秦艽和龙胆挥发油均没有表现出对巨噬细胞 RAW264.7 的细胞毒性。证明在实验设置的药物剂量下,秦艽、龙胆挥发油并没有细胞毒性,实验可行,结果如图 3 所示。

3.3　秦艽、龙胆挥发油对 RAW264.7 细胞 NO 释放的影响　试验结果如图 4 所示,与空白对照组比较,模型组 NO 释放量显著增高,表示模型建立成功。与模型对照组相比较,6、30 μg/ml 秦艽和龙胆挥发油均能明显抑制巨噬细胞 RAW264.7 的 NO 释放量。其中,以 30 μg/ml 的秦艽、龙胆挥发油抑制

作用最为显著,抑制率分别达到 56.3%、54.2%,提示秦艽、龙胆挥发油体外显示了很好的抗炎活性。

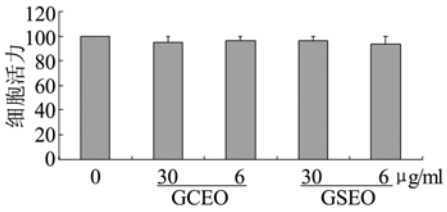

图 3　不同浓度秦艽、龙胆挥发油对 RAW264.7 细胞活力的影响($n=3$)

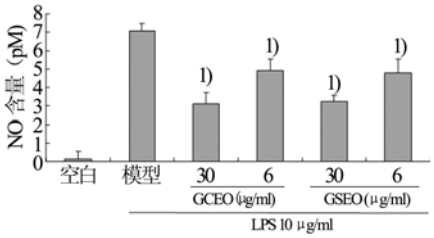

图 4　不同浓度秦艽、龙胆挥发油对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响($n=3$)

[1] $P<0.01$, 与模型组相比。

3.4　*秦艽、龙胆挥发油对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响*　由表 3 可知,不同浓度的秦艽、龙胆挥发油高、低剂量组的耳重差与模型组比较,差异具有显著地统计学意义。说明秦艽、龙胆挥发油均能有效抑制由二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀,显示了较强的抗炎活性。

表 3　秦艽、龙胆挥发油对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响($n=10$)

组别	剂量 (mg/kg, ip.)	耳廓肿胀度 (%)	抑制率 (%)
模型组	——	153.77 ± 6.02	——
DEX	10	78.00 ± 4.02[1)]	40.1
GSEO	120	99.10 ± 6.41[1)]	37.2
	60	99.74 ± 3.53[1)]	32.3
GCEO	120	100.61 ± 9.03[1)]	31.8
	60	108.70 ± 4.82[2)]	26.2

[1)] $P<0.01$, [2)] $P<0.001$, 与模型组相比。

4　讨论

4.2　由表 1、2 可知,从秦艽和龙胆挥发油中分别鉴定出 29 个和 40 个化学成分,但各自成分差异很大。粗茎秦艽富含(2e, 4e)-2, 4-decadienal (14.02%), 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-benzene (12.69%)和 methyl-1, 2-dihydro-2-oxo-quinoline-4-carboxylate (7.86%);而龙胆根中挥发油的主要成分是 n- hexadecanoic acid (16.50%), hexanoic acid (9.11%), diisobutyl phthalate (5.48%), heneicosane (5.24%)和 octanoic acid (5.05%)。另外,从秦艽、龙胆挥发油中均鉴定出 hexanal, 1-octen-3-ol, heneicosane 和 1, 7, 7-trimethyl-(1R)-bicyclo[2.2.1] heptan-2-one 等低极性成分。结合图 1、图 2,秦艽所含挥发油成分富含醛、酚类成分,具有较短的保留时间和较小的分子量,而龙胆则富含脂肪酸类成分,保留时间相对较长,分子量较大。显然,正是这种高含量的醛、酚类成分的存在而使得秦艽的根具有比龙胆更浓郁的香味。

4.2　NO 被认为是病理过程中的介质和调节剂,特别是在急性炎症应答中,少量的 NO 对体内稳态起着重要的调节作用,然而病理情况下诱导型 NO 合成酶合成大量的 NO 则有细胞毒作用,其可加重炎症反应并有致癌作用。因此,测定 RAW264.7 细胞释放 NO 含量对评价秦艽、龙胆挥发油抗炎活性具有重要意义。如图 4 所示,秦艽、龙胆挥发油均表现出对巨噬细胞 NO 生成的抑制作用,且抑制能力随浓度增大而提高,显示出一定的剂量依赖性。当浓度为 30 μg/ml 时,秦艽、龙胆对 RAW264.7 细胞 NO 生成的抑制率分别为 56.3%、54.2%。其机制可能是通过抑制 NO 合成酶活性而发挥抗炎作用的。另外,作者考察了挥发油的体内抗炎活性,实验以小鼠耳廓肿胀模型考察了秦艽、龙胆挥发油的体内抗炎药理学活性。结果表明,秦艽和龙胆挥发油均能够明显对抗由二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀,且呈现剂量依赖性。

4.3　*本实验表明秦艽和龙胆的挥发油在体内、体外均显示了显著的抗炎活性*　2, 4-decadienal,作为秦艽挥发油的主要成分,据报道能有效抑制 TNF-α mRNA 的基因表达而发挥抗炎作用(5 μM, 46%, $P<0.001$)[10];秦艽和龙胆挥发油中所含的另一个化合物 hexanal,在 200 μM 的剂量下同样抑制 TNF-α mRNA 的基因表达(23%, $P<0.001$)[7];n-hexadecanoic acid,作为龙胆挥发油的主要组成成分,据报道其具有免疫应答作用,可以调节感染损伤后的炎症。同时,据报道地龙挥发油的主要成分肉豆蔻酸(17.5%)和 n-hexadecanoic acid (16.9%)在二甲苯引起的小鼠耳肿胀模型中显示出良好的抗炎活性,且其抗炎能力与脂肪酸类成分的含量高低密切相关[11]。因此,作者推断秦艽、龙胆挥发油的抗炎作用归因于此类醛和酸类成分的存在。另外,龙胆苦苷一直被认为是秦艽、龙胆药材的主要抗炎活性成分,据报道,300、150和50mg/kg龙胆苦苷皮下注射

(下转第 283 页)

不确定度

$$u_{rel}(X)=[u_{rel}^2(Wx)+u_{rel}^2(Vx)+u_{rel}^2(Ax)+u_{rel}^2(Q)]^{1/2}=0.015$$

3　计算合成相对标准不确定度 u(X)

将各测定数值代入公式(1),由此计算出的头孢曲松含量,得到所测样品的含量,计算结果取 2 个样品溶液测定的平均值,(其中供试品水份含量另外测得 8.8%)得到所测样品含量为 91.0%。

u(X)由对照品引入的不确定度 $u_{rel}(R)$ 和供试品引入的不确定度 $u_{rel}(X)$ 所构成,$u(X)=u_c(X)/X=[u_{rel}^2(R)+u_{rel}^2(X)]^{1/2}=0.015\ 4$

合成标准不确定度 $u_c(X)=0.015\ 4\times91.0\%=1.40\%$

4　计算扩展不确定度 U

假设测量结果符合正态分布,在置信概率为 95%时,选择包含因子 K=2。

$$U=K\times u_c(X)=2\times1.40\%=2.80\%$$

5　不确定度报告

HPLC 法测定头孢曲松的含量(以干燥品计)为:X=91.0%±2.8%。

6　讨论

本文评估出头孢曲松含量测定的扩展不确定度为 6.0%,表明供试品测定结果的分散程度符合 HPLC 法对准确度的要求,测定结果准确、可靠。在分析评估不确定度时,因为合成不确定度的数值几乎完全取决于重要的不确定度分量,所以应尽量考虑到产生不确定度的全部来源。根据上述评定得知本方法测量结果的不确定度主要来自对照品以及供试品溶液的重复测定和水分测定。在分析了上述影响测量不确定度的原因后,通过采取相应的措施,完全可以将测量结果的不确定度进一步减小。

【参考文献】

[1] 国家质量技术监督局. JJF1059-1999,测量不确定度评定与表示[S]. 北京:中国计量出版社,1999.
[2] 王立云,卢京光,HPLC 法测定头孢硫脒含量的不确定度分析[J]. 齐鲁药事,2007,26,(4):217.
[3] 陈汝红, 杨　梁,HPLC 法测定头孢羟氨苄含量的不确定度评估[J]. 中国药事,2007,21(7):488.
[4] 陈　星,费休氏法测定注射用头孢曲松钠水分的不确定度评定[J]. 海峡药学,2010,22(12):63.
[5] 王洪家,马　兰,贾志刚. 注射用头孢曲松钠含量测定的不确定度分析[J]. 天津药学,2010,22(1):24.
[6] 申　安,HPLC 法测定头孢氨苄胶囊含量的测量不确定度评定[J]. 药物分析杂志,2009,29(8):1384.
[7] 中国药典 2010 版. 二部[S]. 2010:181.

[收稿日期]2011-05-16
[修回日期]2011-05-25

(上接第 277 页)

给药可显著抑制二甲苯引起的鼠耳肿胀,抑制率分别是 56.3%,39.2% 和 14.5% [4],而本实验发现 120 mg/kg 秦艽、龙胆挥发油在小鼠肿胀实验模型中同样表现出显著地抗炎活性,抑制率分别达到 37.2% 和 37.8%。可见,龙胆苦苷和挥发油成分在秦艽、龙胆药材的抗炎活性中均扮演着很重要的角色,因此挥发油也应该得到重视以便更好的控制药材质量。

【参考文献】

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社, 1988: 62.
[2] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社. 1991: 9.
[3] 刘占文, 陈长勋, 金若敏, 等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药, 2002, 33 (1): 47.
[4] 陈长勋, 刘占文, 孙峥嵘, 等. 龙胆苦苷抗炎药理作用研究[J]. 中草药, 2003, 34(9): 814.
[5] 陈　雷, 王海波, 孙晓丽, 等. 龙胆苦苷镇痛抗炎药理作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 903.
[6] Tubaro A, Florio C, Luxich E, *et al*. Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels[J]. Toxicon, 1996, 34: 965.
[7] Jeong GS, Lee DS, Kim YC. Cudratricusxanthone A from *Cudrania tricuspidata* suppresses pro-inflammatory mediators through expression of anti-inflammatory heme oxygenase-1 in RAW264.7 macrophages[J]. Int J Immunopharmacol, 2009, 9: 241.
[8] Kim JB, Han AR, Park EY, *et al*. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-κB inactivation in RAW 264.7 macrophage cells[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30: 2345.
[9] Kou JP, Sun Y, Lin YY, *et al*. Anti-inflammatory activities of aqueous extract from Radix Ophiopogon japonicus and its two constituents[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28: 1234.
[10] Girona J, Vallvé JC, Ribalta J, *et al*. 2,4-Decadienal downregulates TNF-α gene expression in THP-1 human macrophages[J]. Atherosclerosis, 2001, 158 : 95.
[11] 肖寄平, 张炜煜. 脂肪酸在地龙抗炎作用研究中的指示作用[J/OL], 长春中医药大学, 中医中药网.

[收稿日期]　2010-08-31
[修回日期]　2010-11-14