

祖师麻醋酸乙酯提取物体外抗炎作用及其机制

章丹丹¹, 潘一峰², 凌霜¹, 杨晓露¹, 许锦文¹, 卞卡^{1,3}

1. 上海中医药大学 穆拉德中药现代化研究中心, 上海 201203

2. 上海现代中医药股份有限公司, 上海 200051

3. 美国德克萨斯大学休斯顿医学院 德克萨斯大学分子医学研究所, 综合生物及药理学系, 休斯顿 TX 77030

摘要: 目的 研究祖师麻醋酸乙酯提取物(EAEDGC)的体外抗炎作用及其机制。方法 用 γ -干扰素(IFN- γ)和脂多糖(LPS)协同制备小鼠RAW264.7细胞炎症模型, Griess反应测定细胞上清液中NO生成量, MTT法测定细胞活力, 三价铁还原抗氧化能力测试(FRAP assay)测定细胞总抗氧化能力, RT-PCR检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧酶-2(COX-2)、血红素加氧酶-1(HO-1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA的表达; Western blotting检测iNOS、COX-2、HO-1、p-ERK蛋白表达水平。结果 EAEDGC以剂量依赖方式抑制细胞上清液中NO的生成, 提高细胞总抗氧化能力, 下调iNOS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA及iNOS、p-ERK蛋白的表达, 上调HO-1 mRNA和蛋白表达, 同时不影响细胞生长; 但对COX-2 mRNA和蛋白表达影响不大。结论 EAEDGC部分通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)中的细胞外信号调节激酶(ERK)信号转导通路抑制iNOS基因和蛋白的表达, 从而抑制NO的生成, 提高细胞总抗氧化能力, 同时下调IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症介质和上调抗炎介质HO-1的表达, 进而发挥抗炎作用。

关键词: 祖师麻醋酸乙酯提取物; 抗炎机制; 诱导型一氧化氮合酶; 细胞因子; 总抗氧化能力

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1169-05

In vitro anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Daphnes Giraldii Cortex* and their mechanisms

ZHANG Dan-dan¹, PAN Yi-feng², LING Shuang¹, YANG Xiao-lu¹, XU Jin-wen¹, BIAN Ka^{1,3}

1. Murad Research Institute for Modernized Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Shanghai SUNDISE Chinese Medicine Co. Ltd., Shanghai 200051, China

3. Department of Integrative Biology and Pharmacology, Institute of Molecular Medicine, University of Texas Medical School, Houston 77030, USA

Abstract: Objective To investigate *in vitro* anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Daphnes Giraldii Cortex* (EAEDGC) on RAW 264.7 macrophages stimulated with IFN- γ plus LPS and their mechanisms. **Methods** IFN- γ plus LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage has been used as experimental inflammatory model. Griess reaction for nitric oxide (NO) production, FRAP assay for total anti-oxidant capacity, MTT assay for cell proliferation (availability), RT-PCR for mRNA expression and Western blotting for protein expression examination were performed. **Results** EAEDGC could concentration-dependently inhibit NO production in stimulated macrophage. The gene and protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) were also suppressed by the herb extract. The treatment by EAEDGC significantly attenuated mRNA of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α , while increased HO-1 expression. The herb element elevated anti-oxidant capacity of the cells. Furthermore, phosphorylation of ERK (p-ERK) was markedly inhibited by EAEDGC. **Conclusion** EAEDGC exerts potential anti-inflammatory effects including the suppression of pro-inflammatory mediators, such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , and increasing HO-1 expression and total antioxidant capacity. EAEDGC could inhibit the NO production and iNOS expression, which may partially contribute to the regulation of ERK/MAPK pathway.

Key words: ethyl acetate extract from *Daphnes Giraldii Cortex* (EAEDGC); anti-inflammation mechanisms; inducible nitric oxide synthase (iNOS); cytokine; total antioxidant capacity

收稿日期: 2010-11-23

基金项目: 国家科技部重大新药创制专项(2009ZX09311-003); 国家科技部“十一五”支撑计划项目(2006BAI11 B08-03); 国家自然科学基金青年基金资助项目(81001666); 上海市教委高校一氧化氮与炎症医学E研究院计划(E-04010); 上海市科委国际技术转移专项(08430711300); 上海市科委中药现代化专项(08DZ1972104); 上海高校选拔培养优秀青年教师基金资助项目(SZY07029)

作者简介: 章丹丹(1980—), 女, 浙江上虞人, 副研究员, 博士, 主要从事炎症医学和中药新药发现及机制研究。

Tel: (021)51322534 E-mail: izhangdd@126.com

祖师麻为瑞香科瑞香属植物黄瑞香 *Daphne giraldii* Nitsche、陕甘瑞香 *D. tangutica* Maxim. 及凹叶瑞香 *D. retusa* Hemsl. 根皮及茎皮, 性辛、苦、温, 有小毒。其具祛风除湿, 止痛散瘀之功效, 主治风湿痹痛、四肢麻木、跌打损伤等症^[1]。临床上用其治疗类风湿性关节炎疗效显著且不良反应轻微。已开发出祖师麻片等多种剂型药品^[2]。研究表明祖师麻醋酸乙酯提取部位对动物模型具较好的镇痛、抗急性炎症和抗佐剂性关节炎的作用^[3], 但其抗炎分子机制尚未明确。本实验测定 RAW264.7 细胞上清中亚硝酸盐的量, 考察祖师麻醋酸乙酯提取物 (EAEDGC) 对炎症细胞模型 NO 生成量的影响, 并考察 EAEDGC 对炎症中诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧化酶-2 (COX-2)、血红素加氧酶-1 (HO-1) 的影响, 还通过检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及细胞总抗氧化能力的变化、p-ERK 蛋白水平的表达, 探讨 EAEDGC 抗炎机制。

1 材料与仪器

1.1 材料

祖师麻药材购自安徽亳州药材市场, 由上海市食品药品监督管理局鉴定为黄瑞香 *Daphne giraldii* Nitsche。RAW264.7 细胞, 购自 ATCC 公司。RPMI 1640 培养基、胎牛血清, 购自 Gibco 公司。二甲基亚砜 (DMSO)、脂多糖 (LPS)、TRIzol RNA 提取试剂、阳性对照药 L-N6-亚氨基-赖氨酸 (L-NIL)、2,4,6-三吡啶基三嗪 (TPTZ)、水溶性维生素 E (Trolox)、Griess 反应试剂, 均购自 Sigma 公司。蛋白测定试剂、PVDF 膜、100 bp DNA 梯度标准品购自 Bio-rad 公司。鼠重组 γ -干扰素 (IFN- γ), 购自 Chemicon 公司。蛋白梯度标准品, 购自 ProgeMa 公司。iNOS、COX-2、HO-1、p-ERK、 β -actin 抗体和二抗分别购自 Cell Signaling 公司和 Santa Cruz 公司。ECL 检测试剂购自 GE 公司。反转录聚合酶链式反应试剂盒购自北京博大泰克公司; 引物由上海生物工程服务有限公司合成。其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Rotavapor R-220 旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 公司; Modulyod-230 冷冻干燥仪, 美国 Thermo 公司; Spectra MAX190 酶标仪, 美国 MD 公司; D278532 高速冷冻离心机, 德国 Hettich 公司; UV21700 紫外分光光度计, 日本岛津公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; PCR

扩增仪, 德国 Biometra 公司; GIS 凝胶图像分析系统, 上海天能科技有限公司; 单向电泳系统, 美国 Bio-rad 公司; sMPIC2600C 自动 X 线胶片洗片机, 上海申贝办公机械有限公司。

2 方法

2.1 EAEDGC 制备

祖师麻用 70%乙醇加热回流提取 (80 °C, 液料比 1 : 10) 3 次, 滤液减压浓缩, 挥干乙醇, 得醇提浸膏, 经石油醚脱脂后取适量浸膏分散在蒸馏水中, 醋酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液, 减压浓缩, 冷冻真空干燥后 -80 °C 保存, 临用前配制 (紫外分光光度法测定, EAEDGC 含总黄酮 23.79%)。

2.2 细胞培养

RAW264.7 细胞于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 条件 CO₂ 培养箱培养。

2.3 检测指标

2.3.1 Griess 反应考察 EAEDGC 干预后细胞上清液中亚硝酸盐量的变化 细胞悬液以每孔 1×10^5 个、100 μ L 接种于 96 孔板, 培养过夜。对照组用含 0.1% DMSO 的 RPMI 1640 培养细胞; 模型组采用 LPS (100 μ g/L) 和 IFN- γ (1×10^4 U/L) 协同刺激细胞; EAEDGC (50、100、200 mg/L) 组分别于 LPS+IFN- γ 刺激前 6 h (预防处理)、0 h (同时处理)、刺激后 6 h (治疗处理) 3 个时间点处理细胞。刺激维持 24 h 后, 吸取 96 孔板中的培养液 100 μ L, 加入等体积的 Griess 反应试剂, 室温反应 10 min, 酶标仪于 540 nm 处测吸光度值。计算 EAEDGC 各剂量在不同处理时间对细胞上清液中亚硝酸盐的抑制率。

抑制率 = (模型组吸光度值 - 给药组吸光度值) / (模型组吸光度值 - 对照组吸光度值)

2.3.2 MTT 法观察 EAEDGC 对细胞活力的影响 各组吸取 96 孔板中培养液 100 μ L 用于 Griess 反应后, 加入 MTT (用 PBS 溶解为 5 g/L) 溶液 10 μ L, 于 37 °C 继续培养 4 h, 加入 50 μ L 三联剂 (0.01 mol/L 盐酸含 10% SDS 和 0.04 mol/L 异丙醇) 过夜, 用酶标仪测定 570、630 nm 处吸光度值, 以空白对照为 100%, 考察 EAEDGC 对细胞活力的影响。

2.3.3 三价铁还原抗氧化能力测试 (FRAP) 法考察 EAEDGC 对细胞总抗氧化能力的影响 RAW 264.7 细胞培养于 30 mm 细胞培养皿中, 以 100、200 mg/L EAEDGC 预处理 1 h, 并设空白对照及标准对照 Trolox 组, 用 IFN- γ +LPS 继续处理 6 h 后, 于冰上取各处理组蛋白并用 Lowry 法定量测定蛋白

质。FRAP 溶液为 0.3 mol/L 醋酸盐缓冲盐 (pH3.6)、10 mmol/L TPTZ(溶于 40 mmol/L HCl)和 2 mmol/L FeCl₃ (体积比 10:1:1) 混合液。取 5 μL 各组蛋白样品加入 245 μL FRAP 溶液, 静置 10 min 后, 在酶标仪于 593 nm 处测吸光度值。实验结果以 Trolox 抗氧化能力[mmol/(L·g)]为标准, 评价 EAEDGC 对细胞总抗氧化能力的影响^[4]。

2.3.4 RT-PCR 法检测 iNOS、COX-2、HO-1、IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA 表达 RAW264.7 细胞培养于 30 mm 细胞培养皿中, 以 EAEDGC 100、200 mg/L 预处理 1 h, 用 IFN-γ+LPS 继续处理 4 h 后, 加 Trizol 试剂 1 mL, 按说明书提取 RNA, 所用 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8~2.0。按 RT 试剂盒说明逆转录合成模板 cDNA 后, 按 PCR 试剂盒说明应用 PCR 仪进行聚合酶链反应。目的基因引物序列: iNOS 正向引物 5'-GCCTCATGCCTTGATTCA-3', 反向引物 5'-GAGGGTGAATTCAGA-3'; COX-2 正向引物 5'-GATACGTGTTGACGTCCAGA-3', 反向引物 5'-GTCTGTCTAGAGTTTCACCG-3'; HO-1 正向引物 5'-TGACCTCTCAGGGGG-TCAGGTCC-3', 反向引物 5'-AGTCGTGGTCAGTCAACATGGATGC-3'; IL-1β 正向引物 5'-CCTGTGGCCTTGGGCC-TCAA-3', 反向引物 5'-GGTGCTTGATGTACCAG-TTGGG-3'; TNF-α 正向引物 5'-CCCTCACACTCA-GATCATCTTCTCAA-3', 反向引物 5'-TCTAAGTACTTGGGCAGGTTGACCTC-3'; IL-6 正向引物 5'-TGAACAACGATGATGCACTTGC-3', 反向引物 5'-

CGTAGAGAAC-AACATAAGTC-3'; β-actin 正向引物 5'-CCAAGGCCAACCGCCGC-3', 反向引物 5'-AGGGTACATGGTGCCGCC-3'。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后凝胶扫描仪观察拍照。

2.3.5 Western blotting 检测 iNOS、COX-2、HO-1 蛋白表达和 ERK 磷酸化 RAW264.7 细胞培养于 30 mm 细胞培养皿中, 以 EAEDGC 100、200 mg/L 预处理 1 h 后用 IFN-γ+LPS 继续处理, 用冰 PBS 洗涤, 加入蛋白酶抑制剂后收集细胞, 超声破碎, 于 4 °C、3 000×g 离心 15 min, 取蛋白上清液进行蛋白测定。另每孔加入 25 μg 的蛋白上样, 在 7.5%、12%的 SDS-PAGE 凝胶中电泳, 蛋白转移到 PVDF 膜上, 10%脱脂牛奶封闭, 分别用一抗 iNOS (1:1 000)、COX-2(1:1 000)、HO-1(1:1 000)、p-ERK (1:1 000)、β-actin (1:800) 与膜 4 °C 孵育过夜, PBST 溶液洗膜 3×15 min, IgG-HRP 二抗 (1:2 000→1:5 000) 与膜孵育 1 h, PBST 溶液洗膜 3×15 min, 膜控干后加 ECL 试剂, X 线显影、定影。

2.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异显著性检验采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对细胞 NO 生成量的影响

IFN-γ+LPS 协同诱导 RAW264.7 产生大量 NO, 细胞上清液中 NO 产物亚硝酸盐显著增加 (*P*<0.01)。EAEDGC 以质量浓度依赖方式抑制细胞上清液中亚硝酸盐的积累 (*P*<0.01), 预防处理组抑制效果最好; 而对静息细胞 NO 生成无影响, 结果见表 1。

表 1 EAEDGC 对 RAW264.7 细胞 NO 生成量和细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of EAEDGC on NO production and cell viability in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	亚硝酸盐/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	亚硝酸盐抑制率/%	细胞活力/%
对照	—	1.05±0.08	—	100.00
模型	—	68.75±0.01 ^{##}	—	14.60
EAEDGC 治疗处理	50	64.96±0.02	6.05	27.51
	100	53.89±0.03 ^{**}	22.08	47.17
	200	46.98±0.02 ^{**}	32.10	40.24
EAEDGC 同时处理	50	57.23±0.01 ^{**}	17.00	30.58
	100	43.62±0.01 ^{**}	37.11	74.42
	200	17.62±0.04 ^{**}	75.52	140.20
EAEDGC 预防处理	50	48.62±0.01 ^{**}	20.76	39.71
	100	38.47±0.01 ^{**}	37.88	112.38
	200	6.58±0.02 ^{**}	91.73	147.31
静息细胞	50	3.93±0.01	—	97.55
	100	2.74±0.01	—	97.42
	200	3.28±0.01	—	96.18
L-NIL	50 μmol·L ⁻¹	49.22±0.01 ^{**}	35.20	36.20

与对照组比较: ^{##} *P*<0.01; 与模型组比较: ^{**} *P*<0.01

^{##} *P*<0.01 vs control group; ^{**} *P*<0.01 vs model group

3.2 对细胞的活力影响

EAEDGC 以质量浓度依赖方式提高经 IFN- γ +LPS 刺激的细胞的活力, 且以预防处理组的细胞保护作用最强; 而对静息细胞的活力影响不大, 表明 EAEDGC 无明显细胞毒性。见表 1。

3.3 对细胞总抗氧化能力的影响

经 LPS+IFN- γ 刺激后, 细胞的总抗氧化能力从 43.01 ± 11.57 降至 29.21 ± 6.28 ($P < 0.05$), 表明炎症过程中存在氧化应激。3 个剂量 EAEDGC 处理后, 细胞总抗氧化能力较模型组有不同程度的提高 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 EAEDGC 对 RAW264.7 细胞总抗氧化能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of EAEDGC on antioxidant ability of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	FRAP 检测
对照	—	43.01 ± 11.57
模型	—	$29.21 \pm 6.28^{\#}$
EAEDGC	100	$52.02 \pm 5.54^*$
	200	$68.23 \pm 15.46^*$

与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$

$^{\#}P < 0.05$ vs control group; $^*P < 0.05$ vs model group

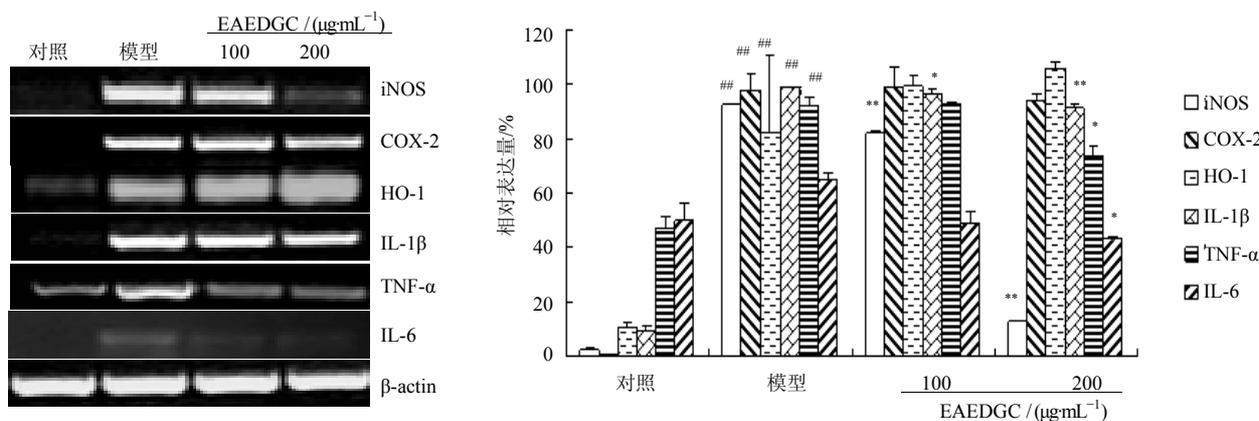
3.4 对 iNOS、COX-2、HO-1 和 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达的影响

对照组 iNOS、COX-2、HO-1 mRNA 均呈低表达。而经 IFN- γ +LPS 刺激后, iNOS、COX-2、HO-1 均呈高表达, 分别为对照组的 71.93 倍 ($P < 0.01$)、16.62 倍 ($P < 0.01$)、4.19 倍 ($P < 0.01$)。经 EAEDGC 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 干预后, iNOS mRNA 表达较模型组分别降低了 11.08% ($P < 0.01$)、86.18% ($P < 0.01$), 但对 COX-2 mRNA 表达无影响。EAEDGC 有上调 HO-1 mRNA 趋势, 使 HO-1 mRNA 比模型组分别上调 21.76%、22.10%。

经 EAEDGC 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 干预后, IL-1 β mRNA 较模型组分别下调 2.14% ($P < 0.05$)、7.14% ($P < 0.01$); TNF- α mRNA 表达分别下调了 6.08%、19.60% ($P < 0.05$); IL-6 mRNA 分别下调了 19.58%、33.75% ($P < 0.05$), 均呈质量浓度依赖性。见图 1。

3.5 对 iNOS、COX-2、HO-1、p-ERK 蛋白表达的影响

经 IFN- γ +LPS 刺激后, 模型组 iNOS 蛋白表达比对照组增加了 32.10% ($P < 0.01$); 而 EAEDGC 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 iNOS 蛋白表达较模型组分别下调了 36.38%、38.37% ($P < 0.05$), EAEDGC 干预后 iNOS 蛋白变化与 iNOS mRNA 变化一致, 并对



与对照组比较: $^{\#}P < 0.01$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$, 图 2 同

$^{\#}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group, Fig. 2 is same

图 1 EAEDGC 对 iNOS 及炎性细胞因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of EAEDGC on mRNA expression of iNOS and inflammatory cytokines ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

COX-2 蛋白的表达无影响。

模型组 HO-1 的蛋白表达较对照组提高了 45.72% ($P < 0.01$)。100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EAEDGC 使 HO-1 蛋白分别比模型组上调了 29.50%、29.73% ($P < 0.01$), 呈质量浓度依赖性。经 IFN- γ +LPS 刺激后, 模型组 p-ERK 表达较对照组上调了 39.37% ($P <$

0.01)。100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EAEDGC 作用后, 使 p-ERK 蛋白较模型组分别下降了 23.57%、34.02% ($P < 0.01$), 呈质量浓度依赖性。结果见图 2。

4 讨论

致炎因子受到刺激将活化巨噬细胞 MAPK/ERK/NF- κ B 信号转导通路, 处于该通路下游的 iNOS 产

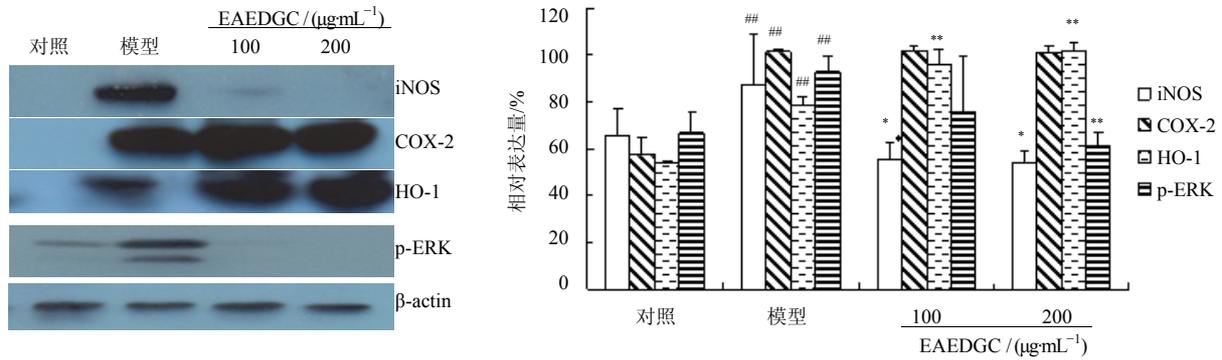


图2 EAEDGC对iNOS、COX-2、HO-1蛋白表达和ERK磷酸化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of EAEDGC on protein expression of iNOS, COX-2, and HO-1 and ERK phosphorylation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

生大量的 NO，同时伴随产生的各类炎症介质推动级联瀑布反应，造成细胞损伤，致使炎症性疾病进一步恶化。对 iNOS 的调控有望成为治疗炎症的新策略^[5]。EAEDGC 抑制 NO 稳定产物亚硝酸盐的生成，对炎症损伤后的细胞具有保护作用，能提高细胞总抗氧化能力，且未显示细胞毒性。

丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 信号转导途径是细胞外信号引起细胞核内反应的通道之一，包括细胞外信号调节激酶 (ERK)、JNK、p38 和 ERK5 共 4 条通路，可参与细胞的凋亡、分化、增殖及生长等过程。炎症反应时，内毒素、促炎细胞因子及活性氧等能同时或顺次激活 MAPK 通路，其中 ERK1、ERK2，磷酸化激活的 ERK1/2 由胞质转到核内，进而介导 NF-κB、Ap-1、c-fos 和 c-Jun 等的转录活化^[6]。而 NF-κB 为调节 iNOS、COX-2 等炎症介质的枢纽。在 COX2 和 iNOS 基因启动子上游的 5'区域含 NF-κB 的结合位点^[7]。iNOS 与 COX-2 关系密切，iNOS 能直接将 COX-2 催化位点硝基化而活化 COX-2^[8]。iNOS 和 COX-2 受 LPS 和 IFN-γ 共同刺激后均高表达，而 EAEDGC 能选择性抑制 iNOS 表达，对 COX-2 表达无影响，推断其可能切断 iNOS 和 COX-2 之间的联系。HO/CO 和 NOS/NO 相互调控，NO 的产生可诱导 HO-1 表达的上调，而 HO-1 的上调具有细胞保护作用，其产物胆红素、铁蛋白、CO 起抗炎作用，且 HO-1 可通过 ERK 途径下调 iNOS，达到降低 NO 生成的效果^[9]。EAEDGC 下调 iNOS 表达，上调 HO-1 表达，以致产生抑制致炎系统和上调抗炎体系的双向调节作用，使机体内环境恢复平衡。此外，IL-1β、TNF-α、IL-6 在炎症急性期均高表达，EAEDGC 均能下调 IL-1β、TNF-α、IL-6 mRNA 表达。

综上所述，EAEDGC 是祖师麻抗炎活性部位之一，其抗炎作用机制是部分通过抑制 MAPK/ERK 信号途径中 ERK 蛋白的磷酸化，抑制 iNOS 靶基因及蛋白的表达，控制 NO 生成和氧化应激，抑制致炎细胞因子表达的同时提高抗炎介质 HO-1 表达，进而发挥抗炎效果。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 二部. 1977.
- [2] 李书慧, 吴立军, 殷红英. 祖师麻化学和药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 401-403.
- [3] 王宇华, 许惠琴, 狄留庆, 等. 祖师麻提取物的镇痛与抗炎作用研究 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1697-1700.
- [4] 高月红, 郑建普, 朱春赞, 等. 抗氧化能力检测方法评估及微型化 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(24): 1863-1866.
- [5] Bryan N S, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development [J]. *Front Biosci*, 2009, 14(1): 1-18.
- [6] Kaminska B. MAPK signaling pathway as molecular target for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1754(1/2): 253-262.
- [7] Surh Y J, Chun K S, Cha H H, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation [J]. *Mutat Res*, 2001, 480-481: 243-268.
- [8] Kim S F, Huri D A, Snyder S H. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2 [J]. *Science*, 2005, 310(5756): 1966-1970.
- [9] Chen K, Maines M D. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38 [J]. *Cell Mol Biol*, 2000, 46(3): 609-617.