

· 毒理 ·

UPLC-QTOF/MS 分析芫花 诱导人肝细胞 L02 损伤的毒性物质基础

施洁瑕¹, 马宏跃^{1*}, 段金廛^{1*}, 尚尔鑫¹, 郭建明¹, 唐于平¹, 陈艳琰¹,
钱叶飞¹, 张军峰², 詹臻², 吉霞¹
(1. 南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 南京 210023;
2. 南京中医药大学 基础医学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:研究芫花提取物诱导人肝细胞 L02 损伤的毒性物质基础。方法:选取人肝细胞 L02 作为体外实验模型,运用 MTT 法测定芫花提取物对细胞增殖的影响,并且采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF/MS)对芫花提取物及与 L02 细胞亲和后胞内化学成分进行定性分析。结果:芫花提取物对 L02 细胞的生长抑制呈明显的剂量依赖关系,48 h 的 IC₅₀ 为(48.34 ± 4.66) mg·L⁻¹。通过 UPLC-QTOF/MS 鉴定的黄酮类成分主要有:芹菜素、3'-羟基芫花素、芫花素、5,4'-二羟基-7,3'-二甲氧基黄酮;二萜原酸酯类成分主要有:芫花酯戊、genkwanine L、芫花酯丙、芫花烯、芫花酯丁、芫花酯庚、芫花酯乙、芫花酯己、芫花酯甲。在芫花提取物亲和的 L02 细胞中鉴定出 3'-羟基芫花素、芫花素、5,4'-二羟基-7,3'-二甲氧基黄酮、芫花酯戊、芫花烯、芫花酯丁、芫花酯乙、芫花酯甲。其中二萜原酸酯类成分芫花酯甲作用 L02 细胞 48 h 的 IC₅₀ 为(29.57 ± 2.01) mg·L⁻¹,黄酮类成分芫花素(0.1 ~ 100 mg·L⁻¹)未发现对 L02 有显著的细胞毒作用。结论:芫花提取物对人肝细胞 L02 具有细胞毒作用,其中二萜原酸酯类成分与细胞有明显的亲和作用,并具显著的细胞毒作用,是芫花提取物中主要的活性物质。

[关键词] 芫花; 人肝细胞 L02; 毒性; 二萜原酸酯类; 芫花酯甲; 黄酮类; 芫花素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0278-05

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070278

Identification of Toxic Components Inducing L02 Injury in Genkwa Flos by UPLC-QTOF/MS

SHI Jie-xia¹, MA Hong-yue^{1*}, DUAN Jin-ao^{1*}, SHANG Er-xin¹, GUO Jian-ming¹,
TANG Yu-ping¹, CHEN Yan-yan¹, QIAN Ye-fei¹, ZHANG Jun-feng², ZHAN Zhen², JI Xia¹
(1. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine
Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. College of Basic Medical Science, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of the present study is to identify the toxic substances in Genkwa Flos extract which could induce human liver cell line L02 injury. **Method:** MTT assay was applied to assess human liver cell line L02 proliferation after incubation with Genkwa Flos extract. The chemical constituents in Genkwa Flos extract and their affinity with L02 cell were measured by ultraperformance liquid chromatography-quadrupole time of

[收稿日期] 20120926(006)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973 计划”)(2011CB505300,2011CB505303)

[第一作者] 施洁瑕, 硕士, E-mail: shijexia12@126.com

[通讯作者] * 马宏跃, 副教授, Tel: 025-85811625, E-mail: hongyuema@njutcm.edu.cn;

* 段金廛, 教授, Tel: 025-85811116, E-mail: duanja@163.com

flight/mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS). **Result:** Genkwa Flos extract exhibited inhibitive effect on L02 cell in a dose-dependent manner. IC_{50} value was $(48.34 \pm 4.66) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ after 48 hours incubation with L02 cell. Four flavonoids, such as apigenin, 3'-hydroxygenkwanin, genkwanin, and velutin, were detected in Genkwa Flos extract. Nine diterpene orthoesters were also detected in Genkwa Flos extract, including yuanhuapine, genkwanine L, ynanhuafine, genkwadaphnin, yuanhuatin, yuanhuagine, yuanhuadine, yuanhuajine, and yuanhuacine. The substances in Genkwa Flos extract that had affinity with L02 were 3'-hydroxygenkwanin, genkwanin, velutin, yuanhuapine, genkwadaphnin, yuanhuatin, yuanhuadine, and yuanhuacine. Among these components, yuanhuacine inhibited the L02 proliferation in a dose-dependent manner with the IC_{50} of $(29.57 \pm 2.01) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ after 48 hours, while genkwanin ($0.1-100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) had no markedly toxic activity on L02. **Conclusion:** Genkwa Flos extract can inhibit the growth of human liver cell line L02 *in vitro*. Diterpene orthoesters exhibit cellular affinity with L02 cell and show cytotoxicity, indicating that Diterpene orthoesters are the main substances contributing to the toxicity of Genkwa Flos.

[**Key words**] Genkwa Flos; human liver cell line L02; toxicity; diterpene orthoesters; yuanhuacine; flavonoids; genkwanin

芫花为中国特有的瑞香科植物,味苦、辛,性温,归属峻下逐水药,具有促炎,抗氧化,抗肿瘤,免疫抑制的作用。实验研究从最早的观察临床症状体征到细胞色素酶与液相色谱,研究逐渐深入^[1-4]。芫花有毒,动物实验表明,芫花对动物肝功能及心肌酶谱等指标有一定影响^[5],芫花水煎剂长期灌胃对大鼠脏器指数,包括肝等7个的脏器影响较大^[6],以乙型肝炎病毒(HBV)DNA 转染的肝癌细胞株 HepG2 2.2.15 细胞为靶细胞,芫花具有较大的细胞毒性^[7],故肝是芫花毒性靶器官之一。

芫花化学成分主要由芫花素、羟基芫花素、芹菜素、芫花酯甲、芫花酯乙等组成,这些成分均可从芫花二氯甲烷部位分离得到,活性成分为瑞香烷型二萜原酸酯类化合物,据报道芫花酯甲,芫花酯乙,芫花酯庚和两个新型的二萜原酸酯类成分 yuanhuahine 和 yuanhualine 对人肺癌细胞 A549 有抑制作用^[8],芫花酯甲能促进人粒细胞 HL-60 凋亡^[9],对多种肿瘤细胞具有较强的杀伤作用,但有关对人肝细胞 L02 毒性影响的研究未见报道,本文采用液质联用方法研究亲和的毒性成分,确定芫花肝毒性作用的物质基础。

1 材料

1.1 仪器 ACQUITY™ UPLC 系统-PDA 检测器(Waters 公司);Synapt™ Q-TOF 质谱仪(Waters 公司),配有 Lock-spray 接口;电喷雾离子源(ESI);Masslynx 4.1 质谱工作站软件(Waters 公司);Bruker Avance AV500/300 型核磁共振仪(TMS 为内标);WRS-1B 型数字熔点测定仪(温度未校正);RE-852 旋转蒸发仪、RE-201B 恒温水浴锅(南京金正教学

仪器有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);PowerWave X 340 型酶标仪(美国 BIO-TEK INSTRUMENTS, INS. 公司),CKX31SF 型倒置显微镜(Olympus 公司);EPED 超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司);SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台(苏州净化有限公司);电子分析天平(上海精密仪器厂);96 孔培养板(Costar 公司)。

1.2 试药和试剂 芫花产地为安徽省与湖北省交界吴家店,经南京中医药大学段金廛教授鉴定为瑞香科瑞香属植物芫花(*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.)的花蕾(批号 110216)。药材标本存放于南京中医药大学标本馆。DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 08766),胎牛血清(杭州四季青,批号 111030),噻唑蓝(MTT,美国 Amresco 公司,批号 0793),甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司),甲酸(分析纯,Merck 公司),乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司)。薄层层析及柱层析硅胶均为青岛海洋化工厂生产。其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞株和细胞培养 细胞株:人肝细胞 L02 细胞株(由中国科学院上海细胞库提供)。细胞培养用含 10% (体积分数)灭活标准胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素,100 mg·L⁻¹链霉素的 DMEM 培养液,于 37 ℃ 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3 d 传代 1 次。实验用对数生长期细胞。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 芫花提取物 取芫花 40 kg,用 95% 乙醇和 50% 乙醇分别加 10 倍量回流提取 2 次,每次 2 h,提

取液合并后,减压浓缩,残渣加水混悬后,依次加石油醚(60~90℃)、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇(水饱和)萃取,减压浓缩后得石油醚部位 955 g,二氯甲烷部位 900 g,乙酸乙酯部位 810 g,正丁醇部位 1 100 g。

2.1.2 芫花酯甲 二氯甲烷部位经硅胶柱层析,石油醚:乙酸乙酯 5:2 洗脱部位进制备液相,80% 甲醇洗脱,分离得化合物芫花素。

2.1.3 芫花素 二氯甲烷部位经硅胶柱层析分离,用石油醚-乙酸乙酯系统洗脱,其中 5:1 流份在回收溶剂后析出的大量沉淀经乙酸乙酯重结晶得化合物芫花酯甲。经分析鉴定芫花酯甲、芫花素纯度均大于 95%。

将芫花二氯甲烷部位减压烘干,精密称取 80 mg,溶于 1 mL DMSO 中作为母液保存备用;精密称取芫花二氯甲烷部位 10 mg,溶于 10 mL 甲醇中作为母液保存备用。精密称取芫花酯甲 1 mg,溶于 DMSO 中配成 63.83 g·L⁻¹ 的母液保存备用。精密称取芫花素 1 mg,溶于 DMSO 中配成 100 g·L⁻¹ 的母液保存备用。

2.2 色谱条件和质谱条件 UPLC 检测条件色谱柱:Waters ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm × 100 mm,1.7 μm);流动相 0.1% 甲酸水(A)和乙腈(B),梯度洗脱(0~3 min:30%~70% B,3~10 min:70%~90% B,10~15 min:90%~100% B,15~16 min:100%~100% B,16~17 min:100%~30% B);柱温 35℃;流速 0.4 mL·min⁻¹;进样量 5 μL。

MS 检测条件:ESI 源,扫描方式 ESI⁺,ESI⁻ 模式,毛细管电压 3 000 V,锥孔电压 30 V,离子源温度 120℃,脱溶剂气温度 350℃,锥孔气流量 50 L·h⁻¹,脱溶剂气流量 600 L·h⁻¹,碰撞能量(10~50 eV),离子能量 1 V,每 0.5 s 采集 1 次图谱;准确质量测定采用芦丁(相对分子质量 610.5175)溶液为锁定质量溶液。质量扫描范围 50~1 000 m/z。

2.3 对 L02 的细胞毒性 取对数生长期细胞以 5 × 10⁴ 个/mL 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL(边缘孔用无菌 PBS 填充),37℃,5% CO₂ 培养 24 h,吸出培养液,加入不同浓度的含药培养基(芫花提取物),每孔 200 μL,设 4 个复孔,浓度梯度分别为 0(对照组),5,10,20,40,80 mg·L⁻¹,37℃,5% CO₂ 继续培养 48 h。每孔加 MTT 液 20 μL,37℃ 继续孵育 4 h。终止培养,弃上清,每孔加 150 μL DMSO,振荡,酶标仪测每孔 A_{490 nm},计算抑制率及半数细胞抑

制浓度(IC₅₀)。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{加药组 } A_{490 \text{ nm}} / \text{对照组 } A_{490 \text{ nm}}) \times 100\%$$

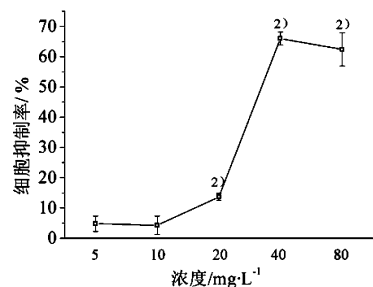
2.4 细胞亲和 细胞接种 于 6 孔板中,每孔加入 1 mL 含有 1 × 10⁶ 个细胞的培养液,24 h 后吸出培养液,每孔加入 50 mg·L⁻¹ 芫花提取物 500 μL,共孵育 48 h 后吸出药液 1 mL 备用。PBS 洗涤所有已亲和细胞 3 次,每孔加纯水 500 μL 反复冻融 5 次(-70℃,5 min;37℃,5 min),超声裂解,加入甲醇,超声,合并,离心,取上清液、沉淀备用。以无血清培养基同法制得空白萃取液。氮气吹干样品,加入 200 μL 甲醇溶解,取 180 μL 进样 UPLC-QTOF/MS 分析。

2.5 芫花酯甲和芫花素对 L02 的细胞毒性 对芫花提取物中二萜原酸酯类成分——芫花酯甲,黄酮类成分——芫花素进行比较(芫花酯甲在已分离得到的二萜原酸酯类成分中含量最高,芫花素在已分离得到的黄酮类成分中含量最高),芫花酯甲质量浓度梯度分别为 0(对照组),0.405,0.810,1.620,3.240,6.480 mg·L⁻¹,芫花素质量浓度分别为 0(对照组),0.1,1,10,50,100 mg·L⁻¹,对 CO₂ 细胞毒性测定方法同 2.3。

2.6 统计学处理 实验结果数据采用 Excel 进行 *t* 检验统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 芫花提取物对 L02 细胞毒性作用分析 计算芫花提取物对 L02 细胞抑制率,结果见图 1。随着芫花提取物浓度的增加,细胞抑制率逐渐上升,呈明显的量效关系。公式计算 IC₅₀,得到芫花提取物对 L02 的 IC₅₀ 为(48.34 ± 4.66) mg·L⁻¹。



与空白对照组比¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

图 1 不同浓度芫花提取物对 L02 细胞毒作用

3.2 芫花提取物的成分分析 采用 UPLC-QTOF/MS 对 1 g·L⁻¹ 芫花提取物成分进行定性分析,(+) ESI-MS 和 (-) ESI-MS 的质谱总离子流图(TIC chromatograms)见图 2,正负离子模式经过比较,在正离子模式下采集数据。对照质谱图,如表 1 所示,从芫花提取物鉴定出的化合物主要是黄酮类和二萜

原酸酯类化合物,分别是芹菜素、3'-羟基芫花素、芫花素、5,4'-二羟基-7,3'-二甲氧基黄酮、芫花酯戊、

genkwanine L、芫花酯丙、芫花烯、芫花酯丁、芫花酯庚、芫花酯乙、芫花酯己、芫花酯甲。

表 1 芫花提取物质谱分析 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)

No.	t_{R} /min	$[\text{M} + \text{H}]^+$	相对分子质量		误差			分子式	化合物
			实测	理论	mDa	PPM	DBE		
1	2.05	271	271.062 3	271.060 6	1.7	6.3	10.5	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	芹菜素 (apigenin)
2	2.59	301	301.073 5	301.071 2	2.3	7.6	10.5	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	3'-羟基芫花素 (3'-hydroxygenkwanine)
3	3.14	285	285.076 3	285.076 3	0.0	0.0	10.5	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	芫花素 (genkwanine)
4	3.24	315	315.088 0	315.086 9	1.1	3.5	10.5	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	5,4'-二羟基-7,3'-二甲氧基黄酮 (velutin)
5	3.36	543	543.228 0	543.223 0	5.0	9.2	12.5	$\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$	芫花酯戊 (yuanhuapine)
6	3.40	561	561.237 7	561.233 6	4.1	7.3	11.5	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{11}$	genkwanine L
7	3.75	541	541.209 3	541.207 4	1.9	3.5	13.5	$\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$	芫花酯丙 (yuanhuafine)
8	4.63	603	603.225 5	603.223 0	2.5	4.1	17.5	$\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$	芫花烯 (genkwadaphnin)
9	4.78	605	605.235 7	605.238 7	2.9	4.8	25.5	$\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_{10}$	芫花酯丁 (yuanhuatin)
10	5.52	585	585.272 2	585.270 0	2.2	3.8	12.5	$\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_{10}$	芫花酯庚 (yuanhuagine)
11	6.29	587	587.281 1	587.285 6	-4.5	-7.7	11.5	$\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_{10}$	芫花酯乙 (yuanhuadine)
12	7.45	647	647.289 1	647.291 5	3.5	5.4	16.5	$\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{O}_{10}$	芫花酯己 (yuanhuajine)
13	8.38	649	649.302 6	649.301 3	1.3	2.0	15.5	$\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{O}_{10}$	芫花酯甲 (yuanhuacine)

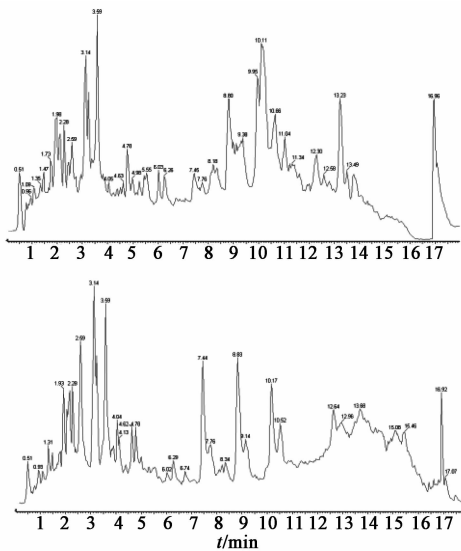


图 2 芫花提取物 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的正、负总离子流

3.3 芫花提取物与 L02 细胞亲和量分析 对空白培养基对照、空白细胞裂解液对照、未经亲和药液、亲和后细胞裂解上清液、亲和后细胞裂解沉淀甲醇萃取液进行 UPLC-QTOF/MS 分析,相关数据见图 3 和表 2。空白的细胞裂解液未检测到芫花提取物中的成分,证明其对芫花提取物成分与细胞作用无干扰。

UPLC-QTOF/MS 检测未亲和药液,经亲和后 L02 细胞裂解沉淀甲醇萃取液,细胞裂解萃取上清液。已亲和的 L02 细胞经裂解、离心、萃取后,与 L02 细胞裂解物结合的化合物含量,细胞内游离的化合物含量如表 2 所示。

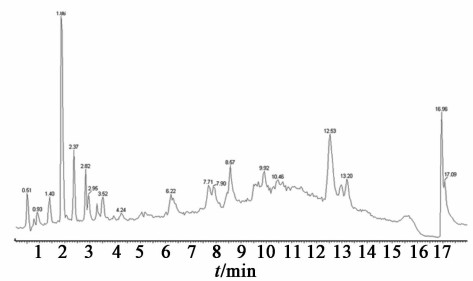


图 3 芫花提取物 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用于 L02 正离子模式下总离子流

表 2 芫花提取物 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 L02 细胞的亲和量

No. 化合物	分子式	细胞	细胞
		裂解液 /m/z	裂解物 /m/z
1 3'-羟基芫花素	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	45	42
2 芫花素	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	681	388
3 5,4'-二羟基-7,3'-二甲氧基黄酮	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	318	143
4 芫花酯戊	$\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$	36	11
5 芫花烯	$\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$	51	109
6 芫花酯丁	$\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_{10}$	40	37
7 芫花酯乙	$\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_{10}$	38	27
8 芫花酯甲	$\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{O}_{10}$	30	33

3.4 芫花酯甲和芫花素对 L02 细胞的毒性 芫花酯甲作用于 L02 细胞 48 h 后,明显抑制了 L02 的细胞的增殖,抑制程度随芫花酯甲浓度增加而增强,呈明显的量效关系, IC_{50} (29.57 ± 2.01) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而芫花素作用 L02 细胞 48 h 后的毒性不强。见表 3。

表 3 不同浓度芫花酯甲和芫花素对 L02 细胞毒作用 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

芫花酯甲		芫花素	
质量浓度	抑制率	质量浓度	抑制率
/mg·L ⁻¹	/%	/mg·L ⁻¹	/%
0.405	12.32 ± 0.93 ²⁾	0.1	1.79 ± 0.13
0.810	17.62 ± 0.38 ²⁾	1	2.92 ± 0.17
1.620	11.73 ± 2.86 ²⁾	10	20.22 ± 0.12 ¹⁾
3.240	9.02 ± 2.38	50	21.97 ± 0.07 ²⁾
6.480	55.86 ± 6.63 ²⁾	100	18.96 ± 0.13 ¹⁾

注:与空白对照组比¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

4 讨论

本实验采用 UPLC-QTOF/MS 联用技术,在正离子模式检测下,由准确相对分子质量(误差 < 5 μg)及元素组成推测的化合物为 13 个,这些在芫花提取物中发现的主要是黄酮类和二萜原酸酯类化合物成分。

运用细胞亲和技术——芫花活性成分经过与人肝细胞 L02 细胞膜结合或者进入细胞内发挥毒性作用,芫花提取物经过 L02 细胞亲和后,在细胞裂解液及裂解物的萃取液中检测到 8 个化合物的存在,推测与 L02 亲和的成分可能为毒性成分。

从而进一步对二萜原酸酯类和黄酮类成分进行比较,根据文献报道^[10],生芫花水浸剂小鼠 ip 的 LD₅₀ 为 28.3 g·kg⁻¹,芫花素的 LD₅₀ 大于 4.0 g·kg⁻¹,芫花酯甲的 LD₅₀ 为 1.5 mg·kg⁻¹。芫花酯甲的毒性约为芫花的 18 866.7 倍。本实验采用 MTT 法测芫花酯甲和芫花素对 L02 的细胞毒性,发现芫花酯甲对 L02 有剂量的依赖性,抑制率随着剂量的增加而上升,IC₅₀ 为 (29.57 ± 2.01) mg·L⁻¹,而芫花素未发现有显著的细胞毒作用,故二萜原酸酯类成分为主要的毒性成分。

其中芫花提取物中黄酮类化合物的母核结构不易断裂,比较稳定^[11];二萜原酸酯类化合物主要以异戊二烯的规律断裂,但因其脂溶性强,含量较少,所以两类化合物在去离子过程中,响应值低,数据值偏小。

芫花抑制细胞增殖机制可能与抑制拓扑异构酶 I,促进癌细胞凋亡,G₁ 期停滞密切相关。其中,芫花酯甲在花中的含量为 0.000 9%^[12],它是新结构类型 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂类抗癌药物,对 DNA 拓扑异构酶 I 活性的抑制作用可能是其抗癌作用机制之一^[13]。

本研究在用 MTT 实验证实了芫花提取物肝毒性的前提下,采用液质联用的方法分析芫花提取物及与人肝细胞 L02 亲和后胞内的化学成分,并研究芫花酯甲对 L02 的毒性作用,为芫花提取物和芫花

酯甲肝毒性的机制研究提供了线索。

[参考文献]

[1] 于大猛,瞿融. 芫花甘草同方配伍研究概述与基层医院应用现状 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (21): 296.

[2] 李文林,范欣生,段金廛,等. 中药十八反的现代临床应用数据分析与思考 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 231.

[3] 韩伟,徐子芳,宋小妹,等. 芫花药材物质基础研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 46.

[4] 肖成荣,王宇光,代方国,等. 甘草、芫花合用对大鼠肝脏细胞色素 P450 酶的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(12): 48.

[5] 黄文权,程相岭,肖鸿,等. 甘草配伍芫花对大鼠心肝肾肾功能及组织形态的影响 [J]. 中国中医急症, 2003, 12(2): 155.

[6] 向丽华,陈燕萍,张智,等. 24 味有毒中药长期毒性实验对大鼠脏器指数的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(1): 35.

[7] 于超,郭辉. 中草药提取物体外抑制 HBV 的筛选实验 [J]. 中药药理与临床, 2001, 17(1): 23.

[8] Hong J Y, Nam J W, Seo E K, et al. Daphnane diterpene esters with anti-proliferative activities against human lung cancer cells from *Daphne genkwa* [J]. Chem Pharm Bull(Tokyo), 2010, 58(2): 234.

[9] Park B Y, Min B S, Ahn K S, et al. Daphnane diterpene esters isolated from flower buds of *Daphne genkwa* induce apoptosis in human myelocytic HL-60 cells and suppress tumor growth in Lewis lung carcinoma (LLC)-inoculated mouse model [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 111(3): 496.

[10] 赵一,原思通,李爱媛,等. 炮制对芫花毒性和药效的影响 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(6): 344.

[11] 邓仕任,夏林波,董倩,等. 芫花药材的 HPLC 指纹图谱及 ESI-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 32.

[12] Liou Y F, Hall I H, Lee K H. Antitumor agents LVI: the protein synthesis inhibition by genkwadaphnin and yuanhuacinee of P-388 lymphocytic leukemia cells [J]. J Pharm Sci, 1982, 71(12): 1340.

[13] Zhang S X, Li X N, Zhang F H, et al. Preparation of yuanhuacine and relative daphne diterpene esters from *Daphne genkwa* and structure-activity relationship of potent inhibitory activity against DNA topoisomerase I [J]. Bioor Med Chem, 2006, 14 (11): 3888.

[责任编辑 聂淑琴]