

基于人呼吸道上皮细胞炎症模型的 连翘提取物抗炎活性实验研究

刘建洲, 张立伟*

山西大学分子科学研究所, 太原 030006

摘要: 通过复制 LPS 诱导的 BEAS-2B 炎症模型, 探讨连翘提取物对炎症反应中炎症因子分泌的作用。采用 MTT 法检测 BEAS-2B 细胞活力, 筛选连翘乙醇提取物 (FSEE)、60% 连翘酯苷 A (60% FTA)、90% 连翘酯苷 A (90% FTA) 最佳给药浓度; 采用倒置显微镜观察连翘提取物对细胞作用后的细胞形态; 采用 Griess Reagent 法检测细胞培养上清 NO 含量; 流式细胞术检测细胞内活性氧 (ROS) 的水平。毒性试验结果表明, 连翘提取物浓度小于 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 BEAS-2B 细胞没有产生毒性; 浓度在 128 ~ 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 60% FTA 与 90% FTA 均表现出对细胞的毒性。抗炎结果表明, 在给药浓度设置为 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 三种提取物均表现出减少 NO 分泌的效果 ($P < 0.01$), 90% FTA 组存在剂量依赖关系; 三种提取物可显著降低 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞胞内活性氧的水平 ($P < 0.05$), 且呈量效关系。另外, FSEE、60% FTA、90% FTA 组间的治疗效果也逐渐增强。由此得出, 90% FTA 为连翘提取物抗炎作用的主要活性部位, 其抗炎活性成分可能为连翘酯苷 A, 这将为连翘抗炎活性的进一步研究提供基础。

关键词: 连翘提取物; 连翘酯苷 A; 呼吸道上皮细胞; 炎症模型; LPS

中图分类号: Q965.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.023

Anti-inflammatory Activity of *Forsythia suspensa* Extract on Human Airway Epithelial Cells Inflammation Model

LIU Jian-zhou, ZHANG Li-wei*

Institute of Molecular Science, Shanxi University, Shanxi Taiyuan 030006, China

Abstract: To investigate the anti-inflammatory activities of *Forsythia suspensa* extract (FSE) with emphasis on excretion of inflammatory cytokines by LPS-induced BEAS-2B inflammation model. BEAS-2B cell viability was detected by MTT method in order to screen out the optimal drug dose of *F. suspensa* ethanol extracts (FSEE), 60% forsythiaside A (60% FTA) extracts and 90% forsythiaside A (90% FTA) extracts; The morphology of BEAS-2B cells treated with FSE were observed by microscope; NO content of cell culture supernatant was determined by Griess Reagent method; Intracellular reactive oxygen species (ROS) was analyzed by flow cytometry. Toxicological experimental results revealed that FSE did not show toxic reaction to BEAS-2B cell at concentration of less than 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$; while both 60% FTA and 90% FTA showed toxicity at the concentration between 128 and 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Anti-inflammatory results showed that all FSE can inhibit the secretion of NO ($P < 0.01$) at concentration 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 90% FTA extracts exhibited a dose-dependent manner; The elevated level of intracellular ROS in LPS-stimulated BEAS-2B cells was significantly diminished by all FSE in a dose-effect manner ($P < 0.05$). In addition, the therapeutic effect of FSEE, 60% FTA and 90% FTA increased gradually. It was concluded that the 90% FTA extracts were the main active fraction of anti-inflammatory effect and forsythiaside A was possibly the active ingredient. The results presented in this study will be helpful for the further study of *F. suspensa* on anti-inflammatory activity.

Key words: *Forsythia suspensa* extract; forsythiaside A; human airway epithelial cells; inflammation model; lipopolysaccharide

收稿日期: 2014-09-18

接受日期: 2014-12-09

基金项目: 科技部科技支撑计划(2011BAI07B06); 山西省科技攻关项目(20140313021-3); 山西省国际合作项目(2014081049-1); 山西省留学回国人员科技活动择优项目(2013)

* 通讯作者 E-mail: lwzhang@sxu.edu.cn

连翘 [*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl.] 始载于《神农本草经》, 是传统常用中药, 味苦, 微寒, 归肺、心、小肠经。连翘具有清热解毒、消肿散结、疏散

风热等功效^[1],临床中广泛用于对呼吸系统炎症、发热等病症的治疗^[2]。

呼吸道上皮是病原体入侵呼吸系统的首要组织防线,在先天免疫系统中具有重要的作用。急性肺损伤是一种以炎症和肺毛细血管通透性增加为特征的临床综合征^[3],此时,呼吸道上皮细胞能够产生细胞因子、趋化因子及抗菌肽等免疫因子参与炎症反应^[4]。革兰氏阴性杆菌产生的脂多糖(LPS)是导致肺损伤的首要原因^[5]。以LPS为诱导剂介导的细胞炎症模型已经有相当多的报道,但大多采用巨噬细胞为载体模型^[6-9]。根据中医用药习惯,连翘针对人上焦肺系统等疾病的治疗有较好的效果,因此,本文以呼吸道上皮细胞为研究对象将更有针对性。由于NO是介导炎症反应的关键因子,在内毒素致机体损伤中起到重要作用^[10],动物模型和人体研究^[11]都表明,过多的活性氧(ROS)产生可导致呼吸道炎症、高反应性、微血管渗透性过高、组织损伤与重塑等,因此,本文以NO、ROS为检测指标,建立人呼吸道上皮细胞(BEAS-2B)炎症细胞模型,筛选连翘提取物抗炎活性部位,寻找可能的抗炎成分,为连翘抗炎活性的进一步研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材

连翘(青翘),2012年8月采于山西省安泽县杜村乡东唐村南山,蒸制后晾干储存,经鉴定为青翘果实。

1.1.2 细胞

BEAS-2B购自通派(上海)生物科技有限公司。该细胞株是由正常人支气管上皮细胞NHBE细胞感染腺病毒12-SV40杂交病毒,连续传代筛选而永生得到。它具有正常人呼吸道上皮细胞的形态和功能,保持上皮细胞的超微结构特征,染色体核型为近二倍体,在传代过程中保持稳定,该细胞株是体外研究支气管上皮细胞功能的理想模型^[12]。

1.1.3 试剂

改良型RPMI-1640培养基(HyClone),胎牛血清(FBS,Gibco公司),胰蛋白酶(0.25%,北京全式金生物技术有限公司),青霉素链霉素混合液(100×,Biotopped公司),脂多糖(LPS,Sigma公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT,Biotopped公司),NO检测试剂盒(碧云天生物技术研究),活性氧(ROS)检测试

剂盒(碧云天生物技术研究),地塞米松(Dex)与吲哚美辛(Indo)均购自中国食品药品检定研究院,二甲基亚砜(DMSO,天津市富宇精细化工有限公司),其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.4 仪器

OHAUS CP114 电子天平(奥豪斯仪器有限公司),TGL-16 冷冻离心机(湖南湘仪),冷冻干燥机(宁波新芝生物科技有限公司),Spectra Max 190 酶标仪(美国Molecular Devices公司),Galaxy 170S CO₂ 培养箱(New Brunswick公司),FACSCalibur 流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 连翘不同提取物(FSE)的制备

1.2.1 连翘乙醇提取物(FSEE)

将青翘粉碎过50目筛,称取10g粉末,按料液比1:10加40%乙醇100mL,90℃水浴加热回流3h,趁热过滤,滤渣再加100mL40%乙醇,再次90℃水浴加热回流1h,趁热过滤,合并两次滤液,于旋转蒸发仪上浓缩至无醇味,冻干,避光密封于干燥器中备用。

1.2.2 60%、90%连翘酯苷A(FTA)

将按1.2.1法制得的连翘提取液湿法装柱,以聚酰胺为柱材料,经中压制备色谱制得含60%FTA的连翘提取物;将该产物进一步分离,以MDS-5为柱材料,经中压制备色谱制得含93.60%FTA的连翘提取物^[13]。

1.3 细胞培养

用含10%FBS的RPMI-1640培养基(含青霉素100U/mL,链霉素100μg/mL)于37℃、5%CO₂培养箱中培养,以0.25%的胰蛋白酶消化细胞传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.4 BEAS-2B细胞炎症模型及实验分组给药

取对数生长期细胞,调整细胞密度为 2×10^5 cells/mL,接种于24孔细胞培养板(500μL/孔),37℃、5%CO₂条件下培养24h。采用预防给药方式,对照组、地塞米松(1μM)、吲哚美辛(1μM)、FSEE(25、50、100μg/mL)、60%FTA(25、50、100μg/mL)、90%FTA(25、50、100μg/mL)作用2h后,给予终浓度为1μg/mL^[14]的LPS(*E. coli*, O55:B5)刺激,培养24h后,胰酶消化,1000rpm离心收集细胞,PBS清洗3次后进行活性氧检测;收集细胞上清液,-20℃储存备用。

1.5 连翘提取物对BEAS-2B细胞活力的影响

取对数生长期细胞,调整细胞密度为 1×10^5

cells/mL, 100 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板, 给药浓度梯度为: 0、2、4、8、16、32、64、128、256 μ g/mL, 同时设空白对照组。MTT 法(5 mg/mL)检测并计算细胞相对增值率(RGR)。

1.6 细胞形态观察

呼吸道上皮细胞(BEAS-2B)在 FSE 作用 24 h 后, 倒置相差显微镜(200 倍)观察细胞形态并拍照。

1.7 细胞培养液上清中 NO 检测

取 1.5 项细胞培养上清, 10000 rpm 冷冻离心 10 min, 按 Griess 试剂盒说明书方法检测上清中 NO 的含量, 检测波长为 540 nm, 每组设 6 个复孔。

1.8 细胞内 ROS 检测

收集 1.5 项细胞, 按说明书装载探针, 取一对照孔另设 Rosup 组作为产生活性氧的阳性对照, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm, 流式细胞仪进行检测。

1.9 统计学处理

采用 Origin 8.0 和 Excel 2007 对数据进行处

理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 多组间采用单向方差分析(one-way ANOVA)进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 不同 FSE 对 BEAS-2B 细胞的毒性作用

经前期研究发现, 在 FSE 浓度小于 100 μ g/mL 情况下, 随着时间的延长, 其对 BEAS-2B 细胞的毒性并不明显。因此, 本实验选择 24 h 作为检测 FSE 对 BEAS-2B 细胞毒性作用的监测点。从表 1、2、3 可以看出, 给药浓度在低于 128 μ g/mL 时, FSEE、90% FTA、60% FTA 对 BEAS-2B 细胞的毒性作用较小; 给药浓度在 128 ~ 256 μ g/mL 时, 90% FTA 与 60% FTA 表现出对 BEAS-2B 细胞的毒性作用。倒置显微镜下拍照, 60% FTA 组细胞形态如图 1 所示。在浓度达到 256 μ g/mL 时, 细胞数量明显减少, 触角消失, 细胞缩小呈模糊的泡状。

表 1 90% FTA 对 BEAS-2B 细胞活力的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of 90% FTA on viability of BEAS-2B cells ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

90% FTA 浓度(μ g/mL) 90% FTA concentration	吸光度值 Absorbance value	相对增值 RGR (%)	细胞毒性分级 Cell Toxicity Grading	抑制率 IR (%)
0	0.677 \pm 0.067	-	-	-
2	0.599 \pm 0.054	88.5	1	11.5
4	0.616 \pm 0.102	91.0	1	9.0
8	0.639 \pm 0.062	94.4	1	5.6
16	0.627 \pm 0.072	92.6	1	7.4
32	0.700 \pm 0.091	99.0	1	1.0
64	0.713 \pm 0.065	105.5	0	0
128	0.763 \pm 0.070	112.8	0	0
256	0.140 \pm 0.185 #	20.6	4	79.4

注: 与 Control 组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Control group, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$.

表 2 60% FTA 对 BEAS-2B 细胞的作用 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of 60% FTA on viability of BEAS-2B cells ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

60% FTA 浓度(μ g/mL) 60% FTA concentration	吸光度值 Absorbance value	相对增值 RGR (%)	细胞毒性分级 Cell Toxicity Grading	抑制率 IR (%)
0	0.701 \pm 0.009	-	-	-
2	0.637 \pm 0.038	90.9	1	9.1
4	0.606 \pm 0.043 #	86.5	1	13.5
8	0.615 \pm 0.048 #	87.8	1	12.2
16	0.682 \pm 0.072	97.3	1	2.7
32	0.698 \pm 0.039	99.7	0	0.3

64	0.719 ± 0.031	102.6	0	0
128	0.790 ± 0.026 #	112.8	0	0
256	0.422 ± 0.093 #	60.3	2	39.7

注:与 Control 组比较, * P < 0.05, # P < 0.01。

Note: Compared with Control group, * P < 0.05, # P < 0.01.

表3 FSEE 对 BEAS-2B 细胞的作用 (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of FSEE on viability of BEAS-2B cells (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

FSEE 浓度 (μg/mL) FSEE Concentration	吸光度值 Absorbance value	相对增值 RGR (%)	细胞毒性分级 Cell Toxicity Grading	抑制率 IR (%)
0	0.619 ± 0.047	-	-	-
2	0.534 ± 0.060 *	89.8	1	10.2
4	0.551 ± 0.051	92.7	1	7.3
8	0.562 ± 0.038	94.7	1	5.3
16	0.590 ± 0.032	99.3	0	0.7
32	0.610 ± 0.040	102.7	0	0
64	0.761 ± 0.026 #	128.2	0	0
128	0.849 ± 0.007 #	142.9	0	0

注:与 Control 组比较, * P < 0.05, # P < 0.01。

Note: Compared with Control group, * P < 0.05, # P < 0.01.

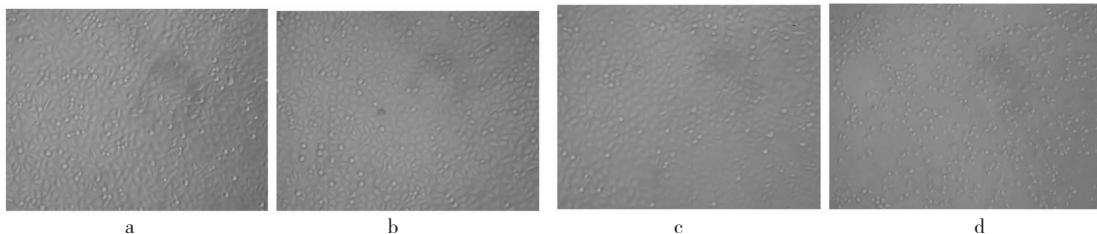


图1 60% FTA 对 BEAS-2B 细胞作用的形态观察结果 (10 × 20)

Fig. 1 Morphological observations of BEAS-2B cells treated with 60% FTA

注:a. 对照组;b. 60% FTA, 2 μg/mL;c. 60% FTA, 128 μg/mL;d. 60% FTA, 256 μg/mL

Note: a. Control; b. 60% FTA, 2 μg/mL; c. 60% FTA, 128 μg/mL; d. 60% FTA, 256 μg/mL.

2.2 吡哌美辛、地塞米松对 BEAS-2B 细胞的毒性影响

给药浓度在 62.5 ~ 2000 nM 之间,吡哌美辛与地塞米松均未表现出对 BEAS-2B 细胞的毒性,后续试验采用的阳性对照组的给药浓度为 1000 nM。

2.3 BEAS-2B 细胞培养上清液 NO 含量检测

如图 2 所示,1 μg/mL LPS 刺激 BEAS-2B 细胞 24 h 后,模型组 NO 释放量显著增加 (P < 0.01);阳性对照组(吡哌美辛、地塞米松) NO 释放量均明显减少 (P < 0.01);FSE 给药组也表现出较强的降低 NO 释放的效果,90% FTA 组且存在剂量依赖关系,浓度越高,降低 NO 释放效果愈加明显。

2.4 BEAS-2B 细胞胞内 ROS 含量检测

如图 3 所示,1 μg/mL LPS 刺激 BEAS-2B 细胞

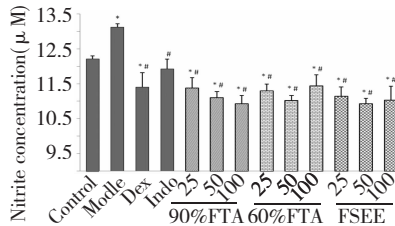


图2 FSE 对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞产生 NO 的影响
Fig. 2 Effect of FSE on NO production from LPS-induced BEAS-2B cells

注:与对照组比较, * P < 0.01;与模型组比较, # P < 0.01, n = 6

Note: compared with control group, * P < 0.01; compared with model group, # P < 0.01, n = 6

24 h 后,模型组与 Rosup 组 ROS 释放量显著增加 (vs. Control, P < 0.01);阳性对照组(吡哌美辛) ROS

释放量明显减少 (vs. Model, $P < 0.01$); FSE 给药组均表现出较强的降低 ROS 含量的作用, 90% FTA、60% FTA、FSEE 组随着浓度的增加, 降低细胞内

ROS 含量的效果越明显, 有剂量依赖关系。90% FTA 组的降低 ROS 含量的效果明显好于另外两组, 在中、高剂量时, 效果与阳性药相近。

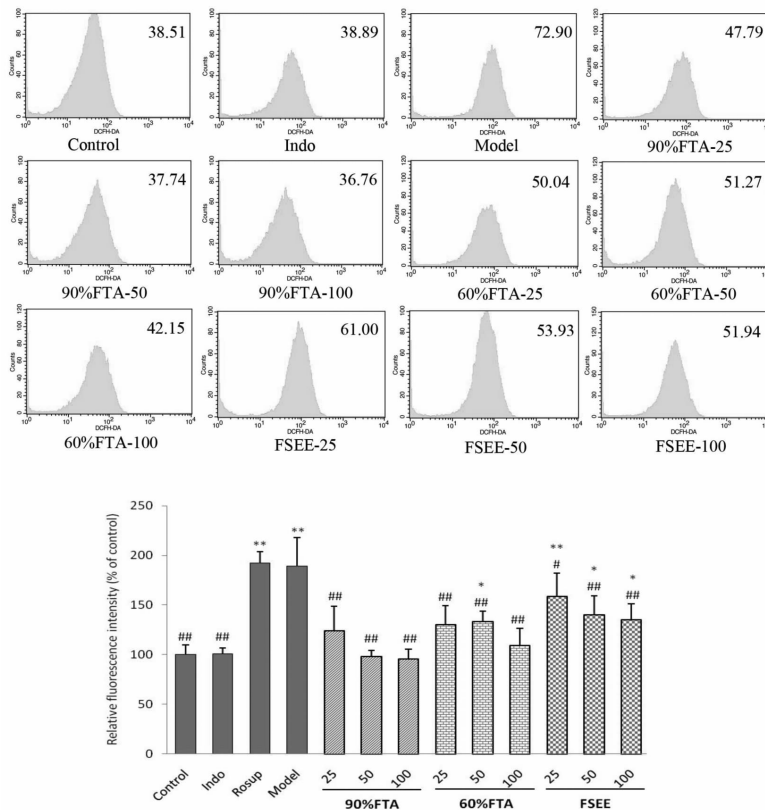


图3 FSE对LPS诱导的BEAS-2B细胞产生ROS的影响

Fig. 3 Effect of FSE on ROS production from LPS-induced BEAS-2B cells

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, $n = 3$

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$; compared with model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, $n = 3$

3 讨论

连翘有抗菌、抗炎、强心、利尿、镇吐等药理作用,是双黄连口服液、双黄连粉针剂、清热解毒口服液等中药制剂的主要原料。研究发现^[15]50%的连翘醇提取物水溶液 20 mL/kg 腹腔注射,对大鼠巴豆油性肉芽囊有非常明显的抗渗出作用及降低炎灶微血管壁脆性作用;复方连翘注射液具有明显的抗炎作用,能降低大鼠和小鼠毛细血管通透性,减少炎性渗出,对蛋清所致足爪水肿有抑制作用,并能增强小鼠炎性渗出细胞的吞噬能力,从而增强机体的防御机能。

连翘挥发油软胶囊治疗急性上呼吸道感染具有显著疗效^[16],而利用体外培养的细胞进行药物性能的研究是目前各实验室常用的研究方法之一,因此

本实验采用人呼吸道上皮细胞为研究对象,对连翘用于治疗上焦系统的疾病的原因进行探讨。本实验采用 MTT 方法首先对不同的连翘提取物进行细胞毒性的研究,高浓度的提取物可致使 BEAS-2B 细胞产生细胞病变,触角逐渐消失,细胞变圆并缩小,细胞呈现模糊的泡状;低浓度的 FSE 反而对该细胞具有一定的“营养维持”作用,低浓度给药组较正常对照组细胞形态整齐均一,MTT 方法测得 60% FTA (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、FSEE (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 吸光度值显著大于正常对照组 ($P < 0.01$)。也可能是因为当提取物的浓度达到一定程度后,对 BEAS-2B 细胞是一种生理刺激,应激反应促使细胞增值以应对这种变化。实验还发现,连翘酯苷浓度越大,其对细胞的毒性越大。为避免因药物的浓度太大对实验结果的影响,因此本实验的给药剂量分别设置为 25、50、100 $\mu\text{g}/$

mL。

据实验研究^[17],连翘具有拮抗内毒素的作用并可显著抑制细菌内毒素诱发的炎症因子的过度表达。参与免疫反应,神经递质传递,血管扩张的 NO 在各组织中的生理浓度是决定其关键地位的最主要因素^[18]。高浓度的 NO 被认为是炎症反应和内毒素血症的细胞毒性因子,研究细胞内 NO 的水平对研究炎症反应具有重要的意义。宋宏等^[19]通过对 BEAS-2B 细胞在臭氧气液界面暴露后的损伤研究发现,通过给予 N-乙酰半胱氨酸药物保护后,NO 释放量显著减少($P < 0.05$)。本实验采用 LPS 诱导 BEAS-2B 细胞产生炎症,通过对 NO 的含量的检测来寻找连翘提取物可能的抗炎有效部位。

通过我们之前的研究^[20]发现,不同连翘提取物对角又菜胶致大鼠足趾肿胀炎症模型有较好的治疗效果,以 90% FTA 效果最佳。与模型组比较,90% FTA 提取物中、高剂量组能极显著降低血清中 TNF- α 与 IL-2 的水平和提高血清中 SOD 的水平。BEAS-2B 细胞炎症实验结果显示,连翘提取物(FSE)具有较好的降低 NO 与细胞内 ROS 含量的作用,且这种效果存在显著性差异。90% FTA 的提取物减少 NO 分泌的效果存在剂量依赖关系,三种提取物都能在一定程度上降低 BEAS-2B 细胞内 ROS 含量的作用,以 90% FTA 的效果最佳,且给药浓度越高,作用效果越好,呈量效关系。据此两方面的原因,我们推测连翘有效的抗炎活性成分可能为连翘酯苷 A。当然也不排除 FSE 中的某种成分针对其它的炎症模型也具有很好的抗炎活性,关于连翘中抗炎成分还有待进一步的研究,这将对中药合理用药,充分发挥药材的治疗效果具有重大的意义。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 159-160.
- 2 Li HB, Chen F. Preparative isolation and purification of phyllirin from the medicinal plant *Forsythia suspense* by high speed counter current chromatography. *J Chromatogr A*, 2005, 1083:102-105.
- 3 Chopra M, Reuben JS, Sharma AC. Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms. *Exp Biol Med (May-wood)*, 2009, 234:361-371.
- 4 Schutte BC, Mccray PB. [beta]-defensins in lung host de-

- fense. *Annu Rev Physiol*, 2002, 64:709-748.
- 5 Tsai KS, Grayson MH. Pulmonary defense mechanisms against pneumonia and sepsis. *Curr Opin Pulm Med*, 2008, 14:260-265.
- 6 Gao Y, Fang L, Qi Y, et al. Shuang-Huang-Lian exerts anti-inflammatory and anti-oxidative activities in lipopolysaccharide-stimulated murine alveolar macrophages. *Phytomedicine*, 2014, 21:461-469.
- 7 Wen CL, Chang CC, Kuo CL, et al. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Antrodia cinnamomea* mycelia both *in vitro* and *in vivo*. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137:575-584.
- 8 Guan JY, Shen H, Cui DF, et al. Effects of forsythoside on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. *African J Pharm Pharmacol*, 2013, 1847-1853.
- 9 Lee JH, Hwang KH, Kim GH. Inhibition of wild herb *Rhaponticum uniflorum* on synthesis of inflammatory mediators in macrophage cells. *Food Sci Biotechnol*, 2013, 22:567-572.
- 10 Yang F, Contois AS, Fang L. Nitric oxide derived nitrate anion contributes to endotoxic shock and multiple organ injury. *Crit Care B, Actin Med*, 2002, 30:650.
- 11 Sugiura H, Ichinose M. Oxidative and nitrative stress in bronchial asthma. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10:785-797.
- 12 Singer SS, Hagedorn JE, Smith DM, et al. The enzymatic basis for the rat liver 6-hydroxymelatonin sulfotransferase activity. *Pineal Res*, 1995, 18:49-55.
- 13 He WL(何文珑), Jia JP(贾金萍), Zhang LW(张立伟). Optimization of polyamide medium voltage preparation technology for forsythiaside. *Food Eng (食品工程)*, 2014, 2:20-22.
- 14 Schulz C, Farkas L, Pfeifer M, et al. Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549). *Scand J Immunol*, 2002, 56:294-302.
- 15 Pharmacology group of combine traditional Chinese and western medicine institute (湖北省中西医结合研究所药理组). Compound forsythia injection pharmacological action research. *XinYiYaoTongXun (新医药通讯)*, 1975, 1:66.
- 16 Xiao HM(肖会敏), Guo QQ(郭倩倩), Wang SW(王四旺), et al. Clinical observation on forsythia volatile oil soft capsule treatment of upper respiratory tract infection. *J Tradit Chin Med (中医药临床杂志)*, 2011, 23:595-596.
- 17 Fu Q(傅强), Cui HL(崔华雷), Cui NJ(崔乃杰). Experimental study on inhibitory effect of forsythia extract on inflammatory response induced by endotoxin. *Tianjin Med J (天津医药)*, 2003, 31:161-163.