

# 小白蒿总黄酮对大鼠腹腔白细胞内白三烯 B<sub>4</sub>、5-羟二十碳四烯酸、游离钙和环一磷酸腺苷水平的影响

花 拉, 王青虎\*, 代那音台, 那仁朝克图, 吴荣君, 吴杰斯

内蒙古民族大学蒙医药学院, 通辽 028000

**摘要:** 本文以大鼠腹腔白细胞为材料, 采用高效液相色谱法 (HPLC)、放免分析法 (RIA) 和荧光分光光度法分别测定大鼠腹腔白细胞内白三烯 B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)、5-羟二十碳四烯酸 (5-HETE)、环一磷酸腺苷 (cAMP) 及游离钙水平。结果表明, 在 2.0 ~ 10.0 μg/mL 浓度范围内, 小白蒿总黄酮可剂量依赖性地抑制完整中性粒细胞中 LTB<sub>4</sub> 的生物合成。另外, 小白蒿总黄酮对人工三肽 (fMLP) 激发的白细胞内游离钙升高具有抑制作用, 并促进细胞内 cAMP 水平提高。小白蒿总黄酮显著影响白细胞的多种功能, 这可能与抗炎作用机理有关。

**关键词:** 小白蒿; 总黄酮; 白三烯 B<sub>4</sub>; 游离钙; 环一磷酸腺苷

中图分类号: R914

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.022

## Effect of *Artemisia frigida* Total Flavonoids on the Levels of LTB<sub>4</sub>, 5-HETE, Ca<sup>2+</sup> and Cyclic AMP in Rat Peritoneal Leukocytes

HUA La, WANG Qing-hu\*, DAI Na-yin-tai, NA Ren-chao-ke-tu, WU Rong-jun, WU Jie-si

College of Traditional Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China

**Abstract:** In this study, rat neutrophils from pleural fluid was used as experimental material to determine the levels of LTB<sub>4</sub>, 5-HETE, Ca<sup>2+</sup> and cAMP with HPLC, RIA and Fura-2/AM, respectively. As a results, *Artemisia frigida* total flavonoids inhibited the formation of LTB<sub>4</sub> from the intact neutrophils with its concentration increasing from 2.0 to 10.0 mg/L, and inhibited the Ca<sup>2+</sup> stimulated by fMLP and promoted the improvement of cAMP in the cells. The effects of *A. frigida* total flavonoids on leukocyte function may be the mechanisms of its anti-inflammatory action.

**Key words:** *Artemisia frigida*; total flavonoid; LTB<sub>4</sub>; Ca<sup>2+</sup>; cAMP

小白蒿系菊科蒿属植物冷蒿 *Artemisia frigida* Willd. 的地上部分, 是历代和民间常用的燥“希日乌苏”特色蒙药<sup>[1]</sup>。《四部医典》中“小白蒿能调理血液, 兼燥“沙日乌苏”而治疗关节肿胀”。“希日乌苏”(蒙医体质分类类型)<sup>[2]</sup>, 汉译为黄水, 它存在于全身各处, 尤其在肌肤及关节较多。希日乌苏出现偏盛偏衰和功能紊乱等反常状态而导致病变称之为“希日乌苏”病。现代蒙医临床证明小白蒿为主剂的五味甘露汤对“希日乌苏”病人治疗关节肿胀和疼痛有明显效果, 尤其对热性“希日乌苏”病人疗效可达到 90% 以上<sup>[3-5]</sup>。

本课题组对小白蒿化学成分前期研究结果<sup>[6-10]</sup>可知, 小白蒿主要化学成分为黄酮类化合物, 相对含量约为 10%, 其中主要包括羟基化多甲氧基黄酮。

近期研究<sup>[11-13]</sup>表明, 羟基化多甲氧基黄酮比其全甲氧基化黄酮具有更强的生物活性, 如抗炎活性和抗癌。因此, 本课题组近期以小白蒿总黄酮为指标, 选择“二甲苯致炎小鼠耳片肿胀及角叉菜胶诱发大鼠足跖肿胀模型”、“棉球肉芽肿模型”和“免疫性炎症模型”进行了实验研究。实验结果表明小白蒿总黄酮对不同炎症模型表现出明显的抗炎作用及剂量依赖性关系。为进一步解释小白蒿总黄酮抗炎作用机制及明确其燥“希日乌苏”功效的关键位点, 本实验在小白蒿总黄酮对炎症发生抑制的有效剂量下, 对大鼠腹腔白细胞内白三烯 B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)、5-羟二十碳四烯酸 (5-HETE)、环一磷酸腺苷 (cAMP) 及游离钙水平影响进行了研究。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

UV-2501 型紫外-可见分光光度计 (岛津), SHZ-

D 循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂), AUW220D 型电子天平(日本岛津);HH-S26S 型水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂);RE52-2 型旋转蒸发器(上海沪西分析仪器厂);日本岛津液相色谱仪(日本岛津公司),配 LC-20Ap 输液泵、SPD-M20A 检测器、CTO-20A 柱温箱和 CBM-20A 工作站。960 CRT 型荧光分光光度计(上海精密科技仪器有限公司)。

## 1.2 试药

小白蒿采集于内蒙古通辽市,由内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药生药学教研室主任布和巴特尔教授鉴定为菊科蒿属植物冷蒿 *Artemisia frigida* Willd. 的地上部分。小白蒿 *Artemisia frigida* Willd. 标本(No. 20140729)保存于内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药化学教研室。芦丁(批号:20086569,中国药品生物制品检定所),硝酸铝,亚硝酸钠,氢氧化钠和乙醇等均为分析纯。LTB<sub>4</sub>、5-HETE、花生四烯酸(AA)、钙离子载体(A<sub>23187</sub>)、前列腺素 B<sub>2</sub>(PGB<sub>2</sub>)、人工三肽(fMLP)均为 Sigma 产品;Fura-2/AM 购于艾美捷科技有限公司;cAMP 放免测定盒购自上海瑞齐生物科技有限公司。

## 1.3 动物

Wistar 大鼠,雄性,体重 200 ~ 300 g,由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供,动物许可证号:SCXK(吉林)-2011-0004。实验时的饲养环境条件为温度 22 ± 2 °C,湿度 50 ± 10%。

# 2 实验方法

## 2.1 小白蒿总黄酮的提取

白蒿粉末 2.0 kg,用 75% 乙醇 50 L 回流提取两次,每次 3 h,滤过,合并滤液。合并液减压浓缩至干,得到其提取物 860 g。提取物加水 500 mL,搅拌成混悬液。将处理好的 D<sub>101</sub> 树脂 500 g,装柱,吸取混悬液,上柱,以 3 mL/min 的流速进行吸附,先用水 5 L 洗脱,然后用 20% 乙醇溶液 5 L 洗脱后再用 85% 乙醇溶液 10 L 洗脱。85% 乙醇洗脱液减压回收至干,即得小白蒿总黄酮(580.0 g)。

## 2.2 总黄酮含量测定

称取小白蒿总黄酮 1.00 g,精密称定,置于 500 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇溶解并至刻度,摇匀,即得供试液。精密吸取供试液 1.00 mL,置于 50 mL 容量瓶中,按课题组文献<sup>[14]</sup>中所建立的方法,在 510 nm 波长处测定其吸光度,计算其百分含量。结果表明小白蒿总黄酮百分含量为 68.01% (n = 5)。

## 2.3 大鼠白细胞悬液的制备<sup>[15]</sup>

Wistar 大鼠乙醚麻醉后,腹腔注射生理盐水(NS)10 mL/只,将大鼠断头放血处死,小心剪开腹腔,吸出腹腔洗液,12000 rpm 离心 10 min,取沉淀细胞加入少量低渗盐水(0.2%)溶解红细胞后再调回等渗,再于 12000 rpm 离心 10 min。取出沉淀细胞悬浮于无钙镁的 Dulbecco's PBS 缓冲液,在光学显微镜下进行白细胞计数,并配成 1.0 × 10<sup>7</sup>/mL 的白细胞悬液。

## 2.4 小白蒿总黄酮对大鼠白细胞内 LTB<sub>4</sub> 产物的影响<sup>[16]</sup>

取白细胞悬液 1.00 mL,分别加入 DMSO 溶解的小白蒿总黄酮或空白溶剂(DMSO,小于 0.5%),每一药物浓度为一组,每组设 5 个复管。置于 37 °C 恒温振荡水浴中温孵 10 min,然后加入花生四烯酸(100 μmol/L,终浓度),A23187(100 μmol/L,终浓度),混匀。继续温孵 20 min 后,立即转移到有 5 mL 乙酸乙酯的离心管中终止反应(乙酸乙酯中含 20 μL 冰醋酸,内标 PGB<sub>2</sub> 50 ng),悬涡振荡 2 min,转移上层乙酸乙酯 4.5 mL,氮气吹干,用 50 μL 甲醇溶解残渣,12000 rpm 离心 10 min,取上清进样,用反相高效液相色谱测定产物的含量。色谱条件:日本岛津 Inertsil ODS-SP(250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相 A:甲醇-水-乙酸(30:70:0.05,pH 3.0),流动相 B:乙腈-甲醇-水-乙酸(60:20:20:0.05,pH 3.0),梯度洗脱,0 ~ 15 min,65% ~ 100% B;检测波长:275 nm;流速:1.0 mL/min。用其峰高与内标 PGB<sub>2</sub> 之比表示相对含量。

## 2.5 小白蒿总黄酮对破碎细胞中 5-脂氧合酶活性的影响<sup>[17,18]</sup>

中性白细胞用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(含 0.95% 丙二醇,0.1% 明胶,pH 7.4)配成细胞悬液(2 × 10<sup>7</sup> 个/mL)。置冰浴中超声破碎后,4 °C 10000 rpm 离心 20 min,取上清作为酶粗液。取含酶液 0.5 mL,分别加入 DMSO 溶解的小白蒿总黄酮或空白溶剂,每一药物浓度为一组,每组设 5 个复管。再加入 100 mmol/L ATP 10 μL,在 37 °C 水浴中温孵 15 min 后加入 400 μmol/L CaCl<sub>2</sub> 2.5 μL,立即加 20 mmol/L AA 2 μL 继续温孵 15 min,然后转移到有 5 mL 乙酸乙酯的 4.5 mL,氮气吹干,用 30 μL 甲醇溶解残渣,12000 rpm 离心 10 min,取上清进样,RP-HPLC 测定产物的含量。色谱条件:日本岛津 Inertsil ODS-SP(250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相 A:甲醇-水-

乙酸(30:70:0.05, pH 3.0), 流动相 B: 乙腈-甲醇-水-乙酸(60:20:20:0.05, pH 3.0), 梯度洗脱, 0~15 min, 65%~100%, 检测波长: 235 nm; 流速: 1.0 mL/min。用其峰高与内标 PGB<sub>2</sub> 之比表示相对含量。

## 2.6 小白蒿总黄酮对多形核白细胞(PMNL)内游离钙的影响

按文献<sup>[13]</sup>的方法制备 PMNL 细胞悬液。取 PMNL 悬液适量, 加入 Fura-2/AM (3 μmol/L, 终浓度), 37 °C 水浴温孵 30 min, 12000 rpm 离心 10 min, 用 HBSS 缓冲液 5 mL 洗去残存于细胞外的 Fura-2/AM, 共洗两次, 再将洗好的白细胞重新悬浮于 HBSS 缓冲液中, 并稀释细胞数至  $5.0 \times 10^6/L$ 。取上述 Fura-2/AM 负载的 PMNL 悬液 2.0 mL, 分别加入 DMSO 溶解的小白蒿总黄酮或空白溶剂(DMSO, 小于 0.5%), 每一药物浓度为 1 组, 每组设 5 个复管。置于 37 °C 恒温振荡水浴中温孵 10 min, 在激发波长 340 nm 和发射波长 500 nm 下, 首先测定静息状态时的荧光强度(即静息时 PMNL 内游离钙浓度), 然后加入刺激剂 fMLP ( $10^{-6}$  mol/L) 测定荧光强度, 1 min 后加 10% Triton X-100 20 μL, 再 1 min 后加 300 mmol/L EGTA 25 mL 使钙离子完全络合。先后测定最大及最小荧光值, 用计算机程序处理实验数据, 分别计算出静息状态时及加刺激物后细胞内钙离子浓度。

## 2.7 小白蒿总黄酮对 PMNL 内 cAMP 的影响<sup>[19]</sup>

PMNL 悬液的制备同上, 除去掺杂红细胞的 PMNL 悬浮于 PBS 中, 分别加入 DMSO 溶解的小白蒿总黄酮或空白溶剂(DMSO, 小于 0.5%), 每一药

物浓度为 1 组, 每组设 5 个复管。置于 37 °C 恒温振荡水浴中温孵 10 min, 用煮沸法破碎 PMNL, 然后用放免法测定 cAMP 水平。

## 2.8 数据统计分析

所有实验结果的数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 软件进行显著性分析, 组间差异采用 t 检验, 以  $P < 0.05$  作为显著性标准。

## 3 实验结果

### 3.1 生物样品中 LTB<sub>4</sub> 和 5-HETE 的鉴定

先测定 LTB<sub>4</sub>、PGB<sub>2</sub> 和 5-HETE 标准品在 RP-HPLC 中的保留时间, 然后对白细胞生物样品进行 RP-HPLC 分析, 结果见图 1。从图 1 可知, LTB<sub>4</sub>、5-HETE 和内标 PGB<sub>2</sub> 的保留时间分别为 6.8、7.7 和 10.7 min。

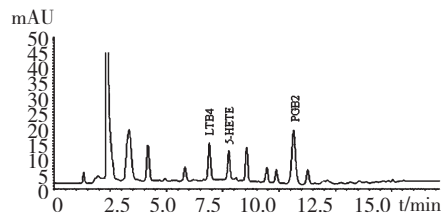


图 1 生物样品色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of biological sample

### 3.2 小白蒿总黄酮对大鼠白细胞内 LTB<sub>4</sub> 产物的影响

小白蒿总黄酮在 2.0~10.0 μg/mL 的浓度范围内, 可以剂量依赖性地抑制 LTB<sub>4</sub> 代谢产物的生物合成(见表 1)。以槲皮素作阳性对照, 0.755 μg/mL 和 1.51 μg/mL 的槲皮素对 LTB<sub>4</sub> 的抑制率分别为 54.1% 和 88.2%。

表 1 小白蒿总黄酮对 LTB<sub>4</sub> 产物的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 1 Effect of *A. frigida* total flavonoid on LTB<sub>4</sub> formation ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组 Group	剂量 Dose (μg/mL)	白三烯 B <sub>4</sub> LTB <sub>4</sub>	抑制率 Inhibition rate (%)
空白对照 Control	-	2.81 ± 0.12	-
小白蒿总黄酮 <i>A. frigida</i> total flavonoids	2.0	2.24 ± 0.08 ***	20.3 ± 2.3
	5.0	1.75 ± 0.06 ***	37.7 ± 3.1
	7.5	1.17 ± 0.02 ***	58.4 ± 2.9
	10.0	0.58 ± 0.04 ***	79.4 ± 3.6
槲皮素 Quercetin	0.755	1.29 ± 0.07 ***	54.1 ± 4.2
	1.51	0.38 ± 0.06 ***	86.5 ± 3.4

注:与空白对照组比较, \*\*\*  $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control, \*\*\*  $P < 0.001$ .

### 3.3 小白蒿总黄酮对破碎细胞中 5-脂氧合酶活性的影响

小白蒿总黄酮在 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度下可以抑制 5-LO 的活性,抑制 5-HETE 的生物合成,在 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度下可以分别使 5-HETE 的

合成下降 39.5% 和 52.1% (表 2),进一步加大小白蒿总黄酮浓度到 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,则检测不到 5-HETE。以槲皮素作阳性对照,0.755  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1.51  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的槲皮素对 5-HETE 的抑制率分别为 17.3% 和 42.3%。

表 2 小白蒿总黄酮对 5-HETE 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of *A. frigida* total flavonoids on 5-HETE ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组 Group	剂量 Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5-羟二十碳四烯酸 5-HETE	抑制率 Inhibition rate (%)
空白对照 Control	-	1.19 $\pm$ 0.11	-
小白蒿总黄酮 <i>A. frigida</i> total flavonoids	2.0	1.07 $\pm$ 0.09	10.1 $\pm$ 2.7
	5.0	0.96 $\pm$ 0.08 *	19.3 $\pm$ 1.8
	7.5	0.72 $\pm$ 0.11 * *	39.5 $\pm$ 2.3
	10.0	0.57 $\pm$ 0.06 * * *	52.1 $\pm$ 3.0
槲皮素 Quercetin	0.755	0.98 $\pm$ 0.07 *	17.3 $\pm$ 3.4
	1.51	0.68 $\pm$ 0.10 * *	42.5 $\pm$ 3.1

注:与空白对照组比较,\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

### 3.4 小白蒿总黄酮对多形核白细胞 (PMNL) 内游离钙的影响

在本实验条件下,小白蒿总黄酮 (5.0 ~ 50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对静息状态下的 PMNL 内胞浆游离钙水平

无明显影响,但在 15.0 ~ 50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内小白蒿总黄酮能显著抑制 fMLP 刺激所致的细胞内游离钙水平增高,结果见表 3。

表 3 小白蒿总黄酮对游离钙的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of *A. frigida* total flavonoids on  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组 Group	剂量 Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\text{Ca}^{2+}$ (nmol/L)	
		加 fMLP 前 Before adding fMLP	加 fMLP 后 After adding fMLP
空白对照 Control	-	203 $\pm$ 41	463 $\pm$ 76
小白蒿总黄酮 <i>A. frigida</i> total flavonoids	5	199 $\pm$ 52	416 $\pm$ 56
	15	201 $\pm$ 39	359 $\pm$ 35 *
	30	195 $\pm$ 45	305 $\pm$ 40 * *
	50	198 $\pm$ 55	256 $\pm$ 36 * *
	槲皮素 Quercetin	2	194 $\pm$ 51

注:与空白对照组比较,\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

### 3.5 小白蒿总黄酮对 PMNL 内 cAMP 的影响

从表 4 可知,小白蒿总黄酮 (30.0 ~ 50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 可使大鼠 PMNL 内 cAMP 水平显著升高。

进一步转化为 5-HETE,或在同一酶作用下进一步氧化为 LTA<sub>4</sub>,LTA<sub>4</sub> 不稳定,很快被 LTA<sub>4</sub>-H 水解为 LTB<sub>4</sub>。AA 的代谢产物 LTB<sub>4</sub>、5-HETE 在炎症疾病等多种疾病中起重要的作用。

## 4 讨论与结论

细胞膜磷脂被磷脂酶 A<sub>2</sub> 水解后释放花生四烯酸 (AA),AA 结合到 5-脂氧合酶激活蛋白 (FLAP),并被其递呈给已转移到核膜的 5-LO,被 5-LO 氧化为 5-氢过氧化二十碳四烯酸 (5-HPETE),5-HPETE

本实验在小白蒿总黄酮对炎症发生抑制的有效剂量下,对大鼠腹腔白细胞内 LTB<sub>4</sub>、5-HETE、cAMP 及游离钙水平影响进行了研究。实验结果表明,小白蒿总黄酮对白细胞 LTB<sub>4</sub> 的生物合成较强的抑制作用,提示小白蒿总黄酮对 5-脂氧酶 (5-LO) 有抑制

表 4 小白蒿总黄酮对 PMNL 内 cAMP 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 4 Effect of *A. frigida* total flavonoids on cAMP( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组 Group	剂量 Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	cAMP (pmol/ $10^6$ cell)
空白对照 Control	-	0.964 $\pm$ 0.215
小白蒿总黄酮 <i>A. frigida</i> total flavonoids	5	1.132 $\pm$ 0.302
	15	1.562 $\pm$ 0.534
	30	1.824 $\pm$ 0.651 *
	50	2.310 $\pm$ 0.754 *
	槲皮素 Quercetin	2

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ .

作用<sup>[8]</sup>。从表 2 可知,小白蒿总黄酮在 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度下抑制 5-HETE 的生物合成,进一步加大小白蒿总黄酮浓度到 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,则检测不到 5-HETE。可见小白蒿总黄酮可以抑制 5-LO 的酶活性。

文献<sup>[9,10]</sup>报道脂氧酶抑制剂可调节钙库的释放,刺激内源性脂氧酶产物生成,能增强细胞钙内流,提高细胞内钙水平。实验研究结果证实小白蒿总黄酮可显著的抑制 fMLP 刺激引起的细胞内游离钙增加。5-LO 正常存在于细胞浆,在细胞活化时借助于  $\text{Ca}^{2+}$  转移至细胞膜上而活化,提示 5-LO 的活性和细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平有紧密关联。此外,本研究还发现小白蒿总黄酮还可使 PMNL 细胞内 cAMP 水平显著升高,而 cAMP 升高可抑制腹腔巨噬细胞 AA 代谢的更新。综上所述,小白蒿总黄酮可在多个环节影响白细胞的功能,这可能与其抗炎作用机理密切相关。

#### 参考文献

- 1 Wang QH (王青虎), Wu RSBD (乌仁苏布德), Bu HBTE (布和巴特尔), *et al.* Review on changes with history and modern research for *Artemisia frigida* Willd. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2010, 27: 897-900.
- 2 Bai QY (白清云). Chinese Med Encyclopaedia-Mongolian Med (中国医学百科全书). Chifeng: Inner Mongolia Science & Technology Press, 1986. 322-324.
- 3 Wu L (乌兰), Te MQL (特木其乐), Yu L (玉兰), *et al.* Analysis of curative effect of Mongolian medicine in treating knee osteoarthritis. *Inner Mon Med J* (内蒙古医学杂志), 2011, 43: 654-655.
- 4 Te MQL (特木其乐), Dai XM (戴雪梅), Sa QL (萨茄拉), *et al.* Effect of Mongolian medicine in treating 132 cases of osteoarthritis. *Chin J Nat Med* (中国民族医药杂志), 2011, 4: 10-11.

- 5 Su RZB (苏荣扎布). Mongolian Medicine Clinic (蒙医临床学). Huhehaote: Inner Mongolia People's Publishing House, 1999. 7-8.
- 6 Wang QH (王青虎), Wang JH, Eerdengbagenna, *et al.* Chemical constituents of *Artemisia frigida*. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2009, 40: 1540-1543.
- 7 Wang QH (王青虎), Wu XL (武晓兰), Wang JH (王金辉). Chemical constituents of *Artemisia frigida* (II). *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2011, 42: 1540-1543.
- 8 Wang QH, Ao WLJ, Wang XL, *et al.* Two new flavonoid glycosides glycosides from *Artemisia frigida* Willd. *J Asia Nat Prod Res*, 2010, 12: 950-954.
- 9 Wang QH, Ao WLJ, Dai NYT. The structural elucidation and HPLC analysis of six flavone glycosides from *Artemisia frigida* Willd. *Chem Res Chin Univ*, 2013, 29: 439-444.
- 10 Wang QH, Wu JS, Wu XL, *et al.* Anti-inflammatory effects and structure elucidation of flavonoid and biflavonoid glycosides from *Artemisia frigida* Willd. *Mon Chem*, 2015, 146: 383-387.
- 11 Li S, Sang S, Pan S, *et al.* Anti-inflammatory property of the urinary metabolites of nobiletin in mouse. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 5177-5181.
- 12 Pan MH, Lai YS, Lai YJ, *et al.* 5-hydroxy-3, 6, 7, 8, 3', 4'-hexamethoxy flavone induces apoptosis through reactive oxygen species production, growth arrest and DNA damage-inducible gene 153 expression, and caspase activation in human leukemia cells. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 5081-5091.
- 13 Lai CS, Li S, Chai CY, *et al.* Inhibitory effect of citrus 5-hydroxy-3, 6, 7, 8, 3', 4'-hexamethoxy flavone on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced skin inflammation and tumor promotion in mice. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 1581-1588.