

走马胎醇提物对佐剂关节炎模型大鼠血清 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 的影响研究

戴卫波*, 吴凤荣, 董鹏鹏, 曾聪彦, 梅全喜

广州中医药大学附属中山医院, 中山 528401

摘要: 研究走马胎醇提物对弗氏完全佐剂(CFA)诱导的佐剂性关节炎(AA)大鼠血清中白细胞介素-6(IL-6)、细胞肿瘤因子 α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的影响,探讨其治疗类风湿性关节炎的作用。采用CFA诱导大鼠AA模型,给予不同剂量走马胎醇提物治疗,进行全身及关节炎肿胀程度评分以及血清细胞炎性因子(IL-6、TNF- α 、IL-1 β)水平的测定。结果显示,与模型组比较,走马胎醇提物能显著降低AA大鼠全身和关节炎肿胀评分及显著降低血清中IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的水平($P < 0.05$ 或 0.01)。走马胎醇提物能拮抗AA大鼠病情发展,其机制可能与其下调血清炎性因子IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的表达有关。

关键词: 走马胎;佐剂性关节炎;白细胞介素-6;细胞肿瘤因子 α ;白细胞介素-1 β

中图分类号: R245

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.009

Effect of Ethanol Extracts from *Ardisia gigantifolia* on Serum IL-1 β , IL-6, TNF- α of Rats with Adjuvant Arthritis

DAI Wei-bo*, WU Feng-rong, DONG Peng-peng, ZENG Cong-yan, MEI Quan-xi

Zhongshan Hospital, Guangzhou University of TCM, Zhongshan 528401, China

Abstract: To study the effects of ethanol extracts from *Ardisia gigantifolia* on IL-1 β , IL-6 and TNF- α in blood serum of adjuvant arthritis (AA) rats. The rats were immunized with the Freund's Complete Adjuvant (FCA). After treating the extracts from *Ardisia gigantifolia* were observed, systemic symptom score and arthritis score and serum swelling degree of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β) level determination. Compared with the model group, *Ardisia gigantifolia* alcohol extract could significantly reduce the systemic inflammatory swelling and joint score of the AA rats and decrease serum levels of IL-6, TNF- α , IL-1 β level ($P < 0.05$ or 0.01). *Ardisia gigantifolia* can inhibit the development of AA, and the mechanism may relate to inhibiting the expression of IL-6, TNF- α , IL-1 β .

Key words: *Ardisia gigantifolia* stapf.; adjuvant arthritis; IL-6; TNF- α ; IL-1 β

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以累及周围关节为主的多因素慢性炎症性疾病,主要表现为持续反复的关节疼痛、红肿、变形、活动功能障碍等,目前在临床治疗上尚无特效药物,临床上以非甾体抗炎药和免疫抑制剂缓解临床症状和控制病情为主,但这些药物均有导致胃肠道和肝肾功能损伤的毒副作用^[1],因而毒副作用相对较低的中药治疗RA逐渐引起重视。走马胎为紫金牛科植物大叶紫金牛 *Ardisia gigantifolia* stapf. 的干燥根,具有祛风除湿,活血化瘀的功效,用于风湿痹痛,跌打损

伤,产后血瘀腹痛,痈疽疮疡^[2],是我国少数名族民间常用于治疗RA的药物之一^[3],多项临床报道也显示单味走马胎^[4]及复方^[5-7]对RA均有良好的治疗作用,并且副作用小,值得开发研究,但未见有关其对RA影响的实验研究报道。本文通过建立CFA诱导的AA大鼠模型,探讨走马胎醇提物抗RA的作用及其机制,为其临床治疗RA提供科学实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠,雄性,体重 170 ± 20 g,由广东省实验动物中心提供(动物合格证号:SCXK(粤)2013-0034)。

收稿日期:2017-02-13 接受日期:2017-02-27

基金项目:广东省中医药局立项(20171282);中山市卫生和计划生育局医学科研项目(2015J050)

*通信作者 Tel:86-760-88815106;E-mail:daiweibo007@163.com

1.2 主要药品与试剂

走马胎[广州至信药材饮片有限公司,批号:20131201,经广东药科大学中山校区田素英副教授鉴定为紫金牛科走马胎 *Ardisia gigantifolia* stapf. 的干燥根];卡介苗(BCG)(北京生物制品研究所,批号:201506DG);甲氨蝶呤(上海信谊药厂有限公司,批号:036140901);液体石蜡(广东恒健制药有限公司,批号:140102);0.9% NaCl 注射液(四川科伦药业股份有限公司,批号:B14012712);IL-1 β Elisa 试剂盒(CUSABIO BIOTECH CO., LTD,批号:O290150033);IL-6 Elisa 试剂盒(CUSABIO BIOTECH CO., LTD,批号:R13015031);TNF- α Elisa 试剂盒(CUSABIO BIOTECH CO., LTD,批号:Q23015032)。

1.3 主要仪器

RE-2000B 旋转蒸发器(上海亚龙生化仪器厂);SHZ-DC III 循环水式真空泵(上海予华仪器设备有限公司);DK-8AS 电热恒温水槽(上海慧泰仪器制造有限公司);KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Muitiskan MLB3 酶标仪(热电上海仪器有限公司);GL-20G-II 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 实验方法

2.1 受试药物的制备

走马胎药材粉碎成粗粉 400 g,加 5 倍量 70% 乙醇水浴回流提取 2 次,每次 1 h。过滤混合提取液,旋转蒸发器(65 $^{\circ}$ C)回收乙醇至无醇味,加蒸馏水配制成含走马胎生药量浓度高剂量为 0.6 g/mL、低剂量为 0.3 g/mL 的药液,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中冷藏备用。

2.2 CFA 的制备^[8]

液体石蜡用 100 mL 小蓝盖广口瓶盛,按液体程序灭菌处理。研钵用报纸包裹,高压灭菌。BCG 带包装置于恒温水浴箱中 80 $^{\circ}$ C 1 h 进行灭活处理。将灭菌及灭活后的液体石蜡、研钵及 BCG 于洁净工作台上配制弗氏完全佐剂。用无菌注射器抽取 10 mL 液体石蜡加入研钵中,倒入 100mg BCG,顺时针方向研磨,研磨至乳化状态,用 10 μ L 的无菌枪头吸取 CFA 滴入玻璃杯盛放的清水里出现滴水成珠现象为止,即乳液滴漂浮于水面不扩散。制成 CFA 中的 BCG 含量为 10 mg/mL。共研磨 3.5 h。

2.3 AA 模型建立^[9]

62 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后,随机留取 10 只作为正常对照组,其余 52 只接受 CFA 造模,即在酒精擦拭大鼠左后足跖部位消毒后,于左侧足跖肉垫处皮内注射 100 μ L CFA/只。至造模 15 d,出现对侧关节出现炎性肿胀,视为造模成功;空白对照组大鼠以同样方式注射 0.9% 氯化钠注射液 100 μ L/只。

2.4 分组及给药

留取的 10 只继续作为正常对照组;从 44 只造模成功的动物中选取 40 只随机分成模型组、甲氨蝶呤阳性组(0.5 mg/kg)、走马胎高剂量组(6 g/kg)、走马胎低剂量组(3 g/kg)共 4 组,每组 10 只,走马胎剂量组每天灌胃一次,甲氨蝶呤阳性组则每隔两天灌胃一次,空白对照组和模型组每天灌胃生理盐水(1 mL/100 g)一次,连续灌胃 20 d。

2.5 观察指标

2.5.1 全身炎症状态评分

从 AA 大鼠炎症出现后,每隔 5 天进行 1 次全身表现评分,评分标准见表 1,每只大鼠最多评分 8 分^[10]。

表 1 AA 大鼠全身表现评分标准

Table 1 AA rat body scoring criteria

部位 Parts	评分 Score		
	0 分 0 Point	1 分 1 Point	2 分 2 Point
鼻 Nose	无结缔组织肿胀	有明显结缔组织肿胀	-
耳 Ear	无结节和发红表现	1 只耳朵出现结节和发红症状	2 只耳朵出现结节和发红症状
尾 Tail	无结节	有结节出现	-
前足爪 Front claws	无肿胀	1 个前足爪肿胀	2 个前足爪肿胀
后足爪 Posterior claws	无肿胀	1 个后足爪肿胀	2 个后足爪肿胀

2.5.2 关节炎肿胀程度评分

从注射造模剂后的第 15 d,每隔 5 d(D15、D20、

D25、D30、D35)对 AA 大鼠关节炎肿胀进展程度进行评分 1 次,观察每组大鼠的四肢继发病变情况,

具体评分标准见表2,将四肢的评分相加,总分最多 评16分^[11]。

表2 AA大鼠关节炎肿胀进展程度评分标准

Table 2 AA rat joint swelling score criteria

评分 Score	症状描述 Symptom description
0分 0 Point	正常
1分 1 Point	足爪及足垫单个区域出现红斑和轻微肿胀
2分 2 Point	足爪和足垫或踝关节两个以上区域出现红斑和轻微肿胀
3分 3 Point	踝关节到跗关节或掌关节出现红斑和中度肿胀
4分 4 Point	踝关节僵硬、畸形、功能障碍和重度肿胀

2.5.3 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 细胞因子水平

于末次给药1 h后,用10%水合氯醛溶液对大鼠进行麻醉处理(麻醉时按300 mg/kg即0.3 mL/100 g对大鼠进行腹腔注射麻醉),腹主动脉采血,3500 rpm离心,取血清于-20℃保存待测,按Elisa试剂盒方法分别检测血清IL-1 β 、TNF- α 和IL-6含量。

2.6 统计学处理

使用SPSS 19.0统计分析软件对实验结果进行统计分析,数据以表示,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 或 0.01 表示有统计学意义。

3 实验结果

3.1 AA大鼠模型评价

注射CFA后,前3 d为大鼠急性炎症期,注射CFA侧的大鼠足跖部位第2 d肿胀达高峰(见图1),肿胀持续3~5 d,到第5~8天期间大部分大鼠致炎侧逐渐消肿。第11~15 d部分致炎的大鼠出现继发侧四肢全身的局部炎症(见图2)。第15 d时,严重的AA大鼠表现出四肢关节炎,个别关节坚硬,尾部及耳部出现红点结节,个别大鼠生殖器也出现炎症(见图3),AA大鼠整体毛色枯燥黯淡,跛

足行动障碍,体重相对空白组减轻。本次实验模型成功率为84.62%。

3.2 对全身炎症状态评分的影响

结果表明,与模型组对比,D15为各组分给药第1 d,各组间全身评分比较均无显著性差异($P > 0.05$),表明给药前各组模型动物整体炎症状态相同;D20、D25、D30、D35时,甲氨蝶呤组、走马胎高、低剂量组评分值均有显著性差异($P < 0.05$ 或 0.01),表明走马胎醇提取物对AA模型动物全身炎症状态有较好的改善作用;走马胎高、低剂量组间各时刻对比均无显著性差异($P > 0.05$),剂量关系不明显。结果见表3。



图1 致炎后第2天致炎侧出现脓肿

Fig. 1 On the second day of side inflammation side of the abscess



图2 第11~15天出现继发侧及四肢关节出现红肿

Fig. 2 In the 11th to 15th day secondary and limb joints appear redness



图3 严重 AA 的大鼠耳部、尾巴出现结节和炎症累及生殖器

Fig. 3 Part of the AA rats showed nodules in the ears and tail, and the genitals were inflamed

表3 对 AA 模型大鼠全身炎症评分情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Evaluation of systemic inflammation in AA model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	全身症状评分 Systemic symptom score				
	D15	D20	D25	D30	D35
模型组 Model group	3.80 \pm 1.40	5.90 \pm 1.29	5.10 \pm 1.29	5.20 \pm 0.79	4.10 \pm 0.99
甲氨蝶呤 Methotrexate	3.50 \pm 1.27	4.10 \pm 1.29 **	3.40 \pm 1.58 **	2.50 \pm 1.27 **	2.50 \pm 1.08 *
走马胎(高) Ardisia gigantifolia-H	3.40 \pm 1.84	4.20 \pm 1.40 **	2.70 \pm 1.16 **	2.80 \pm 1.40 **	1.60 \pm 1.43 **
走马胎(低) Ardisia gigantifolia-L	3.60 \pm 1.43	4.00 \pm 1.25 **	3.10 \pm 1.37 **	2.80 \pm 1.62 **	2.20 \pm 1.81 **

注:与模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。Note: Compare with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3.3 对关节炎肿胀度评分的影响

结果表明,与模型组对比,D15 为各组分组给药第 1 天,各组间关节炎肿胀度评分比较均无显著性差异($P > 0.05$),表明给药前各组模型动物关节炎肿胀状态相同;给药后,D20 ~ D35 各组关节炎肿胀程度均小于模型组,其中 D20 的甲氨蝶呤组

和 D25 的走马胎高剂量组关节炎肿胀评分均有显著性差异($P < 0.05$),D35 的甲氨蝶呤组和走马胎高低剂量组均有显著性差异($P < 0.05$ 或 0.01),表明药后走马胎和甲氨蝶呤对模型动物的关节炎肿胀均有较好的改善作用,尤其药后 D35 改善作用最为明显。结果见表 4。

表4 对 AA 模型大鼠关节炎肿胀进展程度评分情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 The degree of joint swelling in AA model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	关节炎肿胀度评分 The degree of joint swelling				
	D15	D20	D25	D30	D35
模型组 Model group	6.70 \pm 3.53	10.9 \pm 3.51	9.20 \pm 4.26	8.00 \pm 3.97	7.10 \pm 3.67
甲氨蝶呤 Methotrexate	7.60 \pm 3.50	7.40 \pm 3.10 *	6.60 \pm 3.60	5.10 \pm 3.14	3.80 \pm 2.82 *
走马胎(高) Ardisia gigantifolia-H	6.70 \pm 3.50	8.70 \pm 4.52	5.70 \pm 3.23 *	5.60 \pm 4.40	2.50 \pm 2.55 **
走马胎(低) Ardisia gigantifolia-L	6.30 \pm 3.27	8.00 \pm 3.65	6.10 \pm 3.76	5.40 \pm 4.12	3.60 \pm 4.17 *

注:与模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。Note: Compare with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3.4 对 AA 大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 细胞因子水平的影响

结果表明,与模型组比较,正常对照组动物血清中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 细胞因子水平均有显著性差异($P < 0.01$),模型组三项炎症相关细胞因子水平值升高并均显著高于正常对照组;甲氨蝶呤和

走马胎高、低剂量给药组均能降低动物血清中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 细胞因子水平,统计学上有显著性差异($P < 0.05$ 或 0.01),表明走马胎高低剂量均能显著降低 AA 模型动物血清中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 细胞因子水平。结果见表 5。

表5 走马胎醇提取物对 AA 模型大鼠血清细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 On serum cytokines in AA model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
模型组 Model group	105.27 \pm 85.25	1.377 \pm 0.365	24.27 \pm 0.79
正常组 Control	28.59 \pm 22.39 **	0.521 \pm 0.126 **	2.48 \pm 0.58 **
甲氨蝶呤 Methotrexate	37.44 \pm 21.41 **	1.044 \pm 0.217 *	10.27 \pm 2.31 **
走马胎(高) Ardisia gigantifolia-H	50.86 \pm 28.51 *	0.777 \pm 0.359 **	12.56 \pm 2.20 **
走马胎(低) Ardisia gigantifolia-L	46.61 \pm 7.92 *	0.850 \pm 0.263 **	13.24 \pm 4.19 **

注:与模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Note: Compare with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

4 讨论与结论

现代医学认为 RA 的主要发病机制是免疫紊乱,是一种以损害滑膜、软骨和骨的慢性、炎症性自身免疫疾病,以侵犯全身各处关节为主,先期表现为关节痛疼,明显肿胀,屈伸不利,后期可引起软骨坏死、脱落,造成关节破坏、畸形和功能丧失^[11,12]。本研究采用 CFA 诱导的 AA 大鼠模型,在临床表现、病理学、血清学、免疫学改变和病理机制等方面与人类 RA 有许多相似特征,是研究 RA 发病机制和评价治疗 RA 药物较理想动物实验模型^[13,14]。研究认为 AA 大鼠具有局部炎症和全身症状的 RA 动物模型,全身炎症状态、关节炎指数、细胞炎症相关因子等是评价 AA 模型临床表现的主要指标^[11]。

中医认为 RA 属于“痹症”范畴,为风、寒、湿邪侵扰人体的筋骨关节,引起气血局部凝滞、筋脉闭阻、关节疼痛、肢体沉重、僵直、肿胀屈伸不利,湿邪流注关节而肿,从而形成关节炎^[15]。走马胎具有祛风除湿,活血化瘀的功效,主治风湿痹痛,跌打损伤,产后血瘀腹痛,痈疽疮疡等^[2],有临床研究资料显示,单味走马胎用于类风湿关节炎的治疗与雷公藤多苷片的效果相似^[4],并且副作用小,是味理想的类风湿关节炎治疗药物。

本研究结果显示,与正常组比较,模型组病变最重,多数动物显现不同程度的关节炎肿胀和全身炎症状态,而不同剂量的走马胎醇提取物则能降低 AA 模型大鼠关节肿胀程度和全身炎症评分 ($P < 0.05$ 或 0.01),说明走马胎醇提取物每天灌胃能有效缓解 AA 模型大鼠关节炎的症状。

当前,RA 的发病机制尚不明确,普遍认为与机体免疫异常以及体内细胞因子水平失调有关,其中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达异常和失调是 RA 的典

型特征之一,它们是 RA 发病机制重要的直接相关细胞因子,在细胞因子网络中起中心作用^[16]。IL-1 β 本身是一种破骨细胞激活因子,可使滑膜细胞和软骨细胞合成和释放前列腺素 E (PGE2) 和胶原酶,造成关节损伤;TNF- α 与 IL-1 β 效应及其靶细胞的范围有很大的相似性,常同时合成和分泌,起到“中心罪犯”的作用,共同破坏关节软骨和骨;IL-6 可通过 TNF- α 促进滑膜细胞而产生,能在骨的新陈代谢中诱导破骨细胞前体分化成真正的破骨细胞,进一步破坏骨和软骨^[17,18]。本研究中,不同剂量的走马胎醇提取物组与模型组比较,大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量均有显著性或极显著性差异 ($P < 0.05$ 或 0.01),提示走马胎醇提取物能通过下调血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 细胞因子水平来抑制有关炎症发生,从而减缓 RA 的关节肿胀等相关症状,其有关机理尚待进一步探讨。

参考文献

- Shen J(沈杰), Bao JF(鲍建芳), Zhang ZL(张之澧), et al. The therapeutic and prophylactic effects of Zaoecys Dumnades (Cantor) Hydrolysates on collagen-induced arthritis. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 2002, 22(4): 257-259.
- Guangdong Provincial Food and Drug Administration(广东省食品药品监督管理局). Standard of Chinese Medicinal Materials in Guangdong Province(广东省中药材标准). Guangzhou:Guangdong Science and Technology Press, 2004 Vol. 101-104.
- Yang SJ(杨圣金). Treatment of 37 cases of gouty arthritis with Dong medicine. *J Med Pharm Chin Minor* (中国民族医药杂志), 2007, 2(2): 47.
- Tang YP(唐亚平). Clinical observation of *Ardisia gigantifolia* in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Sichuan Tradit Med* (四川中医), 2007, 25(1): 54-55.

- 5 Xu YZ(许勇章). Treatment of 208 cases of rheumatoid arthritis. *Shanxi J Tradit Chin Med* (山西中医), 2009, 25(10):16.
- 6 Xu MZ(吴明忠), Li WJ(李伟居), Wu DS(吴东生). Clinical observation of huagutang decoction in treating rheumatoid arthritis. *China J Orthopaedics Traumatol* (中国骨伤), 2004, 17(5):288.
- 7 Huang JM(黄嘉谋). Clinical observation on treatment of 55 cases of rheumatism with Huoxueyuqichushiqifeng decoction. *J Pract Tradit Chin Internal Med* (实用中医内科杂志), 2014, 28(1):67-68.
- 8 Chang Y(常艳), Qin Q(秦琼), Wu YJ(吴育晶), et al. Immunomodulatory effects of TACI-Ig on T cell responses in rats with adjuvant-induced arthritis. *Acta Univ Med Anhui* (安徽医科大学学报), 2014, 49:935-940.
- 9 Chang Y, Wu Y, Wei W, et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rats with adjuvant-induced arthritis via attenuating inflammatory responses. *Rheumatology (Oxford)*, 2011, 50:862-870.
- 10 Wang D, Chang Y, Wei W, et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rat with adjuvant arthritis. *Clin Exp Immunol*, 2011, 163:225-234.
- 11 Li PP(李培培), Xie GX(解国雄), Song SS(宋珊珊), et al. Clinical manifestations and the main evaluation method on adjuvant-induced arthritis model in rats. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2012, 28:453-457.
- 12 Jin Y(荆云), Du YK(杜瀛琨), Xu LY(许立跃), et al. Effect of Tongbi Zhitong capsule on pathological changes of ankle joint in adjuvant arthritis rats. *J Shaanxi Coll Tradit Chin Med* (陕西中医学院学报), 2008, 31(4):64-65.
- 13 Song SS(宋珊珊), Zhang LL(张玲玲), Wei W(魏伟). Progress in animal models and their pathogenesis of experimental arthritis. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2011, 27:1648-1562.
- 14 Zhao XH(赵欣华). Effect of Bitongling granule on rheumatoid arthritis in rats. *Gansu J Tradit Chin Med* (甘肃中医), 2009, 22(8):62-63.
- 15 Yu FR(俞发荣), Wei KQ(魏克强), Wang WJ(王文己), et al. Experimental study on the effect of Qufeng Powder on rheumatoid arthritis (I). *J Gansu Sci* (甘肃科学学报), 2003, 15:112-115.
- 16 Hu W, Xia LJ, Chen FH, et al. Recombinant human endostatin inhibits adjuvant arthritis by down-regulating VEGF expression and suppression of TNF- α , IL-1 β production. *Inflammation Res*, 2012, 8:827-835.
- 17 Zhang L(张良), Bai RX(白人骅). Cytokines and the progression of research on treatment of rheumatoid arthritis. *China Med Herald* (中国医药导报), 2008, 5(11):27-29.
- 18 Zhang MN(张敏娜). Experimental animal model of rheumatoid arthritis and its evaluation. *Labor Animal Sci* (实验动物科学), 2011, 28(4):57-59.

(上接第 240 页)

- 10 Hussein G, Nakamura N, Meselhy MR, et al. Phenolics from *Maytenus senegalensis*. *Phytochemistry*, 1999, 50:689-694.
- 11 Shen YX, Teng HL, Yang GZ, et al. A new chromone derivative from *Berchemia lineate*. *Acta Pharm Sini*, 2010, 45:1139-1143.
- 12 Gao HY, Wu LJ, Kuroyanagi M. Chemical constituents of *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne. *Chin J Nat Med.*, 2003, 1(2):82-84.
- 13 Xue HZ, Lu ZZ, Konno C, et al. 3 β -(3, 4-Dihydroxycinnamoyl) erythrodiol and 3 β -(4-Dihydroxycinnamoyl) erythrodiol from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry*, 1988, 27:233-237.
- 14 Rushdi AI, Ritter G, Grimalt JO, et al. Hydrous pyrolysis of cholesterol under various conditions. *Org Geochem*, 2003, 34:799-812.
- 15 Muzitano MF, Tinoco LW, Guette C, et al. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, 2006, 67:2071-2077.
- 16 Yang Y(杨郁), Huang SX(黄胜雄), Zhao YM(赵毅民), et al. Flavonoids from *Lycoris aurea*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17:539-541.