

体外新鲜人血法检测热原相关因子IL-1 β 的条件优化及初步方法学研究

王文佳*, 陈志明, 庞智慧, 方海顺, 何华红, 李 薇*(广州市药品检验所, 广州 510160)

中图分类号 R965.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2644-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.17

摘要 目的:建立热原相关因子白细胞介素1 β (IL-1 β)的检测方法并优化其条件,同时进行初步方法学研究。方法:采用体外新鲜人血法。将5、2、0.8、0.32 EU/ml的细菌内毒素标准溶液加入稀释血液中,同时用稀释后的RPMI 1640作为空白对照,培养后采用酶联免疫吸附(ELISA)试验测定血液中释放的IL-1 β 含量。考察不同的稀释剂(RPMI 1640培养基、灭菌生理盐水)、胎牛血清添加与否和血液最终稀释体积分数(40%、20%、10%、8.3%)以及血液保存时间(2、5、6、8、26 h)与细菌内毒素释放的IL-1 β 含量的相关性,计算相关系数及检出限;将不同稀释倍数的清开灵注射液和金纳多注射液供试品及其干扰溶液分别加入稀释血液中,检测其回收率。结果:使用RPMI 1640培养基、40%的终体积分数稀释血液的结果更灵敏(检出限为0.128 EU/ml, $r=0.993$),是否加入胎牛血清对结果无明显影响;血液在4 $^{\circ}$ C保存26 h内,检出限均为0.128 EU/ml, r 值均大于0.990;清开灵注射液和金纳多注射液稀释10、32倍浓度及更多倍数时对该方法无干扰作用,回收率在68%~118%之间。结论:本研究建立的体外新鲜人血检测方法可用于热原物质的检测,并为中药注射液的热原检测提供了试验依据。

关键词 新鲜人血;热原;白细胞介素1 β ;体外试验;清开灵注射液;金纳多注射液

Optimization and Preliminary Methodology Study of *in vitro* Fresh Human Whole Blood Detection Method for Pyrogen-related Factor IL-1 β

WANG Wenjia, CHEN Zhiming, PANG Zhihui, FANG Haishun, HE Huahong, LI Wei (Guangzhou Institute of Drug Control, Guangzhou 510160, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the detection method for pyrogen-related factor interleukin 1 β (IL-1 β) through optimizing detection condition, and to conduct preliminary methodology study. METHODS: The *in vitro* fresh human whole blood detection method was used. The bacterial endotoxin standard solution (5, 2, 0.8, 0.32 EU/ml) were added into diluted blood; using diluted RPMI 1640 as blank control, the content of IL-1 β in blood sample was determined by ELISA after incubation. The relationship of the addition of different attenuants (RPMI 1640 culture, sterilized normal saline) and fetal bovine serum, final dilution volume fraction (40%, 20%, 10% and 8.3%) and storage duration (2, 5, 6, 8, 26 h) with the contents of endotoxin IL-1 β were investigated, and related coefficient and detection limits were calculated. Different dilution times of Qingkailing injection and Ginaton injection samples and interference solutions were added into diluted blood to detect their recovery. RESULTS: The results indicated that RPMI 1640 media and 40% diluted blood was more sensitive (detection limit was 0.128 EU/ml, $r=0.993$); while the addition of fetal bovine serum didn't influence the results. The detection limits of blood sample storied at 4 $^{\circ}$ C for 26 h were 0.128 EU/ml ($r>0.990$). When Qingkailing injection and Ginaton injection were diluted 10, 32 and more times, the detection method was not interfered and the recovery ranged 68%-118%. CONCLUSIONS: Established *in vitro* fresh human whole blood detection method can be used for the detection of pyrogen, and provides trial evidence for the pyrogen detection of TCM injection.

KEYWORDS Human fresh blood; Pyrogen; Interleukin 1 β ; *in vitro* test; Qingkailing injection; Ginaton injection

2015版《中国药典》(四部)载有家兔法和细菌内毒素检查法两种检测热原物质的方法^[1]。家兔法作为热原检查的“金标准”为各国药典所采用,但该方法使用活体动物,费用高,不符合减量化(Reducing)、再利用(Reusing)和再循环(Recycling)的“3R原则”,且只能定性测定,不能用于定量和标准化测定,重复性差,灵敏度低^[2]。细菌内毒素检查法通过鲎血细胞与细菌内毒素结合形成凝胶反应检测细菌内毒素,速度快,灵敏度高,可用于定量测定,但只能检测细菌内毒素,无法检测其他外源性热原物质^[3]。目前,《欧洲药典》7.0版^[4]载了单核细胞活化试验方法(Monocyte activation test, MAT)检测热原物质,该法规定使用4 h内肝素化的外周人血,使用培养液或盐溶液稀释到2%~50%(V/V)的终浓度^[4]进行热原物质的检测,但未

提供具体稀释的方法与材料;且其要求的新鲜血液需在4 h内使用,在实际操作中难以实现,目前尚未见符合该要求的文献研究。体外新鲜人血法是MAT推荐的方法之一,其使用新鲜人血模拟机体反应进行热原检测,免疫细胞经外界刺激后产生内源性热原,即相关细胞因子,如白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等,这些细胞因子进入下丘脑视前区体温调节中枢系统调节体温^[4]。通过酶联免疫吸附(ELISA)试验对相关细胞因子进行检测,可间接用于外源性热原的定性和定量测定。体外新鲜人血法能覆盖较多的热原物质,已经能用于20多种非内毒素热原的检测,而且不受与内毒素结合的物质(如血液中的蛋白物质)干扰^[5]。此方法能消除种属差异,真实地模拟人体发热反应,提高试验结果的准确性,且不受供试品状态(溶液、粉末、甚至是块状物质)的影响。参考《欧洲药典》7.0版对MAT法检测条件的规定及相关参考文献^[6-7],评价体外新鲜人血法的主要指标为不同浓度的细菌内毒素和释放的IL-1 β 含量得出的曲线的相关系数及检出限,借

* 主管药师,硕士。研究方向:药理毒理学。电话:020-81744947。
E-mail: qvickywangwen@sina.cn

通信作者:主任药师。研究方向:药物分析、药理毒理学。电话:020-26283334。E-mail: gz-liwei@tom.com

此衡量该方法的量效关系。本研究拟优化体外新鲜人血法检测热原相关因子IL-1 β 的条件,并初步验证方法的可行性。

1 材料

1.1 仪器

MS-1型漩涡振荡器(德国IKA公司);Nu-4750E型恒温细胞培养箱(美国Nuair公司);Versa Max型酶标仪(美国Molecular Devices公司);XT-1800i型血球计数仪[希森美康医用电子(上海)有限公司];2-6型低速多管架自动平衡离心机(德国Sigma公司)。

1.2 药品与试剂

细菌内毒素标准品(中国食品药品检定研究院,批号:150601-201377,效价:70 EU/支);人IL-1 β ELISA试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司,批号:ZAADBZAD01);胎牛血清(FBS,杭州四季青试剂有限公司,批号:130126);RPMI 1640培养基(美国Life Technologies公司,批号:1487360);清开灵注射液(广州白云山明兴制药有限公司,批号:130223、140323、140334,规格:2 ml/支);金纳多注射液(台湾生化学制药股份有限公司,批号:G4101、G5027、G5083,规格:5 ml:17.5 mg)。

1.3 血液

来自健康献血者,至少1周内无细菌、病毒等感染,且7 d内未服用过类固醇药物、抗炎药物或对免疫系统有抑制作用的药物^[3]。

2 方法

2.1 细菌内毒素标准品溶液的配制

取细菌内毒素标准品用RPMI 1640培养基稀释成5、2、0.8、0.32 EU/ml系列浓度,即得。

2.2 血液采集

取无热原含乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝剂的采血管采集新鲜人血,在无菌条件下加入100 u/ml青霉素和链霉素^[3],4℃冷藏保存。使用血球计数仪测量红细胞和白细胞水平,以保证其水平在正常范围内。

2.3 检测条件优化^[6-7]

试验设计共分为7组——①组:40%血液,以含5% FBS的RPMI 1640培养基稀释;②组:20%血液,以含5% FBS的RPMI 1640培养基稀释;③组:40%血液,以RPMI 1640培养基稀释;④组:20%血液,以RPMI 1640培养基稀释;⑤组:10%血液,以RPMI 1640培养基稀释;⑥组:8.3%血液,以RPMI 1640培养基稀释;⑦组:8.3%血液,以灭菌生理盐水稀释。①、③、⑥、⑦组考察不同稀释剂(5% FBS的RPMI 1640培养基、无FBS的RPMI 1640培养基、生理盐水)和加入血清与否对结果的影响;③~⑥组考察不同终体积分数的血液(40%、20%、10%、8.3%)的影响作用。

分别将上述7组样品加入24孔细胞培养板中,每孔0.8 ml,再分别加入浓度为5、2、0.8、0.32 EU/ml的细菌内毒素工作标准品溶液0.2 ml,用稀释溶剂作为空白对照,轻轻吹打混匀,常规培养(5% CO₂、37℃培养)17 h,以3 000 r/min(离心半径为6 cm)离心10 min,吸取上清,采用ELISA法测定IL-1 β 含量。

2.4 血液保存时间研究

血液采集后于4℃冷藏保存,并分别在血液采集后2、5、6、8、26 h时用RPMI 1640培养基稀释8倍。将血液稀释液加入24孔细胞培养板中,每孔0.8 ml,再加入浓度为5、2、0.8、0.32 EU/ml的细菌内毒素标准品溶液0.2 ml,并用稀释后的RPMI 1640培养基作空白对照,按“2.3”项下方法培养及测定IL-1 β 的吸光度值。

2.5 检测方法的初步方法学研究

清开灵注射液和金纳多注射液说明书标注其人用临床最大剂量分别为40、25 ml,分别对注射液进行稀释。清开灵注射液分别加RPMI 1640培养基稀释至2.5、5、10倍,用2.5、5倍清开灵稀释液分别将细菌内毒素工作标准品稀至2 EU/ml,作为供试品的干扰溶液;金纳多注射液分别加RPMI 1640培养基稀释至16、32、64倍,用16、32倍金纳多稀释液分别将细菌内毒素工作标准品稀至2 EU/ml,作为供试品的干扰溶液。

取“2.3”项下样品加入24孔细胞培养板中,每孔0.8 ml,再分别加入供试品稀释液及供试品的干扰溶液0.2 ml,另设细菌内毒素工作标准品溶液组(5、2、0.8、0.32 EU/ml的细菌内毒素工作标准品溶液),并用稀释溶剂作为空白对照,按“2.3”项下的方法培养及测定IL-1 β 的吸光度值。

2.6 数据拟合

以不同浓度的细菌内毒素浓度为横坐标,以ELISA试剂盒检测的450 nm处吸光度值为纵坐标,采用Curve Expert 1.3计算软件进行曲线的拟合得出IL-1 β 的含量,并统计相关系数(r)和检出限。

3 结果

3.1 稀释液和稀释倍数的筛选结果

各组细菌内毒素的浓度变化见图1,各组IL-1 β 水平的测定结果见表1,相关系数和检出限结果见表2。

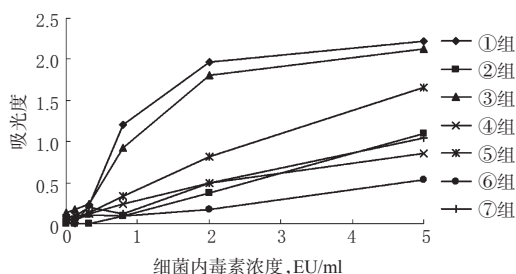


图1 细菌内毒素浓度变化

Fig 1 Changes of endotoxin concentration

表1 IL-1 β 水平的测定结果($n=4$)

Tab 1 Determination results of blood levels of IL-1 β ($n=4$)

组别	稀释溶剂	血液终体积分数,%	细菌内毒素浓度对应IL-1 β 的表达量(吸光度)					
			0	0.128	0.32	0.8	2	5
		EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml	
①组	含5% FBS的RPMI 1640培养液	40	0	0	0.241	1.204	1.965	2.215
②组	含5% FBS的RPMI 1640培养液	20	0	0	0	0.091	0.373	1.099
③组	RPMI 1640培养液	40	0.139	0.180	0.236	0.918	1.811	2.120
④组	RPMI 1640培养液	20	0.066	0.095	0.121	0.238	0.501	0.852
⑤组	RPMI 1640培养液	10	0.049	0.051	0.129	0.329	0.819	1.662
⑥组	RPMI 1640培养液	8.3	0.042	0.057	0.105	0.094	0.177	0.529
⑦组	灭菌生理盐水	8.3	0.086	0.097	0.207	0.123	0.501	1.045

表2 相关系数和检出限结果($n=4$)

Tab 2 Results of related coefficient and determination limit ($n=4$)

组别	稀释溶剂	血液终体积分数,%	r	检出限,EU/ml
①组	含5% FBS的RPMI 1640培养液	40	0.991	0.320
②组	含5% FBS的RPMI 1640培养液	20	0.995	0.800
③组	RPMI 1640培养液	40	0.993	0.128
④组	RPMI 1640培养液	20	0.995	0.128
⑤组	RPMI 1640培养液	10	0.991	0.320
⑥组	RPMI 1640培养液	8.3	0.977	0.320
⑦组	灭菌生理盐水	8.3	0.992	0.320

由图1可知,IL-1 β 的含量随细菌内毒素浓度的增加而增加,表现出显著的量效关系。结果,③~⑥组检测灵敏度较高(即检出限较低,为0.128~0.320 EU/ml,0.977< r <0.995),而①、②组和⑦组灵敏度较低(检出限为0.320~0.800 EU/ml, r 分别为0.991、0.995、0.992);④组灵敏度较高(检出限为0.128 EU/ml, $r=0.995$),③、⑥组灵敏度低(检出限为0.128~0.32 EU/ml, r 分别0.993、0.977)。结果表明使用RPMI 1640培养基对血液进行稀释,比使用灭菌生理盐水和含5% FBS的RPMI 1640培养基稀释条件下更灵敏;终体积分数为40%的稀释血液条件下更灵敏,检出的IL-1 β 的含量数值范围更大。

3.2 血液保存时间的研究

各组细菌内毒素随时间的变化情况见图2,灵敏度和检出限结果见表3。

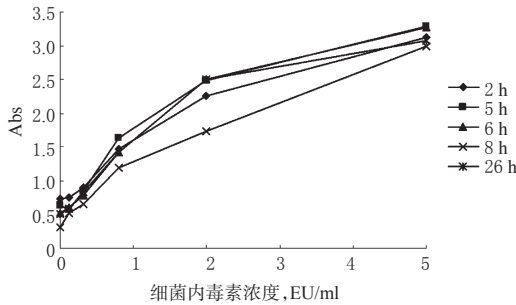


图2 细菌内毒素随时间的变化情况

Fig 2 The change of endotoxin over time

表3 灵敏度和检出限结果($n=4$)

Tab 3 Results of sensitivity and detection limit($n=4$)

血液保存时间, h	细菌内毒素浓度对应IL-1 β 的表达量(吸光度)						r	检出限, EU/ml
	0 EU/ml	0.128 EU/ml	0.32 EU/ml	0.8 EU/ml	2 EU/ml	5 EU/ml		
2	0.740	0.752	0.900	1.466	2.251	3.117	0.996	0.128
5	0.632	0.580	0.851	1.638	2.486	3.295	0.993	0.128
6	0.525	0.602	0.785	1.427	2.510	3.272	0.996	0.128
8	0.426	0.530	0.647	1.197	1.741	2.997	0.993	0.128
26	0.510	0.591	0.835	1.428	2.499	3.074	0.992	0.128

由图2可知,血液保存2~26 h内,IL-1 β 的释放量随细菌内毒素浓度的增大而增加。由表3可知,各保存时间下检出限均为0.128 EU/ml, r 值均大于0.990。结果表明血液保存26 h内有较好的灵敏度和检出限。

3.3 方法学初步研究结果

参考《欧洲药典》7.0版^[4]MAT的规定,供试品的干扰组回收率在50%~200%之间表明试验成立,回收率(%)=(供试品干扰组细菌内毒素含量-供试品组的细菌内毒素含量)/加入的细菌内毒素含量 \times 100%。结果表明,清开灵注射液、金纳多注射液分别稀释至10、32倍及更多倍数时,干扰消失,回收率分别为68%、97%、70%和55%、118%、112%,详见表4(图中“+”表示对细胞因子分泌有抑制作用,“-”表示干扰作用在50%~200%的可接受范围)。

4 讨论

近年来,许多体外热原检查法已被研究和报道,包括人来源血液或细胞方法、动物来源血液方法等。人来源细胞法仍存在问题,如人单核细胞(THP)-1细胞对脂多糖(LPS)的敏感性低、量效关系较差;其他动物来源血液法检测试剂较难获得,能否消除种属差异、准确模拟人体反应尚需进一步研究证实。人全血法分为冻存人全血法和新鲜人全血法。本课题组曾进行冻存人全血法研究,但发现血液在冻存和复苏过程中容易引起血细胞破裂,影响试验结果;而新鲜人全血法是公

表4 MAT法检测回收率和干扰作用的初步方法学研究结果

Tab 4 Preliminary study of recovery and interference effect by MAT method

受试药品	批号	稀释倍数	添加标准内毒素浓度, EU/ml	实测值, EU/ml	回收率, %	干扰作用		
清开灵注射液	130223	5	0	0		+		
			2	0.472	24			
		10	0	0		-		
			2	1.354	68			
			140323	5	0		+	
				2	1.220	61		
	140334	10	0	0		-		
			2	1.941	97			
		5	0.280		+			
			2	0.963	34			
			10	0.130		-		
				2	1.530	70		
金纳多注射液	G4101	32	0	0.103		-		
			2	1.203	55			
		64	0	0.107		-		
			2	1.467	68			
			G5027	32	0	0.114		-
					2	2.478	118	
	64	0		0.119		-		
		2		2.029	95			
		G5083		32	0.101		-	
				2	2.341	112		
	64	0	0.107		-			
		2	1.427	66				

认最能反映人体内反应的体外检测方法,此方法可靠性强,可定量测定且灵敏度高^[2]。本研究根据《欧洲药典》7.0版^[4]收载的MAT法具体研究了不同的稀释液和稀释倍数对反应灵敏度和检出限的影响,并探讨了不同血液保存时间对试验结果的影响。

有研究使用灭菌生理盐水作为血液稀释液并按8.3%体积分数,或使用RPMI 1640培养基作为血液稀释液进行稀释,结果均在《欧洲药典》7.0版规定范围内^[4,6]。FBS是细胞培养基的成分之一,有维持细胞生长、营养及调节酸碱平衡等作用,有报道将其作为人微量全血培养液的成分^[8]。由于细菌内毒素是目前已知的致热活性较强的热原物质,且已有各种标准品,因此本研究参照文献^[8-9],以17 h为孵育时间,以不同浓度的细菌内毒素工作标准品溶液加入稀释的新鲜血液中,检测所产生的IL-1 β 的含量。研究结果显示,选择RPMI 1640培养基为稀释溶剂、血液稀释至40%时检测结果更灵敏。

新鲜人血法血液来源困难,血样不易及时获取,不易满足《欧洲药典》7.0版^[3]规定的4 h内使用的条件。因此,本研究对血液保存时间进行探索,结果显示血液4 $^{\circ}$ C冷藏保存26 h内仍存在较好的量效关系,为体外新鲜人血法的标准化打下了试验基础。

清开灵注射液的成分金银花、栀子、黄芩、板蓝根,具有很强的抗菌、抗病毒、抗炎退热作用^[10-11];动物实验证实其可抑制家兔对大肠杆菌内毒素引起的发热反应,抑制大肠杆菌内毒素引起的中枢性发热介质环磷酸腺苷(cAMP)含量的增加,还可抑制肝细胞脂质过氧化物(LPO)的生成^[12]。金纳多注射液化学成分主要有萜内酯类、黄酮苷类等,体外试验显示双黄酮类化合物异银杏黄素和银杏黄素均可抑制核因子(NF)- κ B的水平,而NF- κ B可参与调控多种分子的早期免疫反应和炎症反应中的各个阶段,包括调控TNF- α 、IL-1 β 的水平等^[9]。本研究采用两种中药注射液进行了MAT方法学的初步研究,结果

藏药湿生扁蕾与獐牙菜的相关本草考证[△]

卢年华*, 芦彦兆, 赵慧巧, 景明#, 陈正君(甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000)

中图分类号 R281.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2647-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.18

摘要 目的:为辨别使用和正确开发藏药湿生扁蕾与獐牙菜提供参考。方法:通过查阅古籍和译本,以“Swertia”“Effect”“Component”“湿生扁蕾”“獐牙菜”“化学成分”等为关键词,组合检索1986年1月—2016年1月在PubMed、Web of Science、中国知网、万方、维普等数据库中有关湿生扁蕾和獐牙菜化学成分、药理作用的相关文献,重点对二者在功效方面的基源归属、生境差异、化学成分进行整理。结果与结论:共查阅到相关文献95篇,其中有效文献29篇。在藏医药本草和译著里关于治疗“赤巴”“胆热”的湿生草类的功效基源归属更多趋向于獐牙菜(印度獐牙菜、川西獐牙菜、藏獐牙菜),而非湿生扁蕾,提示今后尚需进一步开展对二者细分差异化的研究。二者在生境、化学成分上的相似,为其药效一致性提供了依据。由于湿生扁蕾分布较局限,獐牙菜类种属较多、分布广泛,可从化学成分、药理作用进一步研究,以确定獐牙菜是否可以部分或完全替代藏药湿生扁蕾。

关键词 湿生扁蕾;獐牙菜;本草考证

藏药是我国四大民族药之一,是我国医药学宝库中不可分割的重要组成部分。藏医药学有文字记载的历史已经有1300余年^[1-2]。近年来,随着藏医药研究的逐步深入,关于藏药湿生扁蕾(*Gentianopsis paludosa*)的研究报道也越来越多。但是,笔者发现其在功效描述和临床使用中多与同科近属的獐牙菜(*Swertia*)混用。为此,笔者主要通过查阅古籍和译本,以“Swertia”“Effect”“Component”“湿生扁蕾”“獐牙菜”“化学

成分”等为关键词,组合检索1986年1月—2016年1月在PubMed、Web of Science、中国知网、万方、维普等数据库中有关湿生扁蕾和獐牙菜化学成分、药理作用的相关文献,厘清过去藏医药本草中治疗“赤巴”的湿生草的功效基源归属,并从其生境、化学成分、药效学方面进一步辨别二者的异同。结果,共查阅到相关文献95篇,其中有效文献29篇。现对湿生扁蕾和獐牙菜在功效的基源归属、生境、化学成分、药效学等

细菌内毒素标准品溶液组标准曲线 $r=0.998$,检出限为0.128 EU/ml,表明试验条件成立。《欧洲药典》7.0版^[3]收纳的MAT法规定干扰组回收率应在50%~200%。本试验结果显示清开灵注射液和金纳多注射液在稀释至10、32倍及更多倍数时干扰消失,回收率为68%、97%、70%和55%、118%、112%,初步表明体外新鲜人血法具有可行性。另外,本研究组对上述两种中药注射液进行了热原家兔法和细菌内毒素法的比较试验,其中清开灵注射液家兔法干扰组出现了假阴性的结果,而细菌内毒素法在稀释至80倍时,仍然存在干扰作用,这可能与抑制过氧化脂(LPO)的生成和大肠杆菌内毒素引起的中枢性发热介质cAMP含量的增多有关(详细结果将另文发表)。本研究结果显示,金纳多注射液对反应有轻微抑制作用,这可能与双黄酮类化合物的抗炎作用有关,但回收率在规定的范围内(50%~100%),表明结果成立。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:153-157.

[2] 秦媛媛, 吴彦霖, 刘倩, 等. 三类体外热原检测方法的研究进展[J]. 中国药事, 2012, 26(5):507.

[3] Schindler S, von Aulock S, Daneshian M, et al. Development, validation and activation test for pyrogens based on human whole blood[J]. *ALTEX*, 2009, 26(4):265.

[4] Monocyte-activation Test. *European pharmacopoeia 7.0 edition*[S/OL].[2015-09-20]. http://www.academia.edu/7744831/EUROPEAN_PHARMACOPOEIA_7.0.

[5] 范能全, 彭兰. 体外人全血热原检查方法的探讨[J]. 中国药师, 2011, 14(3):443.

[6] Daneshian M, von Aulock S, Hartung T. Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(12):1709.

[7] 黄清泉, 刘文英, 丁黎, 等. 体外人全血热原检测方法的研究[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(5):372.

[8] Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoic cells[J]. *J Immunol Methods*, 2009, 298(1/2):161.

[9] Banerjee S, Mohanan PV. Inflammatory response to pyrogens determined by a novel ELISA method using human whole blood[J]. *J Immunol Methods*, 2011, 369(1/2):146.

[10] Zhou HF, Xie CH, Jian R, et al. Biflavonoids from *Caper (Capparis spinosa L.)* fruits and their effects in inhibiting-NF-kappa B activation[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(7):3060.

[11] 孙立恩. 清开灵注射液致不良反应104例分析[J]. 中国药房, 2012, 23(24):2276.

[12] 张丹卉, 蒋玉凤, 黄启福, 等. 清开灵对内毒素性发热家兔下丘脑cAMP及腹中隔区AVP含量的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(4):340.

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560717)
* 硕士研究生。研究方向:中药新剂型。E-mail:571622102@qq.com
通信作者:教授。研究方向:藏药资源与开发利用。E-mail:1339512509@qq.com

(收稿日期:2015-08-06 修回日期:2016-05-12)
(编辑:刘明伟)