

人免疫缺陷病毒整合酶抑制剂研究进展

王甜甜, 吕志良, 李科 (第二军医大学药学院 上海 200433)

摘要 前病毒 DNA 进入宿主基因的整合过程是 HIV-1 病毒复制的关键过程, 该过程依赖整合酶的催化, 因此抑制整合酶的活性即可减弱或阻止病毒复制。随着对整合酶的结构和功能的认识不断深化, 新型 HIV-1 整合酶抑制剂不断被发现, 来源和结构类型也不断增加和多样化。本文综述了 HIV-1 整合酶的研究新进展, 为新型 HIV-1 整合酶抑制剂研究提供线索。

关键词 抗病毒药物; HIV-1 整合酶抑制剂; 药效团; 构效关系

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)01-0024-07

人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的复制周期包括吸附、融合、逆转录、整合、转录、翻译、出芽和成熟等, 理论上每一环节均可成为药物作用的靶点。目前应对 HIV-1 感染的策略是使用高抗病毒活性的药物治疗, 单独使用或者联合用药。联合用药是将作用于蛋白酶、逆转录酶、融合酶的两种以上抑制剂联合使用, 通常称为鸡尾酒疗法。这种疗法能够延缓病人病情, 改善病人的生活质量。但是, 长期使用中产生的耐药性以及毒副作用却难以解决。因此需要在病毒生命循环中寻找新的治疗靶点。整合酶介导的整合过程是病毒生命及感染必不可少的过程, 整合酶是 HIV-1 病毒复制必需的酶, 而人体内无与之功能相对应的组分, 是抗 HIV-1 药物的理想靶点之一^[1]。近年来, 随着 HIV-1 整合酶 N 端区域、核心区域和 C 端区域的相继测定和推断, HIV-1 整合酶及其抑制剂的研究已经成为抗 HIV-1 药物发展的一个热点。

1 HIV-1 整合酶的结构和功能

HIV-1 整合酶是由病毒的 3' 端 pol 基因编码的共含 288 个氨基酸残基的蛋白质, 折叠成 3 个结构域。核心结构域由第 50~212 位氨基酸残基组成, 其中 Asp64 Asp110 Glu152 为酶的活性中心, 形成 DDE 基序, 是酶的催化部位; N 端结构域由第 1~49 位氨基酸残基构成, 形成 HICCC 基序 (motif)。结合锌离子成锌指结构, 有促进整合酶的四聚化及增强催化活力的功能, 对于酶与病毒形成稳定的复合物起到很关键的作用。C 端结构域由第 213~288 位氨基酸残基组成, 是酶与 DNA 结合的区域。整合酶在体内具有 3' 端切割的内切酶活性以及链转移活性, 即先特异性在病毒的 LTR3' 末端各切掉 2 个核苷酸, 暴露出 3'-CA 末端, 再随机切割宿主

DNA, 产生一个交错切口。然后将病毒 DNA 的 3' 端与宿主 DNA 的 5' 端连接起来, 完成整合的功能^[2]。

2 HIV-1 整合酶抑制剂

2.1 HIV-1 整合酶抑制剂的抑制作用 HIV-1 整合酶抑制剂的作用方式主要有 3' 加工抑制和链转移抑制 2 种。作用机制主要有: ① 与 HIV-1 整合酶的底物结合位点结合, 与底物 DNA 竞争; ② 诱导整合酶活性中心天冬氨酸 64 天冬氨酸 116 和谷氨酸 152 催化三联体 (DDE 基序, DDE motif) 的构象改变或者封闭此催化三联体; ③ 螯合金属离子, 影响酶活性; ④ 与底物 DNA 相互作用, 干扰酶活性^[3,4]。

2.2 HIV-1 整合酶抑制剂

2.2.1 整合酶抑制剂临床药物 早期测试整合酶抑制活性方法是使用纯化重组蛋白——一种放射标记的寡聚核苷酸底物, 辅以必须的 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 来测定, 是一种流行而可行的测试整合酶抑制活性的方法。在过去的 15 年中, 使用该方法进行体外活性测定, 大量属于不同结构类型的 HIV-1 整合酶抑制剂被发现^[5,6]; 最具代表的是二酮酸类 HIV-1 整合酶抑制剂及生物电子等排体 S-1360 (见图 1)。S-1360 是第一个进入临床药物研究的 HIV-1 整合酶抑制剂, 但是由于代谢部分的原因最终没能通过临床试验。试验发现 S-1360 是醛酮还原酶的一个底物, 该酶是 NADPH 依赖性的, 使得包括 S-1360 在内的二酮酸类药物迅速代谢清除, 因而不可能成为药物。因此, MERK 公司的研究人员将二酮酸药效团转换成萘啶酰胺药效团, 成功的开发出 L-870810 和 L-870812 两个候选药物。L-870810 进入临床试验, 不幸的是在临床试验中观察到长期剂量的肝肾毒性^[7], 而且 L-870810 显示的对血清蛋白的高度亲和作用可能减低有效的血药浓度, 因而停止临床实验。

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (034319231)。

作者简介: 王甜甜 (1983-), 男, 硕士研究生。

通讯作者: 李科. Tel (021) 25074585 E-mail proflik@sina.com.cn.

L-870812和 L-870810有类似的结构, 因此认为具有相似的药理特征没能进入临床试验。获得成功的两个 HIV-1 整合酶抑制剂是由 MERK 公司研发的 MK-0518和 GILEAD 公司开发的 GS-9317, 分别代表了二类特异性链转移 HIV-1 整合酶抑制剂。MK-0518是嘧啶酮酰胺类抑制剂, 它在 I、II 期临床中表现出良好的效果以及可承受的毒性^[8,9]。MK-0518不是细胞色素 P450 酶的底物, 也不是该酶的

抑制剂, 被期望有良好的药物-药物间的相互作用, 于 2007年 10月通过 FDA 认证上市^[10]。日本烟草的研究人员对喹诺酮类抗生素进行的结构改造, 发现了 HIV-1 整合酶抑制剂 GS-9137^[11], 现在由 GILEAD 公司开发。GS-9137是喹诺酮羧酸类整合酶抑制剂, 4-喹诺酮-3-羧酸骨架提供了可变的二酮酸结构碎片。GS-9137在 I、II 期临床试验中显示了良好的抑制作用, 现在正处于 II 期临床阶段^[12]。

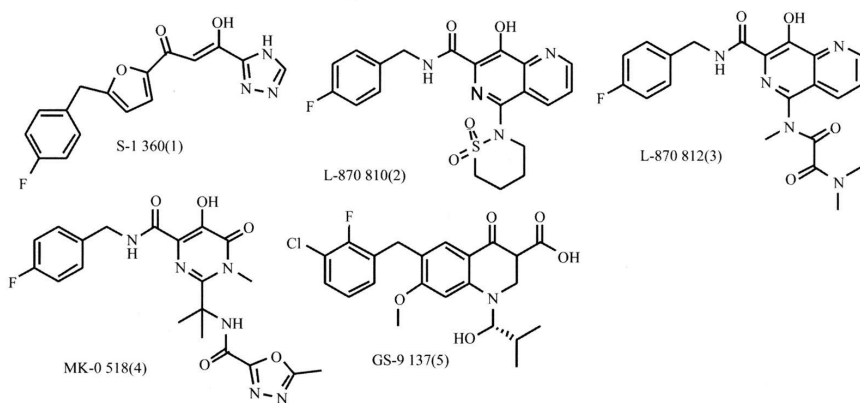


图 1 经临床试验的二酮酸类 HIV-1 整合酶抑制剂结构

2.2.2 β-二酮酸类及相关化合物整合酶抑制剂
二酮酸类 HIV-1 整合酶抑制剂对于致力于研究小分子 HIV-1 整合酶抑制剂具有标志性的作用, 它的发现确证了整合酶是合理的抗病毒作用的靶点。在过去的十几年中, 大量包含二酮酸结构片段的 HIV-1 整合酶抑制剂被合成, 这些二酮酸的衍生物包括: 含氰基的二酮酸、三酮酸及等排体异噁唑等。含氰基的二酮酸衍生物中仅有氰基酮酸 6 显示了良好的 HIV-1 整合酶抑制活性, IC_{50} 为 $(10 \pm 4) \mu M$, 而它的酯衍生物在最大的测试浓度内都没有活性, 说明游离的羧基对氰基二酮酸整合酶抑制剂不可或缺。三

酮酸酯类衍生物 7 抑制链转移活性, IC_{50} 为 $(80 \pm 20) \mu M$ 。其它的一些三酮酸类抑制剂也显示了一定的活性, 说明三酮酸类化合物具有类似二酮酸功能基团作用。以异噁唑-3-羧酸取代二酮功能基团, 却不能显示抑制整合酶的能力。氰基酮酸类、三酮酸类化合物以及不显示活性的异噁唑类化合物说明, 双酮功能基团对于整合酶抑制活性极为重要^[13]。在对三酮酸类整合酶抑制剂的构效关系研究中, 采用不同的取代基取代苯环上的氢, 获得了不同抑制活性的化合物 (见图二), 其中化合物 16 具有最好的抑制活性, 抑制链转移的活性高达 $0.01 \mu M$ ^[14]。

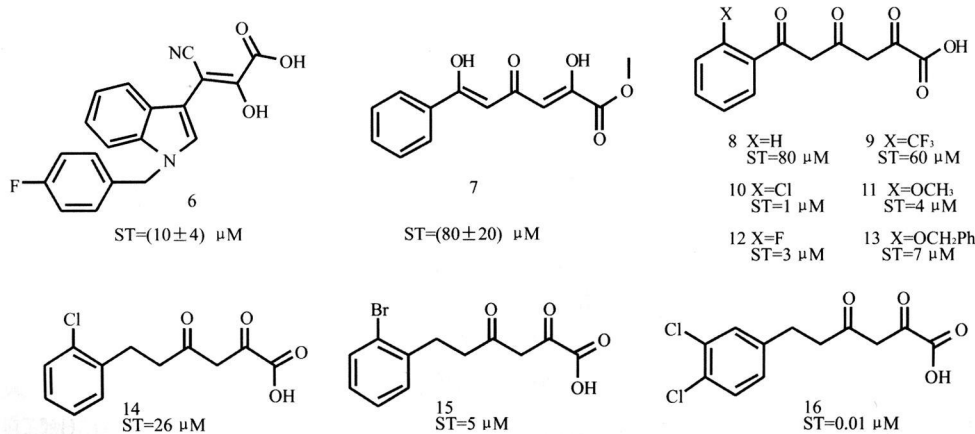


图 2 二酮酸类 HIV-1 整合酶抑制剂结构

苯胺及吲哚取代衍生的酰胺酮酸类抑制剂具有 β -二酮酸药效团, 显示抑制链转移活性^[15]。对于取代苯胺衍生 β -二酮酸整合酶抑制剂, 芳环的取代位置及取代的比例对其活性影响很大。间位取代的化合物 17 的活性明显高于对位取代的化合物 18, 对位和间位都取代的二氯酰胺酮酸 19 更明显的提高了抑制活性 (见图 3), 其抑制链转移

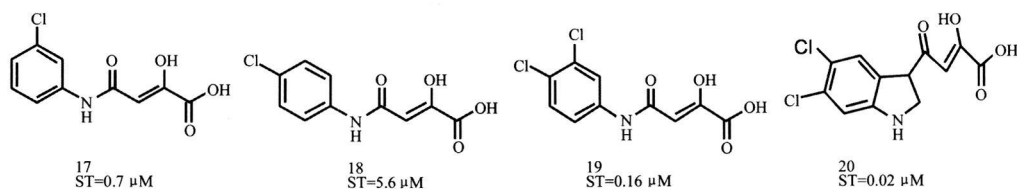


图 3 酰胺酮酸类 HIV-1 整合酶抑制剂结构

N-苯基吡咯二酮酸衍生物抑制 HIV-1 复制与抑制 HIV-1 整合酶链转移活性一致。为了研究 N-苯基吡咯二酮酸类化合物对整合酶链转移的抑制活性的影响因素, 对其中的核心基团吡咯引入额外的取代基, 并对二酮酸基团进行结构修饰。在吡咯的 4 位引入苯环获得的化合物具有良好的抑制活性, 以亚胺基团替换其中的一个或者两个羰基获得的化合物

21 同样具有较好的抑制活性, 但是若将 21 中的二酮酸基团以吡唑-5-羧酸替换获得的化合物 22 则没有明显的抑制活性, 通过引入双键延长二酮酸侧链获得的化合物 23 具有中等的抑制活性。以上说明吡咯 4 位引入苯环具有很好的耐受性, 而酮酸基团很敏感, 稍许改动都会对活性产生很大影响 (见图 4)。

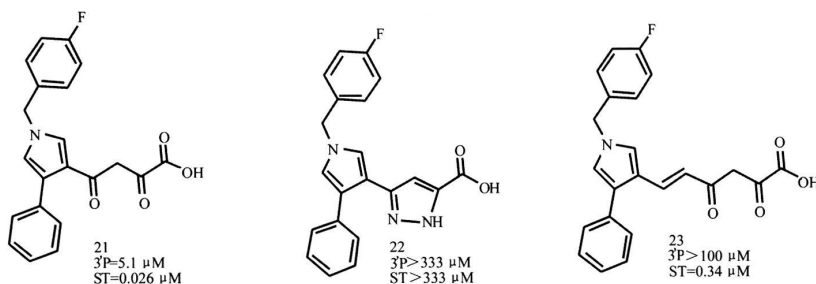


图 4 N-苯基吡咯二酮酸衍生物的结构及对整合酶的抑制活性

以亲水性相对较好的嘧啶碱基或者嘌呤碱基替换疏水性的芳环、芳杂环获得具有嘌呤和嘧啶母核的二酮酸整合酶抑制剂 (见图 5)^[16, 17]。相对于早先研究报道的芳环、芳杂环整合酶抑制剂, 体现了非选择性抑制能力, 同时抑制 3' 末端加工过程和链转移的催化活性。鸟嘌呤母核的 24-26 显示非选择性的抑制 HIV-1 整合酶的活性, 26 抑制 3' 末端加工过程和链转移的活性分别为 IC_{50} 为 30 μ M 和 2.7 μ M。1-位苯基、1, 3-二苯基取代的尿嘧啶二酮酸也显示了非选择性抑制能力。比较而言, 嘧啶碱基取代的二酮酸抑制剂 27 和 28 较嘌呤碱基取代的二酮酸抑制剂 24-26 具有更好的抑制能力, 28 抑制

3' 末端加工过程和链转移的活性分别为 IC_{50} 为 (3.7 \pm 1.0) μ M 和 (0.2 \pm 0.1) μ M, 基于细胞水平的抗 HIV 研究其抑制 HIV-1 复制的 EC_{50} 为 50 nM。这种修饰获得了非选择性的二酮酸类整合酶抑制剂, 但是却降低了抑制能力, 这可能是由于碱基骨架与芳环、芳杂环 β -二酮酸整合酶抑制剂在整合酶活性中心位点作用方式不同。

β -二酮酸类化合物是第一种显示抗逆转录病毒活性与其影响催化活性相一致的 HIV-1 整合酶抑制剂, S-1360 是第一个进入临床实验的 HIV-1 整合酶抑制剂。尽管, 由于存在 β -二酮酸片段, 没能够在病人身上显示疗效, 同时包含 β -二酮酸片

段也认为不再适合进一步的开发成临床药物;但是含有 β -二酮酸片段(药效团)正作为一个模板来

设计具有多样化学骨架和物理化学性质的 H M-1 整合酶抑制剂。

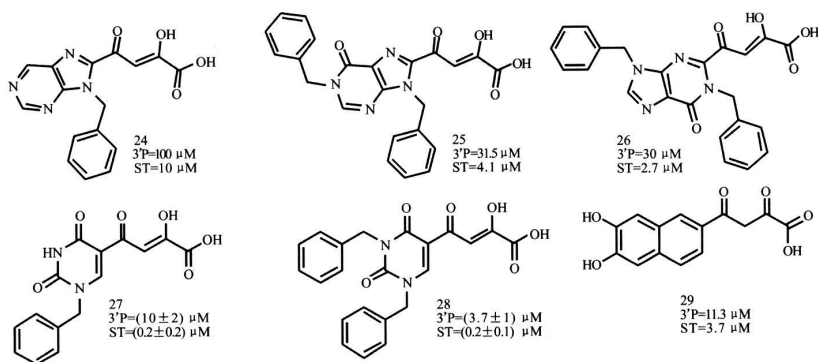


图 5 含有嘌呤和嘧啶母核的二酮酸整合酶抑制剂结构

2.2.3 萘啶酰胺及其相关化合物 L-870810和 L-870812为代表的萘啶酰胺类化合物是迄今为止发现的最重要的一类 H M-1 整合酶抑制剂(见图 6), 第一个临床研究的非二酮酸类整合酶抑制剂即属于该类化合物。萘啶酰胺类整合酶抑制剂同样具有二酮酸药效团, 在体外活性测试中显示了优良的抑制链转移活性的能力。29-32 在 nM 浓度

下即可抑制 H M-1 的复制, 低于 H M-1 病毒感染细胞致病的浓度。但是萘啶酰胺类化合物对人血白细胞具有极高的亲和力, 在正常人血白细胞中抑制 H M-1 复制的能力极大地降低, 为了降低该类化合物的亲和力, 在该类化合物的 5 位引入尿嘧啶、二氢尿嘧啶以及氨基降低该类化合物对人血白蛋白的亲和力^[19]。

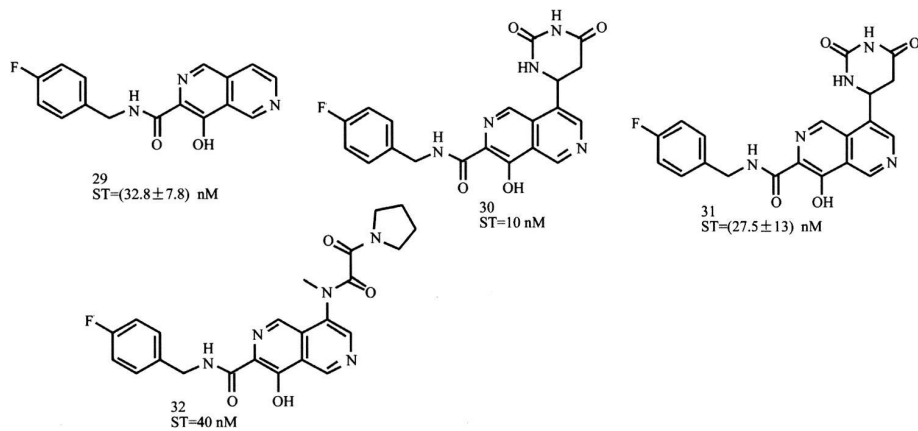


图 6 萘啶酰胺类 H M-1整合酶抑制剂结构

2.2.4 苯乙烯喹啉衍生物 与二酮酸类整合酶抑制剂不同, 苯乙烯喹啉类化合物为非选择性的抑制 H M-1整合酶, 同时抑制整合酶的 3' 末端加工过程和链转移的催化活性, 在极低的微摩尔浓度即可抑制 H M-1的复制(见图 7)。二者抑制作用机制也具有很大差别, 一般的二酮酸整合酶抑制剂通过与酶活性中心的金属离子相络合发挥抑制活性, 而苯乙烯喹啉类化合物是通过干扰整合酶结合区的病毒 DNA 或者目标 DNA 的进入原子核而发挥作用。对

先导化合物 33 进行结构修饰, 5 位引入丙烯酸和羧酸酯基团的苯乙烯喹啉化合物 34和 35^[20], 增加了抑制 3' 末端加工过程和链转移的催化活性, 而其它位置引入取代基则降低其抑制 H M-1整合酶的活性。

2.2.5 喹诺酮-3-羧酸衍生物和喹啉酮-3-酰胺衍生物 喹诺酮-3-羧酸代表了一类新颖的 H M-1 整合酶抑制剂(见图 8)。日本烟草的研究人员成功的将 β -二酮酸药效团嫁接到喹诺酮类抗生物骨架上合成了

喹诺酮类整合酶抑制 GS-9137, 喹诺酮-3-羧酸中的代表药物, 正处于 II 期临床试验阶段^[21]。喹诺酮-3-羧酸拥有 β -二酮酸 3 个功能药效团中的两个, 一个羰基和一个羧基团在一个平面上, 形成可变的单酮共面的整合酶抑制剂药效团。先导化合物 36 抑制链转移活性 IC_{50} 为 $(1\ 600 \pm 300)$ nM。在 6 位苯基的邻位和

间位分别引入 F 和 Cl 获得化合物 37 提高了链转移活性 IC_{50} 为 $(43\ 5 \pm 8\ 8)$ nM。进一步对喹诺酮母核原子进行结构修饰化合物 38 (GS-9137) 抑制链转移活性 IC_{50} 为 $(8\ 2 \pm 1\ 7)$ nM, 抑制 HIV-1 复制的 EC_{50} 为 $(7\ 5 \pm 0\ 8)$ nM。GS-9137 在抗逆转录病毒感染的病人显示了良好的疗效。

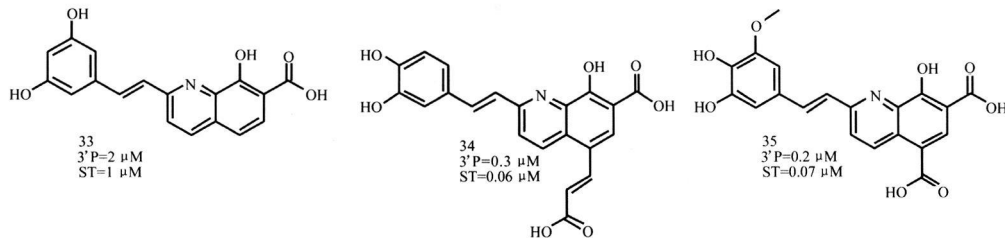


图 7 苯乙烯喹啉类 HIV-1 整合酶抑制剂结构

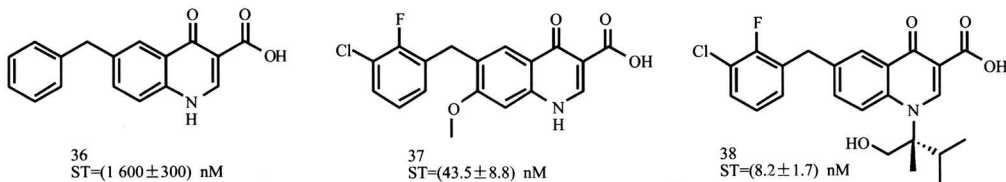


图 8 喹诺酮-3-羧酸类 HIV-1 整合酶抑制剂结构

对早先报道的 HIV-1 整合酶抑制剂 39 进行更广泛的构效关系研究, 发现一类独特的整合酶抑制剂^[22], 喹啉酮-3-酰胺类。化合物 39 抑制 3' 末端加工过程和链转移的催化活性分别为 (40 ± 3) 和 (16 ± 6) μ M。喹啉酮-3-酰胺类化合物的构效关系研究显示: 喹啉酮的 1 位 N 原子和酰胺 N 原子的

取代方式对抑制活性有强烈影响。在一定范围内, 1 位 N 原子的取代基随着脂肪链的增长而活性增加, 在 1 位戊烷取代时有最好的抑制活性, 当 1 位 N 原子上的取代基团大于正戊烷时, 抑制活性下降; 酰胺 N 上的取代基以苯基-2-磺胺 40 和 2-羟基-5-硝基苯基 41 有最好的抑制活性 (见图 9)。

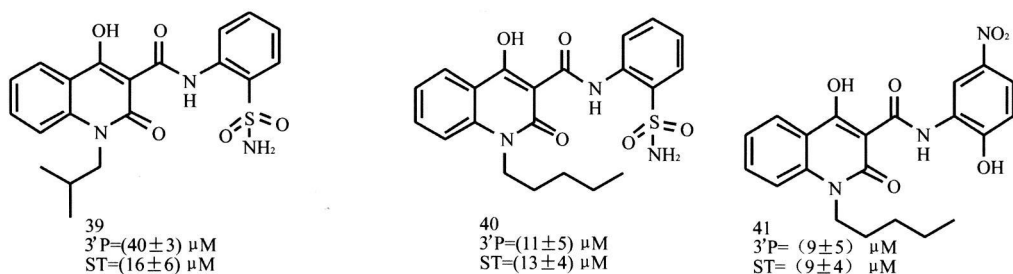


图 9 喹啉酮-3-酰胺类 HIV-1 整合酶抑制剂结构

2.2.6 其它 HIV-1 整合酶抑制剂 整合酶抑制剂包括广泛来源的天然产物以及合成的各种化合物。来源于天然产物中具有良好抑制活性的代表化合物有 42、43、44 抑制链转移活性分别为 $19\ 7\ 9\ 10\ \mu$ M; 其它的合成的 HIV 整合酶抑制剂包括香豆素 45、46^[23], 多聚醌 47, 咪唑类化合物 48^[72] 等多种化合物均具有良好的抑制 HIV-1 整合酶活性 (见图 10)。

3 结语

在过去的 15 年里, 越来越多的 HIV-1 整合酶抑制剂被发现, 不断的努力使得一系列的候选药物进入临床研究; 尽管以二酮酸和喹啉酮-3-酰胺为代表的药物没能通过临床试验, 但是两个链转移特异抑制剂 MK-0518 和 GS-9137 获得认证或者已经进入高级临

床试验,还有几个药物正在进入高级临床试验^[25]。考虑到整合酶在 HIV-1 病毒生命周期中的独特作用,可能给 AIDS 的治疗带来的根本性的改变; 以及 HIV-1 病毒基因高度动态的本质并由此带来的耐药性,寻找 HIV-1 整合酶抑制剂化学骨架以抵抗 HIV-1 产生的耐药性仍极具意义。对 HIV-1 整合酶特异

性抑制剂也不仅仅局限于链转移的抑制和 3' 末端加工的抑制,在 HIV-1 病毒动态生命过程中寻找新的化学结构,寻找新的作用靶点与新的作用机理,对 HIV-1 进行抑制; 并从不同来源的药物中寻找有效的药物抑制 HIV-1,以期找到有效、合理、低毒治疗 HIV-1 感染性疾病。

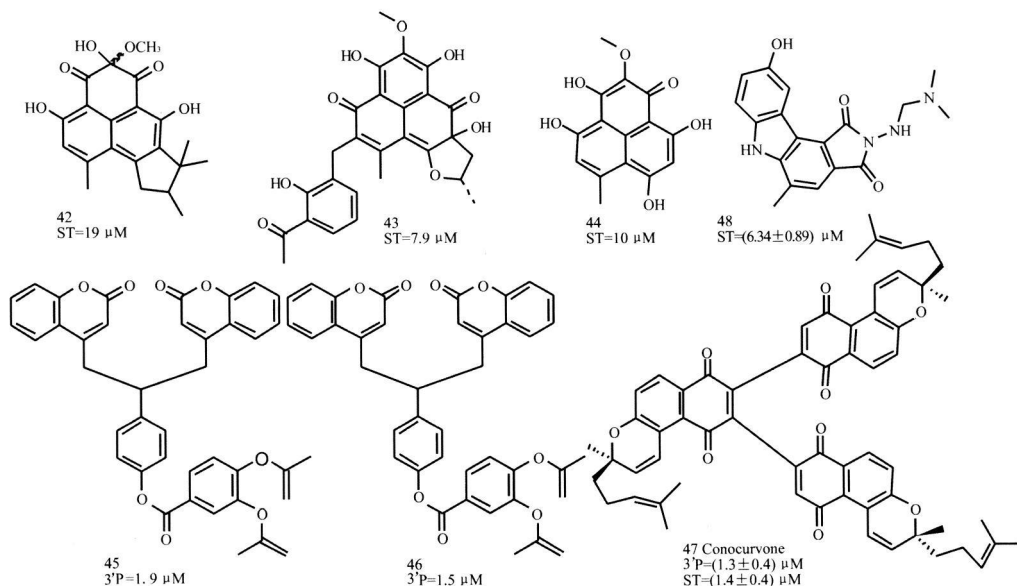


图 10 其他 HIV-1 整合酶抑制剂的化学结构

参考文献:

[1] Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(3): 236.

[2] Thomas M, Brady L. HIV integrase: a target for AIDS therapies [J]. Trends Biochem Sci, 1997, 15(5): 167.

[3] Pommier Y, Marchand C, Neamati N. Retroviral integrase inhibitors year 2000 update and perspective [J]. Antiviral Res, 2000, 47(3): 139.

[4] Takashi K, Tomokazu Y, Akhiko S, et al. A platform for designing HIV integrase inhibitors. Part I: 2-Hydroxy-3-heteroaryl acrylic acid derivatives as novel HIV integrase inhibitor and modeling of hydrophilic and hydrophobic pharmacophores [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 14(24): 8430.

[5] Dayan R, Deng J, Neamati N. HIV-1 integrase inhibitors 2003 ~ 2004 update [J]. Med Res Rev, 2006, 26(3): 271.

[6] Savarino A. A historical sketch of the discovery and development of HIV-1 integrase inhibitors [J]. Expert Opin Invest Drugs, 2006, 15(12): 1507.

[7] Little S, Dusano G, Schooley R, et al. Protocol 004 Study Team. Antiviral effect of L-00087081Q, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in HIV-1 infected patients [C]. 2005, Boston, MA.

[8] Cooper D, Gatell J, Rockstroh J, et al. Results of BENCHMRK-1, a Phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple class resistant virus [C]. 2007, February 25-28, Los Angeles

CA.

[9] Steigbigel R, Kumar P, Eron J, et al. Results of BENCHMRK-2, a Phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus [C]. 2007, February 25-28, Los Angeles.

[10] Kassahun K, McIntosh I, Cui D, et al. Metabolism and disposition in humans of raltegravir (MK-0518), an anti-AIDS drug targeting the HIV-1 integrase enzyme [J]. Drug Metab Dispos, 2007, 35(9): 1657.

[11] Saito M, Motomura T, Aramaki H, et al. Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics [J]. J Med Chem, 2006, 49(5): 1506.

[12] Zolopa A, Mullen M, Berger D, et al. The HIV integrase inhibitor GS-9137 demonstrates potent ARV activity in treatment-experienced patients [J]. 2007, February 25-28, Los Angeles, CA.

[13] Sechi M, Sannia L, Carta F, et al. Design of novel bisesters of beta-diketone acid inhibitors of HIV-1 integrase [J]. Antiviral Chem Chemother, 2005, 16(1): 41.

[14] Walker MA, Johnson T, Ma Z, et al. Triketoacid inhibitors of HIV-integrase: A new chemotype useful for probing the integrase pharmacophore [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(11): 2920.

[15] Walker MA, Johnson T, Ma Z, et al. Exploration of the diketone acid integrase inhibitor chemotype leading to the discovery of the anilide ketone acids chemotype [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(22): 5818.

- [16] Nair V, Uchil V, Neamati N. Beta-diketo acids with purine nucleobase scaffolds: Novel selective inhibitors of the strand transfer step of HIV integrase [J]. *Bioorg Med Chem Lett* 2006, 16 (7): 1920.
- [17] Nair V, Chi G, Pak R, *et al*. HIV integrase inhibitors with nucleobase scaffolds: Discovery of a highly potent anti-HIV agent [J]. *J Med Chem*, 2006, 49(2): 445.
- [18] Maurin C, Bailly F, Mbemba G, *et al*. Design, synthesis and anti-integrase activity of catechol-DKA hybrids [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(9): 2978.
- [19] Guare JP, Wai JS, Gomez RP, *et al*. A series of 5'-aminosubstituted 4-fluorobenzyl-8-hydroxy-[1,6]-naphthyridine-7-carboxamide HIV-1 integrase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett* 2006, 16(11): 2900.
- [20] Zouhiri F, Dan et M, Benard C, *et al*. HIV-1 replication inhibitors of the styrylquinoline class: Introduction of an additional carboxyl group at the C-5 position of the quinoline [J]. *Tetrahedron Lett* 2005, 46(13): 2201.
- [21] DeJesus E, Berger D, Markowitz M, *et al*. Antiviral activity, pharmacokinetics and dose response of the HIV-1 integrase inhibitor GS-9137 (JIK-303) in treatment-naïve and treatment-experienced patients [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006, 43 (1): 1.
- [22] Dayan R, Sanchez T, Neamati N. Discovery and structure-activity relationship studies of a unique class of HIV-1 integrase inhibitors [J]. *Chem Med Chem*, 2006, 1(2): 238.
- [23] Stagliano KW, Emadi A, Lu Z, *et al*. Regiocontrolled synthesis and HIV inhibitory activity of unsymmetrical naphthoquinone and trimeric naphthoquinone derivatives of concurvone [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(16): 5651.
- [24] Yan H, Mizutani TC, Nomura N, *et al*. A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity [J]. *Antivir Chem Chemother* 2005, 16(6): 363.
- [25] Dayan R, Al-Mavsaqi LQ, Neamati N. HIV-1 integrase inhibitors: An emerging clinical reality [J]. *Drugs R D*, 2007, 8(3): 155.

收稿日期: 2008-03-17

(上接第 20页)

材, 研究报道的药理作用也不多, 但是伸筋草在治疗关节肿痛、筋脉拘急、跌打损伤方面, 无论从史料记载和临床应用上, 还是药理研究和有效部位筛选, 都集中在这一点上。因此我们相信伸筋草在治疗关节肿痛、筋脉拘急、跌打损伤方面值得进一步研究开发。

参考文献:

- [1] 中药大辞典, 上海科学技术出版社上册, 1138
- [2] 马丽莎. 四川石松科植物资源及利用 [J]. *四川林业科技*, 2003, 24(2): 63.
- [3] Oghan I, Terzioğlu S, Sener B. A pharocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum* [J]. *Planta Med* 2003, 69(3): 265.
- [4] 杨再波, 钟才宁, 孙成斌, 等. 伸筋草挥发油成分的固相微萃取分析 [J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(13): 1067.
- [5] 卑占宇, 黄志勤, 丁治春, 等. 火焰原子吸收光谱法对伸筋草中金属元素含量的测定分析 [J]. *广东微量元素科学*, 2007, 14(1): 37.
- [6] 郑海兴. 伸筋草煎剂对小鼠抗炎镇痛药理实验研究 [J]. *牡丹江医学院报*, 2005, 26(2): 10.
- [7] 曾元儿, 叶木荣, 徐晖. 伸筋草不同提取部位抗炎镇痛药理实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 1999, 10(9): 641.
- [8] 张朝驹, 李孝林, 杜亚明. 伸筋草汤治疗神经根型颈椎病的实验研究 [J]. *中医药学报*, 2006, 34(4): 22.
- [9] 潘利明, 韩亮. 伸筋草超临界萃取物工艺参数优化及药效验证 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(8): 1944.
- [10] 郑海兴, 周忠光. 伸筋草煎剂对小鼠免疫功能影响的实验研究 [J]. *中医药学报*, 2005, 33(4): 36.
- [11] 尹丽颖, 边晓燕, 韩玉生. 伸筋草醇提物对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织的形态学影响 [J]. *中医药信息*, 2008, 25(2): 28.
- [12] 苗兵, 杨金, 周忠光. 伸筋草乙醇提取物对佐剂性关节炎大鼠类风湿因子和血清细胞因子的影响 [J]. *中医药信息*, 2008, 25(3): 22.
- [13] 吕衡, 周忠光, 边晓燕. 伸筋草提取物对 AA 大鼠 RF 及 Ig 影响的实验研究 [J]. *哈尔滨商业大学学报: 自然科学版*, 2008, 24(3): 274.
- [14] 贺立中, 黄泽华, 王惠茹. 伸筋草注射液的制备及其对大鼠实验性矽肺的疗效 [J]. *中草药*, 1996, 27(12): 719.
- [15] 张百舜, 有继红. 伸筋草对中枢神经系统药物作用的影响 [J]. *中药材*, 1991, 14(11): 38.
- [16] 张建胜, 王雪梅, 高云涛. 伸筋草提取物体外清除活性氧自由基及抗氧化作用研究 [J]. *云南中医中药杂志*, 2008, 29(3): 38.
- [17] 贺立中. 两步超滤法制备伸筋草注射液的实验研究 [J]. *中草药*, 1996, 27(12): 719.
- [18] 贺立中, 涂德云, 黄泽华, 等. 采用超滤技术制备伸筋草注射液的中试生产研究 [J]. *中成药*, 2002, 24(2): 137.
- [19] 卞加花, 陈祈. 挥发油 β -环糊精包合物的制备研究 [J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(3): 191.
- [20] 李冬梅, 张新春, 尹小飞, 等. β -环糊精包合艾叶挥发油的研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2005, 25(6): 519.
- [21] 林志云, 潘利明. 伸筋草超临界提取精油的 β -环糊精包合工艺研究 [J]. *中药材*, 2007, 30(8): 1030.
- [22] 陈小虎. 伸筋草汤治疗神经根型颈椎病临床研究 [J]. *基层医学论坛*, 2006, 10(6): 536.
- [23] 乔建士, 张家云. 伸筋草膏作递质推拿治疗小儿肌性斜颈 39 例 [J]. *中医外治杂志*, 1999, 8(2): 21.
- [24] 段玉军, 康治学, 张桂林. 复方伸筋草酊的配制及临床应用 [J]. *河南中医学报*, 2002, 17(6): 33.
- [25] 李素萍. 伸筋草致接触性皮炎 1 例 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 1995, 9(1): 37.

收稿日期: 2008-03-24