

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.02.003

一种 "天然植物抗菌液" 康人间(KRJ)对 LPS 诱 RAW264.7 细胞的 抗炎效果及机制初探 *

宋志磊¹ 韦乐华¹ 袁 雪¹ 刘新荣¹ 向飞丹州^{2,3} 李迪强⁴ 茆灿泉^{1Δ}

(1 西南交通大学生命科学与工程学院 四川 成都 610031; 2 云南普洱丹州制药股份有限公司 云南 普洱 665199;

3 云南民族医药研究所股份有限公司 云南 昆明 650228; 4 中国林业科学研究院 森林生态环境与保护研究所 北京 100091)

摘要 目的:探索康人间(KRJ)的抗炎效果及其作用机制。**方法:**采用脂多糖(LPS)诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立细胞炎症模型,测定 KRJ 对细胞活力、胞内 ROS、上清 NO 产物水平以及炎症相关蛋白(iNOS、COX-2 等)表达的影响。**结果:**KRJ 预处理后,细胞活力随 KRJ 浓度增加而降低。建模后,KRJ 组细胞上清中促炎症介质 NO 明显被抑制($P<0.0001$),胞内活性氧(ROS)被清除,并表现出明显的剂量依赖性抑制作用($P<0.001$),与炎症密切相关的蛋白 COX-2、iNOS 蛋白均表现出下调趋势($P<0.05$)。**结论:**KRJ 可能通过清除 ROS 活性、下调 NO 产物、COX-2、iNOS 蛋白等减轻炎症反应。

关键词:康人间(KRJ);脂多糖(LPS);RAW264.7;抗炎介质;炎症**中图分类号:**R-33;R285.5;R961.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)02-210-05

Anti-inflammatory Effect and Preliminary Mechanism of "Natural Plant Antibacterial Solution" Kang Ren Jian (KRJ) in Lipopolysaccharide -Stimulated RAW264.7 Cell*

SONG Zhi-lei¹, WEI Le-hua¹, YUAN Xue¹, LIU Xin-rong¹, XIANG FEI Dan-zhou^{2,3}, LI Di-qiang⁴, MAO Can-quan^{1Δ}

(1 School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031, China;

2 Yunnan Puer Danzhou Pharmaceutical Co.Ltd, Ningde, Yunnan, 655199, China;

3 Institute of Yunnan Folk Medicine Co.Ltd, Kunming, Yunnan, 650228, China;

4 Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091, China)

ABSTRACT Objective: To explore the anti-inflammatory effect and mechanism of KRJ. **Methods:** RAW264.7 cell was treated by lipopolysaccharide (LPS) to establish an inflammatory cell model, the effect of KRJ was measured by the cell viability, intracellular ROS level, supernatant NO level and inflammation related protein (iNOS, COX-2). **Results:** After pre-treatment with KRJ, the cell viability was decreased with the increase of KRJ concentration. After modeling, the proinflammatory mediators NO in the supernatant was significantly inhibited ($P<0.0001$) and the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were cleared in KRJ group ($P<0.001$) in a dose-dependent manner. The expression of COX-2, iNOS protein, which were closely related to inflammation, showed a decreasing trend. ($P<0.05$). **Conclusion:** KRJ might reduce the inflammation by clearance of ROS activity, down-regulation of NO products and COX-2, iNOS protein expression.

Key words: Kang Ren Jian (KRJ); Lipopolysaccharide (LPS); RAW264.7; Anti-inflammatory mediator; Inflammation**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R285.5; R961.1 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2018)02-210-05

前言

炎症是由物理、有毒化学物质或者微生物毒素诱导活组织引起的应答反应^[1,2]。这些反应是由包括巨噬细胞^[3]在内的炎症细胞介导的。巨噬细胞是复杂的免疫细胞,在炎症的许多方面发挥重要作用,包括先天和获得性免疫、组织重塑等方面,因而其均能响应各种组织微环境中的应答^[4]。巨噬细胞能够被各种

因子活化,比如促炎因子、细菌脂多糖(LPS)和佛波酯等^[5]。活化的巨噬细胞能够产生许多炎症因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等)和炎症介质,如活性氧(ROS)^[6,7]、一氧化氮(NO)等产物,并对周围组织造成严重的氧化损伤^[8-10]。

LPS 能够刺激巨噬细胞上调诱导型一氧化氮合酶(iNOS)产生 NO^[5,11,12],过表达的 NO 与许多疾病相关,如癌症、类风湿性关节炎和慢性炎症等^[13]。同时,前列腺素 E2(PGE2)激活

* 基金项目:国家科技部自然科技资源平台子项目 "自然保护区生物标本整理、整合与试点"(2005DKA21404);

中央高校科技创新项目(No.2682014CX046);云南普洱丹州制药股份有限公司 "天然植物抗菌液研究"项目(VR01HX11131300411130);

作者简介:宋志磊(1990-),男,硕士,研究方向:药理学,E-mail: songzl3703@126.com

Δ 通讯作者:茆灿泉,博导,教授,研究方向:创新药物,E-mail: maocq@home.swjtu.edu.cn

(收稿日期:2017-04-28 接受日期:2017-05-23)

NF-kappaB 通路诱导环氧化酶-2 (COX-2) 表达上调, 并且 COX-2 和 iNOS 能够同时存在于各种类似的生理病理学作用和炎症性疾病中^[4]。此外, 许多炎症反应与其具有高含量的 NO, iNOS, COX-2 有很大关系^[1]。因此, 寻找一种制剂能够抑制 NO, iNOS, COX-2 的过量表达, 将高度有益于炎症有关疾病的治疗。

"天然植物抗菌液" 康人间(Kang Ren Jian, KRJ)是在科技部基础条件平台子项目"自然保护区生物标本标准化整理、整合和共享"等工作基础上, 在向氏家族三百多年传承的金创良药处方上创新和自主研发的一种新型多功能民族医药产品。前期功效研究显示其具有抑菌消毒、镇痛、抗糖尿病足溃疡以及抗肿瘤等作用, 但其抗炎机制并不清楚。本研究采用 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞建立炎症模型, 测定 KRJ 对细胞活性、胞内 ROS、NO 产物水平, 炎症相关蛋白(iNOS、COX-2 等)的影响以初步探究 KRJ 的抗炎作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 "天然植物抗菌液" 康人间(KRJ)由云南普洱丹州制药股份有限公司制备提供, RAW264.7 巨噬细胞(ATCC), 脂多糖(LPS, L2660), 细胞培养基 DMEM(Gibco, 30-2002), 胎牛血清(Gibco, 10099141), HBSS(Gibco, 14175095), DCFH-DA(Sigma, D6883), 一氧化氮测定试剂盒(碧云天生物技术公司), BCA 蛋白测定试剂盒(biosharp), 牛血清蛋白(BSA, sigma-aldrich), CCK-8 (biosharp), ECL 发光试剂盒(Thermo, BL520A), PVDF 膜(美国 Hybond 公司), 抗体购于 Abcam 公司。

1.1.2 实验仪器 光电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司, AL204), 蛋白质转印系统(biorad, 12-0625), 倒置荧光显微镜(奥林巴斯公司, IX-71), 生物安全柜(Thermo, 1384), CO₂ 培养箱(Thermo, 1300A2), 酶标仪(Thermo, Vavioskan Flash)

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 细胞活力测定 取对数期生长的 RAW264.7 细胞, 按照 5×10^3 孔接种在 96 孔培养板中, 用培养基(10%FBS)将 KRJ 稀释浓度为不同浓度 1%-5% KRJ(v/v), 每组设置 6 个复孔。根据 CCK-8 法^[6], 在培养基中培养 24 h、48 h、72 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 放于培养箱中培养 1-2 h, 取出 96 孔板, 避光, 使用酶标仪在 450 nm, 按照如下公式计算 KRJ 对细胞活力影响。(注: A0: 调零组吸光度值, A1: 实验组吸光度值, A: 空白组吸光度值)。

$$\text{细胞活力}(100\%) = \frac{A1-A0}{A-A0} \times 100\%$$

1.2.2 LPS-RAW264.7 炎症模型建立及观察 根据 LPS-RAW264.7 细胞炎症模型的方法^[8,15], 取对数期生长的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中, 细胞数 5×10^3 孔, 培养 12 h 后, 设置空白对照, 实验组(KRJ 浓度为 3%)培养 24 h, 弃去原培养基, 用 HBSS 洗 3 次, 随后加入 LPS (1 μ g/mL) 孵育 24 h, 利用倒置显微镜观察不同时期的细胞形态变化。

1.2.3 上清液 NO 测定 取对数期生长的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中, 细胞数 5×10^3 孔, 培养 12 h 后, 加入不同浓度 0.5%-5%KRJ (v/v) 预处理细胞 24 h, 随后加入 LPS (1 μ g/mL) 孵育 24 h, 收集上清液后, 根据碧云天 NO 试剂盒的

方法, 在 540 nm 处测定各组吸光度值, 绘制标准曲线, 计算各组 NO 含量。

1.2.4 胞内 ROS 测定 根据 DCFH-DA 测定细胞内 ROS 含量方法^[6]。取对数期生长的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中, 5×10^3 孔, 培养 12 h 后, 不同浓度 0.5%-5%KRJ(v/v) 预处理 24 h, 弃去原培养基, 用 HBSS 洗 2 次, 加入 LPS (1 μ g/mL) 孵育 6 h。孵育后, 用 HBSS 洗涤 2 次, 每孔避光加入 20 μ M 的 DCFH-DA 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 30 min, 利用荧光倒置显微镜在发射波长 490 nm, 吸收波长 530 nm 进行观察, 并利用酶标仪测定各组 ROS 荧光强度值。

1.2.5 细胞总蛋白的提取 将根据文献中的方法^[9], 取对数期生长的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中, 1×10^4 孔, 培养过夜后, KRJ(浓度为 3%)预处理 24 h, 随后加入 LPS (1 μ g/mL) 孵育 18 h。将弃去培养基的培养皿放在冰上加入 100 μ L 含 PMSF 裂解液于冰上裂解 30 min 后, 转移至 1.5 mL 离心管中, 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 10 min, 收集上清, 利用 BCA 法测定各组蛋白浓度。按照蛋白液:5 \times SDS 上样缓冲液 = 4:1, 混匀, 瞬间, 煮沸约 5 min, 用 PBS 调整浓度 1 mg/mL。

1.2.6 Western Blotting 检测蛋白 COX-2、iNOS 的表达 根据目的蛋白分子量进行 10% SDS-PAGE 电泳, 蛋白上样量为 40 μ g, 电泳 2 h。转膜时间 1.5 h。将膜用 TBS 洗 3 次, 5% BSA 封闭 2 h, 一抗 COX-2(1:800)、iNOS(1:800)室温下孵育 1 h 后, 用 TBST 洗 3 次, 加入二抗(1:1000)孵育 1 h, 用 TBST 洗 3 次 3 次。根据用 ECL 化学发光试剂盒操作。在暗室中进行显影定影, 利用 Image J 进行分析条带灰度值, 以目的条带灰度值/GAPDH 灰度值的比值表示。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件处理本实验所得数据, 处理结果以(平均数 \pm 标准差)表示。当 $P > 0.05$ 表示差异性不显著, $P < 0.05$ 表示数据间存在统计学显著差异, $P < 0.001$ 表示数据间存在统计学极显著差异。

2 结果

2.1 不同浓度 KRJ 作用不同时间对巨噬细胞活力的影响

在 KRJ 低浓度时, 在 24 h 内 2% KRJ 以下浓度对巨噬细胞增殖具有微弱促进作用, 3% KRJ 以上浓度对细胞活力有下调作用, 而孵育 48h、72h 各浓度对细胞均具有抑制作用, 并且随着时间的增加和浓度的增加, 整体细胞活力普遍下降(见图 1), 说明 KRJ 对细胞的抑制作用具有普遍的剂量依赖性和时间依赖性($P < 0.05$)。

2.2 LPS 诱导 RAW264.7 细胞形态观察

正常 RAW264.7 巨噬细胞, 基本呈现圆形, 细胞状态良好(见图 2-A)。在对细胞给予 3% KRJ 孵育后, 细胞大部分呈圆形, 开始出现伪足分化现象, 但基本上对细胞刺激较小(见图 2-B)。当细胞利用 LPS 刺激以后, 细胞大部分经过诱导长出触角(见图 2-C), 从细胞形态学变化上可知细胞炎症模型基本建立成功, 胞内及上清液相关因子变化有待进一步验证。

2.3 KRJ 抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生 NO

随着 KRJ 浓度的升高, 其对 LPS 刺激 RAW264.7 产生 NO 产物的抑制作用增强(见图 3), 低于 0.5%-5%(v/v)KRJ 作用时, NO 产物随着 KRJ 浓度升高而减少, 具有药物剂量依赖性($P < 0.05$)。

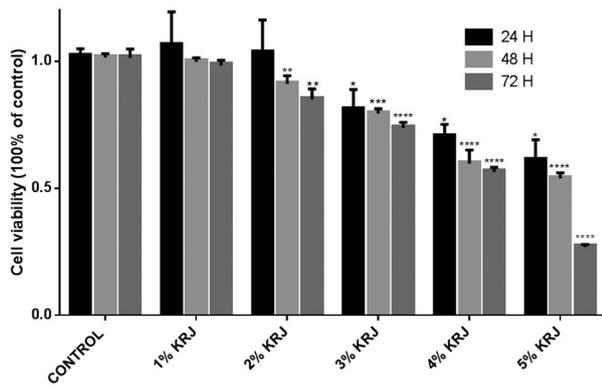


图 1 KRJ 对 RAW264.7 巨噬细胞活性影响

Fig. 1 Effect of KRJ on the viability of RAW264.7 macrophage

0001)。KRJ 浓度升高对细胞的活性有一定的影响，但整体而言，KRJ 抑制 NO 释放作用强于对细胞活力的影响，提示 LPS 刺激 RAW264.7 建立细胞炎症模型成功。

2.4 KRJ 改善 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞内 ROS 水平的影响

与空白组(LPS-)对比，模型组(LPS+)绿色荧光增强；与模型组(LPS+)对比，随着 KRJ 浓度的不断增加，绿色荧光强度减弱，说明 KRJ 对胞内 ROS 水平具有抑制作用，表现出明显的剂量依赖性下降 ROS 水平(见图 4-a)。采用酶标仪测定各组胞内的 ROS 荧光强度值，与荧光显微镜下观察 ROS 水平具有一致规律，说明 KRJ 浓度与 ROS 胞内水平呈负相关(见图 4-b)。综合分析，KRJ 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生的活性氧(ROS)具有显著的清除作用(P<0.0001)。

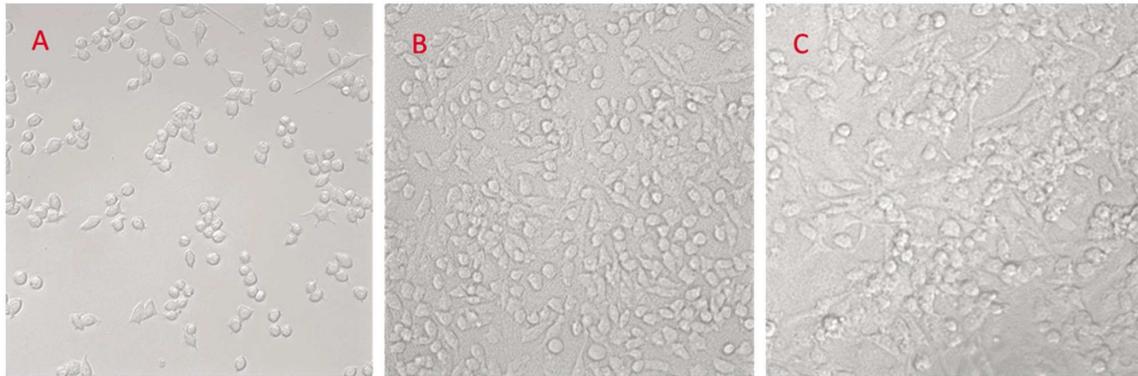


图 2 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的形态

Fig. 2 Morphology of LPS-induced RAW264.7 cell

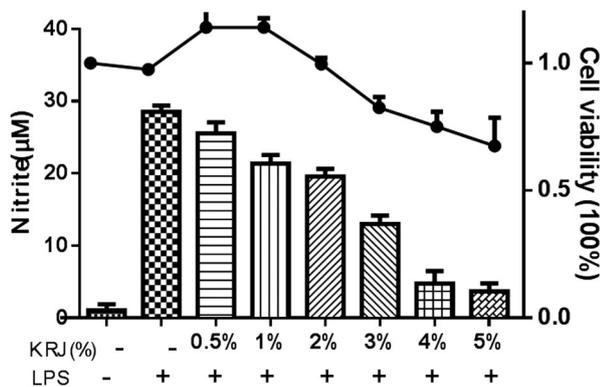


图 3 KRJ 抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的产生

Fig. 3 KRJ inhibited the NO production in inflammatory cells

2.5 KRJ 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞内炎症蛋白的抑制作用

与空白组(LPS-)比较，模型组(LPS+)COX-2 蛋白表达量明显升高 (p<0.0001)；与模型组比较，样品组 (LPS+3% KRJ) COX-2 蛋白表达明显下调(p<0.05)(见图 5-a,c)。经过 KRJ 处理后，样品组 iNOS 蛋白显著下调(P<0.001)(见图 5-b,d)，与 NO 产物被抑制具有一致规律。综合 2 种蛋白的相对灰度值均可得：模型组 > 样品组 > 空白组。

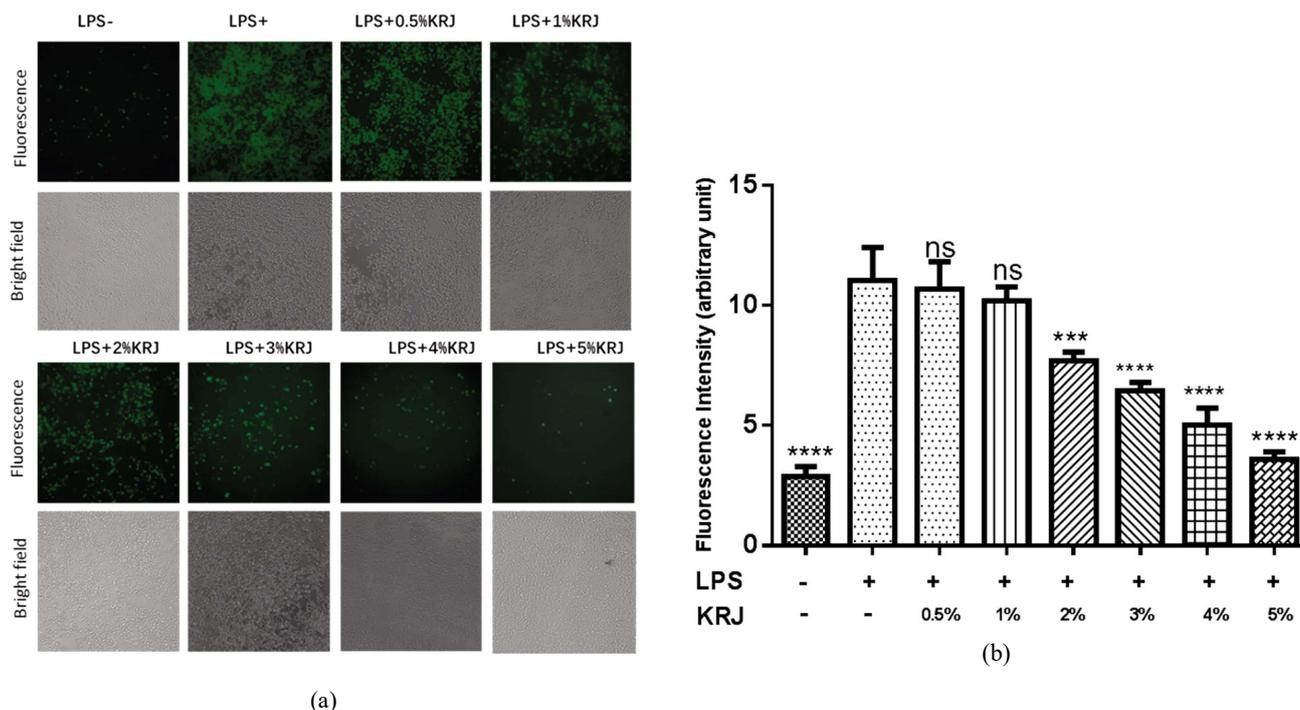
3 讨论

天然植物抗菌液(KRJ)由红花、紫草、刺天茄和芸香草等诸药协同组方而成，虽然前期发现其具有杀菌消毒，镇痛，抗氧化等方面的功效，但是其作用机制仍然不完全清楚。LPS 作为革兰氏阴性菌细胞膜表面的成分通过样受体 4 (toll-like receptor 4)识别于细胞膜表面，并激发急性炎症并促进早期的促炎症介质释放^[7]，抑制这些炎症因子和炎症介质的产物已经成为研发靶向抗炎药物的重点^[8]。

炎症病变以产生大量游离自由基、氮化物和促炎细胞因子为特点。高浓度的 NO 能够联合超氧离子能够形成过氧硝酸盐离子(OONO⁻)，从而导致组织或者细胞的损伤引起炎症^[9]。因此，我们通过 LPS 激活 RAW264.7 巨噬细胞来测定 KRJ 在抑制 NO 产物的抗炎效果。在浓度范围在 0.5%-5%(V/V)KRJ 浓度范围下，KRJ 具有剂量依赖性的抑制作用 (如图 3)。而采用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞增强 NO 产物主要是通过增加胞内的 iNOS 含量产生的，因此通过测定 KRJ 调控胞内 iNOS 蛋白

表达，表明 KRJ 抑制 NO 产生是通过下调 iNOS 表达来实现的(图 5-b)，与抑制 NO 产物的研究结果相一致。除了 LPS 刺激 RAW264.7 能够诱导产 iNOS，其还能够增强 COX-2 蛋白在胞内的表达。在大多数的炎症细胞和组织中，过量的 PEG2 表达能够增加 COX-2 表达水平，本次研究发现 KRJ 下调 COX-2 蛋白水平从而表现出抗炎活性(图 5-a)。

活性氧(ROS)作为氧化应激的关键介质，而氧化应激能够调控和加剧炎症，激活 MAPK 炎症通路^[6,10,20]，本研究采用 DCFH-DA 探针测定胞内 ROS 含量，结果显示 KRJ 具有清除胞内 ROS 水平的抗氧化能力，并且具有剂量依赖性(图 4)。而激活 NF-kB 炎症通路与 COX-2, iNOS 蛋白上调有很大的关系^[11]，这些结果暗示 KRJ 具有调控活化的巨噬细胞的炎症介质来



(a)

(b)

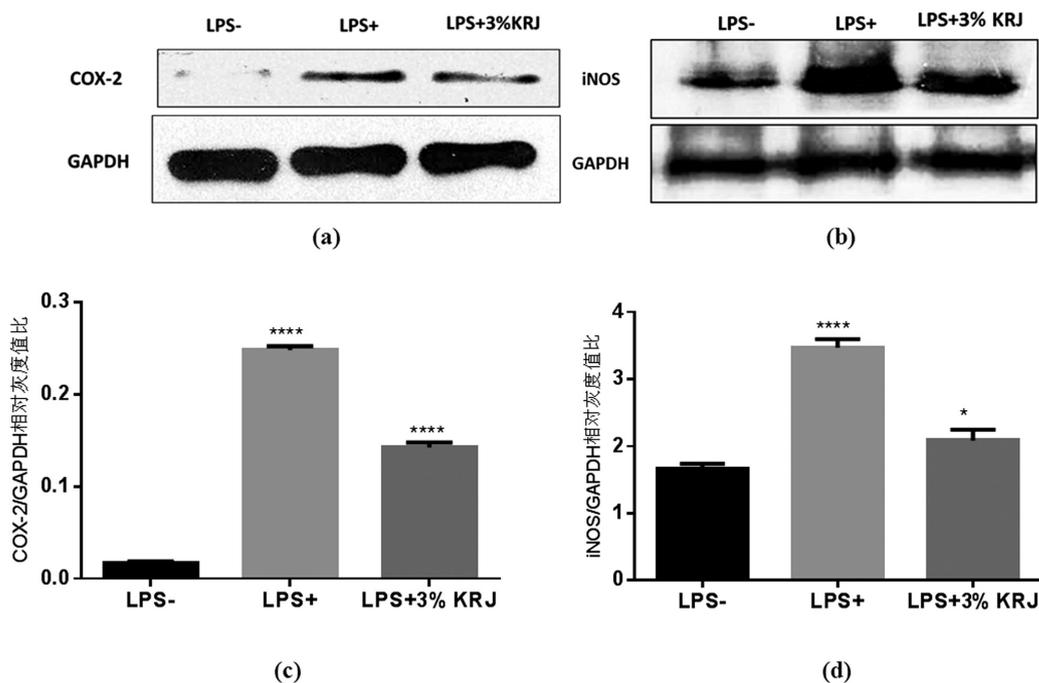
图 4 KRJ 对胞内 ROS 水平抑制作用

(a)胞内 ROS 荧光强度观察 (b)胞内 ROS 荧光强度测定

Fig. 4 KRJ inhibits intracellular ROS

(a) The observation of intracellular ROS fluorescence intensity

(b)The determination of intracellular ROS fluorescence intensity



(a)

(b)

(c)

(d)

图 5 KRJ 对炎症相关蛋白 COX-2 iNOS 调控情况

(a)COX2 蛋白表达 (b)iNOS 蛋白表达 (c-d)蛋白灰度值比

Fig. 5 KRJ regulate inflammation-related protein COX-2 iNOS

(a) The expression of COX2 protein (b) The expression of iNOS protein

(c-d) Proteins gray scale ratio

来消除炎症和减少胞内损伤,KRJ 对 MAPK 和 NF- κ B 通路具有抑制作用,可能 KRJ 具有多通路抑制炎症的效果(如图 6)。

在以往的研究中,许多药用植物提取液具有抗氧化和抗炎

的性质,对于 RAW264.7 炎症细胞中的炎症介质表现出抑制作用,具有广泛的生物活性,如从杜仲叶提取物^[21]、鸦胆子提取物^[22]等药用植物提取液。而 KRJ 作为一种新型的民族医药复方制

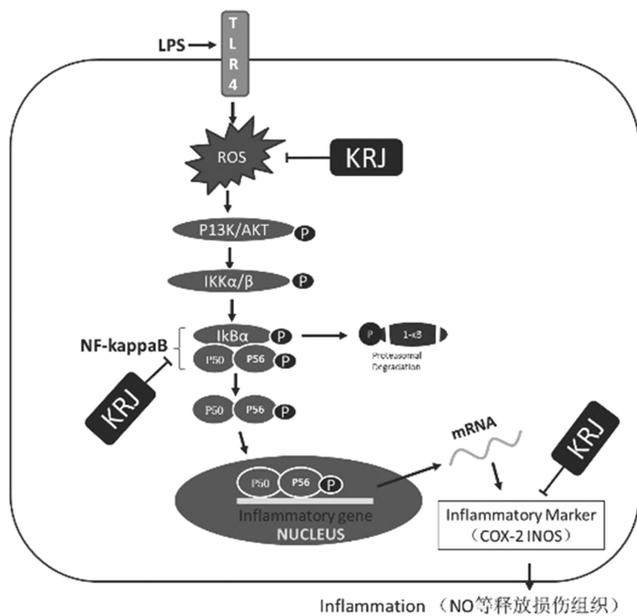


图 6 KRJ 抑制炎症的可能机制

Fig. 6 The possible mechanisms of KRJ inhibiting the inflammation

剂,在其民间药方和功效观察的基础上经过现代研发与工艺改造,保留多种植物的药效成分,相比于单一的抗炎植物提取物,其具有多成分协同组方作用和多靶点抗炎效果,表现出治疗多种临床炎症相关疾病的潜力,且其毒副作用较小。

在后续的研究中,要注重 KRJ 消炎镇痛作用机制的深入研究以及动物水平炎症相关疾病的功效研究(如皮肤疾病的接触性皮炎等),同时探索复方中各成分和其他通路作用研究,为 KRJ 早日进入临床实验阶段奠定基础。

参考文献(References)

[1] Medzhitov R, Inflammation 2010: new adventures of an old flame[J]. Cell, 2010, 140(6): 771-776

[2] Raposo T P, Beirao B C, Pang L Y, et al. Inflammation and cancer: till death tears them apart[J]. Vet J, 2015, 205(2): 161-174

[3] WC R, S B, P R, et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus[J]. Cell, 1978, 15(4): 261-267

[4] Hiroi M, Sakaeda Y, Yamaguchi H, et al. Anti-inflammatory cytokine interleukin-4 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression in the mouse macrophage cell line RAW264.7 through the repression of octamer-dependent transcription [J]. Mediators Inflamm, 2013, 13 (4): 369-372

[5] Cho1 B O, Jeong Y W, Ryu2 H W, et al. Anti-Inflammatory Effect of Mangostenone F in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Macrophages by Suppressing NF-κB and MAPK Activation [J]. Bio &Thera, 2014, 22(4): 288-294

[6] Sittisart P and Chitsomboon B, Intracellular ROS Scavenging Activity and Downregulation of Inflammatory Mediators in RAW264.7 Macrophage by Fresh Leaf Extracts of Pseuderanthemum palatiferum [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 14(3): 309-315

[7] Schieber M and Chandel N S, ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. Curr Biol, 2014, 24(10): 453-462

[8] Choi H S, Seo H S, Kim S R, et al. Anti-inflammatory and anti-proliferative effect of herbal medicines (APR) in RAW264.7 cells[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(5): 1569-1574

[9] Park S Y, Jung S J, Ha K C, et al. Anti-inflammatory effects of mycelium (, CBG-CS-2) in Raw264.7 murine macrophages[J]. Orient Pharm Exp Med, 2015, 15(1): 7-12

[10] Kumase F, Takeuchi K, Morizane Y, et al. AMPK-Activated Protein Kinase Suppresses Ccr2 Expression by Inhibiting the NF-κB Pathway in RAW264.7 Macrophages [J]. PLoS One, 2016, 11 (1): p. e0147279

[11] Kim D H, Chung J H, Yoon J S, et al. Ginsenoside Rd inhibits the expressions of iNOS and COX-2 by suppressing NF-κB in LPS-stimulated RAW264.7 cells and mouse liver [J]. J Ginseng Res, 2013, 37(1): 54-63

[12] Wang W, Yuan H Y, Liu G M, et al. Escherichia coli Maltose-Binding Protein Induces M1 Polarity of RAW264.7 Macrophage Cells via a TLR2- and TLR4-Dependent Manner[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16 (5): 9896-9909

[13] Peng X X, Zhang S H, Wang X L, et al. Panax Notoginseng flower saponins (PNFS) inhibit LPS-stimulated NO overproduction and iNOS gene overexpression via the suppression of TLR4-mediated MAPK/NF-κB signaling pathways in RAW264.7 macrophages [J]. Chin Med, 2015, 10(4): 15-19

[14] Chan P M, Tan Y S, Chua K H, et al. Attenuation of Inflammatory Mediators (TNF-α and Nitric Oxide) and Up-Regulation of IL-10 by Wild and Domesticated Basidiocarps of Amauroderma rugosum (Blume & T. Nees) Torrend in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells[J]. PLoS One, 2015, 10(10): 139-145

[15] Cheng X, Gao D, Chen B, et al. Endotoxin-Binding Peptides Derived from Casein Glycomacropeptide Inhibit Lipopolysaccharide-Stimulated Inflammatory Responses via Blockade of NF-κB activation in macrophages[J]. Nutrients, 2015, 7(5): 3119-3137

[16] Zha L, Chen J, Sun S, et al. Soyasaponins can blunt inflammation by inhibiting the reactive oxygen species-mediated activation of PI3K/Akt/NF-κB pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(9): 107-112

[17] Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, et al. Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion [J]. Clin Immunol, 2012, 145(3): 189-200

[18] Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, et al. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions [J]. Clin Sci (Lond), 2012, 122(4): 143-159

[19] Fang J, Seki T, Maeda H, Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(4): p. 290-302

[20] Tilstra J S, Gaddy D F, Zhao J, et al. Pharmacologic IKK/NF-κB inhibition causes antigen presenting cells to undergo TNFα dependent ROS-mediated programmed cell death [J]. Sci Rep, 2014, 12(8): 363-368

[21] Wang J Y, Yuan Y, Chen X J, et al. Extract from Eucommia ulmoides Oliv. ameliorates arthritis via regulation of inflammation, synoviocyte proliferation and osteoclastogenesis in vitro and in vivo [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 194: 609-616

[22] Ha S J, Lee J, Kim H, et al. Preventive effect of Rhus javanica extract on UVB-induced skin inflammation and photoaging [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 27(3): 589-599