

本文引用:孙 辉,刘翠玲,姚 静,何秋婷,谢 月,梁 奇.葛根素对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应的作用机制研究[J].湖南中医药大学学报,2023,43(4):627-632.

葛根素对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应的作用机制研究

孙 辉,刘翠玲,姚 静,何秋婷,谢 月,梁 奇*

广州中医药大学附属宝安区中医院,广东 深圳 518101

[摘要] **目的** 探讨葛根素(puerarin, PUE)在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的RAW264.7巨噬细胞中的抗炎作用,并揭示其分子机制。**方法** 采用CCK-8比色法分别设置不同浓度的LPS和PUE,观察对RAW264.7细胞活性的影响,筛选出合适的LPS造模浓度及PUE的给药浓度。将细胞分为正常对照组、模型组(1 $\mu\text{g/mL}$)、PUE给药组(12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$)。Griess法检测一氧化氮(nitric oxide, NO)释放量;ELISA法检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的含量;qRT-PCR法检测环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2) mRNA水平;Western blot法检测诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、COX-2、p-I κ B α 、p-p65蛋白表达水平。**结果** 与正常对照组比较,不同浓度的LPS诱导24 h,RAW264.7细胞存活率降低,但对细胞增殖无影响($P>0.05$),PUE在浓度100 $\mu\text{mol/L}$ 及以下时对RAW264.7细胞增殖也无影响($P>0.05$);与模型组相比,PUE给药组(12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$)NO、TNF- α 、IL-1 β 及IL-6的释放量显著降低($P<0.01$),COX-2的蛋白及mRNA表达水平显著降低($P<0.05$),iNOS、p-I κ B α 、p-p65的蛋白表达水平呈浓度依赖性降低($P<0.01$)。**结论** PUE的体外抗炎作用机制与抑制核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路相关。

[关键词] 葛根素;脂多糖;RAW264.7细胞;炎症;一氧化氮;一氧化氮合酶;NF- κ B信号通路

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.04.008

Anti-inflammatory effects and mechanisms of Puerarin on LPS-induced RAW264.7 macrophages

SUN Hui, LIU Cuiling, YAO Jing, HE Qiuting, XIE Yue, LIANG Qi*

Bao'an TCM Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518101, China

[Abstract] **Objective** To explore the anti-inflammatory potential of Puerarin (PUE) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophages and reveal its potential molecular mechanisms. **Methods** The effects of different concentrations of LPS and PUE on the viability of RAW264.7 cells were determined by CCK-8 colorimetric method, and the appropriate LPS modeling concentration and PUE administration concentration were screened. Cells were divided into normal control group, model group (1 $\mu\text{g/mL}$), and PUE administration group (12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$); Griess assay was used to assess the nitric oxide (NO) concentration; tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) content was measured by ELISA; cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA levels were detected by qRT-PCR; the protein expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), COX-2, p-I κ B α , and p-p65 were determined by Western blot. **Results** Compared with the normal control group, the survival rate of RAW264.7 cells decreased after 24 h of LPS induction at different concentrations, and there was no effect on cell proliferation ($P>0.05$), PUE has no significant cytotoxic effects at or below the concentrations of 100 $\mu\text{mol/L}$

[收稿日期]2022-11-25

[基金项目]广东省粤深青年联合基金项目(2019A1515111192)。

[第一作者]孙 辉,男,硕士研究生,研究方向:中药药理研究。

[通信作者]*梁 奇,男,主任中药师,E-mail:liangqi70@gzucm.edu.cn。

($P>0.05$); Compared with the model group, PUE administration group (12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) displayed favorable inhibitory effects on the release level of NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P<0.01$), and the protein and mRNA expression levels of COX-2 significantly decreased ($P<0.05$) in LPS-induced RAW264.7 cells, and it is the same for the expression levels of iNOS, p-I κ B α , p-p65 ($P<0.01$). **Conclusion** The anti-inflammation mechanisms of PUE is related with nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway.

[**Keywords**] puerarin; lipopolysaccharide; RAW264.7 cells; inflammation; nitric oxide; inducible nitric oxide synthase; NF- κ B signaling pathway

炎症是机体对有害刺激(如病原体、受损细胞或刺激物)的复杂生物反应。炎症反应导致疼痛、发热、瘙痒、红肿,甚至诱发过敏、哮喘及肿瘤等^[1-2]。炎症介导的关键因子核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)通路中的重要信号分子。这些因子的调节被广泛认为是抑制各种炎症的良好策略。更具体地说,NF- κ B是促炎基因转录调节的一个重要因素,如白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、一氧化氮(nitric oxide, NO)诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2),也是NF- κ B激活所必需的^[3-4]。因此,NF- κ B活化与炎症性疾病密切相关,针对NF- κ B的抗炎药物的开发备受关注。

中药葛根是解表退热的代表性药物之一,广泛应用于治疗临床炎症性疾病,如发热^[5]、疼痛^[6-10]及类风湿关节炎^[11-12]等。葛根素(puerarin, PUE)是葛根的主要有效成分,虽然其抗炎活性已有报道^[13],但是PUE的抗炎活性所涉及的细胞机制仍有待阐明。本研究通过将PUE作用于脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症模型,研究PUE抗炎反应的作用及机制,为其进一步的开发及临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞及药品

小鼠RAW264.7巨噬细胞购自中国科学院武汉分院细胞库。PUE(上海诗丹德标准服务技术有限公司,批号:110752-202013,纯度 $\geq 98\%$);LPS(美国Sigma-Aldrich公司,批号:#028M4094V)。

1.2 主要试剂

CCK-8试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,批号:21266840);胎牛血清(德国Nobimpex公司,批号:A115-500);DMEM培养基、PierceTM BCA蛋白检测试剂盒(上海赛默飞世尔科技公司,批号:8122524、

WK342259);UltraSYBR Mixture PCR试剂盒(北京康为世纪生物科技股份有限公司,批号:CW2601M);cDNA反转录试剂盒(上海翌圣生物科技股份有限公司,批号:H8203980);iNOS(上海Abcam公司,批号:ab178945);COX-2(批号:37843)、p-I κ B α (批号:2859S)、I κ B α (批号:4814S)、p65(批号:8242S)及p-p65(批号:3033S)均购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.3 主要仪器

CO₂细胞培养箱、高速冷冻离心机(上海赛默飞世尔科技有限公司,型号:371、Sorvall ST 16R);蛋白电泳仪(上海伯乐生命医学产品有限公司,型号:Bio-Rad 1658029);化学发光荧光成像仪(上海天能科技有限公司,型号:5200Multi);医用低温保存箱(青岛海尔特种电器有限公司,型号:HYC-198S);洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号:SW-CJ-2FD)。

2 方法

2.1 细胞培养及传代

RAW264.7细胞在37℃下于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的DMEM中培养,细胞在37℃、5% CO₂空气环境中生长。待细胞密度长至90%时进行传代,用细胞刮刀将贴壁细胞刮下,然后吹匀使细胞成单个悬浮状态,再转移至15 mL离心管,1000 r/min(离心半径8 cm),离心5 min,弃上清液,加入新的培养基重悬,按照1:3进行接种。

2.2 细胞分组及细胞存活率检测

取对数生长的细胞,按照 1×10^6 个/mL接种于6孔板,设置正常对照组、模型组(0.01、0.1、1、10 $\mu\text{g/mL}$)、PUE给药组(7.5、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)。待细胞贴壁过夜,正常对照组加入新鲜培养基,PUE给药组加入不同浓度PUE,每组设3个复孔,培养24 h;每孔加入20 μL CCK-8,放入细胞培养箱内继续孵育4 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度(OD)

值,计算细胞存活率。

2.3 细胞上清液中 NO 释放量的检测

取对数生长期的细胞,按照 1×10^6 个/mL 接种于 96 孔板,设置正常对照组、模型组 ($1 \mu\text{g/mL}$)、PUE 给药组 (12.5 、 25 、 $50 \mu\text{mol/L}$),待细胞贴壁过夜,PUE 给药组加入 PUE 预处理 0.5 h ,除正常对照组,其余各组加入 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 培养 24 h 。吸取各组细胞上清液 $50 \mu\text{L}$,与 Griess 试剂混合,并在室温下孵育 15 min 。使用 NaNO_2 作为标准,在 540 nm 波长处测定 NO 浓度。

2.4 细胞上清液中炎性细胞因子的检测

取对数生长期的细胞,按照 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板,分组及处理同“2.3”,收集细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书定量检测培养基中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、IL-6 的含量。

2.5 COX mRNA 水平的检测

细胞分组及给药方法同“2.3”,收集细胞,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,应用逆转录试剂盒制备 cDNA。所有引物均由上海 Invitrogen 公司合成,使用 Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) 平台设计 COX-2、GAPDH 引物序列(见表 1)。使用 RT-PCR 试剂盒在罗氏 LightCycler480 实时系统(德国 Roche Diagnostics 公司)中进行 qRT-PCR 分析。

表 1 引物序列表

引物	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')	引物大小/bp
COX-2	ATGCTCTGCTTGACTATGT	CACTACATCCTGACCATT	148
GAPDH	AACTTTGGCATTGGGAAGG	ACACATTGGGGTAGGAACA	108

2.6 iNOS、COX-2、NF- κ B 信号通路蛋白表达的检测

细胞分组及给药方法同“2.3”,待细胞贴壁过夜,各给药组加入 PUE 预处理 0.5 h ,除正常对照组,其余各组加入 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 培养 30 min ,收集细胞,加入含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的裂解液冰浴裂解 30 min ,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 $12\ 753 \text{ r/min}$ 离心 15 min ,离心半径 8 cm ;收集上清后,按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明进行蛋白定量,吸取部分蛋白液与 $5\times$ 蛋白质上样缓冲液混匀, $97 \text{ }^\circ\text{C}$ 金属浴煮 5 min ,通过 10% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE) 分离蛋白质提取物,并转移至 PVDF 膜。脱脂奶粉封闭 2 h ,再加入 iNOS、COX-2、p-I κ B α 、I κ B α 、NF- κ B/p65、p-p65 抗体稀释液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。用 TBST 洗涤 3 次,并与在封闭溶液中稀释的过氧化物酶偶联的二抗在室温下孵育 2 h ,洗涤后,使用 ECL 发光液检测蛋白质。

3 结果

3.1 LPS 对 RAW264.7 细胞活性的影响

为了评估 LPS 对 RAW264.7 细胞的细胞毒性作用,将细胞与不同浓度的 LPS (0.01 、 0.1 、 1 、 $10 \mu\text{g/mL}$) 孵育 24 h 。CCK-8 结果显示,与正常对照组比较,在 24 h 内,LPS 的浓度为 0.01 、 0.1 、 1 、 $10 \mu\text{g/mL}$ 时,RAW264.7 细胞存活率降低,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),说明各浓度下 LPS 对细胞无毒性或毒性不明显。详见表 2。

表 2 LPS 对细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	存活率/%
正常对照组	-	100
模型组	0.01	97.43 \pm 3.64
	0.1	96.31 \pm 5.92
	1	97.78 \pm 4.81
	10	96.89 \pm 5.01

3.2 PUE 对 RAW264.7 细胞活性的影响

为了评估 PUE 对 RAW264.7 细胞的细胞毒性作用,将细胞与不同浓度的 PUE (7.5 、 12.5 、 25 、 50 、 $100 \mu\text{mol/L}$) 孵育 24 h 。CCK-8 结果显示,与正常对照组比较,在 24 h 内,PUE 给药组浓度为 7.5 、 12.5 、 25 、 50 、 $100 \mu\text{mol/L}$ 时,RAW264.7 细胞存活率逐渐降低,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),说明各浓度下 PUE 对细胞无毒性或毒性不明显。详见表 3。最后,选择 12.5 、 25 、 $50 \mu\text{mol/L}$ 作为 PUE 的给药浓度,用于进一步研究。

表 3 PUE 对细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	存活率/%
正常对照组	-	100
模型组	7.5	98.21 \pm 2.30
	12.5	98.32 \pm 3.45
	25	96.51 \pm 6.51
	50	97.72 \pm 2.39
	100	96.94 \pm 4.10

3.3 LPS 对 RAW264.7 细胞中炎症因子表达的影响

与正常对照组比较,除模型组(0.01 μg/mL)外,其余 3 个浓度(0.1、1、10 μg/mL)均可明显诱导 RAW264.7 细胞产生炎症因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 ($P<0.05$),并呈现一定的浓度依赖关系。但由于 1 μg/mL 和 10 μg/mL 浓度之间诱导炎症因子水平差异无统计学意义($P>0.05$),故选择 1 μg/mL 的 LPS 作为造模浓度。详见表 4。

表 4 LPS 对细胞中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的影响

组别	浓度/(μg/mL)	TNF-α/(ng/mL)	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(ng/mL)
正常对照组	-	100.98±1.73	9.24±1.32	30.73±1.65
模型组	0.01	120.79±2.01	10.01±1.01	35.18±1.23
	0.1	273.18±7.59 ^{#*}	37.21±1.59 ^{#*}	110.47±5.98 ^{#*}
	1	398.23±10.48 ^{#*Δ}	51.78±3.17 ^{#*Δ}	212.32±7.10 ^{#*Δ}
	10	412.57±9.25 ^{#*Δ}	54.12±2.94 ^{#*Δ}	228.74±6.47 ^{#*Δ}

注:与正常对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组(0.01 μg/mL)比较,^{*} $P<0.05$;与模型组(0.1 μg/mL)比较,^Δ $P<0.05$ 。

3.4 PUE 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中炎症因子表达的影响

与正常对照组比较,模型组上清液中的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,PUE 给药组上清液中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的水平呈浓度依赖性降低($P<0.05$)。详见表 5。

表 5 PUE 对细胞中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的影响

组别	浓度/(μg/mL)	TNF-α/(ng/mL)	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(ng/mL)
正常对照组	-	120.78±2.13	13.23±3.91	25.23±1.18
模型组	1	450.16±30.98 [#]	42.51±2.98 [#]	191.34±7.59 [#]
PUE 给药组	12.5	310.89±15.21 ^{#*}	39.42±1.23 [#]	128.17±9.91 ^{#*}
	25	250.84±14.32 ^{#*Δ}	24.57±2.21 ^{#*Δ}	77.9±12.79 ^{#*Δ}
	50	142.39±9.78 ^{#*Δ&}	19.74±1.98 ^{#*Δ&}	36.18±5.21 ^{#*Δ&}

注:与正常对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与 PUE 给药组(12.5 μmol/L)比较,^Δ $P<0.05$;与 PUE 给药组(25 μmol/L)比较,[&] $P<0.05$ 。

3.5 PUE 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO 和 iNOS 表达的影响

与正常对照组比较,模型组中 NO 的产生以及 iNOS 的表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,PUE 给药组 LPS 诱导的 RAW264.7 中 NO 的产生以及 iNOS 的蛋白表达水平降低($P<0.05$)。详见表 6、图 1。

表 6 PUE 对细胞中 NO 的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/(μg/mL)	NO/(μmol/mL)
正常对照组	-	1.27±0.19
模型组	1	29.14±2.35 [#]
PUE 给药组	12.5	18.47±3.21 ^{#*}
	25	13.21±1.89 ^{#*}
	50	9.21±1.63 ^{#*Δ&}

注:与正常对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与 PUE 给药组(12.5 μmol/L)比较,^Δ $P<0.05$;与 PUE 给药组(25 μmol/L)比较,[&] $P<0.05$ 。

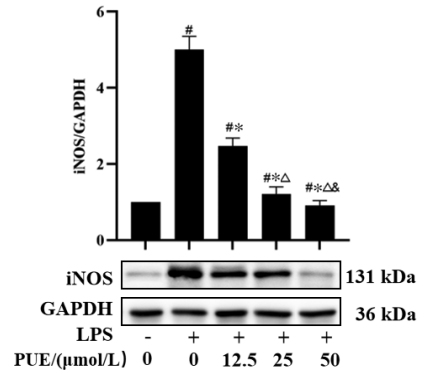


图 1 PUE 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 iNOS 蛋白的影响($n=3$)

注:与正常对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与 PUE 给药组(12.5 μmol/L)比较,^Δ $P<0.05$;与 PUE 给药组(25 μmol/L)比较,[&] $P<0.05$ 。

3.6 PUE 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 COX-2 表达的影响

与正常对照组比较,模型组中 COX-2 的 mRNA 和蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组相比,PUE 给药组 COX-2 的 mRNA 和蛋白表达明显降低($P<0.05$)。详见图 2、表 7。

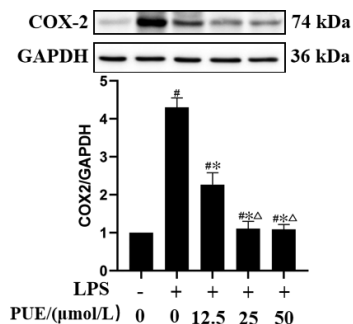


图 2 PUE 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 COX-2 蛋白的影响($n=3$)

注:与正常对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与 PUE 给药组(12.5 μmol/L)比较,^Δ $P<0.05$ 。

3.7 PUE 对 NF-κB 信号通路的影响

与正常对照组比较,模型组 NF-κB 信号通路中 p-p65 和 p-IκBα 表达明显增加($P<0.05$);与模型组相

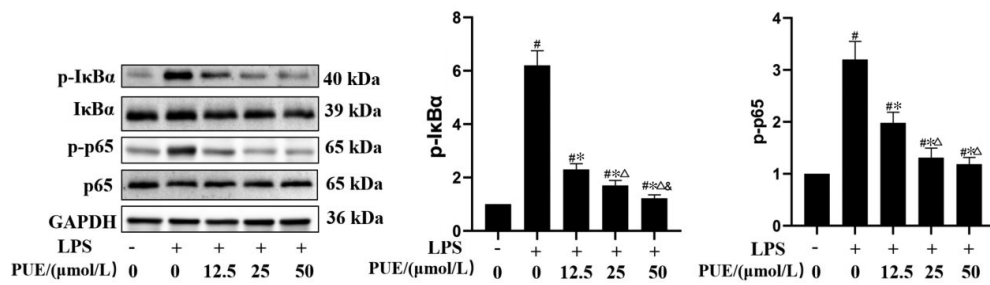


图3 PUE对LPS诱导RAW264.7细胞NF-κB信号通路的影响($n=3$)

注:与正常对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与PUE给药组(12.5 μmol/L)比较,[△] $P<0.05$;与PUE给药组(25 μmol/L)比较,[&] $P<0.05$ 。

比,PUE给药组p-p65和p-IκBα水平呈浓度依赖性降低($P<0.05$)。详见图3。

表7 PUE对细胞中COX-2 mRNA的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/(μg/mL)	COX-2 mRNA
正常对照组	-	1.00±0.00
模型组	1	17.32±0.94 [#]
PUE给药组	12.5	10.56±0.73 ^{**}
	25	7.29±0.98 ^{**}
	50	4.98±0.48 ^{**△&}

注:与正常对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与PUE给药组(12.5 μmol/L)比较,[△] $P<0.05$;与PUE给药组(25 μmol/L)比较,[&] $P<0.05$ 。

4 讨论

炎症是病原体、受损细胞或刺激物攻击机体产生的基本防御机制。炎症反应有多种生理目的,如宿主防御、组织修复反应和稳态恢复。然而,这种反应会产生病理后果,导致炎症组织损伤、化生和稳态设定点的改变。因此,机体需要对炎症反应进行适当的调节。一些有害刺激,如病原体、受损细胞或刺激物可刺激机体产生NO,但过量产生NO会在巨噬细胞中诱导慢性炎症反应^[14]。慢性NO过量产生也涉及其他负面的细胞生理功能,如DNA损伤和诱变^[15]。在本研究中,PUE抑制LPS刺激的RAW264.7细胞中NO的产生。其次,PUE还以剂量依赖的方式抑制LPS诱导的iNOS蛋白水平升高。这些结果表明,PUE可能是一种潜在的抗炎化学物质。前列腺素(prostaglandin, PG)是来源于花生四烯酸的类脂化合物。NO、iNOS和PG维持体内平衡功能并介导致病机制,包括炎症反应。由促炎刺激物、细胞因子、激素和生长因子诱导的COX-2是炎症中PG形成的重要来源^[16-18]。COX-2酶抑制剂被开发用于治疗

与关节炎相关的炎症^[19-20]和疼痛^[21-22]。促炎细胞因子往往会通过诱发机体产生发热、炎症、组织破坏或全身炎症使疾病恶化。IL-6是一种关键的炎症细胞因子,在诱导下游炎症反应中起着重要作用。在这项研究中,我们发现PUE抑制LPS诱导的TNF-α、IL-1β和IL-6的上调。PUE处理以剂量依赖的方式减少LPS诱导的NO释放。此外,PUE下调LPS诱导的iNOS、COX-2、p-IκBα、p-p65的表达。NF-κB可与κB的抑制剂IκBα结合,当给予诱导炎症反应的刺激时,NF-κB被IκBα降解激活,并导致其易位到细胞核中,以促进炎症基因的表达,包括iNOS、COX-2和IL-6。

综上所述,体外实验表明PUE可能是一种具有潜在抗炎作用的天然活性化合物,可以抑制炎症因子的产生以及炎症反应,这种抑制作用可能与调控NF-κB信号通路密切相关。本研究结果可为PUE用于治疗相关炎症性疾病以及进一步的研究利用提供科学参考。

参考文献

- [1] LOPEZ B, MAISONET T M, LONDHE V A. Alveolar NF-κB signaling regulates endotoxin-induced lung inflammation[J]. *Experimental Lung Research*, 2015, 41(2): 103-114.
- [2] PFLUG K M, SITCHERAN R. Targeting NF-κB-inducing kinase (NIK) in immunity, inflammation, and cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22): 8470.
- [3] LIN Y Q, LUO T Y, WENG A L, et al. Gallic acid alleviates gouty arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis through enhancing Nrf2 signaling[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 580-593.
- [4] HIRANO T, HIRAYAMA D, WAGATSUMA K, et al. Immunological mechanisms in inflammation-associated colon carcinogen-

- esis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(9): 3062.
- [5] 管咏梅,龚丽霞,姜鄂,等.葛根及其主要成分安全性研究进展[J]. *中华中医药学刊*,2022,40(3):12-18.
- [6] 朱京,刘桂荣,张志远运用葛根经验[J]. *中医杂志*,2022,63(2): 111-114.
- [7] 张文培.葛根汤在老年病临床治疗中的应用进展研究[J]. *内蒙古中医药*,2021,40(12):124-125.
- [8] 田利军,郭宇松,刘星,等.葛根汤联合针刺治疗青少年颈椎生理曲度异常所致颈源性头痛疗效及对患者脑血管功能状况的影响[J]. *陕西中医*,2020,41(7):875-877,910.
- [9] 樊俐慧,张伟,王志刚,等.基于《伤寒杂病论》探讨葛根的量效关系及用药规律[J]. *中医临床研究*,2021,13(21):28-30.
- [10] 史晨旭,杜佳蓉,吴威,等.葛根化学成分及药理作用研究进展[J]. *中国现代中药*,2021,23(12):2177-2195.
- [11] 娄磊.葛根汤联合肾着汤对类风湿性关节炎患者疗效及免疫功能的影响[J]. *河北医药*,2022,44(6):926-929.
- [12] 杨小又,张丽萍,李涛,等.李兆福教授运用桂枝加葛根汤治疗类风湿关节炎合并外感风寒经验[J]. *风湿病与关节炎*,2020,9(11): 34-35,51.
- [13] 孔令娟,计小清,刘岩,等.葛根素通过调控 AMPK/GSK-3 β / β -catenin 信号通路缓解糖尿病大鼠心肌损伤[J]. *中药材*,2023(2): 474-478.
- [14] LEE Y M, KIM D S. The extraction solvent influences the anti-inflammatory effects of jakyakgamcho-Tang in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and mice with gouty arthritis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 9748.
- [15] ZHAO W R, SHI W T, ZHANG J, et al. Tribulus terrestris L. extract protects against lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage and zebrafish via inhibition of Akt/ MAPKs and NF- κ B/iNOS-NO signaling pathways[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 2021: 6628561.
- [16] 陈诗洁,黄浏姣.电针对缺血脑组织 Survivin、COX-2 表达及二者相关性影响的研究[J]. *湖北中医药大学学报*,2022,24(4): 5-9.
- [17] LI T T, HAI L L, LIU B, et al. TLR2/4 promotes PGE2 production to increase tissue damage in Escherichia coli-infected bovine endometrial explants via MyD88/p38 MAPK pathway[J]. *Theriogenology*, 2020, 152: 129-138.
- [18] 任天琦,刘泽霖,胡海,等.甘草甜素对膝关节骨性关节炎大鼠软骨细胞凋亡及 PTEN/AKT/COX-2 信号通路的影响[J]. *贵州医科大学学报*,2022,47(7):785-790,795.
- [19] STILLER C O, HJEMDAHL P. Lessons from 20 years with COX-2 inhibitors: Importance of dose-response considerations and fair play in comparative trials[J]. *Journal of Internal Medicine*, 2022, 292(4): 557-574.
- [20] WANG Q R, YE C Q, SUN S K, et al. Curcumin attenuates collagen-induced rat arthritis via anti-inflammatory and apoptotic effects[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 72: 292-300.
- [21] ZHANG J Z, CHEN X Y, WU Y J, et al. Identification of active compounds from yi nationality herbal formula Wosi influencing COX-2 and VCAM-1 signaling[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 568585.
- [22] GONZÁLEZ-BARNADAS A, CAMPS-FONT O, MARTÍN-FATÁS P, et al. Efficacy and safety of selective COX-2 inhibitors for pain management after third molar removal: A meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *Clinical Oral Investigations*, 2020, 24(1): 79-96.

(本文编辑 周旦)