

# 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞免疫调节作用的研究

戴 艺, 徐明生\*, 上官新晨, 赵曼云

江西省天然产物与功能食品重点实验室 江西农业大学食品科学与工程学院, 南昌 330045

**摘要:** 研究绿原酸(Chlorogenic acid, CGA)对静息状态及脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)激活状态下小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响。采用不同浓度的绿原酸作用于静息的和经LPS刺激的小鼠腹腔巨噬细胞, 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力, 中性红吞噬实验检测巨噬细胞吞噬能力, Griess法检测NO的产生, 酶联免疫法(ELISA)检测巨噬细胞培养上清液中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10的分泌水平。试验结果表明在正常状态及LPS激活状态下, 绿原酸均能提高小鼠腹腔巨噬细胞的代谢活力、增强吞噬能力、增加NO、促炎性细胞因子IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的分泌量, 降低抑炎性细胞因子IL-10的分泌量, 且作用效果呈剂量依赖性。

**关键词:** 绿原酸; 巨噬细胞; 细胞因子; 免疫调节

中图分类号: R392.12

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.024

## Immunoregulation Effect of Chlorogenic Acid on Mouse Peritoneal Macrophages

DAI Yi, XU Ming-sheng\*, SHANGGUAN Xin-chen, ZHAO man-yun

*Jiangxi Key Laboratory of Natural Products and Functional Food, College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China*

**Abstract:** This study was aimed to explore the immunoregulation effects of chlorogenic acid (CGA) on normal and LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages (PM). MTT assay was used to test the proliferation of macrophage. The phagocytic activity of PM was tested by neutral red phagocytosis experiments. Moreover, the production of nitrous oxide (NO) was measured by Griess reaction and the production of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-10 (IL-10) in culture supernatants were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent method (ELISA). The results showed that CGA promoted the proliferation and the phagocytic activities, increased the secretion of NO and proinflammatory cytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), inhibited the secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-10) both in normal macrophages and in LPS-activated macrophages in a dose-dependent manner.

**Key words:** chlorogenic acid; macrophages; cytokines; immunoregulation

绿原酸又名咖啡鞣酸, 属酚类化合物, 是植物细胞在有氧呼吸过程中经磷酸戊糖途径(HMS)的中间产物合成的一种苯丙素类物质<sup>[1]</sup>。绿原酸广泛存在于植物中, 以金银花、杜仲中的含量最高, 具有抗氧化、抗病毒、降脂降糖、免疫调节作用等多种生物活性, 已成为天然产物领域研究的热点之一。WU HZ等<sup>[2]</sup>研究发现, 无论是在体内还是体外, 绿原酸都能激活钙调神经磷酸酶, 增强巨噬细胞的功能, 且其在体内的功能是通过激活钙调神经磷酸酶途径实现的。体外研究表明, 绿原酸可显著增强流感病毒引起的T细胞增殖, 并且能诱导人淋巴细胞

及人外周血白细胞生成IFN- $\gamma$ 和IFN- $\alpha$ <sup>[3,4]</sup>。

本文使用小鼠腹腔巨噬细胞作为研究对象, 考察绿原酸对正常静息状态及LPS过度激活状态巨噬细胞的免疫调节作用, 为绿原酸在免疫调节方面的进一步研究提供理论依据。此外, 对绿原酸在食品保健品中的开发利用也具有指导意义。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

Km小鼠, 清洁级, 4~6周龄, 18~22g, 雌性, 购于江西中医药大学实验动物中心。实验动物质量合格证号: JZDWN0:2014-0183。

### 1.2 试剂

绿原酸(CGA): 上海同田生物技术有限公司, 纯度大于98%, 批号: 14031321; RPMI1640: 美国

Gibco 公司;胎牛血清(FBS):Biological Industries;青链霉素混合液、MTT(噻唑蓝)、中性红、二甲基亚砷(DMSO):北京索莱宝公司;巯基乙酸肉汤,脂多糖(LPS):美国 Sigma 公司;一氧化氮试剂盒:江苏碧云天生物技术有限公司;IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10 ELISA 试剂盒:美国 RayBiotech 公司。

### 1.3 主要仪器设备

Multiskan MK3 酶标仪、3121 型 CO<sub>2</sub> 培养箱:美国 Thermo electron 公司;3110 Series II 超净工作台:新加坡 StreamLine Laboratory;低速离心机:上海安亭科学仪器厂;XD-202 倒置生物显微镜:南京江南永新光学公司。

## 2 实验方法

### 2.1 试剂配制

绿原酸(CGA)溶液:准确称取 20 mg 的绿原酸标品,用 RPMI1640 培养基将其溶解,稀释至 10 mL,配成浓度为 2000  $\mu$ g/mL 的母液,无菌条件下过 0.22  $\mu$ m 滤膜,4  $^{\circ}$ C 保存。实验时按所需浓度用完全培养基进行稀释。

LPS 溶液:向装有 10 mg 脂多糖粉末管中加入适量的超纯水,充分溶解后稀释到 50 mL,无菌条件下过 0.22  $\mu$ m 滤膜即得 0.2 mg/mL LPS 母液,无菌分装,-20  $^{\circ}$ C 保存。使用时用完全培养基稀释为所需工作浓度。

巯基乙酸溶液:准确称取 2.9 g 巯基乙酸肉汤粉末,溶于 100 mL 蒸馏水,煮沸至完全溶解,分装后 121  $^{\circ}$ C 灭菌 15 min,4  $^{\circ}$ C 保存,使用前提前恢复至室温。

### 2.2 小鼠腹腔巨噬细胞的分离

参考 Hammer M 等<sup>[5]</sup>的方法提取并培养小鼠腹腔巨噬细胞。向小鼠腹腔中注射 2.9% 巯基乙酸肉汤溶液,1 d 后将小鼠脱臼处死,75% 酒精浸泡 5 min,把小鼠腹部朝上固定于板上,剪开小鼠腹部皮肤,暴露腹膜。无菌注射 5 mL 预冷 RPMI1640 培养基,轻柔腹部 5 min,吸出腹腔液,1000 rpm 离心 5 min,弃上清,用 RPMI-1640 完全培养(10% FBS、100 U/mL 的青霉素、100  $\mu$ g/mL 的链霉素)基重悬,计数,调整细胞至所需密度。将巨噬细胞悬液接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L,置 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h 至完全贴壁,吸弃上清,使用完全培养基洗涤 2 次,去除未贴壁细胞,即得到纯化的腹腔巨噬细胞。

### 2.3 实验分组

巨噬细胞纯化后进行实验分组处理。(1)空白对照组:加 100  $\mu$ L 完全培养基;(2)阳性对照组:加入 100  $\mu$ L 终浓度为 5  $\mu$ g/mL 的 LPS;(3)绿原酸处理组:加入 100  $\mu$ L 不同浓度(12.5、25、50、100  $\mu$ g/mL)的绿原酸。

### 2.4 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞代谢活力的影响(MTT 法)

细胞按  $5 \times 10^5$ /mL 接种于 96 孔板,按 2.3 方法进行分组处理,37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h 后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20  $\mu$ L,继续培养 4 h,弃上清,每孔加 150  $\mu$ L DMSO,轻轻震荡约 10 min 使其完全溶解,酶标仪 570nm 波长下测其吸光度值。

细胞代谢活力(%) = 处理组吸光度值/空白对照组吸光度值  $\times$  100

### 2.5 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响(中性红法)

细胞按  $5 \times 10^5$ /mL 接种于 96 孔板,按 2.3 方法进行分组处理,37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h 后弃上清,每孔加 1% 中性红溶液 100  $\mu$ L,孵育 30 min 后用 PBS 洗涤三次,每孔加 200  $\mu$ L 细胞裂解液(等体积无水乙醇与乙酸混合液),4  $^{\circ}$ C 冰箱静置过夜,酶标仪 540 nm 波长下测其吸光度值。

吞噬率(%) = 处理组吸光度值/空白对照组吸光度值  $\times$  100

### 2.6 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 的影响(Greiss 法)

细胞按  $2 \times 10^6$ /mL 接种于 96 孔板中,按 2.3 方法进行分组处理,37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 孵育 48 h 后每孔取 50  $\mu$ L,按碧云天 NO 试剂盒操作。每孔分别加 GreissA 和 GreissB 试剂 50  $\mu$ L,酶标仪于 540 nm 处测定其吸光度值。根据 NaNO<sub>2</sub> 标准曲线换算为 NO<sub>2</sub> 浓度,间接反映 NO 生成量。

### 2.7 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞分泌 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和 IL-10 的影响

细胞按  $2 \times 10^6$ /mL 接种于 96 孔板中,按 2.3 方法进行分组处理,37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 孵育 48 h 后收集上清液,1000 rpm 离心 20 min,取上清。操作严格按照试剂盒说明书进行。

### 2.8 统计学分析

采用 DPS 数据处理系统 Duncan 新复极差多重比较法进行数据统计分析。

### 3 实验结果

#### 3.1 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞代谢活力的影响

从图 1 中可以看出,绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞

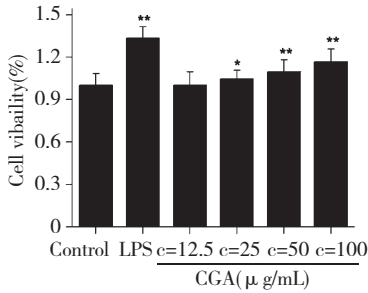


图 1 不同浓度绿原酸对巨噬细胞代谢活力的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of CGA on the metabolic activity of macrophages

与空白对照组比较, \* 表示  $P < 0.05$ ; \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

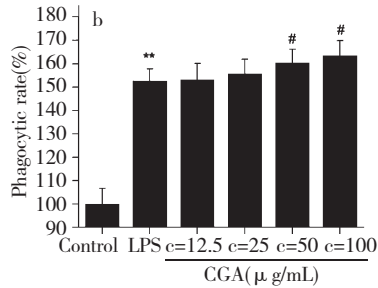
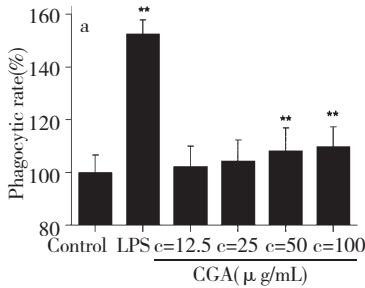


图 2 CGA 和 LPS + CGA 对巨噬细胞吞噬能力的影响

Fig. 2 The effects of CGA and LPS + CGA on phagocytosis in macrophage

与空白对照组比较, \* 表示  $P < 0.05$ ; \*\* 表示  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较, # 表示  $P < 0.05$ ; ## 表示  $P < 0.01$ 。

Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared with LPS group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

促进巨噬细胞释放 NO, 且与空白对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 图 3 (b) 结果显示, 与 LPS 组 NO 分泌量为  $76.28 \mu\text{mol/L}$ , 当 CGA 浓度大

胞代谢 MTT 活力有增强作用, 浓度为  $25 \sim 100 \mu\text{g/mL}$  时与对照组相比有差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且增强作用呈剂量依赖性, 但代谢 MTT 活力低于阳性对照 (LPS) 组。故绿原酸浓度在  $12.5 \sim 100 \mu\text{g/mL}$  范围内对细胞代谢活力有促进作用。

#### 3.2 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响

从图 2 (a) 中可以看出, CGA 浓度为  $50$ 、 $100 \mu\text{g/mL}$  时对巨噬细胞吞噬能力有显著的增强效果 ( $P < 0.01$ ), 而浓度低于  $50 \mu\text{g/mL}$  是与空白对照组差异不显著; 图 2 (b) 表明, 不同浓度的 LPS + CGA 组吞噬率均显著高于空白对照组, 但与 LPS 组比, CGA 浓度高于  $50 \mu\text{g/mL}$  时巨噬细胞吞噬率有显著升高 ( $P < 0.05$ ), 当 CGA 浓度为  $100 \mu\text{g/mL}$  时吞噬率最高, 为  $163.38\%$ 。

#### 3.3 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 能力的影响

从图 3 (a) 中可以看出, 不同浓度的 CGA 均能

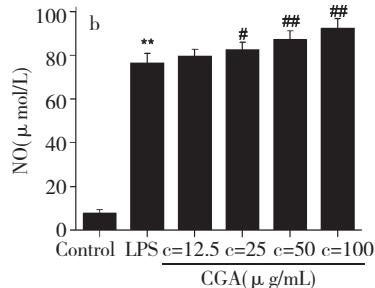
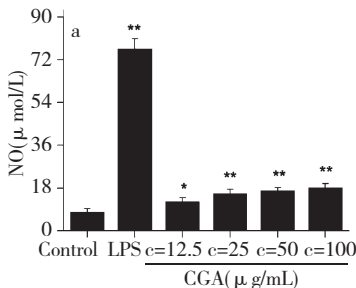


图 3 CGA 和 LPS + CGA 对巨噬细胞产生 NO 能力的影响

Fig. 3 The effects of CGA and LPS + CGA on NO production

与空白对照组比较, \* 表示  $P < 0.05$ ; \*\* 表示  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较, # 表示  $P < 0.05$ ; ## 表示  $P < 0.01$ 。

Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared with LPS group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

于  $25 \mu\text{g/mL}$ , LPS + CGA 处理组能显著促进 LPS 引起的 NO 大量分泌 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 分泌量分别为  $82.8$ 、 $87.3$  和  $92.6 \mu\text{mol/L}$ 。

### 3.4 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞产生 IL-10 的影响

结果表明(图 4),浓度大于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,CGA

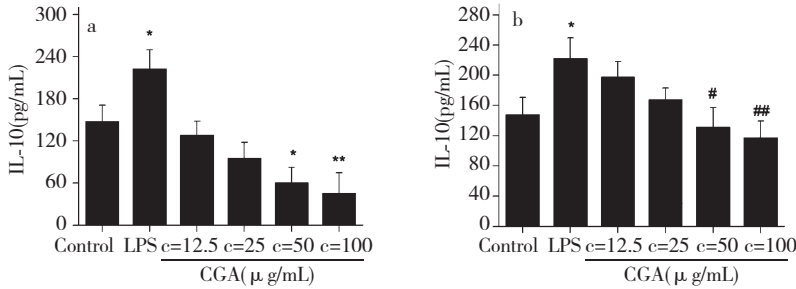


图 4 CGA 和 LPS + CGA 对巨噬细胞产生 IL-10 能力的影响

Fig. 4 The effects of CGA and LPS + CGA on IL-10 production

与空白对照组比较, \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较, # 表示  $P < 0.05$ ; ## 表示  $P < 0.01$ 。

Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared with LPS group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

### 3.5 绿原酸对小鼠腹腔巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的影响

图 5 结果显示,当 CGA 浓度为 50 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  能显著地促进正常和经 LPS 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞释放 TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且呈现剂量依赖性。图 6(a) 结果显示, 与空白对照组相比,

能显著地抑制正常和经 LPS 活化的腹腔巨噬细胞中 IL-10 的释放 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时效果最明显, IL-10 的释放量为 117.56  $\text{pg}/\text{mL}$ 。

高剂量(50 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 CGA 对巨噬细胞释放 IL-1 $\beta$  有极显著的促进作用 ( $P < 0.01$ ), 且随着 CGA 浓度的升高释放量增加。图 6(b) 中, CGA 浓度为 25 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, IL-1 $\beta$  分泌量分别为 489、504、547.8  $\text{pg}/\text{mL}$ , 显著高于 LPS 诱导的巨噬细胞分泌的 IL-1 $\beta$  的量 (437.8  $\text{pg}/\text{mL}$ ,  $P < 0.01$ )。

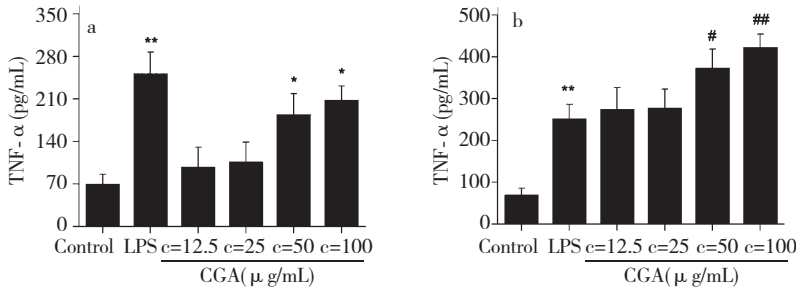


图 5 CGA 和 LPS + CGA 对巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$  能力的影响

Fig. 5 The effects of CGA and LPS + CGA on TNF- $\alpha$  production

与空白对照组比较, \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较, # 表示  $P < 0.05$ ; ## 表示  $P < 0.01$ 。

Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared with LPS group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

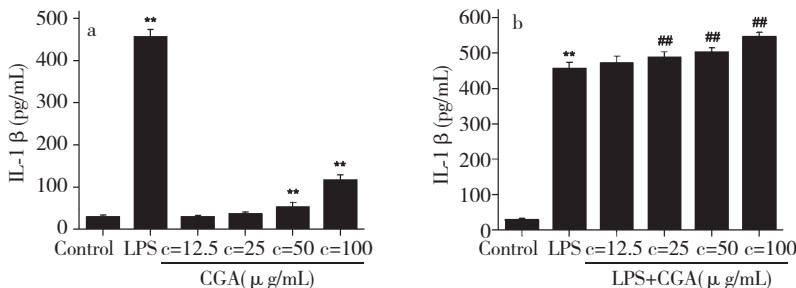


图 6 CGA 和 LPS + CGA 对巨噬细胞产生 IL-1 $\beta$  能力的影响

Fig. 6 The effects of CGA and LPS + CGA on IL-1 $\beta$  production

与空白对照组比较, \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较, # 表示  $P < 0.05$ ; ## 表示  $P < 0.01$ 。

Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared with LPS group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

## 4 讨论

炎症反应是一种重要的机体防御过程,涉及机体活动的许多环节,其中免疫细胞(巨噬细胞、中性粒细胞等)的激活是炎症反应的启动环节<sup>[6]</sup>。巨噬细胞广泛分布于体内,是一类重要的免疫细胞和炎症细胞,在炎症反应中起着重要的作用<sup>[7]</sup>。巨噬细胞是先天性细胞免疫的重要组成部分,有许多功能,包括对外来微生物(细菌、病毒、真菌和寄生虫)的防御和免疫,巨噬细胞具有一系列识别、吞噬、摧毁病原体的细胞表面受体、胞内介质和至关重要的分泌分子<sup>[8]</sup>。

MTT 法因其能快速简便地检测细胞的增殖率和细胞毒性而被广泛使用。其原理是活细胞中的线粒体脱氢酶能将黄色的 MTT 还原成难溶于水的蓝紫色结晶物甲瓩。将甲瓩溶于适当的溶剂(DMSO)中形成紫色溶液<sup>[9]</sup>。本文 MTT 实验结果显示,小鼠腹腔巨噬细胞经 CGA 刺激后,结晶紫形成数量提高,由于原代腹腔巨噬细胞不能在体外培养条件下增殖,这表明 CGA 能有效提高其代谢活力。

吞噬功能是巨噬细胞的重要功能之一,巨噬细胞通过吞噬侵入的病原体及体内衰老、畸变的细胞而提高机体的抗感染能力<sup>[10]</sup>。吞噬能力是衡量巨噬细胞活性的一个重要指标<sup>[11]</sup>。故本文采用中性红法检测巨噬细胞的吞噬能力。结果表明,高浓度的 CGA 对静息和经 LPS 刺激状态下巨噬细胞吞噬能力有增强作用。巨噬细胞对病原体等抗原性异物的识别是通过其表面模式识别受体直接识别某些病原体或其产物所共有的高度保守的特定分子结构 IgG Fc 受体和补体受体识别 IgG 或补体结合的病原体。巨噬细胞和病原体等抗原性异物结合后,经过吞噬和吞饮作用将病原体等摄入胞内形成吞噬体。在吞噬体内,可以通过氧依赖和氧非依赖的杀菌系统杀伤病原体<sup>[12]</sup>。根据结果推测,CGA 可能是通过某个分子结构或生物学机制,促进巨噬细胞表面的 PRR 和病原体或凋亡细胞表面的特定分子结构相结合,从而促进巨噬细胞的吞噬功能,增强巨噬细胞对于外来病原体的固有免疫反应。

NO 是一种多功能介质,参与大量的病理和生理过程。包括单核细胞和巨噬细胞在内的免疫细胞收到刺激时会产生大量 NO<sup>[13]</sup>。NO 是巨噬细胞发挥吞噬功能的基本条件,随着 NO 的增加,巨噬细胞具有更强的吞噬功能<sup>[14]</sup>。据文献<sup>[14]</sup>报道,不同浓

度的 CGA(40 ~ 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )能显著增强静息状态和经 LPS 刺激下巨噬细胞分泌 NO,且具有剂量依赖性,本研究结果与文献结果一致。

IL-10 是一种多功能负性调节因子,主要由 Th2 细胞、活化的 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞产生,它参与免疫细胞、炎症细胞、肿瘤细胞等多种细胞的生物调节,在自身免疫性疾病、严重感染性疾病、肿瘤及移植免疫等多种疾病中发挥重要作用。IL-10 是一种抗炎性因子,可以直接抑制巨噬细胞的功能,发挥下调炎症反应,拮抗炎性介质的作用<sup>[15]</sup>。TNF- $\alpha$  是一种由单核细胞、巨噬细胞和 T 细胞产生的细胞因子,是细胞因子网络的启动因子,在炎症反应中 TNF- $\alpha$  不仅能直接参与炎症反应,还能诱导其他细胞因子如 IL-6、IL-1 $\beta$  等的释放,共同对组织造成损伤<sup>[16]</sup>。IL-1 $\beta$  属于 IL-1 家族,由单核-巨噬细胞产生,是一种重要的促炎因子,具有广泛的生物学效应,参与炎症反应、促进伤口愈合及刺激造血功能等<sup>[17]</sup>。马力<sup>[18]</sup>等人研究表明,绿原酸可促进淋巴细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平升高。此外,绿原酸亦能提高大鼠体内的 IgE、IgG1 和 IL-4 等细胞因子的水平<sup>[19]</sup>,此文献与本文研究结果一致。

因此,本试验以小鼠腹腔巨噬细胞为模型,研究了绿原酸对巨噬细胞代谢活力,吞噬,产生 NO、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10 能力的影响。试验结果表明:(1)不同浓度的绿原酸均能显著促进静息状态下小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO,在浓度为 25 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时可提高巨噬细胞代谢活力,高剂量(50 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的绿原酸可增强巨噬细胞的吞噬能力,促进 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的分泌并减少 IL-10 的产生,增强机体免疫力,且呈现剂量依赖性。(2)当巨噬细胞处于 LPS 活化状态时,在绿原酸浓度为 25 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  可协同 LPS 增强其吞噬能力、促进 IL-1 $\beta$  的释放;高剂量(50 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的绿原酸能增加促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  的释放,减少抗炎细胞因子 IL-10 的分泌量。综上所述,绿原酸可通过促进模型巨噬细胞的代谢活力、吞噬活性、产生 NO 和促炎细胞因子,抑制巨噬细胞产生抗炎细胞因子而发挥免疫调节作用。这为绿原酸的进一步研究奠定了一定的理论基础。

### 参考文献

- 1 Zhou HR (周汉荣). Resources of Chinese Medicine. Beijing: China Medical Science Press(中国医药科技出版社), 1993. 240.

- 2 Wu HZ, Luo J, Yin YX, *et al.* Effects of chlorogenic acid, an active compound activating calcineurin, purified from *Flos lonicerae* on macrophage. *Acta Pharm Sin*, 2004, 25: 1685-1689.
- 3 Wu WH (吴卫华), Kang Z (康桢), Ouyang DS (欧阳冬生), *et al.* Progresses in the pharmacology of chlorogenic acid. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 691-694.
- 4 Jin XH, Ohgami K, Shiratori K, *et al.* Effects of blue honeysuckle (*Lonicera aerulea* L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Exp Eye Res*, 2006, 82: 860-867.
- 5 Hammer M, Mages J, Dietrich H, *et al.* Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med*, 2006, 203: 15-20.
- 6 Pang R (庞然), Zhang SL (张淑玲), Zhao L (赵雷), *et al.* Effect of n-butanol extract from *Melilotus* on pro-inflammatory factors in murine macrophage. *Chin J Mod Med* (中国现代医学杂志), 2009, 19: 2893-2896.
- 7 Yu GW (余功旺), Huang WH (黄文浩), Liu AM (刘爱梅), *et al.* Inflammatory model of mouse peritoneal macrophages. *J Guangdong Pharm Univ* (广东药学院学报), 2014, 30: 766-770.
- 8 Zhang L, Wang CC. Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2014, 13: 138-152.
- 9 Talorete TPN, Bounaziz M, Sayadi S, *et al.* MTT reduction by flavonoids in the absence of cells: Influence of medium type and serum. *Animal Cell Technol: Basic Appl Asp*, 2009, 15: 317-324.
- 10 Ye SS (叶莎莎), Zeng YY (曾耀英), Yin LL (尹乐乐). Effects of salidroside on proliferation, apoptosis, ROS and NO production of murine peritoneal macrophages *in vitro*. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2011, 27: 237-241.
- 11 Chauhan AK, Jakhar R, Paul S, *et al.* Potentiation of macrophage activity by thymol through augmenting phagocytosis. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18: 340-346.
- 12 Chen WF (陈慰峰). *Medical Immunology*. Beijing: People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 2006, 90-91.
- 13 Suzuki C, Aoki-Yoshida A, Kimoto-Nira H, *et al.* Effects of strains of *Lactis* on the production of nitric oxide and cytokines in murine macrophages. *Inflammation*, 2014, 37: 1728-1737.
- 14 Zhang YH (张永红), Guan JY (官佳懿), Cui DF (崔德凤), *et al.* Study on pharmacokinetics of olaquinox in *Carassius auratus*. *Prog Veter Med* (动物医学进展), 2014, 35 (9): 46-51.
- 15 Liu HM (刘红梅), Li SM (李苏楠), Wu TT (吴婷婷), *et al.* Effect of IL-21 on IL-1 $\beta$ , IL-10 and IL-12 mRNA expression in LPS-induced macrophage. *Chin J Vet Sci* (中国兽医学报), 2014, 34: 1653-1662.
- 16 Cui F, Li X, Zhu X, *et al.* MiR-125b inhibits tumor growth and promotes apoptosis of cervical cancer cells by targeting phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit delta. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30: 1310-1318.
- 17 Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 1991, 77: 1627-1652.
- 18 Ma L (马力), Tang FM (唐凤敏), Zeng TS (曾天舒) *et al.* Immune modulatory effects of *Dendranthema morifolium* and chlorogenic acid. *Her Med* (医药导报) 2008, 27: 1168-1170.
- 19 Gong J, Chen SS. Polyphenolic antioxidants inhibit peptide presentation by antigen-presenting cells. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3: 1841-1852.
- (上接第 2115 页)
- 19 Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 1996, 1: 70-76.
- 20 Huang Q (黄群), Yang WG (杨万根), Yu J (余佶), *et al.* Process optimization for antioxidant peptide preparation from *Eucommia* seed meal protein by enzymatic hydrolysis. *Food Sci* (食品科学), 2013, 34: 205-209.
- 21 Xu X, Gao Y, Liu G, *et al.* Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophae thamnoides* L.) oil using response surface methodology. *LWT-Food Sci Technol*, 2008, 41: 1223-1231.
- 22 Li W (李伟), Zhang YT (张应团). The antioxidation effect of *Pyracantha fortuneana* polyphenol *in vitro*. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2008, 29: 121-123.