

桑白皮中 sanggenon B 对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的影响

吴永祥¹, 吴丽萍¹, 胡长玉¹, 万志兵¹, 李丰伯¹, 金泰完^{2*}

¹ 黄山学院生命与环境科学学院, 黄山 245041; ² 韩国安东国立大学食品科学与生物技术学院, 安东 760749

摘要: 采用硅胶柱层析等方法从桑白皮中分离出抗炎活性化合物, 通过波谱分析进行化合物结构鉴定。体外培养 RAW264.7 细胞, 构建脂多糖(LPS)诱导炎症模型, 采用噻唑蓝(MTT)法测定细胞活性, 利用 Griess 法和酶联免疫吸附(ELISA)法分别检测炎症因子一氧化氮(NO)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)的释放量, 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 技术分别测定诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶-2(COX-2)mRNA 和蛋白的表达水平。结果显示: 桑白皮乙醇提取物(MRE)能显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的分泌水平, 且呈现量效关系。对桑白皮进行分离, 得到 1 种抗炎活性化合物, 经波谱数据分析, 确定其为已知的 Diels-Alder 加合物桑根酮 B(sanggenon B)。抗炎活性表明, sanggenon B 显著下调了炎症因子 NO、TNF- α 、IL-6 的合成, 并抑制了 RAW264.7 细胞中 iNOS、COX-2 mRNA 和蛋白的表达水平。研究表明, 从桑白皮中分离出的 sanggenon B 具有一定的抗炎作用, 其抗炎机制可能与调控炎症因子的合成, 降低 iNOS、COX-2 表达有关。

关键词: 桑白皮; 桑根酮 B; RAW264.7 细胞; 炎症; Diels-Alder 加合物

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.7.006

Effect of Sanggenon B from Cortex Mori on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Response in RAW264.7 Cells

WU Yong-xiang¹, WU Li-ping¹, HU Chang-yu¹, WAN Zhi-bing¹, LI Feng-bo¹, KIM Tae-wan^{2*}

¹ College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan 245041, China;

² Department of Food Science and Biotechnology, Andong National University, Andong, 760749, Korea

Abstract: Cortex Mori was separated by silica gel column chromatography to afford the active compound. The structure elucidation of the compound was identified by analysis of spectroscopic data. RAW264.7 cells were stimulated by lipopolysaccharide (LPS) to induce inflammatory model. Cell viability was determined using a methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) were measured by Griess reaction and ELISA, respectively. The inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA and protein levels were measured by qRT-PCR and Western blot, respectively. Results showed Cortex Mori ethanol extract (MRE) was able to inhibit the production of NO in LPS-stimulated RAW264.7 cells, in a dose-dependent manner. One active compound was isolated from Cortex Mori and identified as the Diels-Alder type adducts sanggenon B. The anti-inflammatory results showed that sanggenon B could significantly inhibit the production of NO, TNF- α , and IL-6. Sanggenon B also caused a significant dose-dependent decrease in the mRNA and protein expressions of iNOS, COX-2. In conclusion, sanggenon B isolated from Cortex Mori exhibited obvious anti-inflammatory effect and its mechanism may be related to its regulation on inflammatory cytokines, and inhibition of the expression of iNOS, COX-2.

Key words: Cortex Mori; sanggenon B; RAW264.7 cells; inflammation; Diels-Alder type adducts

桑白皮(Cortex Mori)为桑科植物桑 *Morus alba* L.

的干燥根皮, 是中国、韩国、日本等亚洲国家的传统中药材。桑白皮具有泻肺平喘、消炎、抗浮肿等功效, 可治疗水肿、传染性肝炎、肺热喘咳等症^[1]。现代药理研究表明桑白皮具有抗氧化、抗糖尿病、降血脂及酪氨酸酶抑制等功效^[2-5]。本课题组前期研究

收稿日期: 2018-1-24 接受日期: 2018-05-08

基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2017A398); 安徽省留学回国人员创新项目择优资助计划重点项目(2017srst1)

* 通信作者 E-mail: tk_37@naver.com

表明桑白皮提取物能够有效的抑制 3T3-L1 脂肪细胞分化和消化酶活性(包括 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶),具有潜在的抗肥胖功能^[6]。虽然桑白皮的药理作用和化学成分方面的研究较多,但对桑白皮中抗炎活性成分的分离鉴定及其作用机制的研究仍然缺乏。

炎症是一种复杂的病理过程,是机体对各种组织损伤、病原体侵袭及化学物质刺激等作出的正常防御反应^[7]。长期的炎症反应会伴随着很多疾病的发生和发展,比如心血管疾病、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、糖尿病、脂质代谢异常及癌症等^[8,9]。巨噬细胞 RAW264.7 是一种重要的免疫调节细胞,在炎症反应方面发挥着重要作用。因此,本研究以 RAW264.7 细胞为研究对象,在脂多糖诱导下构建体外炎症模型,并采用硅胶柱层析等方法从桑白皮中分离出抗炎活性化合物,探讨其抗炎作用及作用机制,为新型抗炎药物的开发提供理论基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

NU-8500 型 CO₂ 恒温培养箱(Thermo 公司,美国);IX51 型倒置显微镜(Olympus 公司,日本);SpectraMax-190 型全波长酶标仪(Molecular Devices 公司,美国);ECO™ 实时荧光定量 PCR 仪(illumina 公司,美国)。

1.2 实验材料

桑白皮购自韩国 Omni Herb 公司,经韩国安东国立大学 Kun-Ho Son 教授鉴定为桑(*Morus alba* L.)的干燥根皮。RAW264.7 细胞株购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。胎牛血清、DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司;MTT、LPS、Griess 试剂均购自美国 sigma 公司;TNF- α 、IL-6 试剂盒购自美国 R&D 公司;Kieselgel 60 硅胶、薄层层析板购自德国 Merck 公司;所有分离用有机溶剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 化合物的分离纯化及结构鉴定

将干燥的桑白皮粉碎成粉末,用甲醇在 60 °C 恒温回流提取 3 次,过滤,减压浓缩至浸膏。依次用不同溶剂进行萃取,经旋转蒸发仪浓缩,得到正己烷萃取物、二氯甲烷萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物 5 个不同极性部分,并进行

RAW264.7 细胞抗炎实验,以炎症因子 NO 的释放量为检测指标,评价其抗炎效果,发现乙酸乙酯萃取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 抑制效果最显著。将乙酸乙酯部分上硅胶柱,用氯仿: 甲醇(100: 0~90: 10, v/v)进行梯度洗脱,薄层色谱合并相同组分后,得到 15 个组分,并对组分进行体外 RAW264.7 细胞抗炎实验。将效果显著的第 5 组分继续上硅胶柱,用氯仿: 甲醇(97: 3, v/v)进行洗脱分离,最终获得 1 种具有抗炎活性的化合物 1。利用核磁氢谱、核磁碳谱对化合物进行波谱分析,并结合文献对化合物的结构进行解析。

2.2 RAW264.7 细胞培养及分组

小鼠 RAW264.7 细胞置于 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中培养,培养条件为 37 °C、5% CO₂ 且相对饱和湿度。实验设置空白对照组(DMSO 溶剂)、LPS 模型组(LPS 诱导 + DMSO 溶剂)、MRE 实验组(LPS 诱导 + MRE)、sanggenon B 实验组(LPS 诱导 + Sanggenon B)。

2.3 细胞活力的检测

取对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,贴壁培养 24 h。MRE 处理浓度为 0.02、0.05、0.1 mg/mL, sanggenon B 处理浓度为 0.001、0.002、0.005 mg/mL。培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L 的 MTT,继续培养 3 h 后,吸弃上清液,每孔中加入 200 μ L DMSO 溶液,避光震荡,使紫色结晶充分溶解,于 570 nm 波长处测各孔的吸光值^[10]。

2.4 NO 含量的检测

RAW264.7 细胞以 1×10^6 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 200 μ L,培养 24 h。在实验组分别加入 0.02、0.05、0.1 mg/mL 的 MRE,0.001、0.002、0.005 mg/mL 的 sanggenon B,孵育 1 h 后加入 20 μ L LPS (1 μ g/mL)作用 18 h。收集上清,用 Griess 法检测细胞上清液中 NO 水平^[11]。按照同法用 NO 标准品作吸光值-质量浓度的标准曲线: $Y = 0.0085X + 0.0607$ ($R^2 = 0.991$),通过标准曲线计算细胞上清液中 NO 的浓度。

2.5 TNF- α 、IL-6 水平的检测

RAW264.7 细胞的培养及给药方法同 NO 检测,收集的上清液,采用 ELISA 法测定细胞培养液中的 TNF- α 、IL-6 水平,操作方法参考试剂盒说明书。按同法用 TNF- α 标准品作吸光值-质量浓度的标准曲线: $Y = 0.003X + 0.031$ ($R^2 = 0.992$),用 IL-6

标准品作吸光值-质量浓度的标准曲线: $Y = 0.003X + 0.031$ ($R^2 = 0.995$), 通过标准曲线计算细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 的浓度。

2.6 iNOS、COX-2 mRNA 表达的检测

收集细胞, 利用 Trizol 试剂提取总 RNA, 然后采用 PrimeScript™ RT 试剂将 RNA 逆转入为 cDNAs。以小鼠 β -actin 为内参, 根据引物序列进行 iNOS、COX-2 的实时荧光定量 PCR 反应。引物设计如下: 鼠的 β -actin 正义引物为 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3', 鼠的 β -actin 反义引物为 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'; 鼠的 iNOS 正义引物为 5'-GGA GCG AGT TGT GGA TTG TC-3', 鼠的 iNOS 反义引物为 5'-GTG AGG GCT TGG CTG AGT GAG-3'; 鼠的 COX-2 正义引物为 5'-GAA GTC TTT GGT CTG GTG CCT G-3', 鼠的 COX-2 反义引物为 5'-GTC TGC TGG TTT GGA ATA GTT GC-3'。实时荧光定量 PCR 的反应条件为 95 °C 激活 10 min, 95 °C 变性 15 s, 52 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。

2.7 iNOS、COX-2 蛋白表达的检测

裂解 RAW264.7 细胞, 提取细胞总蛋白。每组定量 25 μ g 蛋白上样, 通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分离, 半干式转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 3 h, 接着用含有 iNOS、COX-

2、 β -actin 的一抗 (1: 100 0) 进行免疫印迹。采用 TBST 缓冲液洗清 3 次后, 用 1: 500 0 稀释的相对应二抗孵育 1 h。滴加发光底物混合物于膜上, 用 X 光曝光、显影及定影。

2.8 数据的统计学分析

所得数据以平均值 \pm 标准差表示, 采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差 (One-way ANOVA) 中的 Duncan's 多重比较法分析, 以 $P < 0.05$ 表示样本间的差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 MRE 对细胞活力及 LPS 诱导的细胞 NO 释放量的影响

由图 1A 可知, 在 0.02 ~ 0.1 mg/mL 浓度下, MRE 对 RAW264.7 细胞活性无显著影响, 与空白对照组相比 (Blank), 无统计学差异 ($P > 0.05$)。由图 1B 可知, 空白对照组 RAW264.7 细胞液中 NO 含量为 $1.59 \pm 0.35 \mu$ M, 细胞经 LPS 刺激后, NO 含量明显升高, 为 $51.27 \pm 3.40 \mu$ M, LPS 模型组与空白对照组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明体外 RAW264.7 细胞炎症模型建立成功。用 MRE (0.02、0.05、0.1 mg/mL) 干预后, 细胞 NO 的含量明显降低, 且随着 MRE 浓度的增加, 其作用效果愈加显著。

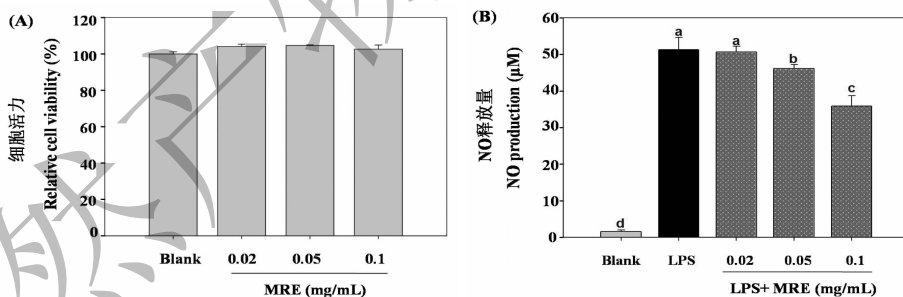


图 1 MRE 对 RAW264.7 细胞活力 (A) 及 LPS 诱导的细胞 NO 含量 (B) 的影响

Fig. 1 Effect of MRE on cell viability (A) and LPS-induced NO production (B) in RAW264.7 cells

3.2 桑白皮中抗炎活性化合物的结构鉴定

化合物 1 无定型粉末; $[\alpha]_D^{22} + 62^\circ$ (c 0.04, MeOH); EI-MS: m/z 570 $[M]^+$, 分子式为 $C_{33}H_{30}O_9$ 。 1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): δ 1.45 (6H, s, CH_3 -11 and CH_3 -16), 1.61 (3H, s, CH_3 -11), 1.87 (1H, dd, $J = 4$ and 14, H-20), 1.98 (1H, dd, $J = 2$ and 14, H-20), 2.35 (1H, d, $J = 17$, H-18), 2.71 (1H, ddd, $J = 2, 4$ and 17, H-18), 2.75 (1H, dd, $J = 7$

and 14, H-9), 3.15 (1H, dd, $J = 9$ and 14, H-9), 3.16 (1H, m, H-14), 5.23 (1H, br dd, $J = 7$ and 9, H-10), 5.53 (1H, br s, H-15), 5.87 (1H, s, H-8), 6.24 (1H, d, $J = 2$, H-23), 6.36 (1H, dd, $J = 2$ and 8, H-25), 6.42 (1H, d, $J = 2$, H-3'), 6.55 (1H, dd, $J = 2$ and 8, H-5'), 6.96 (1H, d, $J = 8$, H-26), 7.39 (1H, d, $J = 8$, H-6'), 11.95 (1H, s, 5-OH, disappeared on addition of D_2O); ^{13}C NMR (125 MHz, acetone- d_6): δ

101.6 (C-2), 91.2 (C-3), 187.6 (C-4), 98.1 (C-4a), 161.4 (C-5), 110.1 (C-6), 164.6 (C-7), 94.4 (C-8), 161.4 (C-8a), 31.1 (C-9), 117.7 (C-10), 135.9 (C-11), 25.0 (C-12), 17.2 (C-13), 132.4 (C-14), 131.8 (C-15), 70.8 (C-16), 26.8 (C-17), 33.9 (C-18), 30.9 (C-19), 38.5 (C-20), 118.3 (C-21), 154.7 (C-22), 102.9 (C-23), 156.7 (C-24), 107.5 (C-25), 129.6 (C-26), 120.4 (C-1'), 160.3 (C-2'), 98.6 (C-3'), 160.3 (C-4'), 108.9 (C-5'), 124.8 (C-6')。结合文献报道^[12,13], 鉴定化合物为 sanggenon B(桑根酮 B), 其结构式如图 2。

3.3 Sanggenon B 对细胞活力及 LPS 诱导的细胞 NO 释放量的影响

由图 3A 可知, 不同浓度 sanggenon B (0.001、0.002、0.005 mg/mL) 作用于 RAW264.7 细胞 24 h 后, 其细胞存活率分别为 103.29%、100.98%、

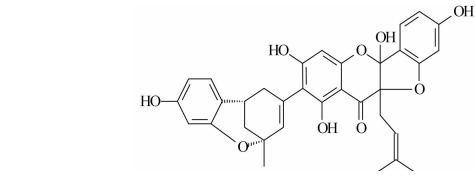
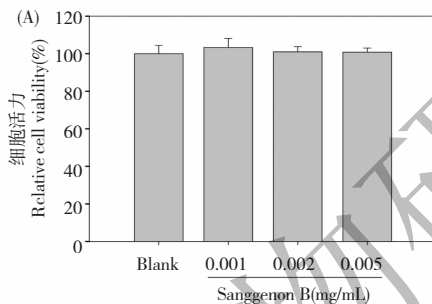


图 2 Sanggenon B 的化学结构

Fig. 2 Chemical structure of the sanggenon B

100.83%, 表明 sanggenon B 在 0.005 mg/mL 浓度内, 对 RAW264.7 细胞无明显毒性作用, 可用于后续实验的研究。由图 3B 可知, LPS 模型组 RAW264.7 细胞液中 NO 含量为 $48.31 \pm 2.64 \mu\text{M}$, 用 0.005 mg/mL sanggenon B 干预后, 细胞液中 NO 含量为 $27.56 \pm 2.32 \mu\text{M}$, 对 NO 生成的抑制率为 42.95%。与 LPS 模型组相比较, sanggenon B 显著地抑制了 LPS 诱导的细胞 NO 的产生, 呈剂量依赖性, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

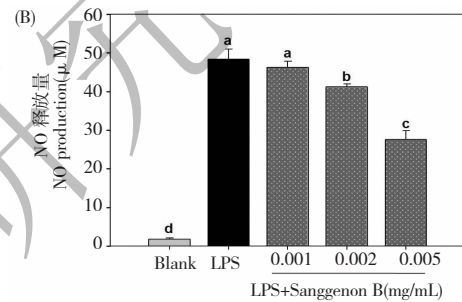


图 3 Sanggenon B 对 RAW264.7 细胞活力 (A) 及 LPS 诱导的细胞 NO 含量 (B) 的影响

Fig. 3 Effect of sanggenon B on cell viability (A) and LPS-induced NO production (B) in RAW264.7 cells

3.4 Sanggenon B 对细胞 TNF- α 、IL-6 水平的影响

由表 1 可知, 与空白对照组比较, LPS 模型组在给予 LPS 刺激后, 细胞中 TNF- α 、IL-6 水平显著提高。空白对照组中 TNF- α 、IL-6 浓度分别为 0.92 ± 0.17 、 $0.05 \pm 0.01 \text{ ng/mL}$, 而 LPS 模型组分别为

31.56 ± 0.53 、 $2.32 \pm 0.44 \text{ ng/mL}$, 存在着显著性差异 ($P < 0.05$)。与 LPS 模型组相比, sanggenon B 可以明显抑制 LPS 诱导细胞的 TNF- α 、IL-6 水平, 随着 sanggenon B 浓度的增加, TNF- α 、IL-6 的含量呈浓度依赖性减少, 且有统计学差异 ($P < 0.05$)。

表 1 Sanggenon B 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TNF- α 、IL-6 含量的影响

Table 1 Effect of sanggenon B on LPS-induced TNF- α 、IL-6 production in RAW264.7 cells

组别 Groups	浓度 Concentration (mg/mL)	TNF- α (ng/mL)	IL-6 (ng/mL)
空白对照组 Blank	-	0.92 ± 0.17^d	0.05 ± 0.01^c
LPS 模型组 LPS	-	31.56 ± 0.53^a	2.32 ± 0.44^a
Sanggenon B 实验组	0.001	31.16 ± 1.13^a	2.20 ± 0.07^{ab}
LPS + Sanggenon B	0.002	15.66 ± 1.54^b	2.12 ± 0.08^{ab}
	0.005	7.71 ± 2.11^c	1.68 ± 0.09^b

注: 同列不同字母表示在统计学上具有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$).

3.5 Sanggenon B 对细胞 iNOS、COX-2 表达的影响

由表 2 可知,与空白对照组比较,LPS 模型组在给予 LPS 刺激后,细胞中 iNOS、COX-2 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与 LPS 模型组相比,sanggenon B 对 iNOS、COX-2 mRNA 表达有显著的抑制作用,且具有浓度依赖性。当 sanggenon B 浓度为 0.005 mg/mL 时,对 iNOS、COX-2 mRNA 表达水平

的抑制率分别为 79%、53%。由图 4 可知,LPS 作用后,iNOS、COX-2 蛋白表达水平明显升高,sanggenon B 作用后能够显著下调 iNOS、COX-2 蛋白表达的水平。结果表明,sanggenon B 可通过调节 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 mRNA 和蛋白的表达来达到抗炎作用。

表 2 Sanggenon B 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 mRNA 表达水平的影响

Table 2 Effect of sanggenon B on LPS-induced iNOS,COX-2 mRNA expression in RAW264.7 cells

组别 Groups	浓度 Concentration (mg/mL)	iNOS / β -actin	COX-2 / β -actin
空白对照组 Blank	-	0.07 \pm 0.01 ^c	0.03 \pm 0.01 ^d
LPS 模型组 LPS	-	1.00 \pm 0.00 ^a	1.00 \pm 0.00 ^a
Sanggenon B 实验组	0.001	0.44 \pm 0.19 ^b	0.77 \pm 0.19 ^{ab}
LPS + Sanggenon B	0.002	0.32 \pm 0.11 ^{bc}	0.62 \pm 0.06 ^{bc}
	0.005	0.21 \pm 0.11 ^{bc}	0.47 \pm 0.10 ^c

注:同列不同字母表示在统计学上具有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$).

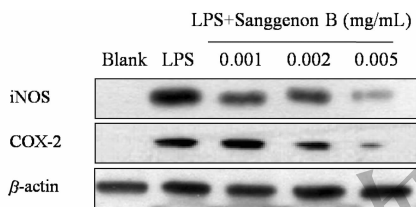


图 4 Sanggenon B 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Effect of sanggenon B on LPS-induced iNOS,COX-2 protein expression in RAW264.7 cells

4 讨论

桑白皮中含有丰富的结构新颖的 Diels-Alde 型加合物^[14-16],包括 sanggenon C、sanggenon D、sanggenon O、mulberrofuran G、kuwanon H、guangsangon B、guangsangon L。药理实验表明这些 Diels-Alde 型加合物具有多种生物活性,如抗高血压、抗氧化、抑菌、抗炎和美白等^[17,18]。Sanggenon B 是从桑白皮中分离得到的 1 种 Diels-Alde 型加合物,具有抗菌、抑制环氧合酶和脂氧化酶等生物活性^[17,19]。由此可见,国内外学者对 sanggenon B 抗炎作用的研究仍然缺乏,其抗炎作用机制的阐明尚未见报道。因此,本研究以从桑白皮中分离出的 sanggenon B 为研究对象,通过构建体外的 LPS 诱导炎症模型,探讨 sanggenon B 对 RAW264.7 细胞 NO

水平的影响,并初步阐明其抗炎作用的机制。

巨噬细胞是参与炎症反应的一种重要的炎性细胞,在炎症发展过程中发挥着至关重要的作用。当 RAW264.7 细胞受到脂多糖等外界刺激时,诱导大量炎症因子的合成与释放,如 NO,前列腺素 E₂ (PGE₂) 等炎症介质以及 TNF- α 、IL-6 等促炎性细胞因子,并促进 iNOS、COX-2 的过量表达,从而导致机体出现一系列的炎症反应^[20]。本实验结果显示,sanggenon B 显著抑制了 LPS 诱导的细胞 NO 的产生,且细胞中炎症因子 TNF- α 、IL-6 的含量均显著性减少,说明 sanggenon B 是通过抑制炎症反应来体现其抗炎效果。iNOS 和 COX-2 是 NO 和 PGE₂ 合成的上游关键酶,其表达水平直接限速了下游 NO 和 PGE₂ 的产生^[21]。因此,调控 iNOS 和 COX-2 的表达是控制炎症发生、发展的关键。在实验中,我们发现 LPS 作用后,iNOS、COX-2 mRNA 和蛋白表达水平明显升高,用 sanggenon B 干预后,上述异常情况均得到了有效的逆转。实验提示,sanggenon B 通过调控 iNOS、COX-2 mRNA 和蛋白的表达,降低了 TNF- α 、IL-6 等促炎性细胞因子的水平,从而抑制 RAW264.7 细胞分泌 NO 等炎症介质来发挥抗炎作用。

综上所述,本研究从桑白皮中分离得到了具有抗炎作用的 sanggenon B,其抗炎机制可能与调控炎症因子的合成,降低 iNOS、COX-2 mRNA 和蛋白表

达有关。这些结果有望为 sanggenon B 作为治疗炎症疾病先导化合物的开发及临床应用提供一定的科学依据。

参考文献

- Li ML(李墨灵), Zhang H(张晗), Xia QM(夏庆梅). Research progress of chemistry, pharmacology, pharmacokinetics of SangBaiPi[J]. *West J Tradit Chin Med* (西部中医药), 2017, 30:137-139.
- EI-Beshbishy HA, Singab AN, Sinkkonen J, et al. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats[J]. *Life Sci*, 2006, 78:2724-2733.
- Yu ZR, Hung CC, Weng YM, et al. Physicochemical, antioxidant and whitening properties of extract from root cortices of mulberry as affected by membrane process[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2007, 40:900-907.
- Zhang M, Chen M, Zhang HQ, et al. *In vivo* hypoglycemic effects of phenolics from the root bark of *Morus alba*[J]. *Fitterapia*, 2009, 80:475-477.
- Feng WS(冯卫生), Yuan PP(袁培培), Niu Y(牛艳), et al. Influence on substance and energy metabolism of diabetic mouse model of chemical split fractions of *Mori Cortex*[J]. *World Sci Technol-Modern Trad Chin Med Mater Med*(世界科学技术-中医药现代化), 2015, 17:464-470.
- Wu YX, Kim YJ, Li S, et al. Anti-obese effects of mulberry (*Morus alba* L.) root bark through the inhibition of digestive enzymes and 3T3-L1 adipocyte differentiation[J]. *Korean J Food Preserv*, 2015, 22:27-35.
- Shi MQ(石孟琼), Qin HL(覃慧林), Zhang YF(张永峰), et al. Effect of total triterpene from *Chaenomeles speciosa* (sweet) Nakaion on cytokines in LPS-stimulated RAW264.7 cells[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中国药理与临床), 2016, 32:76-80.
- Sardi F, Fassina L, Venturini L, et al. Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly[J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 11:149-153.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer[J]. *Nature*, 2002, 420:860-867.
- Wang SX(王书侠), Zhang JM(张家明), Yao XM(姚孝明), et al. Effects of luteolin on the secretion of inflammatory cytokines from activated RAW264.7 macrophages[J]. *J Med Postgra*(医学研究所学报), 2017, 30:31-35.
- Li XJ(李小军), Huang WC(黄玮超), Li Z(李芝), et al. Chemical composition, anti-inflammatory and cytotoxic activities of essential oils from different parts of *Acanthopanax eodiaefolius*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27:1156-1161.
- Nomura T, Fukai T, Hano Y, et al. Constituents of the Chinese crude drug "Sang-Bai-Pi" (*Morus* root bark)[J]. *Planta Med*, 1983, 47:95-99.
- Hano Y, Itoh M, Fukai T, et al. Revised structure of sanggenon B[J]. *Heterocycles*, 1985, 23:1691-1696.
- Zheng ZG(郑兆广), Wang RS(王汝上), Tang D(汤丹), et al. Chemical constituents of Cortex Mori[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23:399-400.
- Lu XH(陆向红), Su Y(苏云), Ren QL(任其龙), et al. Separation of sanggenon D from Sangbaipi[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2002, 14:48-53.
- Dai SJ(戴胜军), Lv ZM(吕子明), Chen RY(陈若芸), et al. Structure and spectral characteristics of Diels-Alder type adducts from *Morus*[J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2005, 40:876-881.
- Sohn HY, Son KH, Kwon CS, et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai[J]. *Phytomedicine*, 2004, 11:666-672.
- Chang LW, Juang LJ, Wang BS, et al. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark[J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49:785-790.
- Cheon BS, Kim YH, Son KS, et al. Effects of prenylated flavonoids and biflavonoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from the mouse macrophage cell line RAW 264.7[J]. *Planta Med*, 2000, 66:596-600.
- Yang LH(杨利红), Zhao FM(赵费敏), Zhang T(张特), et al. Isolation of active compounds from Cortex Mori and its mechanism on anti-inflammatory[J]. *Chin Arch Trad Chin Med*(中华中医药学刊), 2016, 34:3008-3012.
- Tavares E, Minano FJ, Maldonado R, et al. Endotoxin fever in granulocytopenic rats: evidence that brain cyclooxygenase-2 is more important than circulating prostaglandin E₂[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80:1375-1387.