

三峡阳菊叶水提物的抗炎作用研究

李凤玲^{1, 2, 3}, 李陈钦瑶^{1, 2}, 段秀英^{1, 2}, 卢圣鄂⁴, 任风鸣⁴, 刘可春^{1, 2*}, 张云^{1, 2*}

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

2. 山东省斑马鱼人类疾病模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103

3. 山东师范大学生命科学学院, 山东 济南 250000

4. 重庆市药物种植研究所, 重庆 408435

摘要: 目的 利用斑马鱼炎症模型, 评价三峡阳菊叶水提取物(WELTGY)的抗炎作用并对其机制进行初步研究。方法 选取受精后3 d (3 dpf)的转基因斑马鱼移入6孔板中, 设置对照组(胚胎培养用水)、模型组(胚胎培养用水)和WELTGY 0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL组, 作用3 h后, 向除对照组外的其他组中分别加入硫酸铜, 终浓度为20 μ mol/L, 作用1 h后在荧光显微镜下观察转基因品系Tg (zlyz: EGFP)斑马鱼体内炎症细胞迁移情况; 应用DCFH-DA活性氧(ROS)探针AB 野生型斑马鱼染色, 观察荧光强度; 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)测定野生型斑马鱼炎症相关基因的mRNA水平。结果 与模型组比较, 0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL WELTGY组斑马鱼中迁移至侧线部位的炎症细胞数量显著减少 ($P < 0.01$), 斑马鱼荧光强度明显降低, ROS含量减少。与模型组比较, 0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL WELTGY组过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)的mRNA表达显著升高($P < 0.05$ 、 0.01), 核因子抑制蛋白A(I κ B α)、激活蛋白-1(AP-1)的mRNA表达显著降低($P < 0.01$), 炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和前列腺素E2合成酶(PGES)、髓样分化因子(MyD88)、环氧合酶(COX)-2的mRNA表达显著降低($P < 0.01$); 1.6、3.2 mg/mL WELTGY组核转录因子(NF- κ B)的mRNA表达显著下降($P < 0.05$ 、 0.01); 1.6 mg/mL WELTGY组IL-12 α 的mRNA表达显著下降($P < 0.01$)。结论 通过构建斑马鱼急性炎症模型验证了WELTGY具有抗炎作用, 其机制可能是WELTGY抑制ROS释放, 激活PPAR γ 表达, 抑制NF- κ B和AP-1转录活性, 降低炎症因子表达, 从而缓解炎症, 为三峡阳菊叶在饲料添加剂中的应用提供参考。

关键词: 三峡阳菊叶; 水提物; 斑马鱼; 抗炎; 作用机制; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 核转录因子; 激活蛋白-1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2021) 08-1600-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.08.005

Anti-inflammatory effect of water extract from leaves of Three Gorges Yangju

LI Fengling^{1, 2, 3}, LI Chenqinyao^{1, 2}, DUAN Xiuying^{1, 2}, LU Shenge⁴, REN Fengming⁴, LIU Kechun^{1, 2}, ZHANG Yun^{1, 2}

1. Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences) Institute of Biology, Jinan 250103, China

2. Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Jinan 250103, China

3. School of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250000, China

4. Chongqing Pharmaceutical Planting Research Institute, Chongqing 408435, China

Abstract: Objective To evaluate the anti-inflammatory effect of water extracts from leaves of Three Gorges Yangju (WELTGY) and investigate the molecular mechanisms using a zebrafish inflammatory model. **Methods** The transgenic zebrafish 3 days post

收稿日期: 2021-05-30

基金项目: 山东省技术创新引导计划(鲁渝科技协作)项目(2020LYXZ017); 重庆市科技局鲁渝科技合作项目(CSTC2020JSCX-LYJ-SA0030); 山东省优秀青年人才基金项目(ZR2020YQ60); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2020KJC-ZD08)

第一作者: 李凤玲(1995—)女, 硕士, 研究方向为基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价。Tel: (0531)82605331

E-mail: 17853532669@163.com

***共同通信作者:** 张云(1982—), 女, 博士, 研究员, 主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价。Tel: (0531)82605331

E-mail: xiaohan_0818@163.com

刘可春(1964—), 男, 博士, 研究员, 主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与新药研发。Tel: (0531)82605352

E-mail: hliukch@sdas.org

fertilization (3 dpf) were transferred into 6-well plate. Control group (water for embryo culture), model group (water for embryo culture) and WELTGY 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg/mL groups were set up. After 3 hours of treatment, CuSO_4 was added to other groups except the control group, and the final concentration was 20 $\mu\text{mol/L}$. The migration of inflammatory cells in transgenic strain TG (zlyz: EGFP) zebrafish was observed under fluorescence microscope after 1 h; DCFH-DA reactive oxygen species (ROS) probe was used to stain the AB wild type zebrafish and observe the fluorescence intensity. Real time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA levels of inflammation related genes in wild-type zebrafish. **Results** Compared with model group, the number of inflammatory cells migrating to the lateral line of zebrafish in 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mg/mL WELTGY groups were significantly decreased ($P < 0.01$), the fluorescence intensity of zebrafish in 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mg/mL WELTGY groups was significantly decreased, and the ROS content was decreased. Compared with model group, the mRNA expression of PPAR γ in 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mg/mL WELTGY groups was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), and the mRNA expression of IkB α and AP-1 was significantly decreased ($P < 0.01$). The mRNA expressions of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, PTGES, MyD88 and COX-2 were significantly decreased ($P < 0.01$). The mRNA expression of NF- κ B in 0.8, 1.6 and 3.2 mg/mL WELTGY groups were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). The mRNA expression of IL-12 α in 1.6 mg/mL WELTGY group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** This study verified the anti-inflammatory effect of WELTGY in a zebrafish acute inflammation model. WELTGY could inhibit the release of ROS, activate the expression of PPAR γ , inhibit the transcription activities of NF- κ B and AP-1, and reduce the expression of inflammatory factors, thus alleviating inflammation. This study provided a reference for the application of Three Gorges Yangju's leaves in feed additives.

Key words: Three Gorges Yangju leaf; water extract; zebrafish; anti-inflammatory; mechanism; PPAR γ ; NF- κ B; AP-1

菊花 *Chrysanthemum morifolium* Ramat 为我国常用大宗药材,药食兼用。三峡阳菊是菊花的品种之一,主产于三峡库区腹地的云阳、万州和奉节县^[1],是杭白菊在三峡库区经多年驯化、选择形成的地方栽培品种。2020年三峡阳菊入选农业农村部“全国乡村特色农产品”,目前已达33平方公里以上的种植规模。现代药理研究表明,菊花提取物具有抗菌、抗炎、抗氧化、肝保护等多种生物活性,是良好的抗生素替代品。近年来,大量研究表明^[2-6],菊叶中同样含有花中的多种生物活性物质,如类黄酮、挥发油、萜类和多糖等,具有较好的抑菌、抗氧化等活性,而对菊叶抗炎活性的研究未见报道。本实验评价三峡阳菊叶提取物的抗炎活性,以期将菊叶作为饲料添加剂原料加以工业化利用,不仅能够充分利用生物资源,还能有效保护生态环境。

斑马鱼是一种热带淡水鱼,具有独特的生物学、遗传学优势。斑马鱼免疫系统高度保守,具有与人类相似的完整炎症细胞迁移和吞噬等反应体系^[7],是一种良好的脊椎动物模式生物,已被广泛地应用于药理学、发育生物学、新药筛选等领域。本实验采用硫酸铜诱导法建立斑马鱼炎症模型,研究三峡阳菊叶水提取物(water extract from leaves of Three Gorges Yangju, WELTGY)的抗炎活性及作用机制,为三峡阳菊叶的有效利用提供参考。

1 材料

1.1 实验仪器

SZX16型荧光显微镜及DP2-BSW图像采集系统(日本奥林巴斯公司);体视显微镜AXIO Zoom.V16(德国蔡司公司);斑马鱼养殖饲养设备(北京爱生科技公司);实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪(美国罗氏公司)。

1.2 试剂和样品

WELTGY由重庆市药物种植研究所制备并提供,阳菊叶片材料来源于重庆市云阳县芸山农业阳菊种植基地(108°42' E, 30°54' N, 665 m),于菊花采摘完毕后割取地上部分茎叶,自然风干取菊叶部分,样品采集时间为2020年12月1日。取风干叶片材料200 g,剪碎,水回流提取法提取,液料比为10:1,提取时间为120 min。提取液经真空泵滤纸抽滤,滤液65 °C减压蒸馏浓缩得WELTGY,提取率为32.5%。WELTGY中3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸质量分数为8.4%、绿原酸质量分数为7.4%、木犀草苷质量分数为3.6%。

硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,质量分数99.0%,购于国药集团化学试剂有限公司,批号20150603);RNA提取试剂盒(购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司);DCFH-DA活性氧(ROS)检测探针(10 mmol/L,购于南京建成生物科技有限公司);斑马鱼胚胎培养用水(5.0 mmol/L NaCl, 0.17 mmol/L KCl, 0.4 mmol/L CaCl_2 , 0.16 mmol/L MgSO_4)。

2 方法

2.1 溶液配制

WELTGY、硫酸铜、DCFH-DA 活性氧检测探针分别使用斑马鱼胚胎培养用水配制成 12 mg/mL、20 mmol/L、30 μ mol/L 的溶液。

2.2 斑马鱼胚胎的获取

成熟 AB 野生型斑马鱼和绿色荧光标记炎症细胞的转基因斑马鱼品系 Tg(zlyz:EGFP) 由山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供,雌雄斑马鱼在照明 14 h/黑暗 10 h、28 °C 标准条件下分开饲养,定时喂以颗粒状饵料和卤虫。用卵时,取健康性成熟的斑马鱼,按雌雄 2:2 或 1:2 的比例放入交配缸内,次日 10:00—11:00 时获得受精卵,用养鱼水对胚胎清洗 3 遍,然后用 0.1% 的亚甲基蓝消毒后,移入斑马鱼胚胎培养用水中,28 °C 下控光培养。

2.3 硫酸铜诱导炎症模型、分组及给药

在显微镜下挑取荧光正常且发育至 3 dpf 的转基因斑马鱼,小心移入 6 孔板的样孔中,每孔 40 尾幼鱼,设置对照组(胚胎培养用水)、模型组和 WELTGY 0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL 组,每个浓度组设 2 个重复孔。各个组作用 3 h 后,向除对照组外的其他组中分别加入浓度为 20 mmol/L 的硫酸铜,使硫酸铜作用浓度为 20 μ mol/L,作用 1 h 后在荧光显微镜下观察炎症细胞迁移情况,统计泄殖腔后迁移至侧线的炎症细胞个数。

2.4 ROS 含量测定

采用 DCFH-DA 活性氧检测探针测定斑马鱼体内 ROS 的含量。采用给药且硫酸铜造模后的野生型斑马鱼,给药及造模操作见“2.3”项,每组 10 条,用新鲜的养鱼水清洗 2~3 遍,加入 30 μ mol/L 染液

后避光放入 28 °C 恒温培养箱中孵育 40 min,然后用新鲜养鱼水将染液洗净,在体视显微镜下拍照并观察荧光强度变化情况。

2.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)测定炎症相关基因的 mRNA 水平

斑马鱼给药及造模操作见“2.3”项,收集斑马鱼组织放入匀浆器中,利用 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 提取 RNA。将各组样本 RNA 逆转录得到 cDNA,采用 BIO-RAD CFX96 实时系统测定与炎症相关基因的表达量,实验重复 3 次。

实时定量 PCR 扩增反应条件为 95 °C 预变性 30 s 1 个循环后,每个循环变性 95 °C 10 s,退火 60 °C 10 s,共 40 个循环,最后 95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s 1 个循环。结果分析时以 β -actin 为内参,对结果进行相对定量分析。目的基因过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、核转录因子(NF- κ B)、白细胞介素(IL)-1 β 、环氧化酶(COX)-2、前列腺素 E2 合成酶(PTGES)、髓样分化因子(MyD88)、激活蛋白-1(AP-1)、核因子抑制蛋白 A(I κ B α)、IL-6、IL-12 α 以及内参基因 β -actin 的 PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成、纯化,并经质量检测。引物序列见表 1。

3 结果

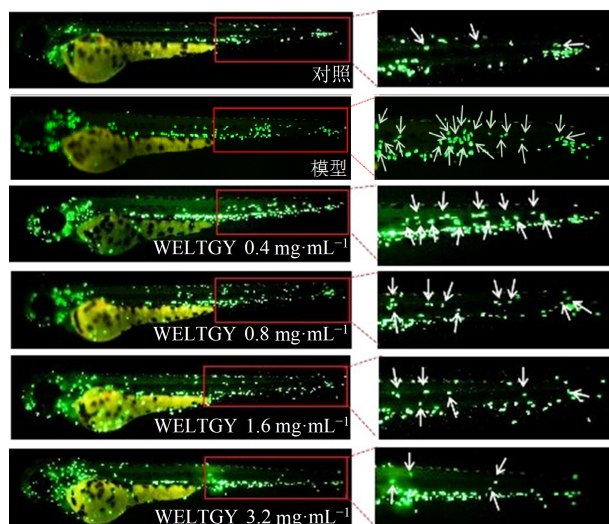
3.1 WELTGY 对硫酸铜引起的炎症细胞聚集的影响

利用硫酸铜损伤神经丘(斑马鱼体表侧线器的末梢器官),造成斑马鱼炎症细胞迁移至神经丘周围(侧线部位),建立硫酸铜诱导的斑马鱼炎症模型,通过计算迁移到斑马鱼侧线部位的炎症细胞数目来评价药物的抗炎活性。如图 1、2 所示,与对照组比,模型组斑马鱼迁移至侧线的炎症细胞数量显

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	正向引物序列	反向引物序列
β -actin	5'-AGAGCTATGAGCTGCCTGACG-3'	5'-CCGCAAGATTCCATACCCA-3'
PPAR γ	5'-CACTCGCTGGACATCAAGCC-3'	5'-TCCTGTAGCTGTACATGTGCGT-3'
IL-1 β	5'-ATGGCAGAAGTACCTAAGCTC-3'	5'-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGTCACT-3'
COX-2	5'-ATCCTGTTGTCAAGGTCCCA-3'	5'-CAAGGGTGCGGGTGTAAAT-3'
PTGES	5'-ATCATTCTTGGAGCGGTCTACT-3'	5'-TACTCTGAGCGATGACATAGGC-3'
Myd88	5'-TGAAGGTGAAGCTCTTCTTGAATGC-3'	5'-CTCCGGACCCGATTGGTCTTA-3'
AP-1	5'-CCACCGCTCTCTCCTATC-3'	5'-ATCCTCTCCAGTTTCCTCTT-3'
I κ B α	5'-GGTGGAAAGACTCCTGAAAGC-3'	5'-TGTAAGTTAGGGAAGGTAAGAATG-3'
NF- κ B	5'-ACAAGACGCAAGGAGCCAG-3'	5'-AACTGTCTCTTGCACAAAGGGCTCA-3'
IL-6	5'-CACTCAGAGACGAGCAGTTTG-3'	5'-TCAGGACGCTGTAGATTTCGC-3'
IL-12 α	5'-ACTCCTACAAGCCCAGCAC-3'	5'-GGACACTCGGTTCGTCAAAC-3'

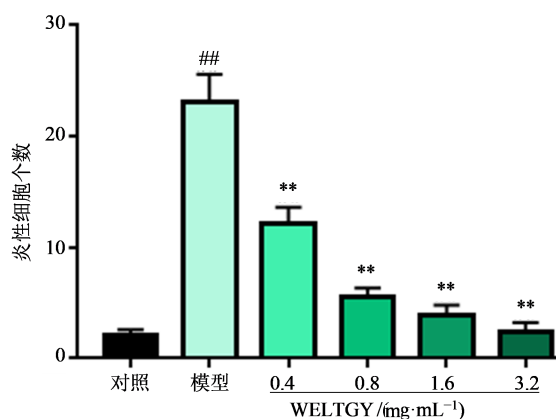


白色箭头指示迁移至侧线部位的炎症细胞

White arrows indicate inflammatory cells migrating to lateral line

图1 WELTGY对斑马鱼炎症细胞聚集迁移的影响

Fig. 1 Effects of WELTGY on migration and aggregation of inflammatory cells in zebrafish



与对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $**P < 0.01$

$##P < 0.01$ vs control group; $**P < 0.01$ vs model group

图2 WELTGY对斑马鱼炎症细胞聚集迁移数量的影响

Fig. 2 Effects of WELTGY on number of migration and aggregation inflammatory cells in zebrafish

著增多 ($P < 0.01$), 硫酸铜导致幼鱼发生炎症反应; 与模型组比较, 0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL WELTGY 组斑马鱼机体中迁移至侧线部位的炎症细胞数量显著减少 ($P < 0.01$)。

3.2 WELTGY降低了斑马鱼体内ROS的产生

ROS 染色结果如图3所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼荧光强度明显提高, ROS 含量升高。与模型组比较, 0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL WELTGY 组斑马鱼荧光强度明显降低, ROS 含量减少。

3.3 WELTGY对斑马鱼炎症相关基因表达的影响

与对照组比较, 模型组斑马鱼中 PPAR γ 的 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$), NF- κ B、IkB α A、

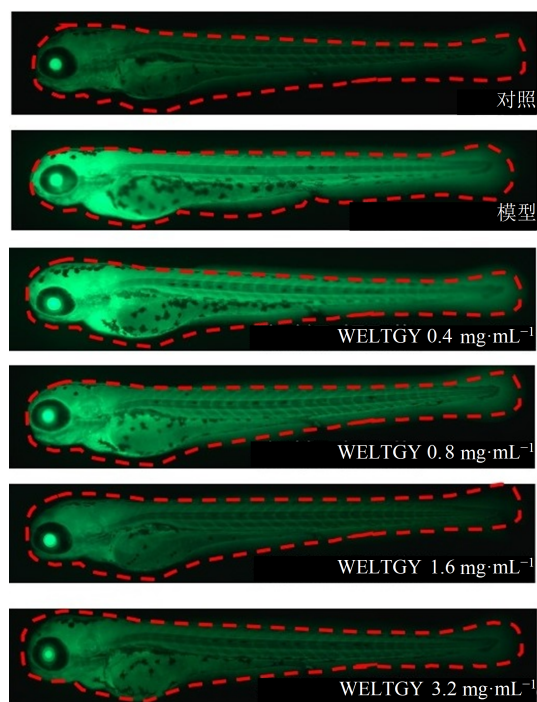


图3 WELTGY对斑马鱼体内ROS产生的影响

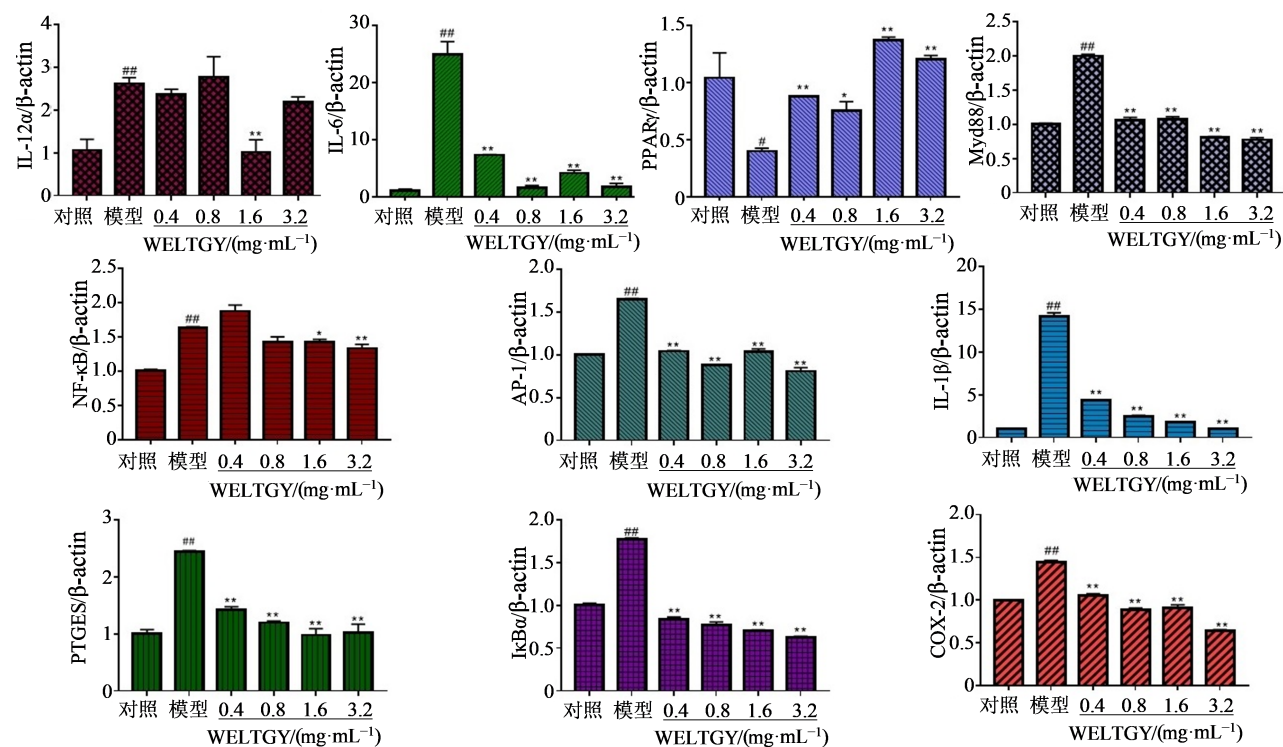
Fig. 3 Effects of WELTGY on ROS production in zebrafish

AP-1 的 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$), 炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-12 α 和 PTGES、Myd88、COX-2 的 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL WELTGY 组 PPAR γ 的 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), IkB α A、AP-1 的 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$), 炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 PTGES、Myd88、COX-2 的 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 1.6、3.2 mg/mL WELTGY 组 NF- κ B 的 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$ 、0.01); 1.6 mg/mL WELTGY 组 IL-12 α 的 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$)。结果见图4。

4 讨论

本实验利用斑马鱼炎症模型研究了 WELTGY 的抗炎活性和作用机制。采用硫酸铜制备斑马鱼炎症模型, 与对照组比较, 模型组斑马鱼体内炎症细胞迁移或聚集数量显著增多, 表明斑马鱼体内发生炎症反应。将炎症模型的斑马鱼暴露于不同浓度 WELTGY (0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL) 中 3 h, 与模型组比较, 斑马鱼体内炎症细胞迁移和聚集数量明显减少, 表明 WELTGY 具有抗炎活性。

有氧生物对分子氧的利用不可避免地导致了一些含氧活性物质的形成, 这些含氧活性物质统称 ROS^[8]。在免疫系统信号传递过程中 ROS 至关重要, 但过量的 ROS 会导致多种生理化损害^[9]。硫酸铜是一种导致斑马鱼急性炎症的物质, 与物理性损



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图4 WELTGY对斑马鱼炎症通路相关基因表达水平的影响

Fig. 4 Effects of WELTGY on mRNA levels of inflammatory-related genes in zebrafish

害不同,硫酸铜诱导斑马鱼炎症是无创伤性的。硫酸铜能够通过抑制总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性和谷胱甘肽(GSH)浓度,显著提高ROS水平^[10]。硫酸铜可以使斑马鱼炎症细胞迅速向神经隆起移动,具有抗炎活性的化合物可以抑制炎症细胞向神经丘的迁移,使这些炎症细胞返回,利用这一观察结果评价化合物的抗炎活性。Li等^[11]选取健康的斑马鱼幼鱼,在模型组与药物组加入硫酸铜1 h后观察并成像炎症反应,发现通关藤皂苷H(TH)显著抑制硫酸铜处理后炎症细胞向神经丘的迁移,证明了TH具有明显的抗炎活性。本实验采取相同的硫酸铜造模方法验证了WELTGY具有抗炎活性。

NF-κB家族一直被认为是炎症过程的中心介质,是先天性和适应性免疫反应的关键参与者^[12]。IκBα是IκB(inhibitor of NF-κB)的家族成员之一,在真核细胞中均有分布^[13]。在静息状态下,NF-κB存在于细胞核外,以非激活形式与IκB聚合;而在病理状态下,NF-κB可被促炎细胞因子和细胞外基质降解产物等激活,同时IκB降解,NF-κB跨过细胞膜进入细胞核,在核内与特定基因结合诱导转录过程的发生^[14]。AP-1是一类重要的真核细胞转录因子,是

由c-Jun和c-Fos组成的异源二聚体,正常情况下无活性或活性很低,可被各种刺激激活,它的表达失调与炎症发生发展密切相关^[15]。AP-1也与多种癌细胞的控制有关,并可能会发展为有助于识别早期疾病或预测严重程度标志物^[16]。PPARγ是核激素受体超家族的一员,是炎症反应中的负反馈调节器,主要通过阻止NF-κB/Rel的活化来抑制单核细胞和巨噬细胞中各种细胞因子的表达^[17]。PPARγ还可以与AP-1竞争结合协同活化因子CBP和p300,从而对AP-1信号转导通路产生抑制作用,抑制炎性介质(IL-1β、IL-6和IL-12α等)的表达^[18]。COX是一组含血红素的同工酶(COX-1和COX-2),由巨噬细胞和其他受炎症影响的细胞大量产生,神经炎症最初就是通过诱导胶质COX-2表达来触发的^[19]。前列腺素E2是公认的炎症预后标志物,PTGES是调节前列腺素E2产生的重要酶^[20]。有研究表明,COX-2可以激活PTGES^[21],与此相一致,硫酸铜暴露后斑马鱼体内COX-2和PTGES mRNA的表达呈上调趋势。Myd88是toll样受体(TLR)和IL-1受体家族下游炎症信号通路的典型适配器。Myd88通过同型蛋白-蛋白相互作用将IL-1受体(IL-1R)或TLR家族成员连接到IL-1R相关激

酶(IRAK)家族激酶。IRAK 家族激酶的激活导致多种功能输出,包括 NF- κ B、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和 AP-1 的激活,使 Myd88 成为炎症通路的中心节点^[22]。本研究给予硫酸铜诱导的炎症模型 WELTGY 干预后,斑马鱼组织中 PPAR γ 的表达显著增加,炎症介质 NF- κ B、AP-1、IL-1 β 、IL-6、IL-12 α 、COX-2、Myd88、IkB α 、PTGES 的表达显著降低,从而达到缓解炎症的效果。

本研究结果表明 WELTGY 具有一定的抗炎作用,其机制可能是 WELTGY 抑制 ROS 释放,激活 PPAR γ 表达,抑制 NF- κ B 和 AP-1 转录活性,降低炎症因子表达,从而缓解炎症。本研究首次在斑马鱼模型中验证了 WELTGY 的抗炎活性,为菊叶在饲料添加剂中的应用提供了更多的理论和实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 三峡阳菊[J]. 厦门航空, 2019(8): 46-47.
Three Gorges Yangju [J]. Xiamen Airl, 2019(8): 46-47.
- [2] 瞿璐, 黄丰, 孙赞, 等. 菊叶中黄酮类成分的研究[J]. 中药材, 2020, 43(6): 1382-1385.
Qu L, Huang F, Sun Y, et al. Flavonoid chemical constituents from the leaves of *Chrysanthemum morifolium* [J]. J Chin Med Mater, 2020, 43(6): 1382-1385.
- [3] Shon J C, Kim W C, Ryu R, et al. Plasma lipidomics reveals insights into anti-obesity effect of *Chrysanthemum morifolium* Ramat leaves and its constituent luteolin in high-fat diet-induced dyslipidemic mice [J]. Nutrients, 2020, 12(10): E2973.
- [4] 胡晓倩, 朱洋洋, 陈乐, 等. 新鲜黄山贡菊叶中挥发油的提取[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(3): 210-214.
Hu X Q, Zhu Y Y, Chen L, et al. Study on extraction process of volatile oil from *Dendranthema morifolium* (Gongju) fresh leaves [J]. Food Ferment Ind, 2011, 37(3): 210-214.
- [5] 马秋, 王照国, 杨雪, 等. 薇甘菊叶的化学成分及抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(12): 2061-2065.
Ma Q, Wang Z G, Yang X, et al. Study on chemical composition and antibacterial activity of the leaves of *Mikania micrantha* H. B. K [J]. Nat Prod Res Dev, 2020, 32(12): 2061-2065.
- [6] Zheng L, van Labeke M C. Chrysanthemum morphology, photosynthetic efficiency and antioxidant capacity are differentially modified by light quality [J]. J Plant Physiol, 2017, 213: 66-74.
- [7] Robertson A L, Ogryzko N V, Katherine M, et al. Identification of benzopyrone as a common structural feature in compounds with anti-inflammatory activity in a zebrafish phenotypic screen [J]. Dis Model Mech, 2016, 9(6): 621-632.
- [8] Li R, Jia Z, Trush M A. Defining ROS in biology and medicine [J]. React Oxyg Species (Apex), 2016, 1(1): 9-21.
- [9] Zou Y, Zhang Y, Han L W, et al. Oxidative stress-mediated developmental toxicity induced by isoniazide in zebrafish embryos and larvae [J]. J Appl Toxicol, 2017, 37(7): 842-852.
- [10] Wang T, Chen X Y, Long X H, et al. Copper nanoparticles and copper sulphate induced cytotoxicity in hepatocyte primary cultures of *Epinephelus coioides* [J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149484.
- [11] Li J J, Zhang Y, Han L W, et al. Tenacissoside H exerts an anti-inflammatory effect by regulating the nf- κ b and p38 pathways in zebrafish [J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 83: 205-212.
- [12] Karin M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(5): a000141.
- [13] Hu X L, Zhang H Y, Zhuang L G, et al. Ubiquitin-fold modifier-1 participates in the diabetic inflammatory response by regulating NF- κ B p65 nuclear translocation and the ubiquitination and degradation of IkB α [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 795-810.
- [14] 赵泽明, 张柳. NF- κ B 信号通路 with 骨关节炎的关系研究进展 [J]. 华北理工大学学报: 医学版, 2021, 23(3): 232-238.
Zhao Z M, Zhang L. Research advances on the relationship between NF- κ B signaling pathway and osteoarthritis [J]. J North China Univ Sci Technol: Health Sci Edit, 2021, 23(3): 232-238.
- [15] Bi C J, Cai Q P, Shan Y Y, et al. Sevoflurane induces neurotoxicity in the developing rat Hippocampus by upregulating connexin 43 via the JNK/c-Jun/AP-1 pathway [J]. Biomed Pharm, 2018, 108: 1469-1476.
- [16] Steinberg S T, Azar Y. AP-1 expression and its clinical relevance in immune disorders and cancer [J]. Am J Med Sci, 2017, 353(5): 474-483.
- [17] Su C G, Wen X, Bailey S T, et al. A novel therapy for colitis utilizing PPAR- γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response [J]. J Clin Invest, 1999, 104(4): 383-389.
- [18] Li M, Pascual G, Glass C K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene [J]. Mol Cell Biol,

- 2000, 20(13): 4699-4707.
- [19] López D E, Ballaz S J. The Role of Brain Cyclooxygenase-2 (Cox-2) beyond neuroinflammation: neuronal homeostasis in memory and anxiety [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(12): 5167-5176.
- [20] Zhang W, Zhang R X, Wang T C, et al. Selenium inhibits LPS-induced pro-inflammatory gene expression by modulating MAPK and NF-kappaB signaling path ways in mouse mammary epithelial cells in primary culture [J]. *Inflammation*, 2014, 37(2): 478-485.
- [21] Surh Y J, Chun K S, Cha H H, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation [J]. *Mutat Res*, 2001, 480/481: 243-268.
- [22] Deguine J, Barton G M. MyD88: a central player in innate immune signaling [J]. *F1000 Prime Rep*, 2014, 6:97.

[责任编辑 兰新新]