

• 药理与临床 •

芒果苷对脂多糖诱导的慢性炎症大鼠 MAPK 通路及血清细胞因子的影响

卫智权¹, 阎莉¹, 邓家刚^{1*}, 邓静²

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001

2. 哈佛大学医学院 Dana-Farber 癌症研究所, 马萨诸塞州 波士顿, 美国 02115

摘要: **目的** 探讨芒果苷对脂多糖(LPS)诱导慢性炎症大鼠模型中 MAPK 通路的调控作用及其对血清细胞因子表达谱的影响。**方法** 以间断尾 iv 小剂量 LPS (200 µg/kg) 制备慢性炎症大鼠模型。模型大鼠随机分为模型组, 泼尼松 (5 mg/kg) 组与芒果苷高、中、低剂量 (200、100、50 mg/kg) 组, 每天 ig 给药 1 次, 共给药 4 周。第 4 周给药末, 分别以 RT-PCR、蛋白免疫印迹法检测白细胞 MAPK 通路 p38、ERK、JNK 基因表达与蛋白磷酸化水平, 以抗体微阵列蛋白质芯片检测血清细胞因子表达谱。**结果** 与模型组比较, 芒果苷高剂量组白细胞 ERK、JNK 基因表达以及 ERK 蛋白磷酸化受到明显抑制, 血清细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、中性粒细胞趋化因子 1 (INC-1) 与血小板源性生长因子 (PDGF) 水平显著降低。**结论** 芒果苷通过调控白细胞 MAPK 通路 ERK、JNK 基因表达以及 ERK 蛋白磷酸化, 降低血清趋化细胞因子水平, 从而发挥抗 LPS 诱导的慢性炎症作用。

关键词: 芒果苷; 慢性炎症; 脂多糖; MAPK 通路; 细胞信号转导; 细胞因子

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)01-0052-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.011

Effects of mangiferin on MAPK pathway and serum cytokines in rats with chronic inflammation induced by lipopolysaccharide

WEI Zhi-quan¹, YAN Li¹, DENG Jia-gang¹, DENG Jing²

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston 02115, USA

Abstract: **Objective** To investigate the regulation of mangiferin on mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway and the serum cytokines expression patterns in chronic lipopolysaccharide (LPS)-induced chronic inflammation of rats. **Methods** The rat model with chronic inflammation was established by iv low dose (200 µg/kg) intermittent LPS injection via the caudal vein. Rats were randomly divided into model, Prednisone (PNS, 5 mg/kg), and mangiferin high-, mid-, low-dose (200, 100, and 50 mg/kg) groups. The rats were ig administered with the predetermined drugs once a day within four weeks. At the end of the 4th week, the RT-PCR was applied to evaluate the gene expression of p38, ERK, and JNK in the MAPK pathway, while the Western blotting was executed to detect their protein phosphorylation levels. The protein antibody microarray chip was employed for serum cytokine expression pattern measurement. **Results** Compared with the model group, both of the expression of ERK, JNK, and the protein phosphorylation of ERK were markedly inhibited in mangiferin high-dose group. The levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (INC-1), and platelet-derived growth factor (PDGF) were significantly lowered. **Conclusion** Mangiferin could simultaneously regulate the gene expression of ERK, JNK, and the protein phosphorylation of ERK in the MAPK pathway and decrease the serum chemotactic cytokines level.

Key words: mangiferin; chronic inflammation; lipopolysaccharide; MAPK signaling pathway; cellular signal transduction; cytokine

收稿日期: 2012-06-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973916); 广西科技厅中药药效研究开放实验室资助项目 (10-046-04-Z11)

作者简介: 卫智权 (1972—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为天然药物活性成分的药理活性。Tel: (0771)3946492 E-mail: metoo.williams@gmail.com

*通信作者 邓家刚 Tel: (0771)3137555 E-mail: JG_Deng@hotmail.com

脂多糖(LPS)是介导感染性炎症损伤的最主要病原分子之一^[1]。LPS通过丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)细胞信号转导通路使白细胞激活,诱导前炎性细胞因子、趋化因子、生长因子和多种重要的炎症细胞因子的合成和释放^[2]。许多疾病与LPS活化MAPK通路导致的持续亚临床炎症密切相关^[3-4]。芒果苷为漆树科植物芒果 *Mangifera indica* L. 叶中的主要活性成分,具有较好的抗炎活性^[5-6]。然而芒果苷对LPS诱导的慢性炎症中MAPK通路的调控作用及其结果尚不明确。本研究以大鼠尾间断iv给予LPS制备慢性炎症模型,考察芒果苷对模型大鼠MAPK通路的主要信号分子p38、ERK、JNK的基因表达与蛋白磷酸化的调控作用,并探讨其对血清细胞因子表达谱的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

芒果苷(质量分数98.3%),由广西中医学院中药药效研究重点实验室惠赠。

大肠杆菌脂多糖(血清型O55:B5),美国Sigma公司;白细胞稀释液,南京建成科技有限公司;大鼠超敏C反应蛋白(hs-CRP)、ELISA试剂盒,美国R&D公司;RNAprep pure总RNA提取试剂盒、Quant cDNA第一链合成试剂盒、2×Taq Plus PCR MasterMix、BCA蛋白定量试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;ReadyPrep总蛋白提取试剂盒,美国Bio-Rad公司;兔抗鼠磷酸化p38/ERK/JNK一抗,美国Epitomics公司;RayBio Rat Cytokine Antibody Array G Series 2蛋白质芯片,北京博奥生物有限公司。PCR基因特异性引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 动物

SPF级SD大鼠,雄性,体质量220~240 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(湘)2009-0004。

1.3 仪器

T-gradient Thermoblock PCR仪,德国Biometra公司;Mini Sub Cell GT水平电泳系统、Mini-Protean Tetra Cell垂直电泳系统、Trans-Blot SD半干转印仪、ChemiDoc MP凝胶成像分析仪,美国Bio-Rad公司;Multiskan Spectrum1500酶标仪,美国Thermo Fisher Scientific公司;LuxScan 10K—A微阵列芯片扫描仪,北京博奥生物有限公司。

2 方法

2.1 慢性炎症大鼠模型制备及方法可行性验证

SD大鼠40只随机分为对照组、LPS 1组(LPS处理1周)、LPS 2组(LPS处理2周)、LPS 3组(LPS处理3周)、LPS 4组(LPS处理4周),观察LPS尾iv后各周末的炎症状态,以验证LPS间断尾iv制备慢性炎症大鼠模型的可行性,具体方法如下:除对照组外的其他各组大鼠按照分组时设定的处理时限,间断尾iv LPS(200 μg/kg)无菌生理盐水溶液,每周1次,对照组大鼠尾间断iv等体积无菌生理盐水4周。观察各组大鼠存活情况。分别于第1、2、3、4周末对相应组别大鼠进行全血白细胞计数与血清hs-CRP测定,验证其炎症状态。

2.2 分组与给药

48只大鼠随机均分为对照组,模型组,泼尼松(5 mg/kg)组,芒果苷高、中、低剂量(200、100、50 mg/kg)组。除对照组外,其他各组大鼠尾间断iv LPS(200 μg/kg)无菌生理盐水溶液,每周1次,共计4周;对照组间断尾iv等体积无菌生理盐水4周。首次注射LPS后次日,各给药组开始ig相应药物,每天给药1次,对照组、模型组ig生理盐水,共给药4周。

2.3 样本采集与指标检测

2.3.1 样本采集 第4周末,各组大鼠ip 2%戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉,下腔静脉穿刺取血,用于全血白细胞计数与血清hs-CRP测定。部分血液经红细胞裂解液处理分离白细胞,少量PBS重悬,稀释至 3×10^6 /mL的白细胞混悬液,置-70℃保存,供提取总RNA用,将总蛋白进行下游的RT-PCR与蛋白免疫印迹检测。其余血液室温静置30 min后于4℃、4 000 r/min离心5 min,得血清,分装冻存于-70℃,供蛋白质芯片检测。

2.3.2 全血白细胞计数与血清hs-CRP测定 取全血20 μL,加白细胞混悬液380 μL,充分混匀后充入细胞计数板计数池进行白细胞计数。采用hs-CRP的ELISA检测试剂盒,严格按照试剂盒说明书操作,以Expert Curve 1.3.8曲线拟合软件计算标准曲线的直线回归方程,计算样品中hs-CRP质量浓度。

2.3.3 RT-PCR检测白细胞p38、ERK、JNK基因表达 按照RNAprep pure培养细胞/细菌总RNA提取试剂盒说明提取白细胞总RNA,按照Quant cDNA第一链合成试剂盒说明合成cDNA第一链。目的基因p38、ERK、JNK与内参基因β-actin的引物序列、扩增产物长度、退火温度见表1。每个PCR

表 1 RT-PCR 反应基因引物序列、产物长度及退火温度

Table 1 Primer sequence, amplification product length, and annealing temperature of RT-PCR reaction

基因	引物序列	产物片段 / bp	退火温度 / °C
p38	正向: CGAGACCGTTTCAGTCCATCAT 反向: CAGTCTTCATTACAGCGAGGTT	319	56
ERK	正向: CTCTGTCATTGCCACCA 反向: ATCCACTCTCCATCTCCAT	387	56
JNK	正向: CTCGGAACACCTTGTCTCTGAA 反向: CCATTCTTAGTTCGCTCCTCC	389	54
β -actin	正向: CACCCGCGAGTACAACCTTC 反向: CCCATACCCACCATCACACC	207	60.4

反应体系: $2 \times$ Taq Plus PCR MasterMix 25 μ L, 上、下游引物各 2 μ L, cDNA 2 μ L, 双蒸水 19 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 最终延伸 5 min。PCR 反应结束, 取目的基因与内参基因扩增产物各 5 μ L, 3% 琼脂糖凝胶水平电泳 (60 min, 凝胶成像分析仪测定扩增产物条带灰度并计算两者的比值作为基因的相对表达量。

2.3.4 Western blotting 法检测白细胞 p38、ERK、JNK 蛋白磷酸化 按照 ReadyPrep 总蛋白提取试剂盒提取白细胞总蛋白, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白定量。根据目的蛋白的相对分子质量, 配制 8% 的 SDS-PAGE 分离胶并浓缩至 5%, 蛋白样品上样量 30 μ g。垂直电泳条件: 浓缩胶恒压 80 V $\times$ 20 min, 分离胶恒压 100 V, 电泳至凝胶底部。采用半干法转膜, 封闭, 一抗孵育, 洗膜, 二抗孵育, 洗膜, 化学发光反应, 胶片显影, 凝胶成像分析仪测定并计算目的蛋白与内参蛋白 β -actin 条带灰度的比值作为蛋白的相对表达量。

2.3.5 蛋白质芯片检测血清细胞因子表达谱 按照 RayBio Rat Cytokine Antibody Array G Series 2 蛋白

质芯片检测 34 种血清细胞因子。4 °C 解冻待测血清样品, 封闭抗体芯片, 96 孔蛋白质芯片微孔板每孔加入待测血清样品 100 μ L, 室温孵育。芯片进行清洗后, 加入抗体并室温孵育, 清洗后再加入荧光染料 Cy3 标记的链霉亲和素, 避光室温孵育。芯片清洗后, 以 LuxScan 10K—A 微阵列芯片扫描仪扫描, 提取数据进行分析。

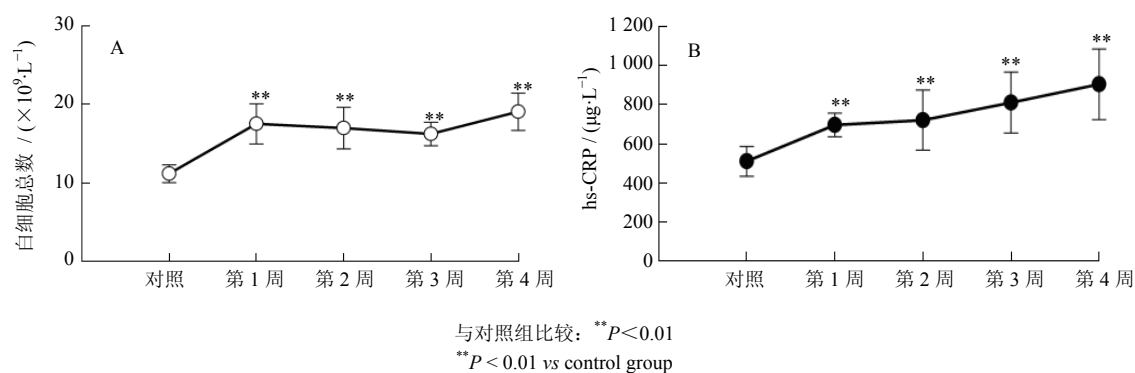
2.4 数据处理

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS 13.0 统计软件进行多样本间均数比较。细胞因子抗体微阵列蛋白质芯片数据两组间信号值比较采用聚类分析法, 并进行差异蛋白分析, 筛选标准为蛋白量的差异倍数在 2 倍以上。其他方差齐性数据采用单因素方差分析 LSD 检验, 方差不齐数据采用 Kruskal Wallis 秩和检验。

3 结果

3.1 慢性炎症大鼠模型验证

LPS 间断尾 iv 4 周内, 全部大鼠均存活, LPS 给药结束后, 大鼠外周血白细胞总数与血清 hs-CRP 质量浓度均显著增加并维持在较高水平, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$), 提示间断给予 LPS 制备大鼠慢性炎症模型是可行的。结果见图 1。

图 1 慢性炎症大鼠外周血白细胞总数 (A) 与血清 hs-CRP (B) 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Fig. 1 Peripheral blood leukocyte number (A) and level of serum hs-CRP (B) in rats with chronic inflammation ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.2 对全血白细胞数与血清 hs-CRP 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠全血白细胞数与血清 hs-CRP 水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,泼尼松与芒果苷 200 mg/kg 明显抑制 LPS 引起的全血白细胞数与血清 hs-CRP 水平升高($P<0.05$),芒果苷 100、50 mg/kg 虽然也有降低全血白细胞数、血清 hs-CRP 水平的作用,但与模型组比较无显著差异($P>0.05$)。结果见图 2。

3.3 对白细胞 p38、ERK、JNK 基因表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠白细胞 p38、ERK、JNK 基因表达显著上调($P<0.01$)。与模型组比较,泼尼松明显抑制 LPS 引起的白细胞 p38、ERK、JNK 基因表达上调($P<0.01$);芒果苷 200 mg/kg 明显抑制 LPS 引起的白细胞 ERK、JNK 基因表达上调($P<0.01$),但对 p38 基因表达未有明显作用($P>0.05$),而芒果苷 100、50 mg/kg 轻微下调 ERK、JNK 基因表达,但与模型组无明显差异($P>0.05$),结果见图 3。

3.4 对白细胞 p38、ERK、JNK 蛋白磷酸化的影响

与对照组比较,模型组 p38、ERK、JNK 蛋白磷酸化水平显著上调($P<0.01$)。与模型组比较,泼尼松明显抑制 LPS 引起的白细胞 p38、ERK、JNK 蛋白磷酸化水平上调($P<0.01$);芒果苷 200 mg/kg 也可明显抑制 LPS 引起的白细胞 ERK 蛋白磷酸化水平上调($P<0.01$),但对 p38、JNK 蛋白磷酸化水平上调未显示下调作用($P>0.05$);芒果苷 100、50 mg/kg 对 p38、ERK、JNK 蛋白磷酸化水平未显示下调作用($P>0.05$)。结果见图 4。

3.5 对慢性炎症大鼠血清细胞因子表达谱的影响

与模型组比较,泼尼松组检出 6 个差异蛋白,分别为细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、聚集蛋白 (Agrin)、中性粒细胞趋化因子 1 (CINC-1)、中性粒细胞趋化因子 2 α (CINC-2 α)、血小板源性生长因子 AA (PDGF-AA);芒果苷高剂量组检出 ICAM-1、MCP-1、CINC-1、PDGF-AA 4 个差异蛋白;芒果苷中、低剂量组则未检出。结果见图 5、6。

4 讨论

许多实验表明,外周血白细胞数与 hs-CRP 水平可以作为评估 LPS 诱导的炎症的指标^[7-8]。在本实验中,注射 LPS 后第 1 周即出现外周血白细胞数显著增多以及 hs-CRP 水平显著升高现象,并在其后 3 周均维持较高水平,提示间断给予 LPS 制备大鼠慢性炎症模型是可行的。

LPS 进入机体经血液循环后,首先与血浆中的 LPS 结合蛋白 (LBP) 结合,再结合于细胞表面的 CD14 分子, LPS-LBP-CD14 复合物与细胞膜上 TLR4 结合,导致 TLR4 的聚合而活化^[9],并通过 TLR4 的跨膜信号传导活化 MAPK 信号通路。在近 20 年研究中,MAPK 通路成员相继被发现,相互作用相继被阐明,这是目前发现成员最多、关系最复杂、研究最详尽的细胞内信号转导通路之一。哺乳动物体内存在 3 条与炎症密切相关的经典 MAPK 信号转导通路: p38 通路、ERK 通路、JNK 通路^[10-11]。LPS 诱导的炎症反应是一个典型的病原体与机体相互作用的过程, LPS 刺激细胞,使 p38、ERK、JNK

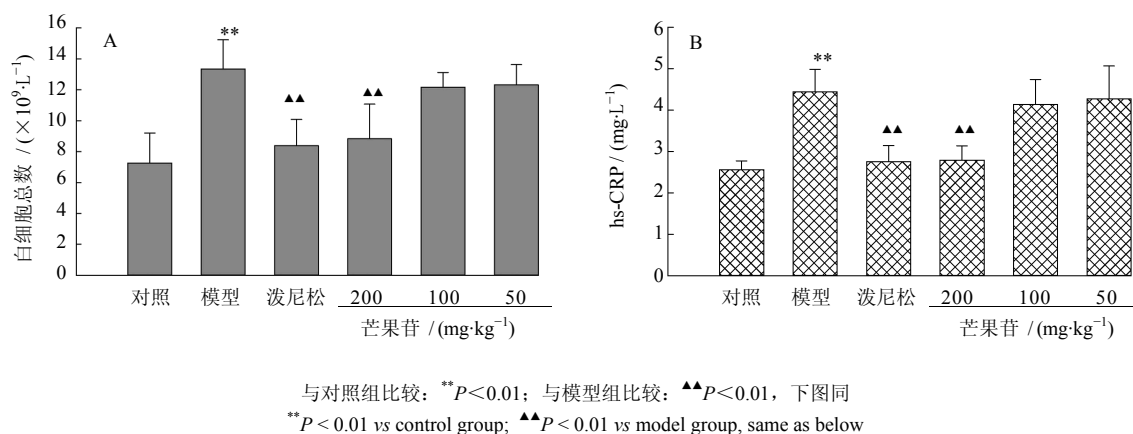


图2 芒果苷对慢性炎症大鼠外周血白细胞总数 (A) 与血清 hs-CRP (B) 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effects of mangiferin on total number of peripheral blood leukocyte (A) and level of serum hs-CRP (B) in rats with chronic inflammation ($\bar{x} \pm s, n=8$)

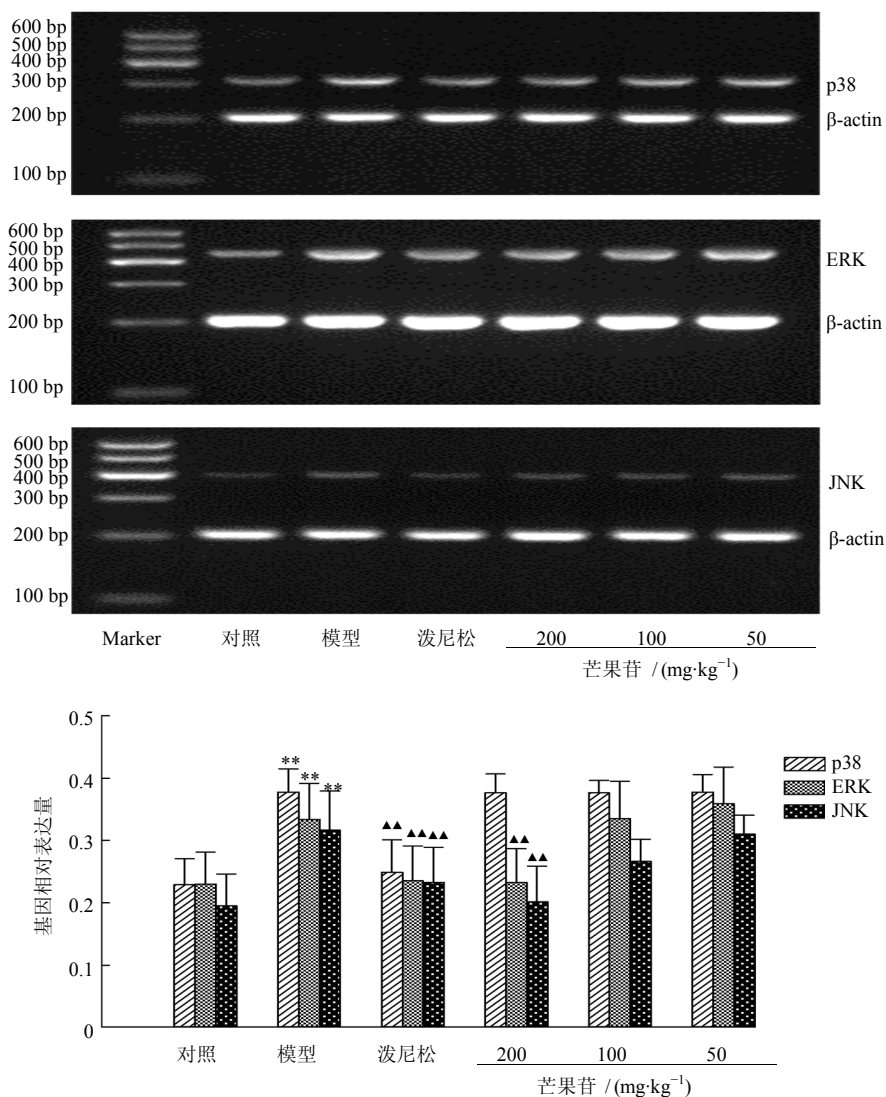


图 3 芒果苷对慢性炎症大鼠白细胞 p38、ERK 和 JNK mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effects of mangiferin on expression of p38, ERK, and JNK mRNA in leukocyte of rats with chronic inflammation ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

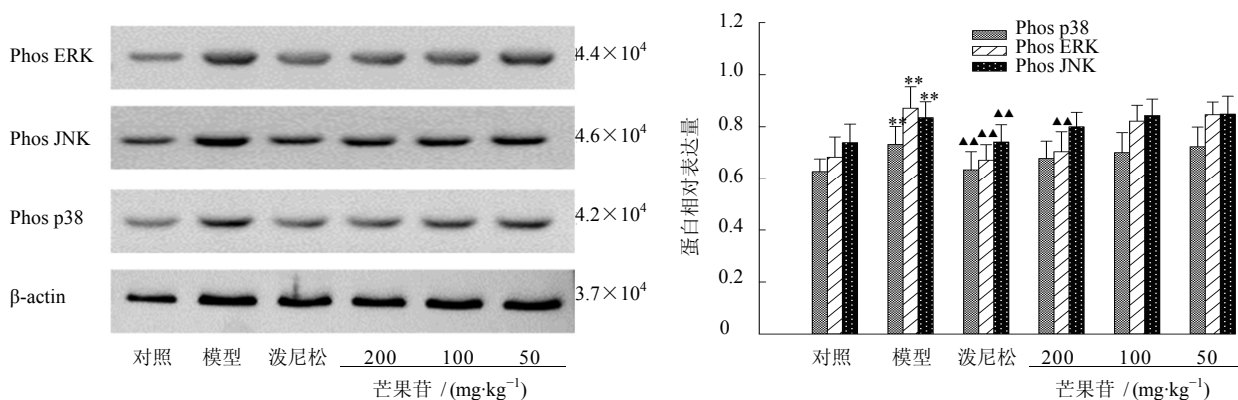


图 4 芒果苷对慢性炎症大鼠白细胞 p38、ERK、JNK 蛋白磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effects of mangiferin on levels of p38, ERK, and JNK protein phosphorylation in leukocyte of rats with chronic inflammation ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

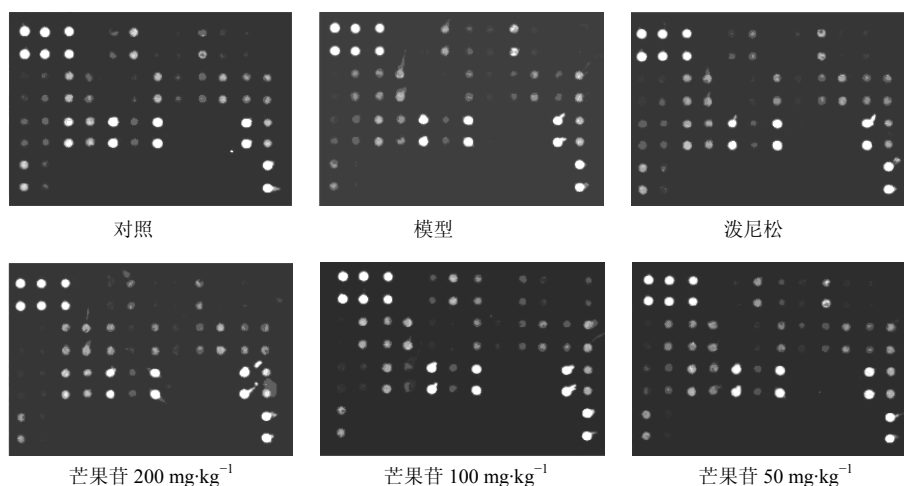


图5 各组大鼠蛋白质抗体微阵列芯片荧光图像

Fig. 5 Fluorescence images of protein antibody microarray chip of rats in each group

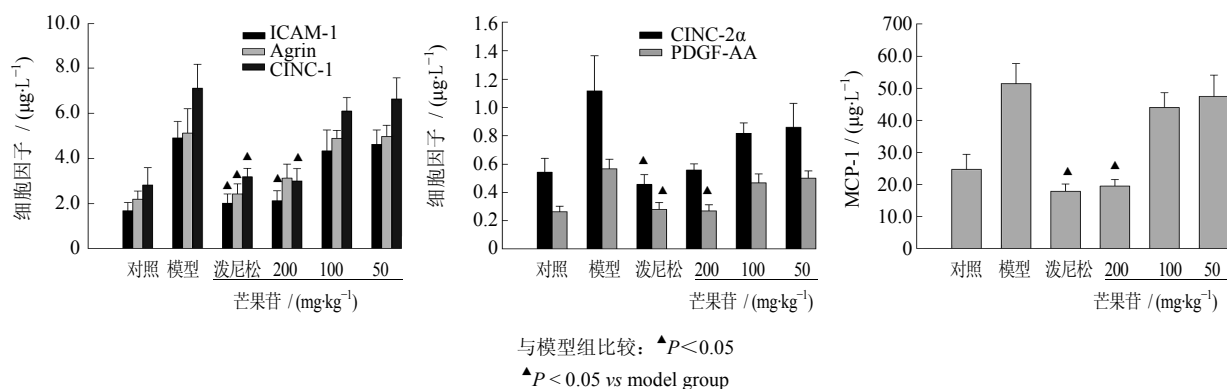


图6 芒果苷对慢性炎症大鼠血清细胞因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effects of mangiferin on expression of serum cytokine of rats with chronic inflammation ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

蛋白磷酸化,然后作用于各自的底物,调控炎症相关基因转录和翻译水平,诱导合成、释放多种炎症细胞因子和免疫调节因子,影响多种转录因子的活性,从而导致炎症的持续存在。在本实验中,模型组大鼠给予LPS后,白细胞p38、ERK、JNK表达及其蛋白磷酸化水平显著上调,提示这或许是LPS诱导慢性炎症的机制之一。因此,抑制LPS对p38、ERK、JNK的上调可能是抑制此类炎症的一个有效方法^[12-13]。芒果苷200 mg/kg对LPS诱导的白细胞ERK、JNK持续高表达与ERK蛋白磷酸化水平异常上调具有显著抑制作用,但剂量为100、50 mg/kg时均未发现有上述作用,提示芒果苷对ERK的作用存在量效关系。但芒果苷仅抑制JNK的基因表达而对其蛋白磷酸化无明显影响,且不能抑制p38的基因表达与蛋白磷酸化,这可能是其抑制LPS诱导的慢性炎症的重要分子机制之一。蛋白芯片测试结果

显示,芒果苷高剂量组与白细胞趋化密切相关的4种炎症细胞因子ICAM-1、MCP-1、CINC-1、PDGF-AA等水平显著降低,鉴于MAPK通路趋化细胞因子的密切关系,推测该现象可能是芒果苷对MAPK通路调控的结果。相对于昂贵的单克隆抗体类药物及还处于实验室阶段的基因沉默疗法,从作用温和、药理效应广泛的天然药物中寻找安全、有效的抑制LPS相关慢性炎症的先导化合物,或许是一个可行的选择。

然而,较大的给药剂量也许是芒果苷开发为新的抗炎药物的障碍之一。是否存在一些尚未明确的因素,如药物未及时吸收便被肠道微生物破坏、药物的生物利用度较低等,导致芒果苷需用较大剂量才能发挥期望的药理效应,是需要进一步探讨和明确的问题^[14-15]。无论如何,芒果苷对于MAPK通路的调控效应丰富了其抗炎作用机制的多样化,提升

了将其作为有希望的先导化合物、研发新的抗炎药物的潜在价值。

参考文献

- [1] Bromfield J J, Sheldon I M. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression *in vitro* [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(12): 5029-5040.
- [2] Wu T T, Chen T L, Chen R M. Lipopolysaccharide triggers macrophage activation of inflammatory cytokine expression, chemotaxis, phagocytosis, and oxidative ability *via* a toll-like receptor 4-dependent pathway: validated by RNA interference [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 191(2/3): 195-202.
- [3] Ben-Haim S, Gacinovic S, Israel O. Cardiovascular infection and inflammation [J]. *Semin Nucl Med*, 2009, 39(2): 103-114.
- [4] Yuan H, Perry C N, Huang C, *et al.* LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(2): H470-H479.
- [5] Rivera D G, Hernandez I, Merino N, *et al.* *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin reduce the airway inflammation and Th2 cytokines in murine model of allergic asthma [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(10): 1336-1345.
- [6] Prabhu S, Narayan S, Devi C S, *et al.* Mechanism of protective action of mangiferin on suppression of inflammatory response and lysosomal instability in rat model of myocardial infarction [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(6): 756-760.
- [7] Bircan A, Kaya O, Gokirmak M, *et al.* C-reactive protein, leukocyte count and ESR in the assessment of severity of community-acquired pneumonia [J]. *Tuberk Toraks*, 2006, 54(1): 22-29.
- [8] Cavric G, Mihalic S N, Tesanovic S J, *et al.* Relationship between polymorphonuclear leukocyte count in bronchoalveolar lavage fluid and bacterial content in Gram's stain and bacterial content in final microbiological report [J]. *Coll Antropol*, 2010, 34(1): 1-6.
- [9] McAleer J P, Vella A T. Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity [J]. *Crit Rev Immunol*, 2008, 28(4): 281-299.
- [10] Boutms T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer [J]. *Pharmacol Rev*, 2008, 60(3): 261-310.
- [11] Zhou H Y, Shin E M, Guo L Y, *et al.* Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX4 expression in RAW 264. 7 macrophages *via* NF-kappa B, JNK and p38 MAPK inactivation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 586(1/3): 340-349.
- [12] Lievin-Le M V, Beau I, Rougeaux C, *et al.* Apical expression of human full-length hCEACAM1-4L protein renders the Madin Darby Canine Kidney cells responsive to lipopolysaccharide leading to TLR4-dependent Erk1/2 and p38 MAPK signaling [J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(5): 764-785.
- [13] Himaya S W, Ryu B, Qian Z J, *et al.* Sea cucumber, *Stichopus japonicus* ethyl acetate fraction modulates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 *via* MAPK signaling pathway in murine macrophages [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2010, 30(1): 68-75.
- [14] Lin H, Lan J, Guan M, *et al.* Spectroscopic investigation of interaction between mangiferin and bovine serum albumin [J]. *Spectrochim Acta A*, 2009, 73(5): 936-941.
- [15] Lin H, Chen R, Liu X, *et al.* Study on interaction of mangiferin to insulin and glucagon in ternary system [J]. *Spectrochim Acta A*, 2010, 75(5): 1584-1591.