

基于 NF- κ B 信号通路的细柱五加中 impressic acid 的抗炎作用研究

肖瑾¹, 李小军², 黄建军³, 高圣权⁴, 陆昌洙⁵, 刘向前^{1*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 赣南医学院药学院, 江西 赣州 341000

3. 中南大学湘雅医学院, 湖南 长沙 410013

4. 世明大学韩方食品营养学部, 韩国 堤川 27136

5. 庆熙大学药学院, 韩国 首尔 130701

摘要: 目的 研究细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith 中 impressic acid (IA) 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的抗炎作用。方法 以 LPS 诱导 RAW264.7 细胞建立炎症模型; 使用 EZ4U 细胞增殖与细胞毒性分析试剂盒检测 IA 对 RAW264.7 细胞的毒性作用; Griess 法测定一氧化氮 (NO) 水平; ELISA 法测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β) 水平; RT-PCR 法检测 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达; Western blotting 检测高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 蛋白表达; ELISA 法细胞质和细胞核的核因子- κ B (NF- κ B) 水平。结果 Impressic acid 可以显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 水平和 HMGB1 蛋白表达, 并抑制 NF- κ B 从细胞质向细胞核的转移 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 细柱五加中 IA 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞具有抗炎作用。

关键词: 细柱五加; impressic acid; 三萜; 抗炎; 高迁移率族蛋白 B1; 核因子- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)22-5781-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.22.016

Anti-inflammatory effect of impressic acid from *Acanthopanax gracilistylus* based on NF- κ B signaling pathway

XIAO Jin¹, LI Xiao-jun², HUANG Jian-jun³, Ko Sung-kwon⁴, Yook Chang-soo⁵, LIU Xiang-qian¹

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. College of Pharmaceutical Sciences, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China

3. Department of Clinical Biochemistry, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410013, China

4. Department of Oriental Medical Food & Nutrition, Semyung University, Jecheon 27136, Korea

5. College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130701, Korea

Abstract: Objective To explore the anti-inflammatory effect of impressic acid (IA) from *Acanthopanax gracilistylus* on lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. **Methods** RAW264.7 cells were stimulated by LPS to establish an inflammatory model. The cytotoxicity of IA on RAW 264.7 cells was detected by EZ4U cell proliferation and cytotoxicity analysis kit. The level of nitric oxide (NO) was determined by Griess. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were determined by ELISA. The expressions of TNF- α and IL-1 β mRNA were detected by RT-PCR. The expression of high-mobility group box 1 protein (HMGB1) was detected by western blotting. The levels of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in cytoplasm and nucleus were measured by ELISA. **Results** IA significantly suppressed the levels of TNF- α and IL-1 β , the expression of HMGB1 protein, and the translocation of NF- κ B from cytoplasm to nucleus in LPS-induced RAW264.7 cells ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** IA from *A. gracilistylus* has an anti-inflammatory effect on LPS-induced RAW264.7 cells.

Key words: *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith; impressic acid; triterpene; anti-inflammatory; high-mobility group box 1 protein; nuclear factor- κ B

收稿日期: 2020-04-25

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2019JJ40223, 2019JJ50448); 湖南中医药大学生物工程重点学科资助项目 (校行科字 [2018] 3 号); 湖南省教育厅一般项目 (18C0399)

作者简介: 肖瑾, 女, 在读硕士, 研究方向为中药及天然药物活性成分研究。Tel: 18774086049 E-mail: xiaojin9339@163.com

*通信作者 刘向前, 男, 博士生导师, 教授。Tel: 13308439949 E-mail: lxq0001cn@163.com

细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith 为五加科五加属植物, 广泛分布于湖南、安徽、河南等地, 其干燥根皮收载于《中国药典》2015 年版一部, 具有祛风除湿、强壮筋骨、活血祛瘀、利尿消肿的功效, 常用于治疗脾肾阳虚、体虚乏力、风湿痹痛、筋骨痿软等^[1-3]。课题组前期研究表明, 糙叶五加 *A. henryi* (Oliv) Harms、吴茱萸五加 *A. evodiaefolius* Franch.、朝鲜刺五加 *A. koreanum* Nakai、刺五加 *A. senticosus* (Rupr. Et Maxim.) Harms 等五加属植物中的提取物和化合物可以抑制炎症细胞中一氧化氮 (NO)、前列腺素 E2、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 等炎症因子的产生^[4-8]。因此, 从五加属植物中寻找新的抗炎活性化合物具有可行性。impressic acid (IA) 在五加科植物如三叶五加^[9]、朝鲜五加^[10-12]、细柱五加^[13]、凹脉鹅掌柴^[14]、台湾鹅掌柴^[15]中广泛存在。课题组前期已经从细柱五加中分离出许多化合物^[13,16-17], 其中 IA 的含量较高。

炎症是活体细胞对致炎因子、局部损伤所产生的防御性反应^[18]。炎症细胞激活后产生的促炎介质导致慢性炎症^[4,19-23]。脂多糖 (LPS) 可诱导巨噬细胞活化^[24], 生成并释放多种炎症介质^[25-27]。核因子- κ B (NF- κ B) 在炎症级联瀑布反应中起关键作用^[28], 当细胞受到 LPS 刺激时, 促使 NF- κ B 从细胞质易位到细胞核, 从而调节炎症相关基因的表达^[29]。细胞核内的高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 作为晚期的炎症介质^[30], 可参与基因转录的调控^[31-34]。脓毒症患者血液中 HMGB1 水平常在晚期 (16~24 h) 升高^[35]。研究表明, 在动物模型中针对早期炎症因子使用相应抗体或拮抗剂可抑制脓毒性休克的发展^[36-38], 但在临床治疗中难以及时干预, 未能达到理想治疗效果^[39-40]。HMGB1 在炎症过程中具有的潜在中心作用, 使其成为炎症治疗的靶标^[41]。抑制 HMGB1 释放的机制与 NF- κ B 信号通路有关^[42]。因此, 通过抑制 HMGB1 表达对炎性疾病进行治疗, 还需研究 NF- κ B 信号通路对 HMGB1 分泌的影响。为探究 IA 的抗炎作用, 本研究通过 LPS 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 建立炎症模型, 考察 IA 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO、TNF- α 、IL-1 β 、HMGB1 水平以及 NF- κ B 信号通路的影响。

1 材料

1.1 试剂

细柱五加叶于 2012 年 9 月在湖南长沙市郊采

集, 由韩国庆熙大学陆昌洙教授鉴定为五加科植物细柱五加 *A. gracilistylus* W. W. Smith, 标本保存于湖南中医药大学药学院 (标本号为 120912)。

LPS、二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司; 地塞米松 (DEX, 批号 S1322, 上海 Selleck 公司); EZ4U 细胞增殖与细胞毒性分析试剂盒购自 Biomedica 公司; HMGB1 抗体购自 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗、增强型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究; TNF- α 、IL-1 β ELISA 试剂盒、TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司; β -actin 抗体 (1:1 000) 购自 Santa 公司; ECL 化学发光试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 细胞核/胞质细胞组分提取试剂盒购自 Biovision 公司; NF- κ B p65 ELISA 试剂盒购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 仪器

JEOL JNM ECP-400 核磁共振仪 (日本电子株式会社); Q-TOF micro LC-MS/MS 质谱仪 (美国 Waters 公司); YL9100 HPLC 系统 (韩国英麟公司); Centricon YM-10 型超滤器 (美国 Millipore 公司); 连续波长多功能酶标仪 (奥地利 Tecan 公司); CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); 96 孔板 (美国 Corning 公司)。

1.3 细胞

RAW264.7 细胞购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所。

2 方法

2.1 IA 的制备

取 1 kg 干燥的细柱五加叶, 粉碎后以甲醇加热回流提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩后得到 140 g 总浸膏。总浸膏溶解于蒸馏水, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇进行萃取, 回收溶剂后得到石油醚部分 6 g、醋酸乙酯部分 42 g、正丁醇部分 58 g。将 25 g 醋酸乙酯萃取物经硅胶柱色谱分离, 分别以氯仿-甲醇 (25:1、20:1、15:1、10:1) 梯度洗脱, 得到流分 Fr.1~4。将 Fr.1 (2.2 g) 经硅胶柱色谱分离, 以氯仿-甲醇 (25:1) 洗脱, 得到 IA 910 mg。根据质谱、核磁共振氢谱、核磁共振碳谱等波谱数据鉴定化合物的结构^[10], 如图 1 所示。采用 HPLC 测定 IA 的质量分数大于 98%。

2.2 细胞培养

RAW264.7 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养

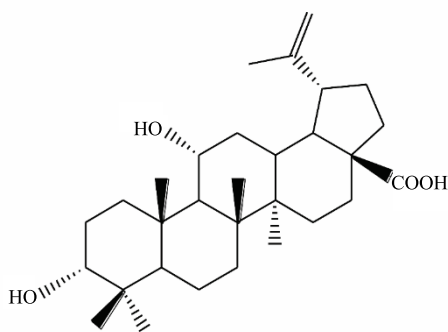


图 1 IA 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of IA

基, 于 5% CO₂、37 °C、饱和湿度的培养箱中培养。

2.3 细胞毒性测定

采用 EZ4U 细胞增殖与细胞毒性分析试剂盒检测 IA 对 RAW264.7 细胞的毒性作用。将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞以 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 培养 8 h。设置对照组和 IA 组, IA 组分别加入不同浓度的药物 (5、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$, IA 以 0.1% DMSO 溶解), 对照组加入 0.1% DMSO, 培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL EZ4U 试剂, 于 37 °C 培养 4 h。用酶标仪在 450 nm (参比波长 620 nm) 波长处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.4 Griess 法测定 NO 水平

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以 2.5×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中, 培养 12 h, 设置对照组, LPS 组, IA (10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$) 组。IA 组加入不同浓度的药物, 除对照组外, 其余各组均加入 LPS (100 ng/mL), 孵育 24 h。取 100 μL 细胞上清液与 100 μL Griess 试剂混合, 于室温下孵育 10 min, 使用酶标仪测定 540 nm 处的 A 值^[19,25]。

2.5 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-1 β 水平

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以 1×10^6 个/孔接种于 12 孔板中, 培养 12 h, 设置对照组、LPS 组、DEX (10 $\mu\text{mol/L}$) 组、IA (10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$) 组。DEX 组、IA 组加入不同浓度的药物, 除对照组外, 其余各组均加入 LPS (100 ng/mL), 孵育 12 h。收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明测定 TNF- α 、IL-1 β 水平。

2.6 RT-PCR 法检测 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 12 孔板, 培养 8 h。设置对照组、LPS 组、IA (10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$) 组。IA 组

加入不同浓度的药物孵育 1 h 后, 除对照组外, 其余各组加入 LPS (100 ng/mL) 孵育 2 h。PBS 洗涤 2 次, 加入 TRIzol 试剂, 提取总 RNA。通过反转录试剂盒得到 cDNA, 再用相应引物进行 PCR 分析, 检测 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达。引物序列如下, TNF- α 正向引物为 5'-GAATGGGTGTTTTCATCC-ATTCT-3', 反向引物为 5'-GCTTAAGTGACCTCG-GAGCTTACA-3'; IL-1 β 正向引物为 5'-TTGACGG-ACCCCAAAGAGTG-3', 反向引物为 5'-ACTCCT-GTACTCGTGGAAGA-3'; β -actin 正向引物为 5'-ATGGTGG GAATGGGTCAGAAG-3', 反向引物为 5'-GGAAGA TGTTACTCGACGAGC-3'。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 于紫外灯下观察^[19,25]。

2.7 Western blotting 法检测 HMGB1 蛋白表达

取 RAW264.7 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 12 孔板, 培养 8 h。设置对照组、LPS 组、IA (10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$) 组。IA 组加入不同浓度的药物孵育 1 h 后, 除对照组外, 其余各组加入 LPS (100 ng/mL) 孵育 24 h。吸取细胞培养液上清液加入 Centricon YM-10 超滤器中, 离心、滤过并浓缩, 浓缩的样品于 -80 °C 保存。

收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入 100 μL 细胞裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L PMSF、0.1% SDS、0.02% 叠氮化钠、1% Nonidet P-40) 置冰上裂解细胞, 收集细胞。超声 30 s 后于 4 °C 离心 30 min, 取上清液于 -80 °C 保存, 采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。

蛋白样品经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 转移至 PVDF 膜。加入 5% 脱脂奶粉, 于室温封闭 1 h, 分别加入 HMGB1、 β -actin 抗体于 4 °C 孵育过夜。洗涤后加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗 (1:5 000), 于室温孵育 1 h。洗涤后, 使用 ECL 发光试剂盒检测 HMGB1 蛋白表达, 采用 Quantity One 软件进行分析。

2.8 细胞核 NF- κ B 活性检测

取 RAW264.7 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 12 孔板, 培养 8 h。设置空白组、对照组、LPS 组、IA (10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$) 组。IA 组加入不同浓度的药物孵育 1 h 后, 除空白组和对照组外, 其余各组加入 LPS (100 ng/mL) 孵育 2 h。收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 使用细胞核/胞质细胞组分提取试剂盒分离细胞质和细胞核, 按照 ELISA 试剂盒说明检测细胞核中 NF- κ B 水平。

2.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行分析, 组内比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 IA 对 RAW264.7 细胞活力的影响

如图 2 所示, IA (75、100 $\mu\text{mol/L}$) 显著降低细胞存活率 ($P < 0.05$), 具有明显的细胞毒性; IA (5~50 $\mu\text{mol/L}$) 对细胞存活率均无显著影响。因此, 后续实验所使用的 IA 浓度不超过 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

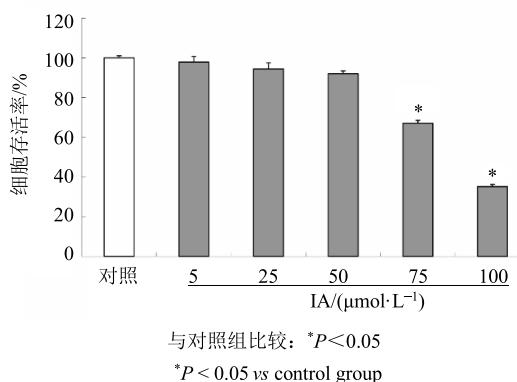
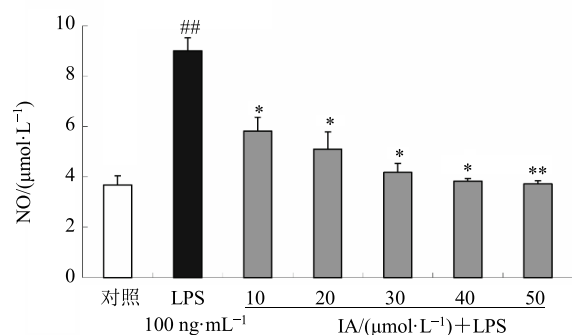


图 2 IA 对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of IA on cell viability in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 IA 对 NO 水平的影响

如图 3 所示, 静息状态下 RAW264.7 细胞产生 (3.68 ± 0.37) $\mu\text{mol/L}$ NO; LPS 组 RAW264.7 细胞 NO 水平显著增加 ($P < 0.01$), 为 (9.01 ± 0.51) $\mu\text{mol/L}$ 。IA 组 NO 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 呈剂量



与对照组比较: ### $P < 0.01$; 与 LPS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs LPS group, same as belows

图 3 IA 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of IA on NO level in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

相关性。提示 IA 对 NO 的产生具有良好的抑制作用。

3.3 IA 对 TNF- α 、IL-1 β 分泌的影响

TNF- α 、IL-1 β 是参与调节免疫应答、造血、炎症的多功能促炎细胞因子。如图 4 所示, 与对照组比较, LPS 组 TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, IA 组 TNF- α 、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 呈剂量相关性。提示 IA 可抑制促炎介质 TNF- α 、IL-1 β 分泌。

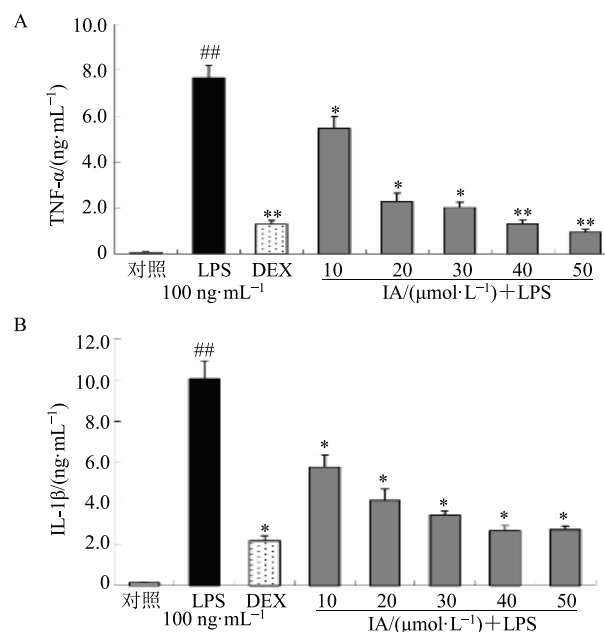


图 4 IA 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α (A) 和 IL-1 β (B) 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of IA on levels of TNF- α (A) and IL-1 β (B) in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 IA 对 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, LPS 组 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达显著增加; 与 LPS 组比较, IA 组 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达显著降低, 与 ELISA 法测定的 TNF- α 和 IL-1 β 分泌结果一致。

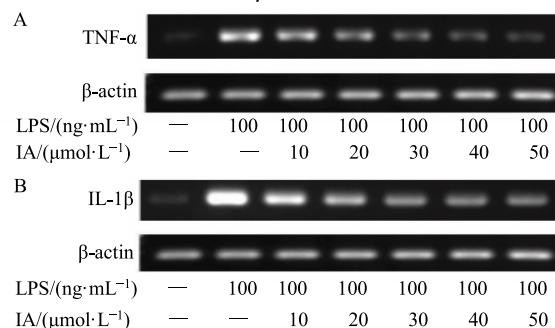


图 5 IA 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α (A) 和 IL-1 β (B) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of IA on expressions of TNF- α (A) and IL-1 β (B) mRNA in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 IA 对 HMGB1 蛋白表达的影响

HMGB1 是一种细胞内蛋白质^[43], 当其存在于细胞外时, 为免疫系统充当坏死标志物。研究表明, 受损或坏死的细胞可以将 HMGB1 释放到细胞外, 从而引发炎症反应^[44]。如图 6-A 所示, 与 LPS 组比较, IA 组细胞上清液中 HMGB1 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 呈剂量相关性。如图 6-B 所示, 不同浓度的 IA 均对细胞内 HMGB1 蛋白表达没有明显改变。上述结果表明 IA 能显著降低 HMGB1 分泌, 但对 RAW264.7 细胞中 HMGB1 蛋白的稳态水平没有影响。提示 IA 可能通过抑制 HMGB1 分泌, 发挥抗炎作用。研究表明, LPS 刺激巨噬细胞后, 可与 HMGB1 结合形成复合物, 进而抑制 HMGB1 的出核与释放, 胞外 HMGB1 水平降低, 并且 HMGB1 与 LPS 复合物的致炎活性远远大于同剂量的 LPS^[45-48]。

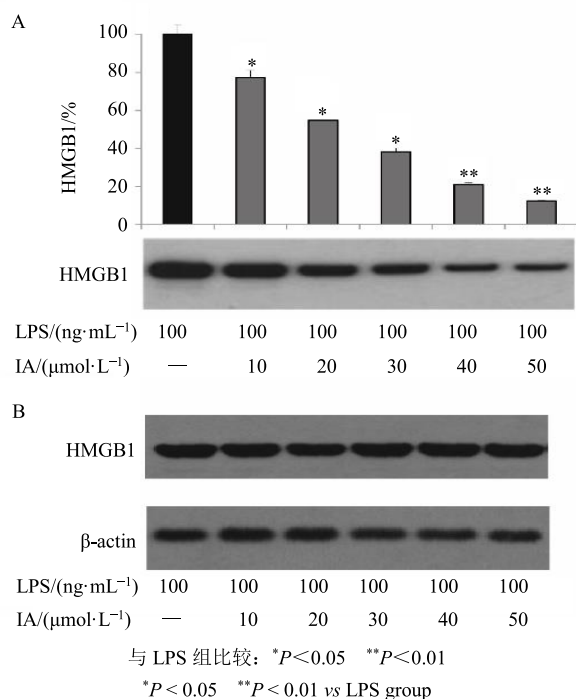


图 6 IA 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液中 HMGB1 (A) 和胞内 HMGB1 (B) 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Fig. 6 Effect of IA on expression of HMGB1 protein in supernatant (A) and intracellular (B) of LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.6 IA 对 NF- κ B 活性的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, LPS 组 NF- κ B 水平显著上升 ($P<0.01$); 与 LPS 组比较, IA 组 NF- κ B 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 呈剂量相关性。提示 IA 可通过抑制 NF- κ B 信号通路, 从而减轻炎症反应。

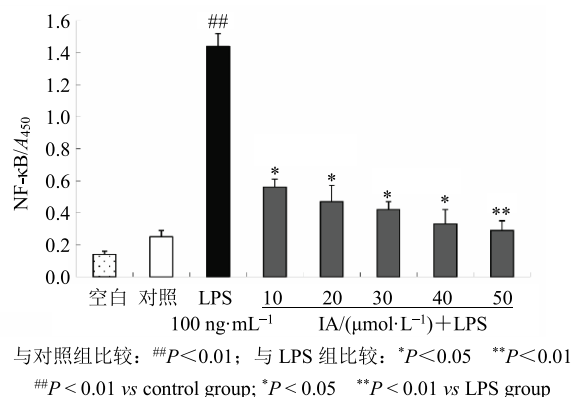


图 7 IA 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Fig. 7 Effect of IA on NF- κ B activity in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

4 讨论

HMGB1 可以通过刺激多种细胞合成、释放促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等^[49], 参与炎症疾病的发病过程^[11,50], 从而加剧炎症反应^[51]。脓毒症的发病机制与炎症反应密切相关。研究表明, 在脓毒症动物模型中, HMGB1 蛋白抑制剂或拮抗剂能显著降低致死性内毒素血症和急性组织损伤的发生率^[52]。因此, HMGB1 可能是降低脓症患者死亡率和并发症的靶点。

细柱五加药用历史悠久, 科研工作者对其次级代谢产物开展了较多药理学研究, 但 IA 的潜在抗炎作用尚未阐明。本研究表明, IA 显著减少 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO、TNF- α 、IL-1 β 炎症介质的产生, 抑制 HMGB1 分泌和 NF- κ B 活性。

综上所述, 细柱五加中羽扇豆烷型三萜 IA 可通过抑制巨噬细胞中 NF- κ B 活化发挥抗炎作用, 并抑制 TNF- α 、IL-1 β 、HMGB1 表达, 指示 IA 可作为治疗炎症性疾病如风湿性关节炎、类风湿性关节炎、颈椎病、腰椎间盘突出等的药物或先导化合物。但 IA 对脓毒症动物模型的全身炎症反应和重要器官损伤的保护作用、IA 的生物利用度等仍需进一步研究。本研究表明细柱五加具有一定的开发前景, 从细柱五加中筛选更多有效化合物及其作用机制研究, 可为细柱五加的临床应用提供理论依据和实验基础。

参考文献

- [1] Li X J, Zou Q P, Wang X, *et al.* Lupane triterpenes from the leaves of *Acanthopanax gracilistylus* [J]. *Molecules*, 2018, 23(1): 87.

- [2] Shan B E, Yoshita Y, Sugiura T, *et al.* Suppressive effect of Chinese medicinal herb, *Acanthopanax gracilistylus*, extract on human lymphocytes *in vitro* [J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 118(1): 41-48.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] Seo Y S, Lee S J, Li Z, *et al.* Araliasaponin II isolated from leaves of *Acanthopanax henryi* (Oliv.) Harms inhibits inflammation by modulating the expression of inflammatory markers in murine macrophages [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(1): 857-864.
- [5] Kang D H, Kang O H, Li Z, *et al.* Anti-inflammatory effects of Ciwujianoside C3, extracted from the leaves of *Acanthopanax henryi* (Oliv.) Harms, on LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3749-3758.
- [6] Zhou T, Li Z, Kang O H, *et al.* Antimicrobial activity and synergism of ursolic acid 3-*O*- α -L-arabinopyranoside with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(4): 1285-1293.
- [7] Huang W C, Li Z, Li X J, *et al.* Chemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxic activity of the liposoluble constituents from different parts of *Acanthopanax evodiaefolius* by the herbal blitzkrieg extractor [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(2): 406-411.
- [8] Kim J A, Yang S Y, Koo J E, *et al.* Lupane-type triterpenoids from the steamed leaves of *Acanthopanax koreanum* and their inhibitory effects on the LPS-stimulated pro-inflammatory cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(22): 6703-6707.
- [9] Ty P D, Lischewski M, Phiet H V, *et al.* Two triterpenoid carboxylic acids from *Acanthopanax trifoliatum* [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(12): 2889-2891.
- [10] Harris H E, Raucchi A. Alarmin(g) news about danger: Workshop on innate danger signals and HMGB1 [J]. *EMBO Rep*, 2006, 7(8): 774-778.
- [11] Cai X F, Lee I S, Shen G H, *et al.* Triterpenoids from *Acanthopanax koreanum* root and their inhibitory activities on NFAT transcription [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(8): 825-828.
- [12] Park S H, Nhiem N X, Kiem P V, *et al.* A new norlupane triterpene from the leaves of *Acanthopanax koreanum* increases the differentiation of osteoblastic MC3T3-e1 cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33(1): 75-80.
- [13] 邹亲朋, 刘向前, 李炯奎, 等. 细柱五加叶甲醇提取物中的羽扇豆烷型三萜成分 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2011, 47(6): 120-126.
- [14] Srivastava S K. A new triterpenic acid from *Schefflera impressa* [J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(3): 298-302.
- [15] Kuo Y H, Lo J M, Chan Y F. Cytotoxic components from the leaves of *Schefflera taiwaniana* [J]. *J Chin Chem Soc*, 2002, 49(3): 427-431.
- [16] Liu X Q, Yook C S, Chang S Y. Chemical constituents of *Acanthopanax gracilistylus* [J]. *Chin Herb Med*, 2004, 35(3): 250-252.
- [17] Liu X Q, Chang S Y, Park S Y, *et al.* A new lupane-triterpene glycoside from the leaves of *Acanthopanax gracilistylus* [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(6): 831-836.
- [18] Liu X Q, Zou Q P, Huang J J, *et al.* Inhibitory effects of 3 α -hydroxy-lup-20(29)-en-23, 28-dioic acid on lipopolysaccharide-induced TNF- α , IL-1 β , and the high mobility group box 1 release in macrophages [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 2017, 81(7): 1305-1313.
- [19] Nanjundaiah S M, Stains J P, Moudgil K D. Kinetics and interplay of mediators of inflammation-induced bone damage in the course of adjuvant arthritis [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2013, 26(1): 37-48.
- [20] Moreira A P, Hogaboam C M. Macrophages in allergic asthma: Fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution [J]. *J Interf Cytok Res*, 2011, 31(6): 485-491.
- [21] Hansson G K, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12: 204-212.
- [22] Hanken K, Eling P, Hildebrandt H. The representation of inflammatory signals in the brain - a model for subjective fatigue in multiple sclerosis [J]. *Front Neurol*, 2014, 5: 264.
- [23] Wang X Z, Zhu M Q, Hjorth E, *et al.* Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11(1): 40-50.
- [24] Zou Q P, Liu X Q, Huang J J, *et al.* Inhibitory effects of lupane-type triterpenoid saponins from the leaves of *Acanthopanax gracilistylus* on lipopolysaccharide-induced TNF- α , IL-1 β and high-mobility group box 1 release in macrophages [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9149-9156.
- [25] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 723-737.
- [26] Wang H, Yang H, Czura C J, *et al.* HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation [J]. *Am J Resp Crit Care Med*, 2001, 164(10 Pt 1): 1768-1773.
- [27] Otterlei M, Ostgaard K, Skjåk-Braek G, *et al.* Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate [J]. *J Immunother*, 1991, 10(4): 286-291.

- [28] Iwanowycz S, Wang J F, Altomare D, *et al.* Emodin bidirectionally modulates macrophage polarization and epigenetically regulates macrophage memory [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(22): 11491-11503.
- [29] Gilmore T D. Introduction to NF-kappaB: Players, pathways, perspectives [J]. *Oncogene*, 2006, 25(51): 6680-6684.
- [30] Gao H Y, Wu L J, Kuroyanagi M, *et al.* Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* koehne and their activities in JB6 mouse epidermal cells [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(11): 1318-1321.
- [31] Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8): 5237-5246.
- [32] Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, *et al.* HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation [J]. *J Immunol*, 2000, 165(6): 2950-2954.
- [33] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi M E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 191-195.
- [34] Lotze M T, Tracey K J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): Nuclear weapon in the immune arsenal [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(4): 331-342.
- [35] Andersson U, Wang H, Palmblad K, *et al.* High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(4): 565-570.
- [36] Fiedler V B, Loof I, Sander E, *et al.* Monoclonal antibody to tumor necrosis factor: Alpha prevents lethal endotoxin Sepsis in adult rhesus monkeys [J]. *J Lab Clin Med*, 1992, 120(4): 574-588.
- [37] Poll T V D, Levi M, Hack C E, *et al.* Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees [J]. *J Exp Med*, 1994, 179(4): 1253-1259.
- [38] Poll T V D, Levi M, Deventer S J V, *et al.* Differential effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees [J]. *Blood*, 1994, 83(2): 446-451.
- [39] Fisher C J, Dhainaut J F, Opal S M, *et al.* Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with Sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra sepsis syndrome study group [J]. *JAMA*, 1994, 271(23): 1836-1843.
- [40] Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, *et al.* Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. Norasept II study group [J]. *Lancet*, 1998, 351(9107): 929-933.
- [41] Li X, Wang L K, Wang L W, *et al.* Cisplatin protects against acute liver failure by inhibiting nuclear HMGB1 release [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 11224-11237.
- [42] Chang Y L, Huang X J, Liu Z H, *et al.* Dexmedetomidine inhibits the secretion of high mobility group box 1 from lipopolysaccharide-activated macrophages *in vitro* [J]. *J Surg Res*, 2013, 181(2): 308-314.
- [43] Wang H. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice [J]. *Science*, 1999, 285(5425): 248-251.
- [44] Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(3): 189-201.
- [45] 郭映涛. 谷胱甘肽 S-转氨酶 P1 通过抑制高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的释放调控 LPS 诱导的炎症反应 [D]. 南京: 南京师范大学, 2013.
- [46] Youn J H, Oh Y J, Kim E S, *et al.* High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes [J]. *J Immunol*, 2008, 180(7): 5067-5074.
- [47] 秦阳华. HMGB1 与 LPS 协同刺激巨噬细胞产生致炎细胞因子的机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [48] 黄慧娜. 参附注射液对 LPS 刺激的 Tet-on-HMGB1 过表达 RAW264.7 细胞 HMGB1 表达的影响 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [49] Andersson U, Tracey K J. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection [J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 139-162.
- [50] Bianchi M E. DAMPs, PAMPs and alarmins: All we need to know about danger [J]. *J Leukocyte Biol*, 2007, 81(1): 1-5.
- [51] Sha Y G, Zmijewski J, Xu Z W, *et al.* HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines [J]. *J Immunol*, 2008, 180(4): 2531-2537.
- [52] Fogo A S, Antonioli E, Calixto J B, *et al.* Tormentic acid reduces vascular smooth muscle cell proliferation and survival [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 615(1/3): 50-54.