

茶蜂花粉提取物 BPE 对 LPS 诱导的 Raw 264.7 细胞的体外抗炎症作用

平 舜, 王 凯, 张江临, 胡福良*

(浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 以茶蜂花粉提取物(BPE)为实验材料,研究了其可能的抗炎活性。通过福林酚法和三氯化铝比色法测定 BPE 中的总酚酸和总黄酮质量分数,ABTS 自由基清除实验评价 BPE 体外自由基清除能力,并采用 LPS 诱导的小鼠 Raw 264.7 细胞体外炎症模型,探究 BPE 对炎症因子和相关基因表达的调控作用。结果显示,BPE 的总酚酸及总黄酮质量分数分别为 (255.23 ± 21.43) mg/g (绿原酸当量)和 (132.85 ± 14.77) mg/g (芦丁当量);BPE 的 ABTS 自由基清除力的 IC_{50} 值为 (53.9 ± 5.38) μ g/mL;在体外抗炎实验中,BPE 能显著抑制 Raw 264.7 细胞 NO 的释放,显著抑制 *iNOS*、*IL-1 β* 和 *IL-10*,增强 *HO-1* 基因 mRNA 水平的表达,并呈一定的剂量相关性。表明,BPE 富含黄酮和酚酸类物质并具有很强的自由基清除能力,在体外细胞实验中表现出了良好的抗炎症效果。

关键词: 茶蜂花粉;自由基清除;抗炎

中图分类号:S 896 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2015)12—1302—06

In Vitro Anti-Inflammatory Effects of Camellia Sinensis Bee Pollen Extract (BPE) on LPS-Induced Inflammation in RAW 264.7 Macrophage Cells

PING Shun, WANG Kai, ZHANG Jianglin, HU Fuliang*

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: This study intended to evaluate the anti-inflammatory activity of *Camellia sinensis* bee pollen extract (BPE). Total phenolic content and total flavonoid content of BPE were determined by the Folin-Ciocalteu method and $AlCl_3$ colorimetry, respectively. Meanwhile, ABTS free-radical scavenging methods were used to evaluate its free-radical scavenging capacity. On the other hand, the anti-inflammatory effect of BPE was investigated *in vitro* by evaluating its modulating effects on the key inflammatory cytokines and the mRNA expression of inflammatory-mediators and cytokine genes in LPS stimulated Raw 264.7 cells. The results showed that the total phenolic content and total flavonoid content of BPE were 255.23 ± 21.43 mg/g and 132.85 ± 14.77 mg/g, respectively. BPE exhibited strong ABTS free-radical scavenging capacity and its IC_{50} value was 53.9 ± 5.38 μ g/mL. *In vitro*, BPE exhibited significantly to inhibit NO release and the mRNA expression of *iNOS*, *IL-1 β*

收稿日期: 2014-11-07

基金项目: 国家蜂产业技术体系专项(CARS-45);浙江省新苗人才计划项目(2013R401287)。

* 通信作者: 胡福良 (1964—),男,浙江东阳人,理学博士,研究员,博士研究生导师,主要从事蜜蜂科学及功能性食品科学的研究。

E-mail: flhu@zju.edu.cn

and *IL-10*, and to increase the mRNA expression of *HO-1*. The results indicated BPE was rich in phenolic compounds and had strong free-radical scavenging capacity, and showed a good anti-inflammatory effects *in vitro*.

Keywords: *Camellia sinensis* bee pollen extract, free radical scavenging capacity, anti-inflammation

蜂花粉中含有丰富的营养物质和生物学活性物质^[1],具有保护心血管系统、促进机体免疫力、清除自由基、调节肠道功能和治疗前列腺疾病等功能^[2-3]。炎症是机体组织受到病原体、受损细胞和其它刺激物等有害刺激所产生的一种自我保护性应答反应^[4],目前蜂产品中蜂胶的抗炎功能及其机制已得到广泛的研究^[5],蜂花粉作为重要的蜂产品之一却鲜有抗炎研究的报导。本研究中通过体外抗氧化实验评价茶(*Camellia sinensis*)蜂花粉提取物的抗氧化能力,并研究了其对脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠单核巨噬细胞(Raw 264.7)体外炎症反应和相关的炎症转录因子 mRNA 水平的表达作用,探讨了蜂花粉提取物的抗炎作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

茶蜂花粉,2013年10月采集自浙江安吉;小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 细胞,由浙江大学生命科学研究院夏总平教授惠赠;脂多糖(LPS),购自美国 Sigma 公司;PCR 引物,合成于上海生工生物工程技术服务有限公司;SYBR®Premix Ex Taq™(2×)等 RT-PCR 试剂,购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 茶蜂花粉提取物的制备

新鲜茶蜂花粉经冷冻干燥、机械破壁后置于-20℃贮存备用。将破壁蜂花粉使用正己烷脱脂,待充分提取后过滤,回收残渣,往残渣中加入体积分数 50%乙醇溶液,超声辅助提取,待充分提取后过滤,回收滤液,旋转蒸发滤液,浓缩乙醇,再用乙酸乙酯提取,获得乙酸乙酯提取液,干燥制得提取物(*Camellia sinensis* Bee Pollen Extract, BPE)。将 BPE 溶于纯乙醇,制成 20 mg/mL BPE 储备液,经 0.22 μm 滤膜过滤后,-20℃贮存备用。

1.3 总黄酮和总酚酸质量分数的测定

BPE 的总黄酮含量测定方法参照分光光度比

色法(GB/T 20574-2006),选用岛津 UV-2550 型紫外分光光度计测定,吸收波长为 415 nm。选用福林-酚法测定 BPE 的总酚酸含量,以没食子酸为对照,方法参照杨磊等的研究^[6]。

1.4 ABTS 自由基清除力测定

评价 BPE 的抗氧化能力选用 ABTS 自由基清除力,依据 Shi 等的方法^[7]并作适当调整。将 15 mL 7 mmol/mL 的 ABTS 水溶液与 264 μL 140 mmol/mL 的过硫酸钾溶液混合后室温下避光静置过夜,形成 ABTS+储备液,使用前用无水乙醇稀释至在 734 nm 吸光度为 0.70±0.02。反应在 96 孔酶标板中进行,每孔加入 50 μL 相应质量浓度的 BPE 加 100 μL 的 ABTS+反应液,混合后室温黑暗中孵育 10 min,734 nm 下测定吸光值。BPE 清除力以 IC₅₀ 表示,即达到 50%的 ABTS 自由基清除时的 BPE 质量浓度。

1.5 BPE 体外抗炎活性

1.5.1 细胞培养及细胞活力测定 小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 培养于 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和体积分数 10%热灭活胎牛血清混合的 DMEM 高糖培养基中,置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。BPE 对 RAW 264.7 细胞的活性与增殖检测采用 Cell Counting Kit-8(CCK8)法,选用 Dojido 的 CCK-8 试剂盒。10×10⁴/mL 的 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,孵育 24 h 后加入适当质量浓度的 BPE,每孔加入 100 μL CCK8 试剂反应 2 h 后利用酶标仪在波长 450 nm 下测定 OD 值。

1.5.2 Greiss 反应测定细胞培养液中 NO 浓度 小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 接种于 24 孔板孵育 24 h,再用相应质量浓度 BPE 预处理 1 h,再用 1 μg/mL 的 LPS 刺激。经 24 h 孵育,收集细胞培养液。离心分装后置于-80℃待测。细胞液中 NO 浓度选用碧云天 NO 试剂盒,酶标仪波长 550 nm 下测定 OD 值。

1.5.3 总 RNA 提取以及反转录 选用 Omega 公司的 E.Z.N.A 总 RNA 试剂盒提取小鼠巨噬细胞 RAW

264.7 的 RNA,具体步骤参照用户手册。Nano Drop ND-2000 型分光光度计测定提取纯化后的 RNA 浓度和纯度,然后用焦碳酸二乙酯(DEPC)预处理的水稀释后置于-80℃。以 RNA 为模板高效合成第一链 cDNA 的反应体系,选用 DRR037A Primpscript® RT reagent kit 试剂盒,在 25 μ L 反应体系中使用 1 μ L RNA 模板,反转录产物置于-20℃环境备用。

表 1 qRT-PCR 实验中的引物序列

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

基因	引物序列	产物大小/bp	登录号
<i>GAPDH</i>	5'-GAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC-3' 5'-TAGCCGTATTCATTGTCATACCAG-3'	212	NM_008084.2
<i>IL-1β</i>	5'-CCAACAAGTGATATTCTCCATGAG-3' 5'-ACTCTGCAGACTCAAACCTCCA-3'	239	NM_008361.3
<i>IL-10</i>	5'-CTATGCTGCCTGCTCTTACTG-3' 5'-CAACCCAAGTAACCCCTAAAAGTC-3'	221	NM_010548.2
<i>iNOS</i>	5'-TTTCCAGAAGCAGAATGTGACC-3' 5'-AACACCACTTTCACCAAGACTC-3'	294	NM_0109273
<i>HO-1</i>	5'-ACATTGAGCTGTTTGAGGAG-3' 5'-TACATGGCATAAATTCCCCTG-3'	241	NM_010442.2

2 结果与讨论

2.1 BPE 的总黄酮、总酚酸质量分数及其 ABTS 清除力

一些植物类天然产物富含酚酸、黄酮和单宁酸等,这些物质具有强抗氧化和抗自由基能力^[10]。BPE 中总黄酮和总酚酸质量分数测定结果见表 2。可见,以芦丁为对照,BPE 总黄酮质量占干质量的 13.29%;以绿原酸为对照,其总酚酸质量占干质量的 25.52%。

表 2 BPE 中总黄酮和总酚酸的含量及其 ABTS 清除能力
Table 2 Total flavonoid content, total phenolic content and ABTS free-scavenging activities of BPE

样品	总黄酮质量分数/(mg/g)	总酚酸质量分数/(mg/g)	ABTS 清除力 IC ₅₀ /(μ g/mL)
BPE	132.85 $\pm$ 14.77	255.23 $\pm$ 21.43	53.91 $\pm$ 5.38
抗坏血酸			71.71 $\pm$ 3.62

在炎症细胞中,多形核白细胞产生并释放活性氧自由基和活性氮自由基,这些自由基包括超氧阴离子、羟基自由基、过氧化氢和一氧化氮等^[11]。细胞内产生的过量活性氧自由基会造成核酸、蛋白质、碳水化合物和脂类等生物分子的损伤,恶化炎症程度,对细胞和组织造成严重损伤^[12]。因此,清除自由

1.5.4 实时定量荧光 PCR 分析 实验中的寡核苷酸引物利用 Perlprimer 软件设计并由上海生工生物技术公司合成,具体引物信息见表 1。实时荧光定量 PCR 选用 TaKaRa 的 SYBR premix EX Taq 试剂盒,根据文献[8]方法分析检测。*GAPDH* 为管家基因,作为目标基因表达水平的标准参照物,选用 2^{- Δ Ct} 法计算表达水平^[9]。

基的能力也是评价抗炎效果的一个重要指标。研究中测得 BPE 的 ABTS 自由基清除能力的 IC₅₀ 值为 (53.91 $\pm$ 5.38) μ g/mL, 强于维生素 C 的 ABTS 自由基清除能力(见表 2)。表明 BPE 具有很强的自由基清除能力,这可能与富含黄酮和酚酸类物质有关,与前人的研究结果一致^[13]。

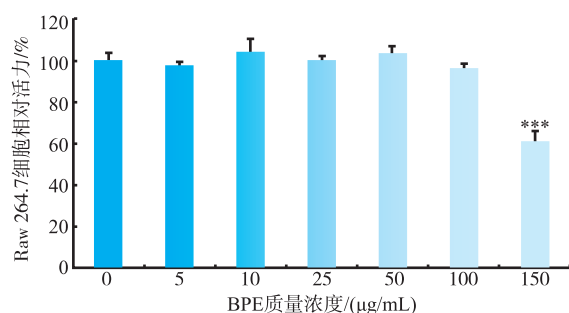
2.2 BPE 对 RAW264.7 细胞活力的影响

为选择合适浓度的 BPE,采用了 CCK-8 法测定不同浓度的 BPE 对 RAW264.7 细胞生长的影响,结果见图 1。质量浓度为 5~100 μ g/mL 时,RAW264.7 细胞活力未出现显著性变化,表明该质量浓度范围内 BPE 处理无明显细胞毒性。而高于此质量浓度时,RAW264.7 细胞的活力显著降低。因此,后续研究将 100 μ g/mL 设为质量浓度实验上限。

2.3 BPE 对 RAW264.7 细胞的体外抗炎作用

2.3.1 BPE 对 NO 释放的作用 NO 是由 NO 合酶(Nitric Oxide Synthase, NOS)催化 L-精氨酸(L-Arginine)而生成。炎症发生过程,NO 是一种重要的跨膜信息分子,激活的巨噬细胞可以大量分泌 NO,导致周围组织损伤^[14]。本研究中评价了不同质量浓度 BPE 对 1 μ g/mL LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放 NO 能力的影响,结果见图 2。在刺激的 RAW264.7 细胞液中 NO 浓度为 (6.52 $\pm$ 1.21) μ mol/L,在未刺激

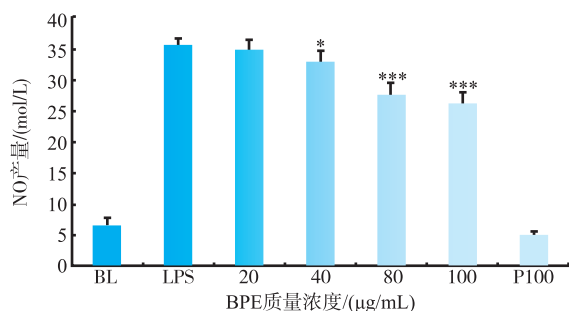
且以 100 $\mu\text{g/mL}$ BPE 处理, 则其浓度亦处较低水平, 为 $(5.20 \pm 0.24) \mu\text{mol/L}$, 表明在未受 LPS 刺激的 Raw 264.7 细胞中, 细胞液的 NO 浓度处于较低水平且 BPE 并不影响 NO 释放。LPS 刺激 24 h 后, 其浓度增加到 $(35.70 \pm 0.94) \mu\text{mol/L}$ 。而在刺激前 1 h 加入不同质量浓度 BPE 预处理 Raw 264.7 细胞, 发现对其 NO 的释放能力具有一定抑制, 并呈质量浓度依赖性。在 BPE 质量浓度为 80、100 $\mu\text{g/mL}$ 时对 NO 释放的抑制作用极显著。由此可推测, BPE 可以通过抑制 NO 的释放来起到抗炎作用。



与空白组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 1 BPE 对 Raw 264.7 细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of BPE on the cell viability of Raw 264.7 cells



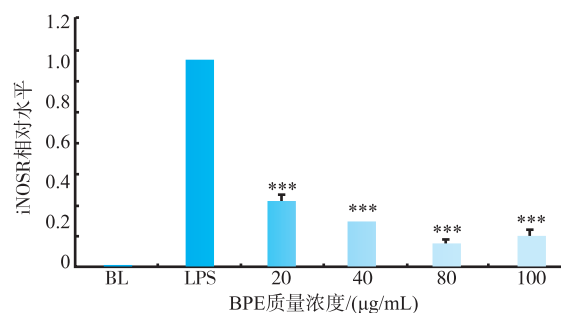
与 LPS 刺激组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 2 BPE 对 Raw 264.7 细胞释放 NO 能力的影响

Fig. 2 Effects of BPE on nitric oxide (NO) production in Raw 264.7 cells

2.3.2 BPE 对炎症调节因子 mRNA 水平表达的作用
在炎症过程中, 细胞内诱导型 NO 合酶(induced Nitric Oxide Synthase, iNOS)会高表达^[15]。NO 测定结果表明, BPE 可抑制炎症过程中 NO 产生, 且呈剂量相关性。已有蜂胶研究表明, 巴西绿蜂胶醇提取液能通过影响核因子- κB (NF- κB)信号通路, 从而抑制 iNOS 基因的转录, 进而减少 iNOS 产生, 抑制 iNOS 催化合成 NO 的能力^[16-17]。本研究中, iNOS 基因

mRNA 的水平表达定量结果见图 3。4 个给药质量浓度均极显著抑制 iNOS 基因 mRNA 水平的表达, 且也具有质量浓度相关性, 与对 NO 的抑制效果一致, 可推测 BPE 可能存在与巴西绿蜂胶醇提取液相同的作用机制, 即抑制 NO 合成。在剂量上, 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 BPE 对 iNOS 基因 mRNA 水平的表达抑制效果非常显著, 但此后随着质量浓度的增加抑制效果趋于平缓, 这可能与 20 $\mu\text{g/mL}$ 给药质量浓度后 iNOS 表达已处于较低水平相关。



与 LPS 刺激组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

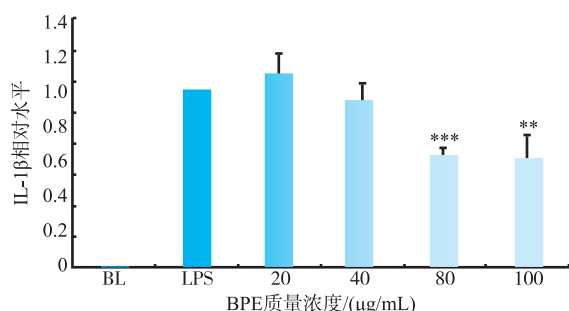
图 3 BPE 对 Raw 264.7 细胞中 iNOS 的 mRNA 水平表达的影响

Fig. 3 Effects of BPE on the mRNA expression of iNOS in LPS stimulated Raw 264.7 cells

白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 是重要的炎症相关因子, 在炎症反应中它会高表达^[15]。在激活的巨噬细胞中, IL-1 β 是一种重要的促炎症因子, 它可加剧炎症反应, 造成组织和器官的损伤^[18]。本研究中, 在 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 BPE 处理并未表现出对 IL-1 β 的抑制作用, 而随着质量浓度的升高显著性地抑制 IL-1 β 的表达, 结果见图 4, 但其抑制作用弱于同质量浓度的 BPE 对 iNOS 的表达。

IL-10 是一种重要的抗炎因子, 陈红光利用含氢培养液试验 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 Raw 264.7 的炎症模型, 发现 LPS 刺激可诱导 IL-10 的高表达, 而含氢培养液可以增强 IL-10 的表达并具有浓度依赖性^[19]。而王慧研究了白藤梨多糖对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 Raw 264.7 炎症模型的免疫调控作用, 发现 LPS 刺激同样可诱导 IL-10 的高表达, 但白藤梨多糖处理均抑制了 IL-10 的表达。在表达量上随着白藤梨多糖剂量增加, IL-10 表达量在增强^[20]。本研究中 LPS 刺激同样可诱导 IL-10 的高表达, 但 BPE 的处理显著性地抑制了 IL-10 的表达, 且具有一定的质量浓度相关性, 结果见图 5。BPE 质量浓度

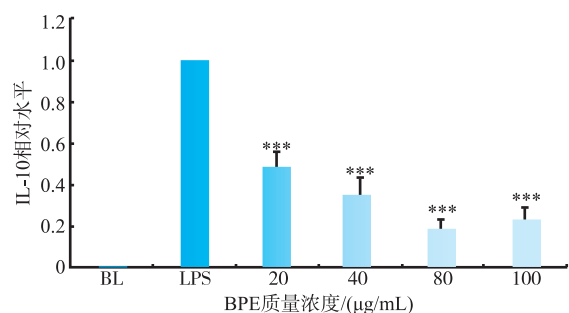
在 80、100 $\mu\text{g/mL}$ 时, IL-10 的表达量已处于较低水平, BPE 对 IL-10 表达的抑制作用趋缓。因此, 推测 BPE 可能是通过缓解炎症反应而抑制了抗炎症因子 IL-10 的表达。



与 LPS 刺激组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 4 BPE 对 Raw 264.7 细胞中 IL-1 β 的 mRNA 水平表达的影响

Fig. 4 Effects of BPE on the mRNA expression of IL-1 β in LPS stimulated Raw 264.7 cells



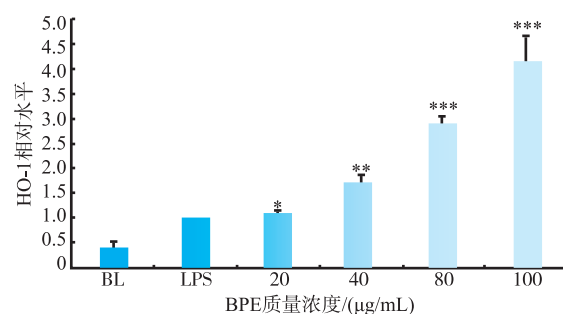
与 LPS 刺激组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 5 BPE 对 Raw 264.7 细胞中 IL-10 的 mRNA 水平表达的影响

Fig. 5 Effects of BPE on the mRNA expression of IL-10 in LPS stimulated Raw 264.7 cells

血红素氧合酶-1 (hemeoxygenase-1, HO-1) 是一种应激反应蛋白质, 可有效调控细胞内的活性氧水平, 从而起到抗氧化作用^[21]。HO-1 的高表达可以增强细胞抵抗凋亡刺激的能力^[22]。研究发现, LPS 刺激

后细胞内增强了 HO-1 基因 mRNA 水平的表达, 而 BPE 预处理极显著地增强了 HO-1 基因 mRNA 水平的表达, 结果见图 6, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 BPE 处理时 HO-1 的表达量接近 LPS 刺激时的 4 倍, 并呈现出随着剂量的增加 HO-1 的表达也不断增强。因此可以推断, BPE 在 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞炎症模型中是一种强有效的抗氧化剂, 从而发挥对细胞损伤的保护作用。Park 等研究发现, 高表达的 HO-1 可有效抑制 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的表达^[22-25], 因此可推测 BPE 可能是通过增强 HO-1 的表达来抑制 iNOS、IL-1 β 和 IL-10 的表达, 从而起到抗炎作用。



与 LPS 刺激组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 6 BPE 对 Raw 264.7 细胞中 HO-1 的 mRNA 水平表达的影响

Fig. 6 Effects of BPE on the mRNA expression of HO-1 in LPS stimulated Raw 264.7 cells

3 结 语

茶蜂花粉提取物 BPE 含有丰富的酚酸和黄酮类物质, 并且具有极强的清除自由基的能力。在细胞实验中, BPE 可以有效地抑制 NO 的产生, 同时增强 HO-1 的表达, 抑制 iNOS、IL-1 β 和 IL-10 炎症相关基因的表达, 从而起到良好的体外抗炎效果。但是, 本研究结果只是论证了 BPE 具有的体外抗炎功效, 仍需有进一步的动物实验进行验证, 以便充分开发茶蜂花粉的抗炎活性。

参考文献:

- [1] 任乃艳, 卢荣, 程妮, 等. 蜂花粉活性成分的研究进展[J]. 中国蜂业, 2011(10-12): 76-78.
REN Naiyan, LU Rong, CHEN Ni, et al. Recent advances in active ingredients of bee pollen [J]. *Apiculture of China*, 2011 (10-12): 76-78. (in Chinese)
- [2] Llnskens H, Jorde W. Pollen as food and medicine-a review[J]. *Economic Botany*, 1997, 51(1): 78-86.
- [3] Silva T M S, Camara C A, da Silva Lins A C, et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19(6): 507-511.
- [4] Coussens L M, Werb Z. Inflammation and cancer[J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 860-867.

- [5] 王凯,张江临,胡福良. 蜂胶抗炎活性及其分子机制研究进展[J]. 中草药,2013,44(16):2321-2329.
WANG Kai,ZHANG Jianglin,HU Fuliang. Research progress in anti-inflammatory activity of propolis and its molecular mechanism[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**,2013,44(16):2321-2329.(in Chinese)
- [6] 杨磊,隋小宇,祖元刚,等. Folin-Ciocalteu 法测定迷迭香中总酚酸含量[J]. 中成药,2009,31(2):272-275.
YANG Lei,SUI Xiaoyu,ZU Yuangang,et al. The Total phenolic content in rosemary determined by the Folin-Ciocalteu method [J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**,2009,31(2):272-275.(in Chinese)
- [7] Shi H M,Yang H S,Zhang X W,et al. Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory and radical scavenging properties of methanolic extracts of Chinese propolis [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012,60(50):12403-12410.
- [8] Wang K,Ping S,Huang S,et al.Molecular mechanisms underlying the in vitro anti-inflammatory effects of a flavonoid-rich ethanol extract from chinese propolis (poplar type)[R]. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**,2013.
- [9] Xie C,Kang J,Li Z,et al.The acai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent:blockade of LPS-mediated TNF-alpha and IL-6 production through inhibiting NF-kappa B activation and MAPK pathway [J]. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2012,23(9):1184-1191.
- [10] Nacz M,Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food[J]. **Journal of Chromatography A**,2004,1054(1-2):95-111.
- [11] Ramos C L,Pou S,Britigan B E,et al. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes[J]. **Journal of Biological Chemistry**,1992,267(12):8307-8312.
- [12] Trenam C W,Blake D R,Morris C J. Skin inflammation-reactive oxygen species and the role of iron[J]. **Journal of Investigative Dermatology**,1992,99(6):675-682.
- [13] Dudonne S,Vitrac X,Coutiere P,et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH,ABTS,FRAP,SOD,and ORAC assays [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009,57(5):1768-1774.
- [14] 定天明,陈坚,张正行,等. 生物体内一氧化氮的检测方法及其应用[J]. 药学进展,2005,29(5):221-226.
DING Tianming,CHEN Jian,ZHANG Zhengxing,et al. The methods for determination of nitric oxide in Vivo and their applications[J]. **Progress in Pharmaceutical Sciences**,2005,29(5):221-226.(in Chinese)
- [15] Lee K H,Choi E M. Effect of pine pollen extract on experimental chronic arthritis[J]. **Phytotherapy Research**,2009,23(5):651.
- [16] Song Y S,Park E H,Hur G M,et al. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity [J]. **Journal of Ethnopharmacology**,2002,80(2-3):155-161.
- [17] Tan-No K,Nakajima T,Shoji T,et al. Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema[J]. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**,2006,29(1):96-99.
- [18] Bachiega T F,Orsatti C L,Pagliarone A C,et al. The effects of propolis and its isolated compounds on cytokine production by murine macrophages[J]. **Phytotherapy Research**,2012,26(9):1308-1313.
- [19] 陈红光. 含氢培养液对脂多糖致 Raw 264.7 巨噬细胞炎症反应的影响[D]. 天津:天津医科大学,2013.
- [20] 王慧. APES 对 RAW 264.7 细胞的免疫调控作用及其机制研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.
- [21] Min K J,Cho K H,Kwon T K. The effect of oxidized low density lipoprotein (oxLDL)-induced heme oxygenase-1 on LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells[J]. **Cellular Signalling**,2012,24(6):1215-1221.
- [22] Liu Z M,Chen G G,Ng E K W,et al. Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells[J]. **Oncogene**,2004,23(2):503-513.
- [23] Park S Y,Park D J,Kim Y H,et al. Upregulation of heme oxygenase-1 via PI3K/Akt and Nrf-2 signaling pathways mediates the anti-inflammatory activity of Schisandrin in Porphyromonas gingivalis LPS-stimulated macrophages [J]. **Immunology Letters**, 2011,139(1-2):93-101.
- [24] Chakraborty P,Saraswat G,Kabir S N. Alpha-Dihydroxychalcone-glycoside (alpha-DHC) isolated from the heartwood of Pterocarpus marsupium inhibits LPS induced MAPK activation and up regulates HO-1 expression in murine RAW 264.7 macrophage[J]. **Toxicology and Applied Pharmacology**,2014,277(1):95-107.
- [25] Oh Y C,Jeong Y H,Cho W K,et al. Inhibitory effects of palmultang on inflammatory mediator production related to suppression of NF-kappa B and MAPK pathways and induction of HO-1 expression in macrophages[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2014,15(5):8443-8457.