

Tối ưu hoá mô hình sàng lọc hợp chất kháng viêm trên tế bào macrophage RAW 264.7

- Lê Đình Tố
- Nguyễn Trung Kiên
- Trần Linh Thuớc
- Đặng Thị Phương Thảo

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2016, nhận đăng ngày 30 tháng 11 năm 2017)

TÓM TẮT

Viêm là một đáp ứng bảo vệ cơ thể của hệ miễn dịch đối với các tác nhân có hại. Quá trình viêm quá mức gây nên rất nhiều loại bệnh. Hiện nay, viêm đang được điều trị bằng thuốc kháng viêm steroid và các thuốc kháng viêm không steroid. Tuy nhiên cả hai loại thuốc trên đều có những tác dụng phụ không mong muốn trên nhiều cơ quan. Vì vậy, nhu cầu tìm kiếm những hợp chất kháng viêm mới là cấp thiết, đặc biệt là hợp chất có nguồn gốc từ tự nhiên. Nghiên cứu này nhằm xây dựng mô hình tế bào RAW 264.7 trong nghiên cứu sàng lọc hợp chất kháng viêm và thử nghiệm khả năng kháng viêm của cây thuốc An điền mềm (*Hedyotis capitellata* var. *Mollis*). Nghiên cứu tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của việc bổ sung tế bào, mật độ tế bào, nồng độ lipopolysaccharide (LPS), thời gian ủ LPS lên khả năng tiết nitric oxide

của tế bào RAW 264.7. Kết quả thực nghiệm cho thấy mật độ tế bào tối ưu cho mô hình là 10^4 tế bào trên giếng, gây độc tế bào sử dụng huyết thanh 1 %, sử dụng LPS nồng độ cuối là 0.5 $\mu\text{g/mL}$ trong thời gian 24 giờ. Tiếp theo, nghiên cứu này ứng dụng mô hình này để đánh giá khả năng kháng viêm của cây thuốc An điền mềm (*Hedyotis capitellata* var. *Mollis*) là cây thuốc được cộng đồng người Cơ Ho, Bidoup Núi Bà, Lâm Đồng, Việt Nam sử dụng để điều trị vết thương ngoài da. Dữ liệu thực nghiệm cho thấy các cao chiết của cây thuốc đều có khả năng kháng viêm *in vitro*, đặc biệt phân đoạn ether dầu hòa ở nồng độ 23,8 $\mu\text{g/mL}$ thể hiện hoạt tính ức chế tiết nitric oxide 128,20 %, trong khi dexamethason 50 μM cho hiệu quả ức chế tiết nitric oxide 112 %.

Từ khóa: viêm; RAW 264.7, *Hedyotis capitellata* var. *Mollis*, nitric oxide, lipopolysaccharide

MỞ ĐẦU

Viêm quá mức là nguyên nhân của nhiều loại bệnh như ung thư, tim mạch, đái tháo đường, béo phì, loãng xương, thấp khớp, viêm ruột, hen suyễn, suy giảm thần kinh trung ương, bệnh Parkinson... [6]. Hiện nay viêm đang được điều trị bằng thuốc kháng viêm steroid (glucocorticoid-GC) và các thuốc kháng viêm không steroid (NSAIDs). Tuy nhiên, cả hai loại thuốc trên đều có những tác dụng phụ không mong muốn trên nhiều bộ phận cơ thể [9, 12]. Vì vậy, việc nghiên cứu, tìm kiếm thêm các hợp chất kháng viêm khác là nhu cầu thực tiễn, đặc biệt là nhu cầu sàng lọc các hợp chất tự nhiên có hoạt tính kháng viêm từ các

cây thuốc dân gian. Nhiều mô hình sàng lọc hợp chất kháng viêm đã và đang được các nhà khoa học sử dụng. Trong đó các mô hình *in vitro* được thực hiện trên các tế bào nuôi cấy có ưu điểm thuận tiện và hiệu quả trong việc sàng lọc các hợp chất có hoạt tính kháng viêm.

Trong nghiên cứu về hợp chất kháng viêm, nhiều nhà nghiên cứu sử dụng đại thực bào như một mô hình thử nghiệm. Có nhiều loại đại thực bào được sử dụng như RAW 264.7, J774, WEHI-3, P388D1 [4, 5, 13, 14, 18]. Trong đó, mô hình tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng lipopolysaccharide (LPS) được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu sàng lọc hợp chất

kháng viêm. Tuy nhiên, các công bố khoa học này cho thấy sự khác biệt trong các thông số của mô hình kích thích phản ứng viêm sung như nồng độ LPS, mật độ tế bào, nồng độ FBS (Fetal Bovine Serum) sử dụng để gây đỏi tế bào, thời gian gây đỏi tế bào, và thời gian ủ với LPS [4, 5, 7, 14, 18]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tối ưu hóa mô hình sàng lọc chất kháng viêm sử dụng tế bào RAW 264.7

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây thuốc (mẫu thử)

Cây an điền mềm được thu hái tại vườn quốc gia Bidoup Núi bà, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam. Cây thuốc được định danh tại Khoa Sinh học-Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh. Sau đó mẫu cây được phơi khô, xay nhuyễn, chiết xuất cao toàn phần với ethanol 70 %. Các cao phân đoạn ether dầu hỏa, ethyl acetat nước, được ly trích từ cao tổng bằng phương pháp bổ sung các dung môi tương ứng. Tiếp theo cao chiết được cô quay, đông khô và bảo quản ở 4 °C.

Dòng tế bào động vật

Tế bào RAW 264.7 (ATCC TIB 71) được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh Học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

Hóa chất

Môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium – Nutrient Mixture F-12 (Himedia), huyết thanh (Sigma), LPS (Sigma), dexamethason (Sigma), thuốc

thử Griess (Sigma), DMSO (Merck), ethanol (Chemsol), ether dầu hỏa (Chemsol), ethyl acetat (Chemsol).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xây dựng mô hình tế bào RAW 264.7 để sàng lọc chất kháng viêm.

Tế bào RAW 264,7 được nuôi trong môi trường DMEM-F12, FBS 10 % đến độ phủ 70–80 %, sau đó tế bào được cấy chuyển qua trong đĩa 96 giếng để thực hiện thí nghiệm với các thay đổi về nồng độ LPS, mật độ tế bào, các điều kiện gây đỏi tế bào, thời gian ủ với LPS. Sau đó, 50 µL dịch nổi trong đĩa 96 giếng nuôi tế bào (sau khi đã ủ với LPS và đạt được các chỉ tiêu về thời gian và thành phần thí nghiệm) được chuyển sang đĩa 96 giếng khác và bổ sung một thể tích 50µL thuốc thử Griess, ủ 10 phút. Đo OD bước sóng 550 nm.

Phương pháp khảo sát khả năng ức chế nitric oxide của cao chiết cây thuốc an điền mềm.

Tế bào RAW 264.7 được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 10^4 tế bào/giếng, ủ trong 12 giờ ở điều kiện 37 °C, 5 % CO₂. Hút bỏ môi trường cũ và thay thế bằng môi trường chứa 1 % FBS, ủ trong 6 giờ. Sau đó, thay môi trường cũ bằng môi trường có chứa cao chiết (hoặc dexamethason) ở các nồng độ khác nhau và LPS nồng độ 0,5 µg/mL, ủ 24 giờ. Hút 50 µL dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng khác và bổ sung 50 µL thuốc thử Griess, ủ 10 phút. Đo OD bước sóng 550 nm. Khả năng ức chế sinh nitric oxide được tính bằng công thức:

$$\text{Khả năng ức chế} = \frac{OD_{550nm} \text{ kích thích LPS không trị liệu} - OD_{550nm} \text{ kích thích được trị liệu}}{OD_{550nm} \text{ kích thích LPS không trị liệu} - OD_{550nm} \text{ không kích thích LPS}} (\%)$$

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và xử lý ANOVA bằng Tukey test, sử dụng phần mềm GraphPad Prism (giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê).

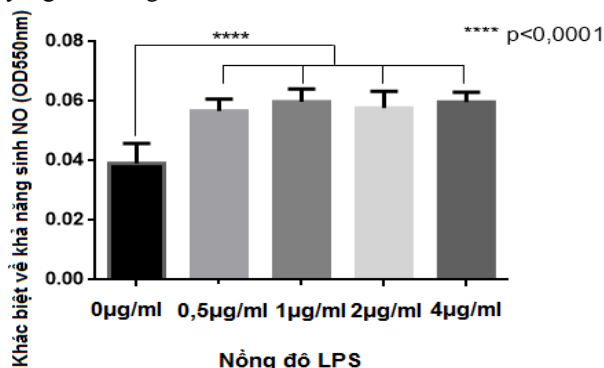
KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất kích thích LPS lên khả năng sinh NO của tế bào RAW 264.7

Trong mô hình khảo sát hoạt tính kháng viêm trên tế bào RAW 264.7, đại thực bào RAW 264.7 được chủ động kích thích viêm bằng LPS. Tế bào RAW 264.7 đáp ứng sự kích thích LPS này bằng các điều hoà nội bào và sinh NO. Khảo nghiệm đánh giá hoạt tính kháng viêm trên dòng đại thực bào này được đánh giá thông qua khả năng làm giảm tiết NO của tế bào [2, 3].

Nhằm tạo mô hình đại thực bào ở trạng thái kích thích viêm, nghiên cứu này tiến hành khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng LPS lên khả năng tiết NO với 4 nồng độ 0,5, 1, 2, 4 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả thực nghiệm chứng minh cả 4 nồng độ LPS đều cho thấy khả năng tiết NO có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với

chứng âm (Hình 1). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ LPS từ 0,5 $\mu\text{g/mL}$ tới 4 $\mu\text{g/mL}$ không có sự gia tăng trong sự tiết NO, tỉ lệ tiết NO so với chứng âm không đổi và xấp xỉ 1,5 lần. Do vậy, LPS với nồng độ 0,5 $\mu\text{g/mL}$ được áp dụng cho các thử nghiệm tiếp theo.

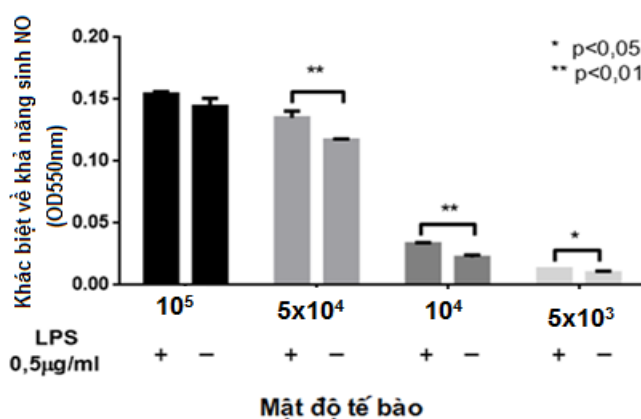


Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ chất kích thích LPS lên khả năng sinh NO của tế bào RAW 264.7

Khảo sát ảnh hưởng của mật độ tế bào lên khả năng tiết NO của tế bào RAW 264.7

Mật độ tế bào trong đĩa nuôi cấy là một yếu tố quan trọng tác động lên sinh lý tế bào, đây cũng là một yếu tố ảnh hưởng lên khả năng đáp ứng viêm của đại thực bào trong môi trường thử nghiệm. Vì vậy, nghiên cứu này tiến hành khảo sát các mật độ tế bào khác nhau từ 5×10^3 tế bào/giếng, 10^4 tế bào/giếng, 5×10^4 tế bào/giếng và 10^5 tế bào/giếng. Kết quả thực nghiệm cho thấy khi tăng mật độ tế bào, lượng NO tiết ra tăng. Tuy nhiên, khi mật độ tế bào tăng, tỉ lệ tăng so với chứng âm giảm dần. Tỉ lệ tiết NO so với

chứng âm cao nhất ở mật độ tế bào 10^4 tế bào/giếng đạt 1,5 lần sau đó tỉ lệ này giảm xuống còn 1,18 lần ở mật độ 5×10^4 tế bào/giếng và 1,07 lần ở mật độ 10^5 tế bào/giếng (Hình 2). Mật độ tế bào cao làm môi trường bị cạn kiệt dinh dưỡng có thể ảnh hưởng tới hoạt động phiên mã của các gene iNOS, làm lượng NO sinh ra so với chứng âm bị chậm lại, ngoài ra khi mật độ cao, tế bào bị kìm hãm và cảm ứng tự chết theo cơ chế apoptosis [11]. Do đó mật độ tế bào 10^4 tế bào/giếng là tối ưu cho mô hình của nghiên cứu này.



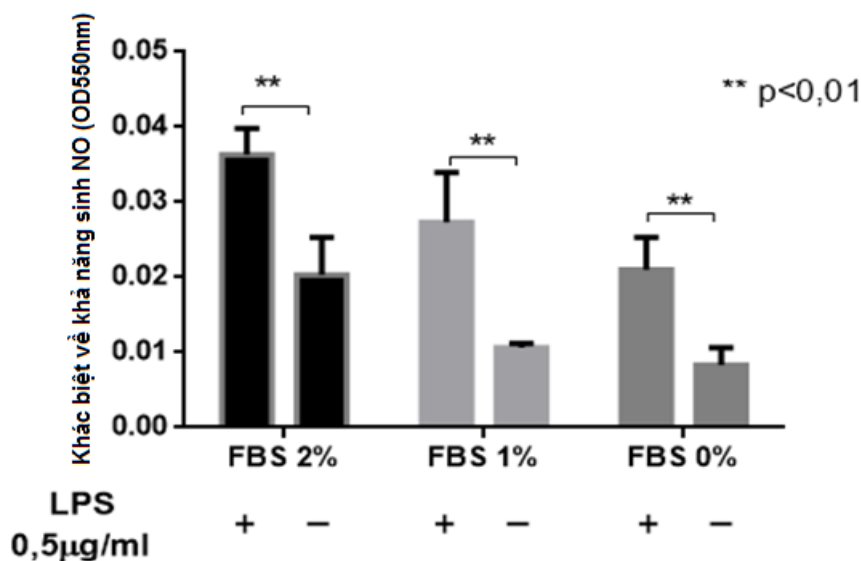
Hình 2. Ảnh hưởng của mật độ tế bào lên khả năng tiết NO của tế bào RAW 264.7

Khảo sát ảnh hưởng của các phương pháp gây đói tế bào lên khả năng sinh NO của tế bào RAW 264.7

Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ huyết thanh lên khả năng sinh NO của tế bào RAW 264.7

Khi được nuôi cấy ở điều kiện huyết thanh thấp (gây đói), tế bào sẽ bước vào giai đoạn G0/G1 và không tăng sinh. Hơn nữa sự làm đói toàn bộ huyết thanh kích thích đại thực bào sản xuất và tiết IFN- α , IFN- β dẫn tới quá trình apoptosis [8, 10, 16]. Vì nồng

độ FBS gây đói có ảnh hưởng tới khả năng đồng nhất tế bào, cảm ứng apoptosis, tiến hành khảo sát ba nồng độ FBS làm đói là 2 % 1 % và 0 %. Kết quả cho thấy ảnh hưởng của nồng độ FBS tới tỉ lệ NO tiết ra, khi nồng độ FBS giảm lượng NO tiết ra cũng giảm. Cả ba nồng độ FBS là 2 %, 1 % và 0 % đều cho sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng âm. Trong đó, nồng độ FBS 1% cho tỉ lệ chênh lệch so với chứng âm cao nhất, gấp khoảng 2,6 lần (Hình 3). Như vậy, FBS 1 % được sử dụng cho các khảo sát tiếp theo.



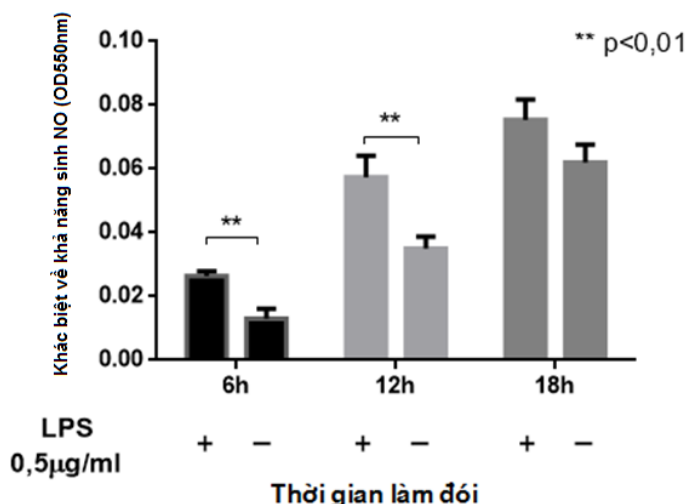
Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ huyết thanh lên khả năng sinh NO của tế bào RAW 264.7

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian làm đói lên khả năng sinh NO của tế bào RAW 264.7

Bên cạnh nồng độ FBS làm đói tế bào, thời gian gây đói tế bào cũng ảnh hưởng đến sự đồng nhất của tế bào, thời gian gây đói có thể từ 15–30 phút tới nhiều tuần tùy từng loại tế bào [10]. Chu kỳ tế bào RAW 264.7 khoảng 12 giờ, do đó nghiên cứu này tiến hành khảo sát các khoảng thời gian làm đói 6 giờ (khoảng 0,5 chu kỳ), 12 giờ (khoảng 1 chu kỳ) và 18 giờ (khoảng 1,5 chu kỳ).

Khi tăng thời gian làm đói, mặc dù lượng NO tiết ra tăng nhưng tỉ lệ NO so với chứng âm giảm dần.

Khi tăng thời gian làm đói lên 18 giờ, kết quả cho thấy không còn sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng âm. Tỉ lệ NO sinh ra so với chứng âm đạt cao nhất khi làm đói với thời gian là 6 giờ, đạt 2 lần và sau khoảng thời gian 12 giờ tỉ lệ này giảm xuống và đạt 1,6 lần và cuối cùng sau 18 giờ tỉ lệ này chỉ còn 1,2 lần (Hình 4). Điều này gợi ý rằng thời gian làm đói quá lâu (lớn hơn 1 chu kỳ tế bào) có tác động gây tăng tiết NO quá mức ở cả chứng âm và chứng dương. Do đó thời gian làm đói tối ưu chọn được là 6 giờ.

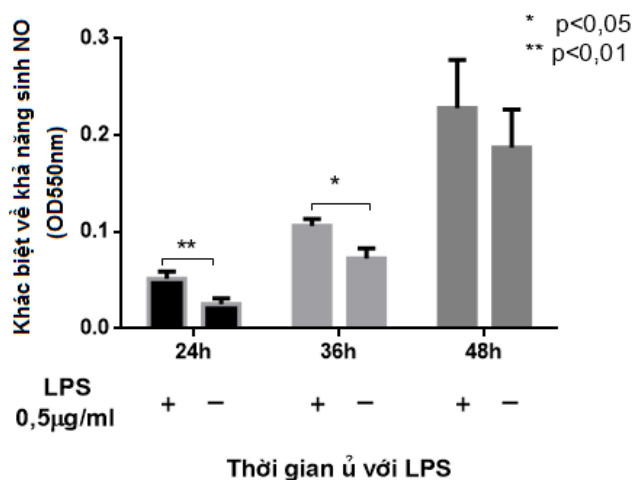


Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian làm đói lên khả năng sinh NO của tế bào RAW 264.7

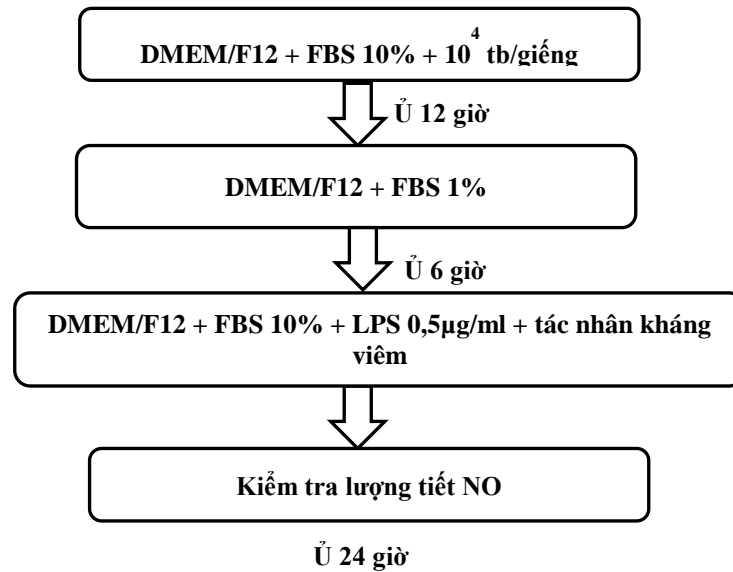
Khảo sát ảnh hưởng của thời gian ủ với chất kích thích LPS lên khả năng sinh NO của tế bào RAW 264.7

Thời gian ủ với LPS là một trong những yếu tố ảnh hưởng tới lượng NO tiết ra [17]. Vì vậy, tiến hành khảo sát thời gian ủ với LPS ở các thời điểm là 24 giờ, 36 giờ và 48 giờ. Thực nghiệm cho thấy, theo thời gian khảo sát, lượng NO tiết ra khi tế bào được kích thích tăng dần, cụ thể sau 36 giờ lượng NO tiết

ra ở chứng dương tăng gấp 2 lần so với chứng dương ở 24 giờ, và sau 48 giờ lượng NO tiết ra khi được kích thích tăng 4,4 lần so với 24 giờ. Mặc dù lượng tiết tăng nhưng tỉ lệ NO bị ảnh hưởng bởi thời gian ủ với LPS. Tỉ lệ này đạt cao nhất đạt 2 lần với thời gian ủ với LPS là 24 giờ và giảm dần khi tăng thời gian ủ với LPS lên 36 giờ và 48 giờ (Hình 5). Kết quả này phù hợp với thời gian ủ với LPS của mô hình tế bào RAW 264.7 trong các công bố trước đó [4, 5, 15]



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian ủ với chất kích thích LPS lên khả năng sinh NO của tế bào RAW 264.7



Hình 6. Quy trình thử nghiệm hoạt tính kháng viêm trên mô hình tế bào RAW 264.7

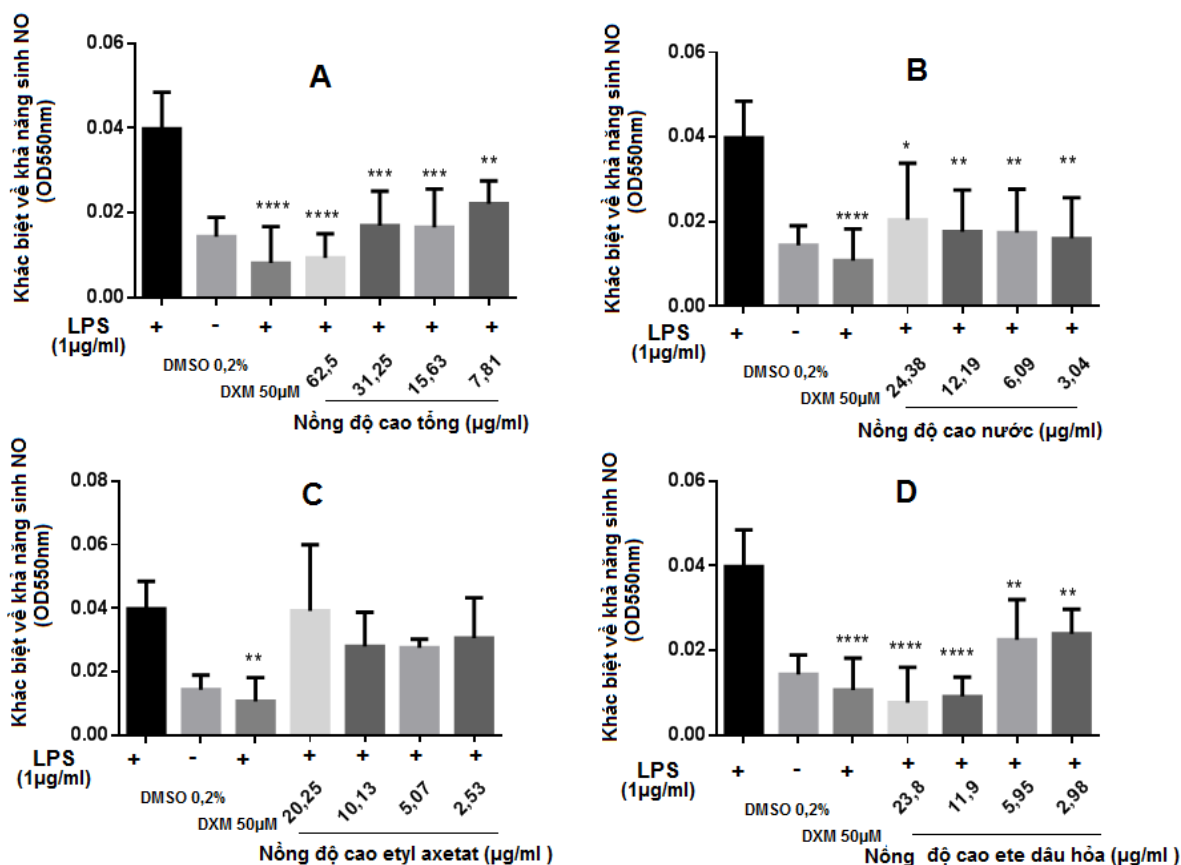
Các kết quả khảo sát thu được gợi ý quy trình thử nghiệm hoạt tính kháng viêm trên mô hình tế bào RAW 264.7 (Hình 6).

Khảo sát khả năng ức chế sinh NO của cao tổng và cao phân đoạn cây An điền mềm.

Tiến hành ứng dụng mô hình đã xây dựng nhằm đánh giá khả năng ức chế sinh NO của cao chiết của cây thuốc an điền mềm, cây thuốc được đồng bào dân tộc K'Ho, tỉnh Lâm Đồng, sử dụng để điều trị vết thương ngoài da. Kết quả cho thấy, khi tế bào RAW 264.7 được kích thích bởi tác nhân LPS, tỉ lệ NO sinh ra cao gấp 3 lần. Trong thí nghiệm này, chất kháng viêm dexamethason được sử dụng làm chứng dương, dexamethason giúp tế bào RAW 264.7 giảm tiết hoàn toàn lượng NO. Đối với cây thuốc an điền mềm, khả năng ức chế viêm được tìm thấy trong cả cao tổng lẫn cao phân đoạn. Ở các cao tổng nồng độ 62,5 μg/mL ức chế 109,26 % NO sinh ra, cao nước nồng độ 24,38 μg/mL ức chế 97,9 % NO sinh ra, cao ete dầu hòa các nồng độ 23,8 μg/mL và 11,9 μg/mL

cho khả năng ức chế NO hoàn toàn và mạnh hơn dexamethason (ức chế 112 %) lần lượt là 128 % và 118 %. Cao ethyl acetate có khả năng ức chế viêm kém hơn so với cao tổng vào cao phân đoạn, chỉ ức chế cao nhất 53 % ở nồng độ 5,07 μg/mL. Kết quả thu được đã xác định phân đoạn cao chứa các hợp chất có hoạt tính cao trong kháng tiết NO là phân đoạn nước và phân đoạn ether dầu hòa (Hình 7).

Nghiên cứu trước đây của R.Amad và cộng sự (2005) trên cao methanol cho thấy cây An điền mềm có khả năng ức chế tiết NO khoảng 40 % ở nồng độ cao tổng là 100 μg/mL [1]. Sự khác biệt trong khả năng ức chế NO giữa nghiên cứu của đề tài này và nhóm tác giả R.Amad có thể do sự phân bố và thời gian thu hái, loại cao chiết khác nhau của cây thuốc khi tiến hành thí nghiệm. Các kết quả thực nghiệm cho thấy mô hình tế bào RAW 264.7 của nghiên cứu xây dựng được hoạt động hiệu quả trong việc sàng lọc cây thuốc có hoạt tính kháng viêm.



Hình 7. Khả năng ức chế sinh NO của cao tổng và cao phân đoạn cây an điền mềm

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc xây dựng mô hình tế bào RAW 264.7 nhằm sàng lọc chất kháng viêm với các thông số: nồng độ LPS 0,5 µg/mL, mật độ tế bào 10⁴ tế bào/giếng, nồng độ huyết thanh gây đối 1 %, thời gian gây đối 6 giờ, và thời gian ủ với LPS là 24 giờ.

Lời cảm ơn : Công trình này được thực hiện với kinh phí từ đề tài mã số B2014-18-04 được cấp bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) và sự hỗ trợ của Vườn Quốc Gia Bidoup - Núi Bà, Lâm Đồng, Việt Nam.

Optimization of an anti-inflammatory screening model on the RAW 264.7 macrophage cell

- Le Dinh To
- Nguyen Trung Kien
- Tran Linh Thuoc
- Dang Thi Phuong Thao

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Inflammation is the response of living tissues to the injury. Prolonged or inappropriate inflammation has been involved with many diseases such as, cancer, diabetes, heart disease... These days, inflammation has been treated by nonsteroidal and steroidal anti-inflammatory drugs, which have a lot of side effects. It opens the need and interest of new drugs discovery. Particularly, scientific and pharmaceutical communities show great interest in finding new anti-inflammatory compounds in traditional medicinal plants. This study aimed to optimize an in vitro anti-inflammatory model. Cell heterogeneity, cell density, LPS concentration and LPS incubation time were chosen to optimize the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 macrophage cells. Our results show that 104 cells/well, FBS 1 %, starvation for 6 h, LPS 0.5

*µg/mL in 24 h were optimized parameters in the model. Then, extracts from *Hedyotis capitellata*, a traditional medicinal plant used by K'ho minority, Bidoup Nuiba national park, Lam Dong province, Vietnam, was chosen to evaluate the in vitro anti-inflammatory model. The anti-inflammatory activity was tested by measuring the production of NO in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophage cells. The experimental data indicate that the extracts of this plant decreased NO production in LPS-stimulated RAW 264.7, particularly, the petroleum ether fraction at the concentration of 23.8 µg/mL inhibited NO production by 128.20 %; whereas dexamethasone 50 µM inhibited NO accumulation to 112 %.*

Keywords: inflammation, RAW 264.7; *Hedyotis capitellata* var. *Mollis*; nitric oxide; lipopolysaccharide.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. R. Ahmad, A.M. Ali, D.A. Israf, N.H. Ismail, K. Shaari, N.H. Lajis, Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis* species. *Life Sciences*, 76, 17, 1953–1964 (2005).
- [2]. J.L. Balligand, P.J. Cannon, Nitric oxide synthases and cardiac muscle autocrine and paracrine influences. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17, 10, 1846–1858 (1997).
- [3]. C.Y. Chang, M. Tucci, R.C. Baker, Lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production and inhibition of cell proliferation is antagonized by ethanol in a clonal *macrophage* cell line. *Alcohol*, 20, 1, 37–43 (2000).
- [4]. C. Deng, J. Liu, G. Wang, L. Ma, C. Xie, X. Wang, X. Li, L. Chen, A novel small molecule, (*E*)-5-(2, 4-di-tert-butyl-6-((2, 4-dioxothiazolidin-5-ylidene) methyl) phenyl)-5'-methyl-7, 7'-dimethoxy-4, 4'-bibenzo [d][1, 3] dioxole-5, 5'-

- dicarboxylate (7k), Alleviates the development of d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure by inhibiting macrophage infiltration and regulating cytokine expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341, 1, 146–155 (2012).
- [5]. J. Kim, H.J. Hur, K.-W. Lee, H.-J. Lee, Anti-inflammatory effects of recombinant arginine deiminase originating from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 9, 1491 (2007).
- [6]. D. Laveti, M. Kumar, R. Hemalatha, R. Sistla, V. Gm Naidu, V. Talla, V. Verma, N. Kaur, R. Nagpal, Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 12, 5, 349–361 (2013).
- [7]. C. Nicholas, S. Batra, M.A. Vargo, O.H. Voss, M.A. Gavrilin, M.D. Wewers, D.C. Guttridge, E. Grotewold, A.I. Doseff, Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- κ B through the suppression of p65 phosphorylation. *The Journal of Immunology*, 179, 10, 7121–7127 (2007).
- [8]. K. Ohki, F. Amano, S. Yamamoto, O. Kohashi, Suppressive effects of serum on the LPS-induced production of nitric oxide and TNF- α ; by a macrophage-like cell line, WEHI-3, are dependent on the structure of polysaccharide chains in LPS. *Immunology and Cell Biology*, 77, 2, 143–152 (1999).
- [9]. C. Ong, P. Lirk, C. Tan, R. Seymour, An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clinical Medicine & Research*, 5, 1, 19–34 (2007).
- [10]. S. Pirkmajer, A.V. Chibalin, Serum starvation: caveat emptor. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 301, 2, C272–C279 (2011).
- [11]. H. Sakagami, K. Kishino, O. Amano, Y. Kanda, S. Kunii, Y. Yokote, H. Oizumi, T. Oizumi, Cell death induced by nutritional starvation in mouse macrophage-like RAW264. 7 cells. *Anticancer Research* 29, 1, 343–347 (2009).
- [12]. H. Schäcke, W.D. Döcke, K. Asadullah, Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids, *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 1, 23–43 (2002).
- [13]. D.J. Stuehr, M.A. Marletta, Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Research*, 47, 21, 5590–5594 (1987).
- [14]. X. Tan, Y.L. Wang, X.L. Yang, D.D. Zhang, Ethyl acetate extract of *Artemisia anomala* S. moore displays potent anti-inflammatory effect. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ID 681352, 10 (2014).
- [15]. P. Vadiveloo, E. Keramidaris, W. Morrison, A. Stewart, Lipopolysaccharide-induced cell cycle arrest in macrophages occurs independently of nitric oxide synthase II induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1539, 1, 140–146 (2001).
- [16]. J. Wei, Z. Sun, Q. Chen, J. Gu, Serum deprivation induced apoptosis in macrophage is mediated by autocrine secretion of type I IFNs. *Apoptosis*, 11, 4, 545–554 (2006).
- [17]. J. Xaus, M. Comalada, A.F. Villedor, J. Lloberas, F. López-Soriano, J.M. Argilés, C. Bogdan, A. Celada, LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . *Blood*, 95, 12, 3823–3831 (2000).
- [18]. P.P.K. Zar, A. Morishita, F. Hashimoto, K. Sakao, M. Fujii, K. Wada, D.X. Hou, Anti-inflammatory effects and molecular mechanisms of loquat (*Eriobotrya japonica*) tea. *Journal of Functional Foods*, 6, 523–533 (2014).