

Списки содержания доступны на [сайте ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Биомедицина и фармакотерапия

домашняя страница журнала: www.elsevier.com/locate/bioph

Антипсориазическое и противовоспалительное действие *Caempferia parviflora* на кератиноциты и клетки макрофагов

Мингван На Такуатунг^а, Сараньяпин Потиканонд а,д, Сиривут Сукхи^б,
 Питчая Мунгкорнасавакул^{в,е}, Танаторн Джаранакулванич^а, Киттинан Чинда^а,
 Нитвара Викан^ф, Вутигри Нимламул а, д, *^г

^а Кафедра фармакологии, медицинский факультет, Чиангмайский университет, Чиангмай, Таиланд

^б Кафедра микробиологии медицинского факультета Чиангмайского университета, Чиангмай, Таиланд

^в Кафедра химии, Факультет естественных наук, Чиангмайский университет, Чиангмай, Таиланд

^г Исследовательский центр фармацевтических нанотехнологий, фармацевтический факультет Чиангмайского университета, Чиангмай, Таиланд

^е Программа экологических наук, Факультет естественных наук, Чиангмайский университет, Чиангмай, Таиланд

^ф Институт молекулярной биологии, Университет Махидол, Салая, Накорн Патом, Таиланд

ИНФОРМАЦИЯ О СТАТЬЕ

Ключевые слова:

Воспаление

Кемпферия мелкоцветковая

Липополисахариды (ЛПС)

МАПК

Макрофаги

Ядерный фактор-κВ (NF-κB)

АННОТАЦИЯ

Caempferia parviflora (КР) использовалась в народной медицине для лечения различных заболеваний, в том числе противовоспалительных. Однако антипсориазические эффекты в аспекте подавления активации NF-κB не исследовались. Поэтому наше текущее исследование было направлено на выяснение противовоспалительного действия КР в индуцированных липополисахаридом (ЛПС) клетках RAW264.7 и противовоспалительных эффектов КР в индуцированных цитокинами кератиноцитах человека, клетках HaCaT. Мы обнаружили, что экстракт КР значительно подавлял воспаление, вызванное LPS, как при экспрессии генов, так и при продукции белка. В частности, с помощью метода Грисса было исследовано резкое снижение содержания оксида азота (NO). Таким образом, данные RT-qPCR, ELISA и вестерн-блоттинга подтвердили, что важные маркеры воспаления и псориаза, включая индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS), циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2), фактор некроза опухоли (TNF)-α, интерлейкин ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-17, ИЛ-22 и ИЛ-23 значительно снижались под действием КР. Эти события были связаны с результатами иммунофлуоресцентного исследования и вестерн-блоттинга, где активация NF-κB при стимуляции ЛПС явно ингибировалась КР благодаря его способности подавлять деградацию IκB-α, приводящую к ингибированию ядерной транслокации NF-κB. Кроме того, экстракт КР значительно ингибировал стимулированное LPS фосфорилирование ERK1/2, JNK и p38 дозозависимым образом, наряду с ингибированием активации ERK1/2 в клетках HaCaT, индуцированных как TNF-α, так и EGF. Интересно, что клетки HaCaT, подвергшиеся воздействию 15 мкг/мл КР, также демонстрировали значительное снижение миграции и пролиферации клеток. Наши результаты показали, что экстракт КР может быть разработан в качестве многообещающего средства для лечения воспаления и псориаза, частично за счет воздействия на пути пролиферации и NF-κB.

1. Введение

Псориаз является одним из наиболее распространенных дерматологических заболеваний, которым страдает до 2% населения земного шара [1]. Это иммуноопосредованное заболевание, клинически характеризующееся эритематозными, резко ограниченными папулами и округлыми бляшками, покрытыми серебристыми слоистыми чешуйками [2]. Клиническая картина показывает толстый эпидермис с инфильтративным воспалением дермы и удлиненными сетчатыми гребнями [3]. Патогенез псориаза связан с интерлейкином (ИЛ)-23, который продуцируется дендритными клетками и кератиноцитами, и этот цитокин стимулирует Т-хелперные клетки 17.

в дерме для продукции ИЛ-17А и ИЛ-22 [4]. Воспаление представляет собой сложную физиологическую реакцию на вредные раздражители, которая характеризуется болью, жаром, покраснением и отеком [5]. Макрофаги играют важную роль в местной защите хозяина и воспалительной реакции, которая управляется провоспалительными цитокинами, такими как оксид азота (NO), фактор некроза опухоли (TNF), ИЛ-1 и ИЛ-6 [6]. NO, газ, вырабатываемый клетками млекопитающих, синтезируется из аминокислоты L-аргинина с помощью ферментов, называемых индуцибельными синтазами оксида азота (iNOS) [7]. NO отвечает за несколько биологических процессов, в том числе за нейротрансмиттер, регуляцию артериального давления и контроль желудочно-кишечного тракта.

* Автор, ответственный за переписку: кафедра фармакологии медицинского факультета Чиангмайского университета, Чиангмай, Таиланд.

Адрес электронной почты: wutigri.nimlamool@cmu.ac.th (В. Нимламул).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2021.112229>

Поступила в редакцию 15 июня 2021 г.; Поступила в редакцию 2 сентября 2021 г.; Принято 18 сентября 2021 г. Доступно онлайн 24 сентября 2021 г.

0753-3322/© 2021 Авторы.

Опубликовано Elsevier Masson SAS. Это статья в открытом доступе под лицензией CC BY-NC-ND.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

функции дыхания и мочеполовой системы [8]. Кроме того, NO избыточно вырабатывается во время защитных и иммунологических реакций хозяина активированными макрофагами, что стимулируется липополисахаридом (ЛПС).

[7]. ЛПС ассоциирован с активацией толл-подобного рецептора (TLR) 4 [9], что приводит к фосфорилированию и транскрипционной активации киназ ядерного фактора-κB (NF-κB) и митоген-активируемого протеина (MAP), включая ERK, JNK и p38, которые являются важными сигналами для iNOS [10].

Более того, MAPK также могут опосредовать клеточные ответы на внеклеточные сигналы и провоспалительные цитокины, особенно TNF-α, IL-1 и IL-6, тогда как простагландин E2 (PGE2) синтезируется циклооксигеназой (COX)-2 в различных моделях воспаления [11]. Аберрантная активация этой системы приводит к иммунодефициту, септическому шоку или индукции аутоиммунитета [5]. Таким образом, комбинированная регуляция продукции провоспалительных цитокинов, восстановление NO и ингибирование пути NF-κB и MAPK считаются терапевтическими стратегиями лечения воспалительных заболеваний [12,13].

Эффективное лечение аутоиммунных и воспалительных заболеваний, включая псориаз, является одной из самых больших неудовлетворенных медицинских потребностей. Использование обычных стероидных и иммунодепрессантных препаратов при псориазическом воспалении по-прежнему остается основным в типичной практике [14,15]. Однако необходимо принимать во внимание постоянные опасения по поводу безопасности при длительном использовании [16]. Таким образом, существует большой интерес к природным соединениям, которые веками использовались для уменьшения псориазического воспаления [17]. Было показано, что многие растения и их соединения проявляют сильную противовоспалительную активность [18–20]. *Caempferia parviflora* (КР) или *Krachaidam*, также известный как черный имбирь, принадлежащий к семейству Zingiberaceae, произрастает на севере и северо-востоке Таиланда [21]. Его корневища традиционно используются в народной медицине для лечения различных заболеваний, включая аллергию, астму, импотенцию, подагру, диарею, дизентерию, язвенную болезнь и диабет [22,23]. Более того, недавние данные показывают, что КР обладает противовоспалительной активностью [24–26], активностью, регулирующей клеточный метаболизм [27], сосудорасширяющим и кардиопротекторным действием [28,29], нейротропным действием [30,31], а также антиоксидантным и антигипертензивным действием. -воспалительная активность [21]. В частности, что касается противовоспалительного действия КР, предыдущие исследования показали, что гексановые и этанольные экстракты КР ингибируют дегрануляцию, индуцированную IgE-антигеном или ионофором кальция, в клетках базофильного лейкоза крыс (RBL-2H3) [32] и ингибируют дегрануляцию, связанную с подавлением поступления кальция в клетки [33]. Интересно, что в предыдущих данных также сообщалось, что этанольный экстракт КР ингибировал экспрессию простагландина E2 (PGE2) в LPS-индуцированных клетках RAW264.7, тогда как гексан и хлороформ уменьшали отек лапы у крыс [34]. Следовательно, соединения, выделенные из КР, проявляли ингибирующее действие на высвобождение оксида азота (NO), индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), PGE2 и TNF-α в LPS-индуцированных клетках RAW264.7 за счет активации тирозинкиназного пути селезенки, но не Пути ERK и JNK [34–36]. Кроме того, сообщалось, что экстракт КР и его соединения подавляют продукцию NO в клетках RAW264.7, стимулированных липополисахаридами, ингибируют моноцитарную лейкомию человека, THP-1, адгезию клеток к эндотелиальным клеткам пупочной вены человека (HUVEC), снижают продукцию ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), опосредованный Ang-II, и ингибируют выработку клеточных активных форм кислорода (АФК) в пиоцианин-стимулированных HUVEC [37]. Однако противовоспалительное действие КР на индуцированные липополисахаридами клетки RAW264.7 в других аспектах, включая подавление активации NF-κB, еще не исследовано.

Это настоящее исследование было направлено на выяснение противовоспалительного и антипсориазического действия и механизмов КР на ингибирование LPS-индуцированных клеток RAW264.7 и индуцированных цитокинами кератиноцитов человека, клеток HaCaT. В частности, мы исследовали влияние КР на подавление экспрессии генов и выработку белков оксида азота, ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α, iNOS и ЦОГ-2. Кроме того, также были определены ингибирующие свойства КР в отношении основных путей передачи молекулярного сигнала, связанных с NF-κB и MAPK. Исследование показало, что КР обладает противовоспалительным действием, по крайней мере частично, благодаря своей способности подавлять активацию NF-κB и путь передачи пролиферативного сигнала, и это растение может быть хорошим кандидатом в качестве альтернативного терапевтического средства для

псориазические воспалительные заболевания.

2. Материалы и методы

2.1. Растительный материал и экстракция *Caempferia parviflora* Rhizomes

Корневища КР были посажены, собраны, аутентифицированы и извлечены, как сообщалось ранее [24]. В частности, мы получили свежие корневища КР из культивируемого участка под названием «жилье CMU-RSPG *Caempferia*». Это жилище находится в Чианг Дао, провинция Чиангмай, Таиланд. Завод был аутентифицирован, и ему был присвоен номер образца ваучера (R-CMUKP002). Образцы растений хранились в Гербарии факультета естественных наук Чиангмайского университета. Для приготовления экстракта КР собранные корневища КР тщательно очищали, сушили на воздухе при комнатной температуре, взвешивали и измельчали на мелкие кусочки. Материалы обрабатывали ультразвуком в 95% этаноле при комнатной температуре в течение 72 часов. Затем раствор фильтровали и удаляли растворитель с помощью роторного испарителя. Процент выхода экстрактов из растения (в пересчете на сухую массу) составил 9,9%. После экстракции 1 мл 100% ДМСО добавляли к 1 г этанольного неочищенного экстракта КР, чтобы получить исходный раствор КР с концентрацией 1 г/мл. Перед каждым экспериментом исходный раствор КР разбавляли в среде, а конечную концентрацию ДМСО поддерживали ниже 0,02% об./об. на протяжении всего эксперимента. Для каждого эксперимента проводили не менее 3 независимых испытаний.

Контроль качества экстракта КР оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), определяя присутствие 9 метоксифлавонов в экстракте КР (КП1 = 3,5,7,3',4'-пентаметоксифлавоны, КП2 = 5,7, 4'-триметоксифлавоны, КП3 = 3,5,7-триметоксифлавоны, КП4 = 3,5,7,4'-тетраметоксифлавоны, КП5 = 5-гидрокси-3,7,3',4'-тетраметоксифлавоны, КП6 = 5-гидрокси-7-метоксифлавоны, КП7 = 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлавоны, КП8 = 5-гидрокси-3,7-диметоксифлавоны и КП9 = 5-гидрокси-3,7,4'-триметоксифлавоны). Анализ проводили в сравнении с девятью стандартными соединениями метоксифлавонов ((1) = 3,5,7,3',4'-пентаметоксифлавоны, (2) = 5,7,4'-триметоксифлавоны, (3) = 3, 5,7-триметоксифлавоны, (4) = 3,5,7,4'-тетраметоксифлавоны, (5) = 5-гидрокси 3,7,3',4'-тетраметоксифлавоны, (6) = 5-гидрокси-7-метоксифлавоны, (7) =

5-гидрокси-7,4'-диметоксифлавоны, (8) = 5-гидрокси-3,7-диметоксифлавоны, (9) = 5-гидрокси-3,7,4'-триметоксифлавоны), которые были получены от Eсо дружественная лаборатория исследования продуктов (EFPRL), химический факультет, факультет естественных наук, Чиангмайский университет.

Для анализа методом ВЭЖХ определение соединения проводили на приборе Agilent серии 1100 (Agilent Technologies, США), оснащенном детектором UV-Vis (с длиной волны детектирования 330 нм). Для дифференциального разделения использовали колонку C18 (250 мм × 4,6 мм, внутренний диаметр 5 мкм, Hypersil™, Sigma-Aldrich, США). Подвижной фазой служила метанол – 0,5% уксусная кислота (65:35, об./об.), работу проводили при скорости потока 1,0 мл/мин. Объем инъекции составлял 20 мкл.

2.2. Культура клеток

Клетки макрофагов RAW 264.7 были приобретены у ATCC (ATCC, Манассас, Вирджиния, США), а клетки HaCaT были получены у CLS Cell Lines Service GmbH (Эпельхайм, Германия). Клетки культивировали и поддерживали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM).

(Гибко, США). Клетки выращивали при 37 °C в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Merck KGaA, Германия), пенициллина (100 ЕД/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (Gibco, США) во влажной атмосфере. 5% CO₂.

2.3. Анализ жизнеспособности клеток

Потенциальную цитотоксичность КР по отношению к макрофагам RAW 264.7 и клеткам HaCaT оценивали с использованием анализа бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ), как описано ранее [38]. Вкратце, клетки (2 × 10⁵ клеток/мл) высевали в 96-луночные планшеты.

в течение 24 ч в полной среде и обрабатывали различными концентрациями КП (0–1000 мкг/мл) или растворителем (ДМСО 0,001–0,1%) в течение 24 ч.

Затем в каждую лунку добавляли раствор МТТ (0,5 мг/мл в PBS), после чего планшеты инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение 2 ч. После аспирации культуральных супернатантов в каждую лунку добавляли по 200 мкл ДМСО и инкубировали планшеты в темноте в течение 10 мин. Поглощение при 590 нм измеряли с помощью микропланшет-ридера (BioTek Instruments, США). Анализ жизнеспособности клеток проводили трижды (трижды для каждого отдельного испытания).

2.4. Анализ оксида азота

Определение оксида азота проводили с использованием коммерческого реактива Грисса (Sigma, США) для определения общего содержания нитратов и нитритов как показателя образования оксида азота, как описано ранее [39]. Вкратце, клетки RAW 264.7 (1,5 × 10⁶ клеток/мл) высевали и культивировали в течение 24 часов. Перед стимуляцией ЛПС («Sigma», США) клетки обрабатывали КП в течение 4 ч. После 24 ч инкубации ЛПС культуральный супернатант (100 мкл) из каждой лунки собирали и смешивали с равным объемом реактива Грисса в новом 96-луночном планшете. После инкубации при комнатной температуре (КТ) в течение 15 мин измеряли оптическую плотность при 540 нм с помощью микропланшет-ридера (BioTek Instruments, США). Концентрацию нитрита определяли по стандартной кривой нитрита натрия.

2.5. Анализ полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (RT qPCR)

Клетки RAW 264.7 (1,5 × 10⁶ клеток/мл) высевали и культивировали в течение 24 часов. После предварительной обработки экстрактом КП в различных концентрациях (3,75, 7,5 и 15 мкг/мл) в течение 4 ч клетки стимулировали ЛПС (1 мкг/мл) в течение 24 ч и собирали для определения экспрессии мРНК. Тотальную РНК выделяли с использованием мини-набора FavorPrep™ Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Тайвань). Концентрацию тотальной РНК определяли на спектрофотометре Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific, США). Затем РНК подвергали обратной транскрипции с помощью ReverTra ACE® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Япония), как описано в протоколе производителя. Обратную транскрипцию проводили при 37 °C в течение 15 мин, 50 °C в течение 5 мин и 98 °C в течение 5 мин. Последующую комплементарную (к)ДНК использовали для количественной ПЦР с использованием системы ПЦР в реальном времени PCRmax Eco 48 (PCRmax Limited, Великобритания) с PerfeCTa™ SYBR® Green FastMix™, Low Rox™ (Quanta Biosciences™, США), следуя инструкции производителя. Реакционная смесь состояла из 2 мкл кДНК, 1 мкл воды, не содержащей нуклеаз, 5 мкл PerfeCTa™ SYBR® Green FastMix™, Low Rox™ и 1 мкл (100 нМ) каждого конкретного праймера (таблица 1). ПЦР проводили в следующих условиях: 95 °C 3 мин, 45 циклов 95 °C 15 с, 58 °C 15 с, 72 °C 30 с.

Таблица

1 Количество (%) метоксифлавонов (КР1–КР9) в экстракте КП, определенное с помощью анализа ВЭЖХ. RT: время удерживания (мин).

Пиковое ВУ (мин)	Компонент	Количество (%)	
1	7.809	Неизвестный	0,67
2	10,459	Неизвестный	2,90
3	11,581	КР1:3,5,7,3',4'-пентаметоксифлаво	18,97
4	15,844	Неизвестный	11,68
5	17,793	КР2:5,7,4'-триметоксифлаво	25,62
6	19,370	КР3:3,5,7-триметоксифлаво	3,80
7	20,897	КР4:3,5,7,4'-тетраметоуфлаво	13,27
8	31,753	КР5:5-гидрокси-3,7,3',4'-тетраметойфлаво	1,94
	41,107	КР6: 5-гидрокси-7-метоксифлаво	3,71
9	48,435	КР7: 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлаво	6,02
11	51,676	КР8: 5-гидрокси-3,7-диметоксифлаво	4,70
12	58,269	КР9: 5-гидрокси-3,7,4'-триметоксифлаво	6,72

2.6. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Клетки RAW 264.7 и HaCaT (1,5 × 10⁶ клеток/мл) высевали в чашки диаметром 3 см и культивировали в течение 24 часов. После обработки экстрактом КП при разных концентрациях (3,75, 7,5 и 15 мкг/мл) в течение 4 ч, клетки стимулировали ЛПС (1 мкг/мл) в течение 6 ч и 24 ч. Затем собирали культуральные супернатанты. Концентрацию IL-6 и TNF-α в супернатантах клеток RAW 264.7 измеряли с помощью мышиного IL-6 и TNF-α ELISA MAX™ Deluxe (BioLegend, США), тогда как концентрацию IL-6, IL-17, IL-22 и IL-23 в культуральных супернатантах клеток HaCaT измеряли с использованием человеческого IL-6, IL-17, IL-22 и IL-23-α ELISA MAX™ Deluxe (BioLegend, США). ИФА проводили в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, 96-луночный планшет для ELISA покрывали 100 мкл 1х захватывающего антитела в буфере для покрытия и инкубировали в течение ночи при 4 °C. Планшет промывали промыочным буфером (0,05% Tween-20 в PBS) четыре раза, а затем блокировали 200 мкл блокирующего буфера на 1 ч при комнатной температуре. После четырехкратного промывания планшета промыочным буфером стандарты мышиного IL-6 и TNF-α разводили для создания диапазона концентраций 0–1000 пг/мл. Образцы супернатантов или стандарты (100 мкл) добавляли в каждую лунку в двух повторностях на 2 ч при комнатной температуре.

Планшет промывали промыочным буфером четыре раза, затем в каждую лунку добавляли специфическое детектирующее антитело (100 мкл) на 1 ч при комнатной температуре и четыре раза промывали. Добавляли 100 мкл авидина, конъюгированного с HRP (1:1000), и планшет инкубировали в течение 30 мин с последующим пятикратным промыванием. Наконец, в каждую лунку добавляли свежеперемешанный раствор субстрата ТМБ (100 мкл) и инкубировали в темноте в течение 30 мин. В каждую лунку добавляли стоп-раствор (2 н. H₂SO₄) (100 мкл) и измеряли оптическую плотность при 450 нм и 570 нм.

с использованием планшет-ридера (BioTek Instruments, США) в течение 15 мин.

2.7. Иммунофлуоресцентное исследование

Клетки RAW 264.7 выращивали на покровных стеклах в течение 24 часов. Затем клетки предварительно обрабатывали экстрактом КП в концентрации 15 мкг/мл в течение 4 ч и стимулировали ЛПС в течение 1 ч. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом, растворенным в PBS, в течение 15 мин. После трехкратной промывки PBS клетки пермеабелизовали с использованием 0,3% TritonX-100 в PBS в течение 5 мин. Затем клетки инкубировали с 1% BSA в растворе PBS в течение 1 ч и с моноклональным антителом кролика NF-κB p65 (D14E12) XP (1:350) (Cell Signaling Technology, США) при 4 °C в течение ночи. Клетки трижды промывали PBS по 5 мин и инкубировали с козьим антикроличьим Ig, конъюгированным с Alexa 594, в разведении 1:500 (Life Technologies, США) и 5 мкг/мл Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific), США в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре. После трехкратной промывки PBS и один раз дистиллированной водой клетки монтировали с использованием Fluoromount-G (0100-01: SouthernBiotech, США). Покровные стекла образцов были покрыты лаком для ногтей, чтобы предотвратить их высыхание. Наблюдения проводили на флуоресцентном микроскопе AX70 Olympus®, Япония, с 40-кратным увеличением, микрофотографии получали с помощью программного обеспечения DP-BSW Basic для цифровой камеры микроскопа DP71.

2.8. Ядерная и цитозольная экстракция

После обработки клеток экстрактом КП ядерный и цитозольный экстракты готовили на основе ранее описанных методов с некоторыми модификациями [40,41]. Вкратце, клетки собирали центрифугированием в течение 1 мин при 2000× g, промывали холодным PBS и ресуспендировали в буфере А (10 мМ HEPES, pH 10, 1,5 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 0,5 мМ дитиотреитол (ДТТ), 300 мМ), сахара, 0,1% Нонидет Р-40). Затем клетки центрифугировали (15 000× g) в течение 10 мин при 4 °C. Ядерный осадок промывали 1 мл холодного PBS и центрифугировали (15000× g) в течение 5 мин при 4 °C. Триста микролитров цитозольных экстрактов ресуспендировали в 80 мкл 5-кратного восстанавливающего буфера Лэммли, а ядерные экстракты ресуспендировали в 100 мкл 1-кратного восстанавливающего буфера Лэммли перед проведением вестерн-блоттинга.

2.9. Вестерн-блоттинг

Для обнаружения ЦОГ-2, общего ERK1/2, pERK1/2, NF-κB, IκB, pAKT и pJNK клетки RAW 264.7 и HaCaT предварительно обрабатывали 3,75, 7,5 и 15 мкг/мл экстракта КП в течение 4 ч, затем стимулировали 1 мкг/мл ЛПС в течение либо 6 ч, либо 24 ч для сбора лизата цельных клеток и 1 ч для сбора ядерной и цитоплазматической экстракции. Клетки RAW 264.7 и HaCaT готовили путем добавления 1x восстанавливающего буфера Лэмбли в чашки для образцов. Образцы отбирали, нагревали при 95 °С в течение 5 мин, разделяли с помощью SDS-PAGE и электрооблитоировали на мембраны PVDF (GE Healthcare Life Sciences, Германия). Мембраны блокировали 5% BSA в TBS-T (0,02 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,0137 M NaCl и 0,1% Tween 20) при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем мембраны инкубировали с первичными антителами (Cell signaling Technology, США) при 4 °С в течение ночи. Используемые первичные антитела включали COX-2, общий ERK1/2, pERK1/2, NF-κB, IκB, pAKT и pJNK (1:1000 для каждого антитела), ламинаровое антитело в разведении 1:1000 и ламинаровое антитело 1:10000. разведение анти-β-актинового антитела. После трехкратной промывки TBS-T мембраны инкубировали с соответствующими вторичными антителами в разведении 1:5000 [IRDye® 800sw против IgG мыши или IRDye® 680RD против IgG кролика (LI-COR Biosciences, США)]. Иммуные комплексы выявляли с помощью вестерн-блоттинга LI-COR odyssey CLx (LI-COR Biosciences, США). Интенсивность иммуореактивных полос анализировали и количественно определяли с использованием программного обеспечения ImageJ.

2.10. Анализ миграции

Клетки HaCaT выращивали в 12-луночных планшетах для тканевых культур с обозначенными лунками для необработанных групп, получавших 15 мкг/мл КП и ДМСО. Как только клетки достигли 95-100% конfluence, наконечник пипетки объемом 200 мкл использовали для соскоба клеточного монослоя по вертикальной и горизонтальной поперечной линии, чтобы создать «царапину» в каждой лунке. Центр креста, где встречаются две линии царапины, использовался для позиционирования центра раневого зазора. Лунки один раз промывали питательной средой для удаления любых отслоившихся клеток, а затем снова заполняли обрабатывающей средой. Миграцию клеток (заполнение промежутков) исследовали с помощью фазово-контрастного микроскопа с программным обеспечением EOS Utility через 0 ч (сразу после царапины) (день 0), через 24 ч (день 1) и через 48 ч (день 2) после ранения. Измеряли площади зазоров и количественно оценивали миграцию клеток. Каждую обработку проводили трижды, и каждый эксперимент повторяли не менее двух раз.

2.11. Анализ подсчета клеток

Клетки HaCaT выращивали в 12-луночных планшетах для тканевых культур при плотности

5 × 104 клеток/лунку и инкубировали до тех пор, пока клетки не достигли 90% конfluence.

Клетки обрабатывали экстрактом КП в концентрации 3,75, 7,5 и 15 мкг/мл перед подсчетом общего количества клеток в разные моменты времени (0, 24, 48 и 72 ч) с использованием гемоцитометра. Время удвоения клеток рассчитывали по следующему уравнению: $\text{продолжительность} \cdot \log(2) / [\log(\text{конечная концентрация}) - \log(\text{начальная концентрация})]$.

2.12. статистический анализ

Для сравнения групп лечения использовали t-критерий Стьюдента для двух групп и однофакторный дисперсионный анализ для нескольких групп. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Данные представлены как среднее ± SEM. Во всех анализах значение p (p < 0,05) считалось статистически значимым.

3. Результаты

3.1. Химический состав экстракта КП

После получения экстракта КП и проведения ВЭЖХ-анализа результаты, показанные на рис. 1, ясно продемонстрировали, что этанольный экстракт КП содержит метоксифлавоны в качестве основных соединений, которые представляют собой 3,5,7,3',4'-пентаметоксифлавоны (КП1), 5,7,4'-триметоксифлавоны (КП2), 3,5,7-триметоксифлавоны (КП3), 3,5,7,4'-тетраметоксифлавоны (КП4), 5-гидрокси-3,7,3',4'-тетраметоксифлавоны (КП5), 5-гидрокси-7-метоксифлавоны (КП6), 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлавоны (КП7), 5-гидрокси-3,7-диметоксифлавоны (КП8) и 5-гидрокси-3,7,4'-триметоксифлавоны (КП9). Номер пика, время удерживания и процентное содержание каждого соединения показаны в табл. 1. В наибольшем количестве присутствовало соединение KP2 (25,62%), за ним следуют KP1 (18,97%), KP4 (13,27%), KP9 (6,72%), KP7 (6,02%), KP8 (4,70%), KP3 (3,80%), KP6 (3,71%) и KP5 (1,94%).

3.2. Влияние КП на жизнеспособность клеток RAW 264.7 и HaCaT

Жизнеспособность клеток RAW 264.7 и HaCaT, обработанных различными концентрациями экстракта КП, измеряли с использованием анализа МТТ. Процент жизнеспособных клеток отслеживали в течение 24 часов. Эффект подавления выживаемости клеток экстрактом КП по сравнению с контролем носителя ДМСО. Результаты показали, что жизнеспособность как клеток RAW 264.7, так и клеток HaCaT снижалась при увеличении концентрации экстракта КП. IC50 экстракта КП в RAW 264.7 и экстракта КП составила 43,83 ± 3,172 мкг/мл и 48,86 ± 1,689 мкг/мл соответственно (рис. 2). Экстракт КП в концентрациях менее 31,25 мкг/мл оказался нетоксичным как для

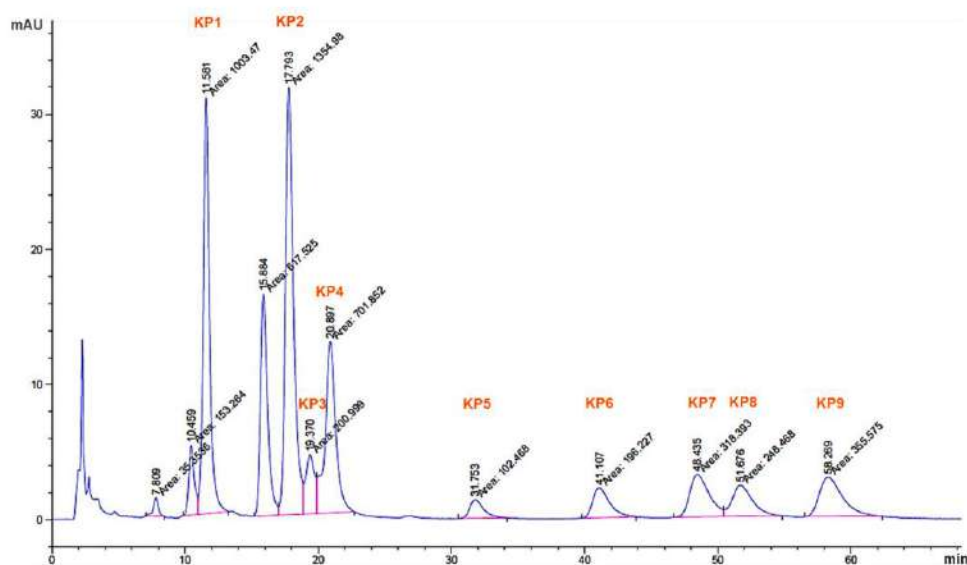


Рис. 1. Хроматограмма ВЭЖХ спиртового экстракта *K. parviflora*. Аббревиатура «КП» с номерами пиков (при определенных временах и площадях удерживания) указывает на следующие соединения: KP1 = 3,5,7,3',4'-пентаметоксифлавоны, KP2 = 5,7,4'-триметоксифлавоны, KP3 = 3,5,7-триметоксифлавоны, KP4 = 3,5,7,4'-тетраметоксифлавоны, KP5 = 5-гидрокси-3,7,3',4'-тетраметоксифлавоны, KP6 = 5-гидрокси-7-метоксифлавоны, KP7 = 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлавоны, KP8 = 5-гидрокси-3,7-диметоксифлавоны, KP9 = 5-гидрокси-3,7,4'-триметоксифлавоны.

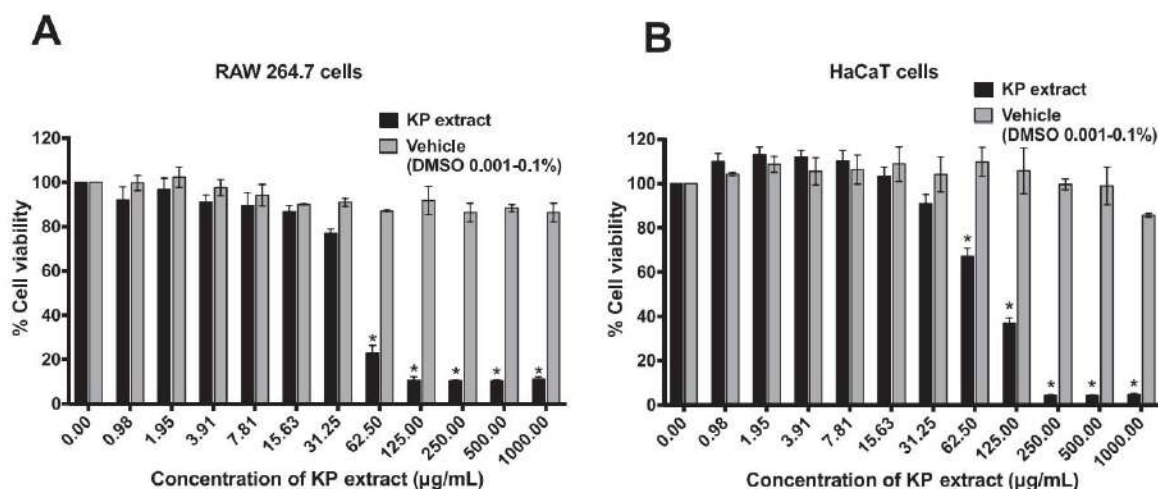


Рис. 2. Влияние КП на жизнеспособность клеток RAW264.7, измеренное с помощью анализа МТТ. Столбцы показывают процент жизнеспособности клеток RAW264.7, обработанных различными концентрациями экстракта КП (0–1000 мкг/мл) в течение 24 часов. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего для трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ достоверно по сравнению с необработанными клетками (0 мкг/мл).

Сотовые линии. Поэтому для последующих экспериментов в этом исследовании был выбран экстракт КП в диапазоне нетоксичных концентраций (3,75, 7,5 и 15 мкг/мл).

3.3. Влияние КП на ингибирование образования оксида азота

Одной из основных характеристик клеток RAW264.7 в ответ на воспалительные стимулы является продукция оксида азота. В качестве шага к определению того, обладает ли КП способностью подавлять воспаление, мы обнаружили присутствие оксида азота в культуральных супернатантах необработанных и обработанных КП клеток с помощью реактива Грисса. Мы обнаружили, что по сравнению с необработанными клетками обработка клеток ЛПС значительно увеличивала продукцию оксида азота примерно до 50 мкМ (рис. 3). Интересно, что клетки, обработанные ЛПС в присутствии экстракта КП, демонстрировали резкое снижение продукции оксида азота в зависимости от концентрации. В частности, экстракт КП в концентрациях 7,5 и 15 мкг/мл значительно снижал уровень оксида азота примерно до 45 и 30 мкМ соответственно; однако было доказано, что контрольный носитель ДМСО не влияет на подавление индуцированной ЛПС продукции оксида азота в клетках RAW264.7 (рис. 3).

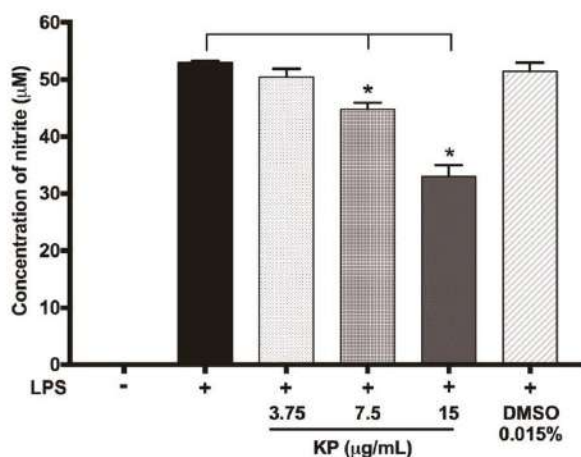


Рис. 3. Ингибирующее действие КП на индуцированную ЛПС продукцию оксида азота. Клетки ($1,5 \times 10^6$ клеток/мл) предварительно обрабатывали различными концентрациями (3,75, 7,5 и 15 мкг/мл) экстракта КП в течение 4 ч, а затем инкубировали с ЛПС (1 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего для трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ достоверно по сравнению с группой, получавшей ЛПС.

3.4. Влияние КП на ингибирование экспрессии генов воспалительных цитокинов

Основываясь на наблюдении, что КП может снижать выработку оксида азота, индуцированную липополисахаридами, мы также предположили, что КП может снижать выработку воспалительных цитокинов. Чтобы проверить нашу гипотезу, мы определили влияние КП на уровни экспрессии мРНК IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2 и TNF- α с помощью qRT-PCR. Как показано на рис. 4, обработка ЛПС заметно увеличивала транскрипцию всех генов цитокинов, тогда как клетки, предварительно обработанные экстрактом КП, значительно ослабляли уровни генов IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2 и TNF- α , индуцированные LPS. зависимым от концентрации образом. В частности, ингибирующая активность 3,75, 7,5 и 15 мкг/мл экстракта КП в отношении экспрессии IL-1 β в клетках RAW264.7 была примерно в 6, 12 и 24 раза соответственно выше по сравнению с экспрессией IL-1 β клеток, стимулированных только ЛПС (фиг. 4А). Кроме того, по сравнению с клетками RAW264.7 при стимуляции только ЛПС, в группах, обработанных экстрактом КП в концентрации 15 мкг/мл, наблюдалось приблизительно 10-кратное снижение экспрессии ИЛ-6 (рис. 4В) и 18-кратное снижение уровня iNOS (рис. 4С) и экспрессия ЦОГ-2 (рис. 4Д). Более того, присутствие 3,75 и 7,5 мкг/мл экстракта КП было способно подавлять экспрессию IL-6 и iNOS в 5 и 6 раз соответственно по сравнению с клетками RAW264.7, стимулированными одним ЛПС (рис. 4В и С). Кроме того, экстракт КП в концентрациях 3,75, 7,5 и 15 мкг/мл ингибировал экспрессию TNF- α в 2 раза по сравнению с клетками RAW264.7, стимулированными одним ЛПС (рис. 4Е).

3.5. Влияние КП на ингибирование секреции воспалительных цитокинов

Поскольку мы наблюдали сильное ингибирование экспрессии цитокинов на генном уровне, мы хотели бы дополнительно исследовать, ингибирует ли КП выработку и секрецию IL-1 β , IL-6 и TNF- α в LPS-стимулированных клетках RAW264.7 с помощью ELISA. Результаты показали, что по сравнению с необработанным контролем LPS значительно увеличивал продукцию IL-1 β , IL-6 и TNF- α в культуральных супернатантах клеток RAW264.7 (рис. 5). Однако обработка экстрактом КП значительно ингибировала продукцию IL-1 β , IL-6 и TNF- α в зависимости от концентрации (рис. 5). Хотя уровни продукции IL-1 β в клетках, стимулированных ЛПС, через 6 ч статистически не отличались от клеток, обработанных экстрактом КП в концентрациях 3,75, 7,5 и 15 мкг/мл, обработка клеток экстрактом КП во всех концентрациях значительно снижала уровень ЛПС. стимулировал продукцию IL-1 β после 24 ч инкубации в 1 раз ($p < 0,05$) (рис. 5А и В). Кроме того, экстракт КП в концентрациях 7,5 и 15 мкг/мл значительно снижал уровень ИЛ-6 в культуральных супернатантах клеток RAW264.7 примерно в 2 и 10 раз соответственно по сравнению с клетками, стимулированными ЛПС.

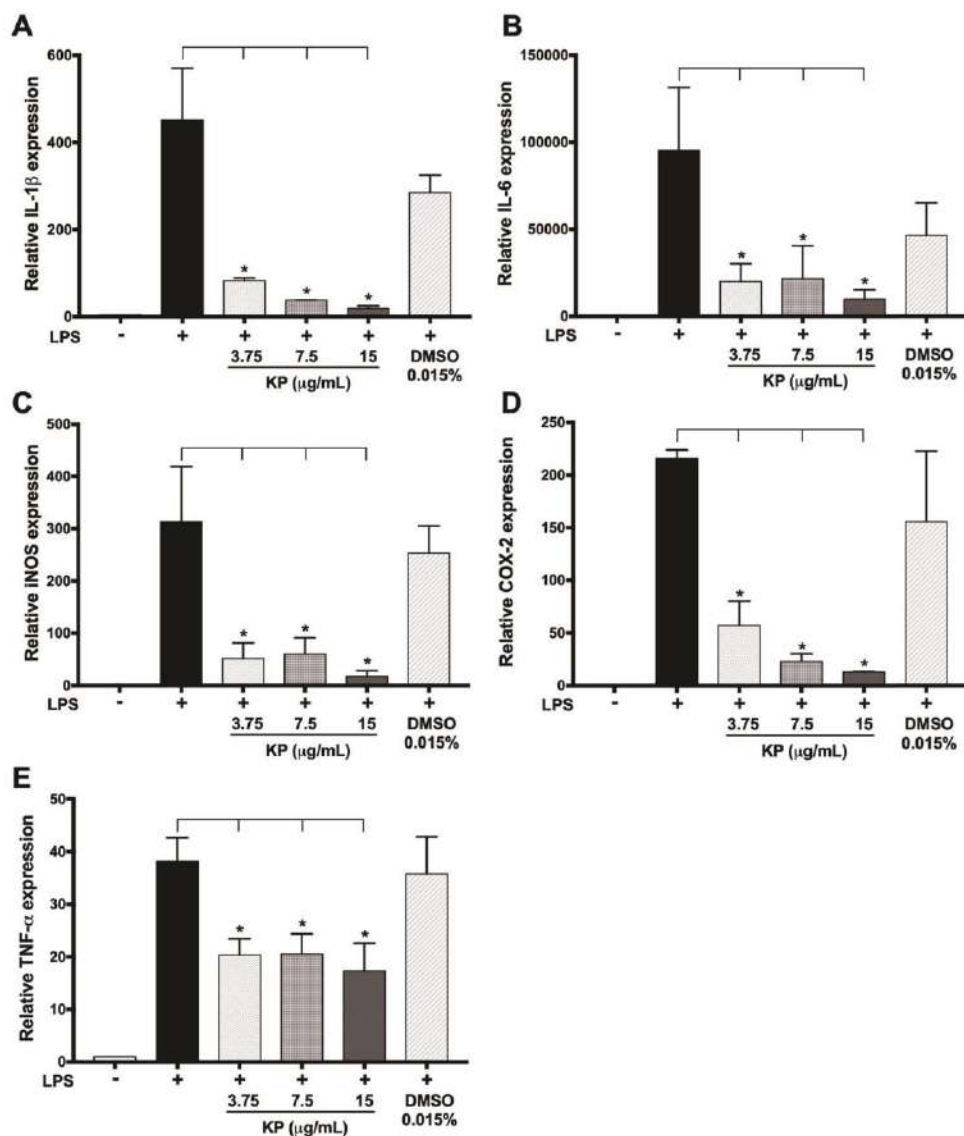


Рис. 4. Ингибирующее действие КП на индуцированную ЛПС экспрессию мРНК ИЛ-1β, ИЛ-6, iNOS, ЦОГ-2 и ФНО-α. Клетки (1,5 × 10⁶ клеток/мл) предварительно обрабатывали различными концентрациями (3,75, 7,5 и 15 мкг/мл) экстракта КП в течение 4 ч, а затем инкубировали с ЛПС (1 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего для трех независимых экспериментов. *p < 0,05 достоверно по сравнению с группой, получавшей ЛПС.

(Рис. 5С и D). Более того, присутствие экстракта КП в концентрации 15 мкг/мл значительно снижало индуцированную ЛПС продукцию TNF-α в 3 раза (p < 0,05) (рис. 5Е и F).

3.6. Влияние КП на подавление индуцированной ЛПС активации NF-κB в клетках RAW264.7

В этом исследовании изучали, обладает ли экстракт КП способностью блокировать активацию пути NF-κB, поскольку регуляция воспалительных медиаторов в LPS-стимулированных макрофагах транскрипционно связана с NF-κB [42]. Анализ локализации NF-κB с помощью иммуоокрашивания и флуоресцентной микроскопии показал, что экстракт КП сохраняет NF-κB в цитоплазме клеток (рис. 6А). Активированные свободными димерами субъединицы NF-κB (p50/p65) могут перемещаться из цитозоля в ядро при диссоциации IκB-α от NF-κB. Поэтому, чтобы четко убедиться, что КП может подавлять ядерную транслокацию NF-κB, был проведен вестерн-иммуоблоттинг для NF-κB. Воздействие только ЛПС значительно увеличивало количество NF-κB в ядре до 4,8 раз.

Однако экстракт КП в концентрации 15 мкг/мл заметно ингибировал индуцированную LPS ядерную транслокацию NF-κB (рис. 6В и С). На том основании, что А и В).

фосфорилирование ингибирующего каппа-В (IκB) и его последующая деградация различными стимулами являются критическими этапами активации NF-κB [43]. Далее мы исследовали влияние экстракта КП на ингибирование индуцированной ЛПС деградации белка IκB-α с помощью иммуоблоттинг-анализа. Мы обнаружили, что экстракт КП в концентрации 15 мкг/мл заметно ингибировал индуцированную ЛПС деградацию IκB-α (рис. 6D и E) в 0,97 раза по сравнению с группой, получавшей ЛПС (в 0,7 раза).

3.7. Влияние КП на ослабление фосфорилирования MAPK и продукции ЦОГ-2 в клетках RAW264.7, стимулированных ЛПС.

Чтобы подтвердить, опосредовано ли ингибирование активации NF-κB через пути MAPK мы исследовали влияние экстракта КП на стимулированное LPS фосфорилирование ERK1 / 2, JNK и p38 MAPK в клетках RAW264.7. Как показано на рис. 7А, ЛПС заметно индуцировал фосфорилирование ERK1/2, JNK и p38. Тем не менее, предварительная обработка экстрактом КП значительно ингибировала LPS-стимулированное фосфорилирование ERK1/2, JNK и p38 дозозависимым образом. В частности, 15 мкг/мл экстракта КП снижали фосфорилирование ERK1/2, JNK и p38 в 1,8, 2,2 и 1,3 раза соответственно (рис.

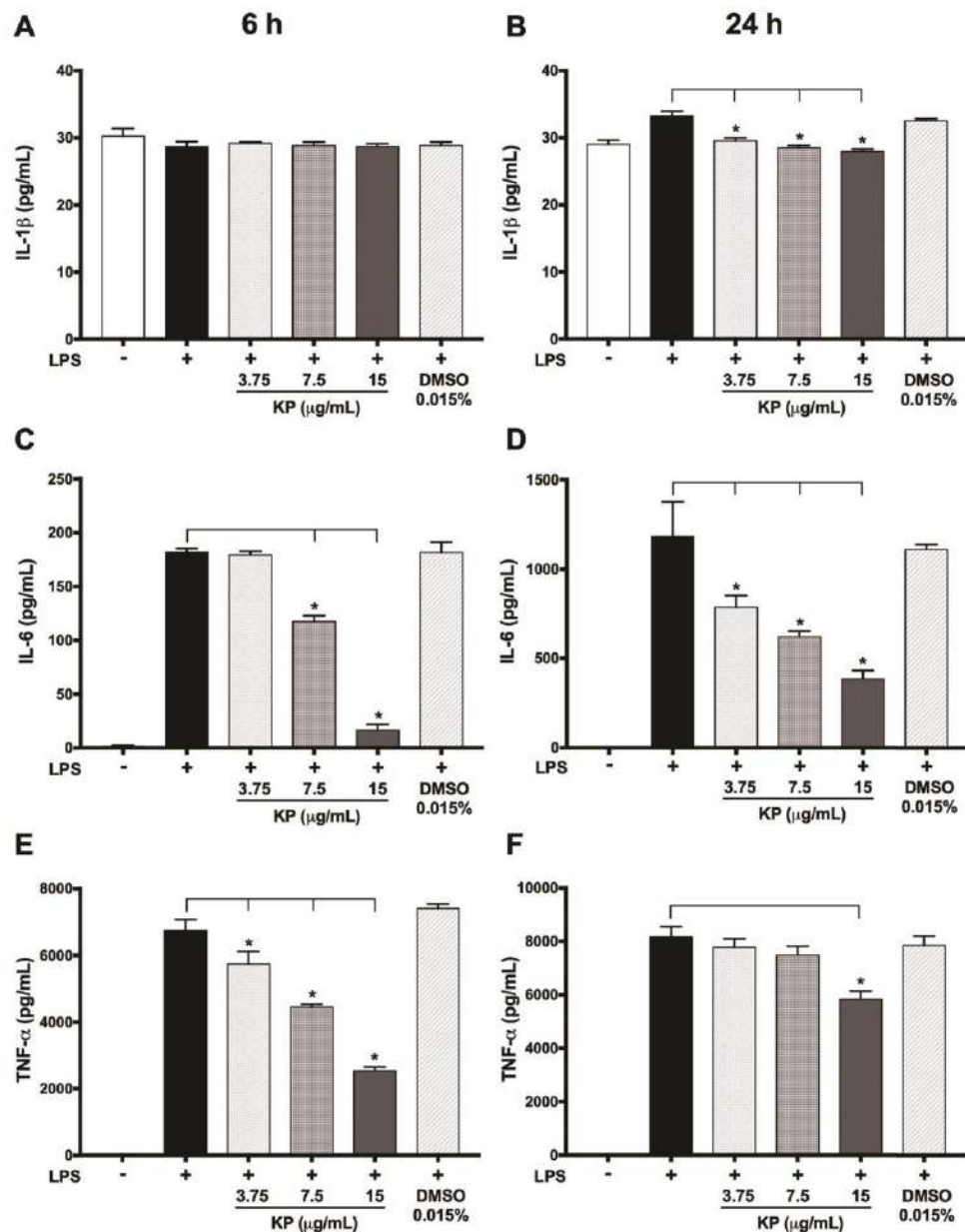


Рис. 5. Ингибирующее действие КП на индуцированную ЛПС продукцию ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α в клетках RAW264.7 через 6 и 24 ч. Клетки ($1,5 \times 10^6$ клеток/мл) предварительно обрабатывали различными концентрациями (3,75, 7,5 и 15 мкг/мл) экстракта КП в течение 4 ч, а затем инкубировали с ЛПС (1 мкг/мл) в течение 6 ч или 24 ч. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ достоверно по сравнению с группой, получавшей ЛПС.

Кроме того, экстракт КП в концентрации 15 мкг/мл может значительно снизить продукцию ЦОГ-2 (снижение примерно на 30%) по сравнению с клетками, обработанными ЛПС (рис. 7А и С).

3.8. Влияние КП на ингибирование миграции кератиноцитов

Чтобы изучить миграционную способность, был проведен анализ с царапинами на клетках HaCaT, подвергнутых обработке 15 мкг/мл КП в течение 24 и 48 часов. Чтобы устранить любое смешение и изменение скорости закрытия из-за неравного расстояния между краями раны, раны повторяли во многих повторах и тщательно выбирали, чтобы гарантировать, что все они имели одинаковую начальную ширину зазора примерно 500 мкм. Наши результаты показали, что клетки HaCaT, подвергшиеся воздействию 15 мкг/мл КП, демонстрировали значительное замедление заполнения пробелов на 40% и 51% по сравнению с необработанными и обработанными ДМСО клетками через 24 часа и 48 часов соответственно (рис. 8).

3.9. Влияние КП на подавление пролиферации клеток

Момент времени удвоения рассчитывали, используя количество клеток HaCaT, обработанных КП в разные моменты времени. Время, необходимое клеткам HaCaT для деления от одной до двух клеток, составляло приблизительно 24 часа. Интересно, что обработка КП в дозах 3,75, 7,5 и 15 мкг/мл в клетках HaCaT значительно увеличила время удвоения клеток до 51,62, 59,92 и 136,1 ч соответственно (рис. 9).

3.10. Влияние КП на антипсориатическое воспалительное действие

Затем мы стремились определить антипсориатическое действие КП на кератиноциты человека, чтобы исследовать функцию КП в иммунной регуляции Т-хелперов 17. Продукция ключевых воспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-6, ИЛ-17, ИЛ-22 и ИЛ-23, связанных с патофизиологией псориаза, оценивалась с помощью ELISA, как показано на рис. 10. Избыточная продукция ИЛ-6, ИЛ-17, ИЛ-22 и ИЛ-23 были обнаружены в TNF

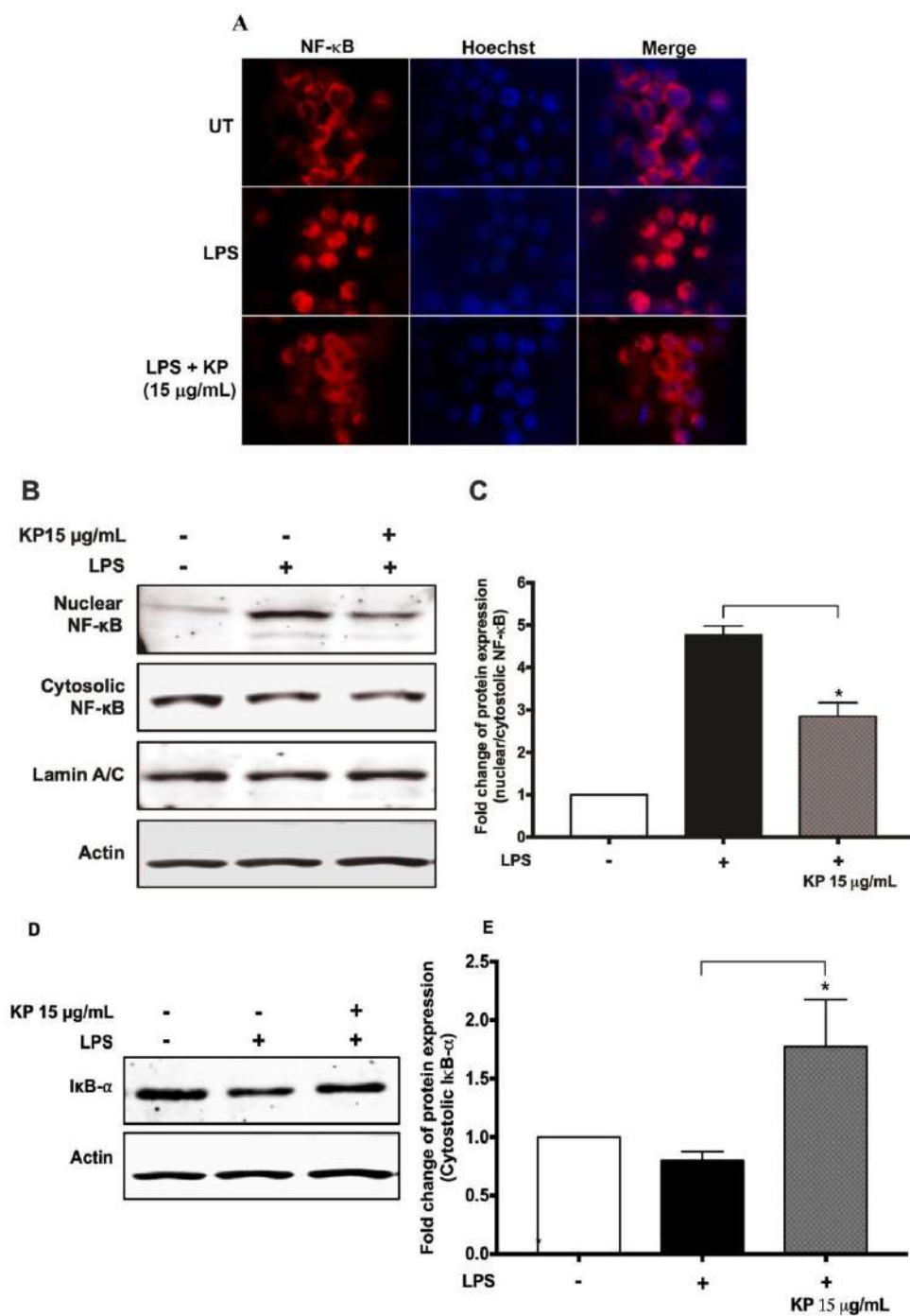


Рис. 6. Влияние КП на подавление восходящей передачи сигналов для активации NF-κB в клетках RAW264.7, индуцированных ЛПС. Клетки предварительно обрабатывали 15 мкг/мл экстракта КП в течение 4 ч, а затем инкубировали с ЛПС (1 мкг/мл) в течение 1 ч. (А) Локализация NF-κB была визуализирована с помощью флуоресцентного микроскопа после окрашивания на NF-κB (красный). Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (синий). (В, D) NF-κB и IκB-α в LPS-стимулированных клетках RAW264.7 с помощью вестерн-блоттинга. Микрофотографии были получены с 40-кратным увеличением. (С, Е) Количественное определение относительной интенсивности полос из трех независимых экспериментальных результатов было определено с помощью денситометрии. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего для трех независимых экспериментов. *p < 0,05 достоверно по сравнению с группой, получавшей ЛПС.

α-стимулированные клетки HaCaT, однако обработка экстрактом КП приводила к заметному снижению этих цитокинов. Наши результаты показали, что экстракт КП в концентрациях 3,75, 7,5 и 15 мкг/мл значительно подавлял продукцию IL-23 в культуральных супернатантах TNF-α-индуцированных клеток HaCaT примерно в 2, 2,5 и 3 раза, соответственно, по сравнению с клетками HaCaT, индуцированными TNF-α (фиг. 10D). Хотя 15 мкг/мл экстракта КП значительно ингибировали TNF-α-индуцированную продукцию IL-6, IL-17 и IL-22 примерно в 2,5, 1,5 и 1,5 раза соответственно, экстракт КП при концентрации 3,75 и 7,5 мкг/мл показали тенденцию к снижению по сравнению с клетками, стимулированными TNF-α (фиг. 10A, B и C).

Кроме того, мы исследовали статус фосфорилирования киназы ERK1/2 в клетках HaCaT, обработанных КП, с помощью вестерн-блоттинга. Данные показали, что экстракт КП в концентрации 15 мкг/мл значительно подавлял активацию

Передача сигналов ERK1/2, о чем свидетельствует примерно 1,5-кратное снижение уровней pERK1/2 как в TNF-α-, так и в EGF-индуцированных клетках HaCaT (фиг. 11). Следовательно, регуляция пролиферативной активности экстракта КП, вероятно, связана с ингибированием сигнального пути ERK1/2.

4. Дискуссия

Псориаз представляет собой осложненное воспаление с иммуноопосредованным заболеванием кожи, которое связано с высокой степенью заболеваемости [2]. Большинство пациентов с псориазом имеют сниженное качество жизни, связанное со здоровьем, и оказывают глубокое психосоциальное воздействие [44]. Воспаление является биологической реакцией иммунной системы, которая уже давно является хорошо известным симптомом, ведущим к повреждению тканей и многим распространенным заболеваниям, в

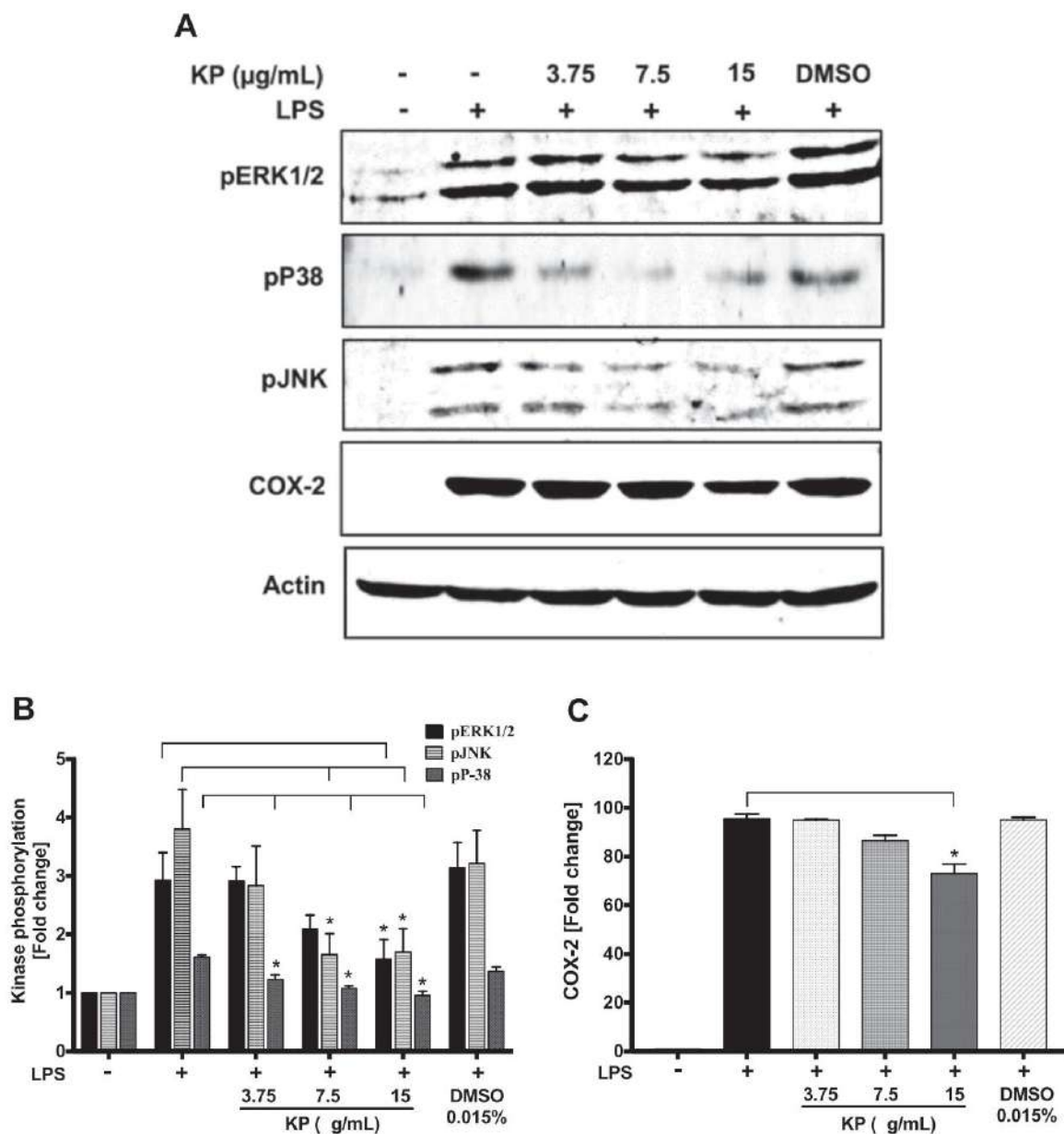


Рис. 7. Влияние КП на фосфорилирование MAPK и продукцию ЦОГ-2 в клетках RAW264.7, стимулированных ЛПС. (А) Клеточные белки из клеток использовали для обнаружения фосфорилированных или полных форм ERK1/2, p38 и JNK MAPK. (В и С) Количественное определение относительной интенсивности полосы из трех независимых экспериментальных результатов было определено с помощью денситометрии. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ достоверно по сравнению с группой, получавшей ЛПС.

псориаз [45]. Таким образом, для замедления воспалительного процесса с последующим потенциальным риском побочных реакций использовались обычные стероидные и иммунодепрессивные препараты [46]. Это открывает новые возможности для альтернативной терапии с использованием народной медицины из растений и трав для блокирования воспалительных процессов с минимальными или нулевыми побочными эффектами [47]. Утверждается, что несколько различных лекарственных растений и их активных соединений обладают мощным противовоспалительным действием с установленными потенциальными механизмами действия [18,20]. Некоторые растения проявляли активность, стимулирующую пролиферацию клеток [48,49], в то время как многие из них демонстрировали антипролиферативные эффекты [24,26,50,51]. Экстракт *Caempferia parviflora* является одним из альтернативных лекарственных средств, обладающих противовоспалительной активностью [21]. Однако антипсориазное действие КП на TNF- α -индуцированные клетки HaCaT и противовоспалительное действие КП на LPS-индуцированные клетки RAW264.7 в других аспектах, в частности подавление активности NF- κ B, исследовано в этом исследовании мы исследовали противовоспалительные и

псориазное воздействие КП на клеточную линию макрофагов RAW264.7 и клеточную линию кератиноцитов человека HaCaT. Результаты показали, что экстракт КП снижал жизнеспособность клеток макрофагов и кератиноцитов в зависимости от концентрации. Клиническая картина больных псориазом проявляется акантозом, эритематозными овальными бляшками с прилипшими серебристыми чешуйками, возникающими в результате гиперпролиферации кератиноцитов [52]. Кроме того, данные показывают, что миграционный эффект эпидермальных кератиноцитов может стимулировать реэпителизацию ран и рекапитулировать псориазные бляшки [53]. Следовательно, ингибирование пролиферации и миграции кератиноцитов может быть полезным для терапии псориаза [54]. Мы продемонстрировали, что экстракт КП ингибирует пролиферацию и миграцию кератиноцитов. Наши результаты согласуются с предыдущими исследованиями, показавшими, что метоксифлавоноиды, выделенные из КП, снижали жизнеспособность клеток в активированных ЛПС клетках RAW264.7 [36]. Кроме того, мы обнаружили, что экстракт КП ингибировал пролиферацию клеток Jb6 P+ и HaCaT [55].

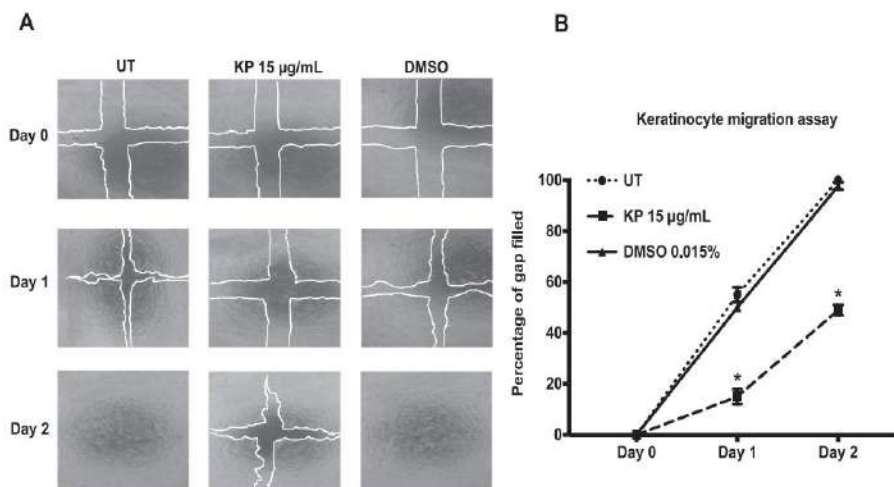


Рис. 8. (А) Микроскопические изображения анализа миграции кератиноцитов HaCaT; и (В) графический анализ влияния КП на миграцию кератиноцитов (процент заполненных пробелов). Клетки, обработанные 15 мкг/мл КП, сравнивали с необработанными клетками и клетками, обработанными ДМСО. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ достоверно по сравнению с группой, не получавшей лечения.

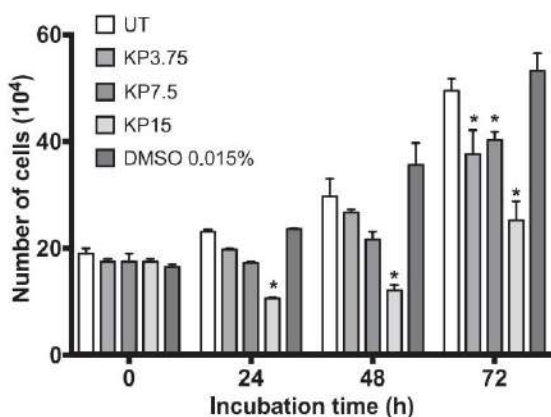


Рис. 9. Количество клеток кератиноцитов HaCaT, обработанных нетоксичными концентрациями КП (3,75, 7,5 и 15 мкг/мл), по сравнению с необработанными клетками и клетками, обработанными ДМСО, при 0, 24, 48 и 72 час. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ достоверно по сравнению с группой, получавшей ЛПС.

В патофизиологии псориаза участвуют ключевые цитокины, в том числе ИЛ-23, который действует через пути передачи сигнала и регуляцию транскрипции в контроле дифференцировки Т-хелперов 17, тем самым продуцируя ИЛ-17, ИЛ-22, ФНО- α [2,4]. В процессе воспаления основными функциями макрофагов являются презентация антигена, фагоцитоз и иммуномодуляция за счет продукции различных цитокинов и факторов роста [56], включая NO, TNF- α , IL-1 и IL-6 [57]. NO, который регулируется iNOS, является мощным реактивным фактором воспалительных реакций, обнаруживаемых в стимулированных макрофагах и в очагах воспаления [12]. Кроме того, ЦОГ-2 является ферментом, индуцированным воспалением, который сильно экспрессируется в местах воспаления [58]. Было высказано предположение, что iNOS и ЦОГ-2 играют важную роль в воспалении. Все эти молекулярные игроки совместно могут индуцировать рекрутирование дополнительных избыточных воспалительных клеток, что приводит к запуску острой генерализованной воспалительной реакции, характерной для септического шока и полиорганной недостаточности [59]. По этой причине терапевтические вмешательства, направленные на макрофаги и их продукты, могут открыть новые возможности для противовоспалительного и антипсориазического лечения. В настоящем исследовании мы показали, что экстракт КП ингибирует экспрессию генов iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α и COX-2 в макрофагах, активированных ЛПС. Эти данные свидетельствуют о том, что КП действует главным образом путем подавления iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α и COX-2

транскрипция в активированных макрофагах. Наши наблюдения аналогичны тем, о которых сообщалось в 2009 г., когда неочищенный этанольный экстракт КП и его соединения (5,5-гидрокси-3,7,3', 4'-тетраметоксифлавоны) ингибировали высвобождение PGE2 и подавляли экспрессию мРНК iNOS, тогда как ЦОГ-2 экспрессия мРНК была частично затронута [34].

Хорошо известно, что NF- κ B играет важную роль в контроле гена, кодирующего провоспалительные цитокины, такие как IL-1 β , IL-6 и TNF- α , а также индуцируемые ферменты, включая iNOS и ЦОГ-2 [60]. Кроме того, активация NF- κ B стимулирует фосфорилирование, убиквитинирование и последующую деградацию I κ B- α специфическими киназами I κ B. Это позволяет свободному гетеродимеру p65-p50 NF- κ B транслоцироваться в ядро и повышать экспрессию провоспалительных генов [61].

Поскольку мы наблюдали, что КП снижает экспрессию нижестоящих провоспалительных генов NF- κ B, разумно предположить, что КП может мешать активации передачи сигналов NF- κ B. Поэтому мы исследовали влияние КП на ингибирование индуцированной ЛПС деградации белка I κ B- α и ингибирование индуцированной ЛПС транслокации NF- κ B в ядро. Наши результаты показали, что лечение ЛПС вызвало резкое снижение NF- κ B в цитоплазме и увеличение в ядре, но этот эффект можно было обратить в зависимости от концентрации путем предварительной обработки экстрактом КП. Настоящее исследование предполагает, что КП ингибирует индуцированную липополисахаридами активацию NF- κ B, частично за счет подавления деградации белка I κ B- α , что приводит к удержанию NF- κ B в цитоплазме макрофагов RAW264.7. Наши результаты согласуются с недавним исследованием, показывающим, что 5,7-диметоксифлавоны регулируют экспрессию iNOS и NF- κ B в клетках P.acnes-стимулированных кератиноцитов человека (HaCaT), а также подавляет фосфорилированный I κ B- α и ядерную транслокацию NF- κ B p65 в LPS-стимулированных клетках RAW264.7 [62]. Кроме того, сообщалось, что экспрессия NF- κ B и COX-2 снижалась при обработке экстрактом КП в H₂O₂-индуцированных стареющих клетках дермальных фибробластов человека (Hs68) [63], тогда как Lee et al. обнаружили, что экстракт КП подавлял транскрипционную активность NF- κ B в 23 кДж/см² индуцированных солнечными длинами волн (SUV) клетках JB6 P+ [55]. Эти данные указывают на потенциальную роль КП в ингибировании активации NF- κ B и подавлении продукции оксида азота и провоспалительных цитокинов в активированных макрофагах. Далее мы выяснили специфические пути передачи воспалительного сигнала, на которые может влиять КП.

Хорошо известно, что MAPK, представляющие собой высококонсервативные протеинсерин/треонинкиназы, ответственны за регуляцию продукции медиаторов воспаления. При стимуляции ЛПС активируется фосфорилирование JNK, ERK и p38 MAPK, и эти фосфорилированные киназы играют решающую роль в контроле экспрессии генов выживания клеток и провоспалительных цитокинов, включая ИЛ-1 β , ИЛ-6, TNF- α и COX-2. Таким образом, подавление активности генов.

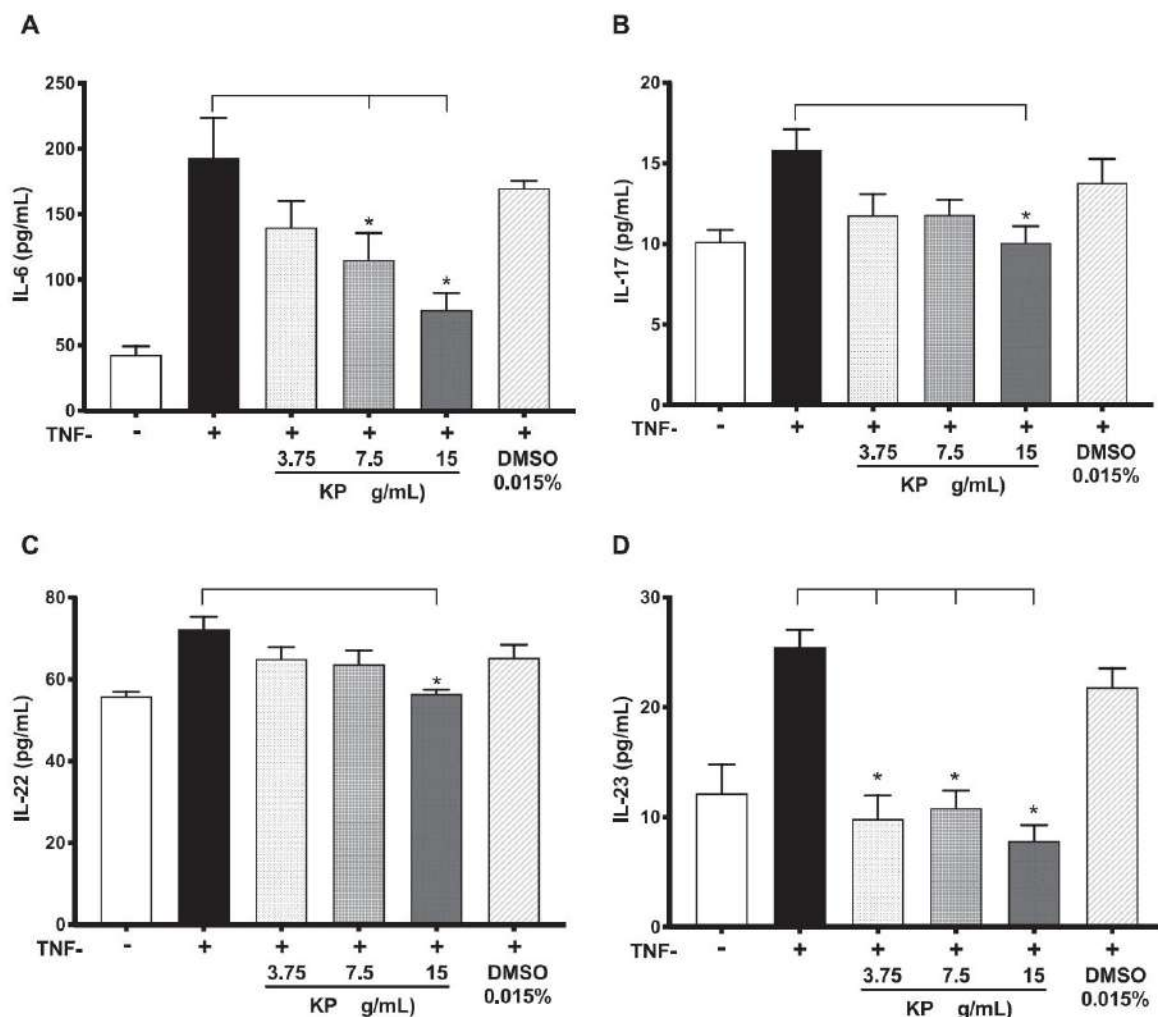


Рис. 10. Ингибирующее действие КП на индуцированную TNF- α продукцию IL-6, IL-17, IL-22 и IL-23 в клетках HaCaT через 24 ч. Клетки ($1,5 \times 10^6$ клеток/мл) предварительно обрабатывали различными концентрациями (3,75, 7,5 и 15 мкг/мл) экстракта КП в течение 4 ч, а затем инкубировали с TNF- α (20 нг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ достоверно по сравнению с группой, получавшей TNF- α .

α и ЦОГ-2 [64]. Поэтому мы исследовали влияние КП на фосфорилирование MAPK. Наши данные показали, что предварительная обработка экстрактом КП значительно ингибировала LPS-стимулированное фосфорилирование ERK1/2, JNK и p38 дозозависимым образом. Точно так же экстракт КП также значительно ингибировал TNF- α -индуцированное фосфорилирование пути ERK1/2 в кератиноцитах человека. Эти результаты ясно предоставляют накопленные доказательства того, что фосфорилирование ERK1/2, JNK и p38 сильно ингибируется КП. Однако степень ингибирования для каждой киназы была разной, при этом максимальный ингибирующий эффект оказывался на JNK. Эти результаты показывают, что пути передачи сигнала, опосредованные ERK1/2, JNK и p38, эффективно блокируются КП в активированных макрофагах. Недавно в отчете было показано, что ингибирование фосфорилирования JNK, но не ERK, снижает стимулируемую LPS продукцию NO [65]. С другой стороны, предыдущее исследование Hwang et. (2010) продемонстрировало, что ингибирование фосфорилирования ERK и p-38, но не JNK, снижало стимулируемую LPS продукцию NO [66]. Более того, недавние исследования показали, что соединения, выделенные из КП (5,7-диметоксифлаван, триметиллапигенин и тетраметиллютеолин), проявляли ингибирующее действие на высвобождение оксида азота (NO), индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS), PGE2 и TNF- α в LPS-индуцированных клетках RAW264.7 посредством активации пути тирозинкиназы селезенки, но не путей ERK и JNK [34–36]. Тем не менее, неизвестно, как КП регулирует события киназы-субстрата перед сигнальной трансдукцией MAPK и NF- κ B. Чтобы определить точные молекулярные механизмы действия КП, необходимы структурные манипуляции, которые синтезируют ортогональную пару киназа-субстрат в виде

эффективный инструмент для изучения функциональных последствий специфических событий фосфорилирования в живых клетках [67]. Основываясь на нашем открытии, что КП может подавлять активацию сигнальных путей как NF- κ B, так и MAPK, а также нижестоящих провоспалительных медиаторов на уровне генов и белков, мы твердо верим, что КП обладает подлинным противовоспалительным и противовоспалительным действием. псориаз.

5. Вывод

Это исследование предоставило накопленные доказательства того, что экстракт *Caempferia parviflora* обладает противовоспалительной и антиспориатической активностью, включая ингибирование продукции провоспалительных цитокинов IL-6, IL-17, IL-22 и IL-23 в TNF- α -индуцированных кератиноцитах. и ингибирование экспрессии генов NO, iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α и COX-2 в макрофагах, стимулированных ЛПС. Кроме того, КП проявлял ингибирующее свойство в отношении пролиферации и миграции клеток HaCaT. Было доказано, что этот ингибирующий процесс регулируется путями передачи сигнала NF- κ B и MAPK, включая ERK1/2, p38 и JNK в LPS-индуцированных клетках RAW264.7 и ERK1/2 в TNF- α -индуцированных кератиноцитах. Хотя для подтверждения детального механизма необходимы дальнейшие исследования, наш отчет решительно поддерживает традиционное использование *Caempferia parviflora* и предполагает, что это растение является многообещающим кандидатом для разработки новых противовоспалительных и антиспориатических средств.

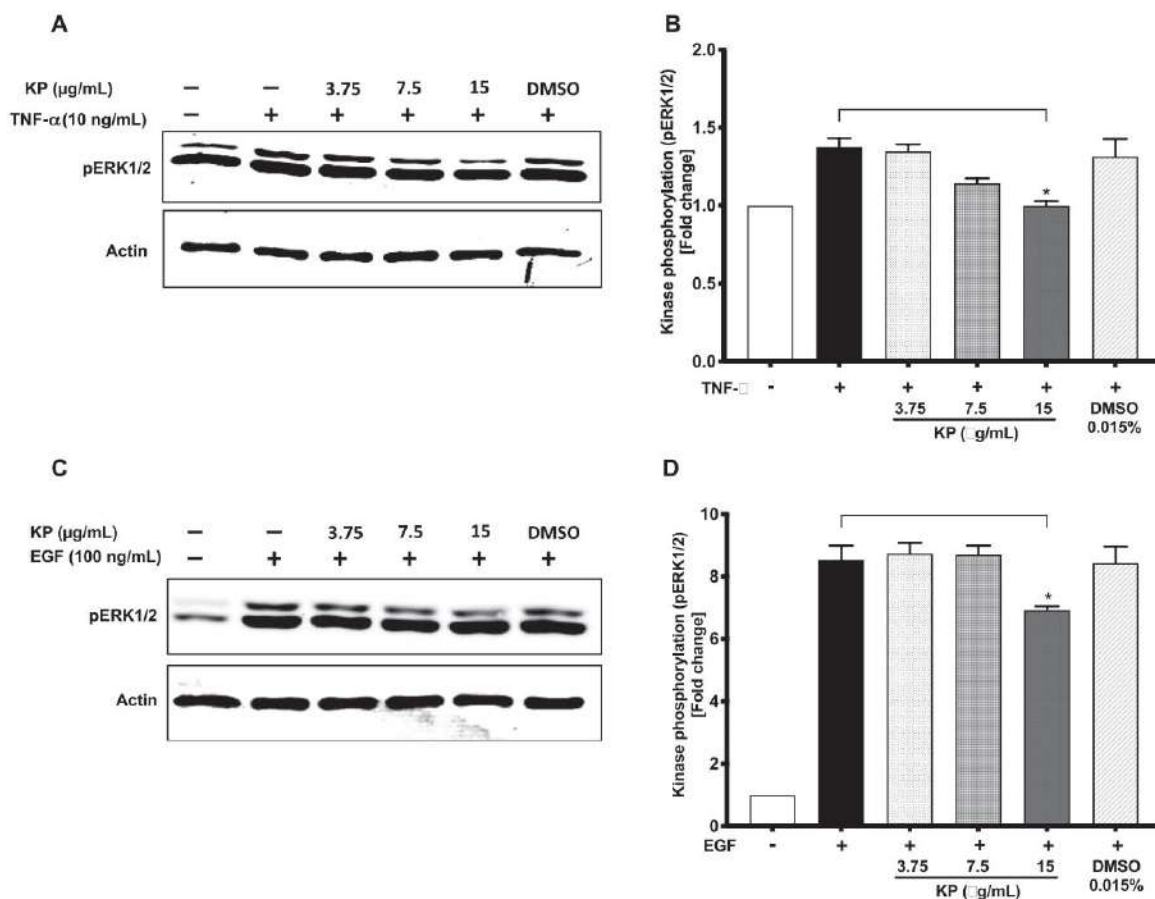


Рис. 11. Влияние КП на фосфорилирование MAPK в клетках HaCaT, стимулированных TNF-α и EGF. (A) Клеточные белки из клеток использовали для обнаружения фосфорилированных или полных форм ERK1/2 (A и C). Количественное определение относительной интенсивности полос из трех независимых экспериментальных результатов определяли с помощью денситометрии (B и D). Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего для трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$ достоверно по сравнению с группой, стимулированной либо TNF-α, либо EGF.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Управления постоянного секретаря Министерства высшего образования, науки, исследований и инноваций (номер гранта RGNS 63-064) и медицинского факультета Чиангмайского университета (номер гранта 118-25641). Кроме того, работа была частично поддержана Национальным исследовательским советом Таиланда (NRCT). Спонсоры не участвовали в разработке проекта, сборе данных, интерпретации или решении о публикации.

Вклад автора

Эксперименты, анализ данных и написание рукописи проводились MNT и WN. SP, SS, TJ, PM и KC проводили эксперименты. NW выполнил анализ данных, оказал техническую поддержку и отредактировал рукопись. WN основала исследовательский проект, разработала эксперименты и внесла свой вклад в финансирование проекта.

Заявление об авторском вкладе CRediT

Вутигри Нималмун: Концептуализация, методология, исследование, написание – обзор и редактирование, управление проектом, получение финансирования. Мингван На. Takuathung: Investigation, Writing — первоначальный проект. Сараньяпин Потиканонд: Расследование. Сирипут Сукхи: Ресурсы. Питчая Мункорнасавакул: Ресурсы. Танаторн Джаранакулванич: Расследование. Киттинан Чинда: Расследование. Nitwara Wikan: Ресурсы, Написание - обзор и редактирование.

Дополнительный материал

Дополнительные материалы предоставляются по запросу.

Заявление о конфликте интересов

Авторы заявляют, что у них нет конкурирующих интересов.

Подтверждение

Эта исследовательская работа была частично поддержана Исследовательским центром фармацевтических нанотехнологий фармацевтического факультета Чиангмайского университета, Чиангмай, Таиланд.

использованная литература

- [1] E. Christophers, Псориаз – эпидемиология и клинический спектр, *Clin. Эксп. Дерматол.* 26 (4) (2001) 314–320.
- [2] FO Nestle, DH Kaplan, J. Barker, Psoriasis, *N. Engl. Дж. Мед.* 361 (5) (2009) 496–509.
- [3] T.E. Кристенсен, К.П. Каллис, Дж. Папенфусс, М.С. Хоффман, С.Б. Хансен, Б. Вонг, Дж. М. Панко, Г.Г. Крюгер, Наблюдения за псориазом в отсутствие терапевтического вмешательства, идентифицирует два недооцененных морфологических варианта, псориаз с тонкими и толстыми бляшками, а также связанные с ними фенотипы, *J. Invest. Дерматол.* 126 (11) (2006) 2397–2403.
- [4] Э. Фитч, Э. Харпер, И. Скорчева, С. Е. Курц, А. Бловельт, Патология псориаза: последние достижения в области цитокинов IL-23 и Th17, *Curr. Ревматол. Отчет* 9 (6) (2007) 461–467.
- [5] О. Такеучи, С. Акира, Рецепторы распознавания образов и воспаление, *Cell* 140 (6) (2010) 805–820.
- [6] C. Gabay, I. Kushner, Белки острой фазы и другие системные реакции на воспаление, *N. Engl. Дж. Мед.* 340 (6) (1999) 448–454.

- [71] J. MacMicking, Q.-w. Xie, C. Nathan, Оксид азота и функция макрофагов, *Анну. Преподобный Иммунол.* 15 (1) (1997) 323–350.
- [8] С. Монкада, А. Хиггс, Путь L-аргинин-оксид азота, *N. Engl. Дж. Мед.* 329 (27) (1993) 2002–2012 гг.
- [9] Р. Симаду, С. Акаши, Х. Огата, Ю. Нагаи, К. Фукудومه, К. Мияке, М. Кимото, MD-2, молекула, которая придает липополисахаридную чувствительность к платному рецептору 4, *Дж. Эксп. Мед.* 189 (11) (1999) 1777–1782.
- [10] X. Ян, Д. В. Янг, Ф. Гусовский, Дж. Чоу, Клеточные события, опосредованные липополисахарид-стимулируемый toll-подобный рецептор 4. MD-2 необходим для активации митоген-активируемых протеинкиназ и Erk-1, *J. Biol. хим.* 275 (27) (2000) 20861–20866.
- [11] С. Монкада, Оксид азота: открытие и влияние на клиническую медицину, *JR Soc. Мед.* 92 (4) (1999) 164–169.
- [12] ID Welters, C. Fimiani, TV Biffinger, GB Stefano, NF-κappaB, оксид азота и сигнализация опиатов, *Мед. Гипотезы* 54 (2) (2000) 263–268.
- [13] AJ Lewis, AM Manning, Новые мишени для противовоспалительных препаратов, *Сург. мнение хим. биол.* 3 (4) (1999) 489–494.
- [14] R. Flower, Стероидные противовоспалительные препараты как ингибиторы фосфолипазы A2, *Adv. Простагландин Тромбоксан Рез.* 3 (1978) 105–112.
- [15] J. Steinmeuer, Фармакологические основы терапии боли и воспаления нестероидными противовоспалительными препаратами, *Arthritis Res.* 2 (5) (2000) 379–385.
- [16] C. Sostres, CJ Gargallo, MT Argoyo, A. Lanas, Неблагоприятные эффекты нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП, аспирин и коксибы) на верхние отделы желудочно-кишечного тракта, *Best Pract. Рез. клин. Гастроэнтерол.* 24 (2) (2010) 121–132.
- [17] J. Maroon, JW Bost, A. Maroon, Натуральные противовоспалительные средства для облегчения боли, *Surg. Нейрол. Междунар.* 1 (2010) 80.
- [18] P. Hantikitchai, P. Buacheen, P. Pitchakarn, M. Na Takuathung, N. Wikan, D. R. Smith, S. Potikanond, W. Nimlamool, Экстракт *Artocarpus lakoocha* ингибирует индуцированный LPS воспалительный ответ в клетках макрофагов RAW 264.7, *Int. J. Mol. науч.* 21 (4) (2020).
- [19] P. Hantikitchai, HJ Lou, N. Wikan, DR Smith, S. Potikanond, W. Nimlamool, Oxyresveratrol ингибирует IL-1β-индуцированное воспаление путем подавления активации AKT и ERK1/2 в микроглии человека, *HMC3, Int. J. Mol. науч.* 21 (17) (2020).
- [20] P. Намсен, Н. Роджанстиен, С. Сиризатавог, П. Ройсанга, В. Нимламул, S. Potikanond, *Thunbergia laurifolia* оказывает антифибротическое действие на звездчатые клетки печени человека, *Evid. Дополнение на основе Altern. Мед.* 2017 (2017), 3508569.
- [21] Д. Чен, Х. Ли, В. Ли, С. Фенг, Д. Денг, *Caempferia parviflora* and its метоксифлавоны: химия и биологическая активность, *Эвид. -На основе дополнения. Альтерн. Мед.: eCAM* 2018 (2018), 4057456.
- [22] К. Тода, С. Хитоз, С. Такеда, Х. Симода, Экстракт черного имбиря повышает физическую работоспособность и мышечную выносливость за счет улучшения воспаления и энергетического обмена, *Heliyon* 2 (5) (2016), 00115.
- [23] С. Саокаев, П. Вилаират, П. Рактаньякан, П. Дилокторнасакул, Т. Диппайом, С. Kongkaew, R. Srumsiri, A. Chuthaputti, N. Chaiyakunapruk, Клинические эффекты *Krachaaidum* (*Caempferia parviflora*): систематический обзор, *J. Evid. -На основе дополнения. Альтерн. Мед.* 22 (2017) 413–428.
- [24] S. Potikanond, S. Sookkhee, M. Na Takuathung, P. Mungkornasawakul, N. Wikan, DR Smith, W. Nimlamool, Экстракт *Caempferia parviflora* проявляет противораковую активность против HeLa шейки матки, *Front. Фармакол.* 8 (630) (2017) 630.
- [25] С. Парам, С. Сухи, К. Саконвасун, М. На Такуатунг, P. Mungkornasawakul, W. Nimlamool, S. Potikanond, Противораковое действие *Caempferia parviflora* на клетки рака яичников SKOV3, *BMCC Complement. Альтерн. Мед.* 18 (1) (2018), 178.
- [26] B. Сурадж, С. Сухи, Дж. Паньякаев, П. Мунгкорнасавакул, Н. Викан, Д. R. Smith, S. Potikanond, W. Nimlamool, Экстракт *Caempferia parviflora* ингибирует активацию STAT3 и выработку интерлейкина-6 в клетках рака шейки матки HeLa, *Int. J. Mol. науч.* 20 (17) (2019).
- [27] Т. Хоригава, Т. Симада, Ю. Окабе, К. Киношита, К. Кояма, К. Миямото, К. Ичиносэ, К. Такахаши, М. Абурада, Полиметоксифлавоноиды из *Caempferia parviflora* индуцируют адипогенез на преадипоцитах 3T3-L1, регулируя факторы транскрипции на ранней стадии дифференцировки, *Biol. Фарм. Бык.* 35 (5) (2012) 686–692.
- [28] В. Малакул, С. Тираваралан, К. Инганнинан, П. Савасди, Эффекты *Caempferia parviflora* Wall. Ex *Vaker* об эндотелиальной дисфункции у крыс с диабетом, вызванным стрептозотоцином, *J. Ethnopharmacol.* 133 (2) (2011) 371–377.
- [29] С. Йорсин, К. Каноквирун, Н. Раденахмад, К. Джансакул, Эффекты кемпферии *parviflora* rhizomes дихлорметановый экстракт на сосудистые функции у самцов крыс среднего возраста, *J. Ethnopharmacol.* 156 (2014) 162–174.
- [30] JU Welbat, P. Chaisawang, W. Chaijaroonkhanarak, P. Prachaney, W. Pannangrong, B. Sripanidkulchai, P. Wigmore, Экстракт *Caempferia parviflora* улучшает когнитивные нарушения и снижает пролиферацию клеток, вызванную лечением валпроевой кислотой у крыс, *Апп. Анат. = Анат. Анц.: Выкл. Орган Анат. Гэс.* 206 (2016) 7–13.
- [31] К. Юн, Дж. Ли, К.-Т. Хо, М. Джун, Открытие полиметоксифлавонов из черного имбиря (*Caempferia parviflora*) в качестве потенциальных ингибиторов β-секретазы (BACE1), *J. Funct. Еда* 20 (2016) 567–574.
- [32] И. Ёсида, А. Цуда, Т. Харада, А. Ямагучи, К. Ямадзак, С. Инохана, С. Исигава, Н. Кибуне, Т. Сатояма, СС-и. Кацуа, М. Судзуки, Н. Ватаи, Т. Хиросе, Х. Мицуэ, М. Ширакава, Комай, Идентификация и оценка противовоспалительных соединений из *Caempferia parviflora* AU - Horigome, Satoru, Biosci., Biotechnol., Biochem. 78 (5) (2014) 851–860.
- [33] С. Тьютракул, С. Субхадхирасакул, С. Кумми, Противоаллергическая активность соединений из *Caempferia parviflora*, *J. Ethnopharmacol.* 116 (1) (2008) 191–193.
- [34] С. Sae-wong, P. Tansakul, S. Tewtrakul, Противовоспалительный механизм *Caempferia parviflora* в мышечных макрофагальных клетках (RAW 264.7) и у экспериментальных животных, *J. Ethnopharmacol.* 124 (3) (2009) 576–580.
- [35] С. Тьютракул, С. Субхадхирасакул, Эффекты соединений из кемпферии. *parviflora* на продукцию оксида азота, простагландина E2 и фактора некроза опухоли-альфа в клетках макрофагов RAW264.7, *J. Ethnopharmacol.* 120 (1) (2008) 81–84.
- [36] К. Сae-Вонг, Х. Мацуа, С. Тьютракул, П. Тансакул, С. Накамура, Ю. Номура, М. Йошигава, Подавляющее действие метоксифлавоноидов, выделенных из *Caempferia parviflora*, на экспрессию индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS) в клетках RAW 264.7, *J. Ethnopharmacol.* 136 (3) (2011) 488–495.
- [37] С. Хоригоме, И. Ёсида, С. Ито, С. Инохана, К. Фушими, Т. Нагаи, А. Ямагучи, К. Фузита, Т. Сатояма, С. Катсуа, С. Судзуки, М. Ватаи, Н. Хиросе, Т. Мицуэ, Х. Ширакава, М. Комай, Ингибирующее действие экстракта *Caempferia parviflora* на адгезию моноцитов и продукцию клеточных активных форм кислорода в эндотелиальных клетках пупочной вены человека, *Еур. Дж. Нутр.* 56 (3) (2017) 949–964.
- [38] Т. Мосманн, Быстрый колориметрический анализ клеточного роста и выживания: применение к анализам пролиферации и цитотоксичности, *J. Immunol. Методы* 65 (1–2) (1983) 55–63.
- [39] NS Bryan, MB Grisham, Методы обнаружения оксида азота и его метаболитов в биологических образцах, *Free Radic. биол. Мед.* 43 (5) (2007) 645–657.
- [40] JA Molitor, WH Walker, S. Doerre, DW Ballard, WC Greene, NF-κappa B: семейство индуцибельных и дифференциально экспрессируемых энхансер-связывающих белков в Т-клетках человека, *Прогр. Натл. акад. науч. США* 87 (24) (1990) 10028–10032.
- [41] Д. Р. Кордл, С. Р. Рид, М. А. Хавигер Дж., Индуцированные липополисахаридом фосфорилирование MAD3 и активация c-Rel и родственных белков NF-κB в моноцитарном THP-1 человека, *Cells, J. Biol. хим.* 268 (5) (1993) 11803–11810.
- [42] Y. Yamamoto, RB Gaynor, Терапевтический потенциал ингибирования пути NF-κappaB при лечении воспаления и рака, *J. Clin. расследование* 107 (2) (2001) 135–142.
- [43] Т. Лю, Л. Чжан, Д. Джу, С.-К. Солнце, передача сигналов NF-κB при воспалении, сигнал Трансдукт. Цель. тер. 2 (2017) 17023.
- [44] JM Gelfand, SR Feldman, RS Stern, J. Thomas, T. Rolstad, DJ Margolis, Детерминанты качества жизни у пациентов с псориазом: исследование населения США, *J. Am. акад. Дерматол.* 51 (5) (2004) 704–708.
- [45] Л. Чен, Х. Дэн, Х. Цуй, Дж. Фан, З. Цзо, Дж. Дэн, Ю. Ли, С. Ван, Л. Чжао, Воспалительные реакции и связанные с воспалением заболевания органов, *Oncotarget* 9 (6) (2017) 7204–7218.
- [46] Н. Мур, К. Поллак, П. Буткерайт, Неблагоприятные лекарственные реакции и лекарственные препараты. взаимодействия с безрецептурными НПВП, *Theor. клин. Управление рисками* 11 (2015) 1061–1075.
- [47] DL Ambriz-Perez, N. Leyva-Lopez, EP Gutierrez-Grijalva, JBJCF Heredia, Agric. Фенольное соединение: Nat. Альтерн. Воспаление. Обращаться. Версия 2 (1) (2016), 1131412.
- [48] J. Ruttanapattanakul, N. Wikan, S. Okonogi, M. Na Takuathung, P. Buacheen, P. Pitchakarn, S. Potikanond, W. Nimlamool, Экстракт *Boesenbergia rotunda* усиливает пролиферацию кератиноцитов человека за счет активации ERK1/2 и PI3K /Aktкиназы, *Биомед. фарм.* 133 (2021), 111002.
- [49] В. Нимламул, С. Потиканонд, Дж. Руттанапаттанакул, Н. Викан, С. Оконоги, С. Джантрапиром, П. Питчакарн, Дж. Каринчай, Экстракт куркумы амариссима ингибирует сети передачи сигналов роста и выживания, чтобы стимулировать пролиферацию кератиноцитов человека, *Биология (Базель)* 10 (4) (2021).
- [50] С. Парам, С. Сухи, К. Саконвасун, М. На Такуатунг, P. Mungkornasawakul, W. Nimlamool, S. Potikanond, Противораковое действие *Caempferia parviflora* на клетки рака яичников SKOV3, *BMCC Complement Alter.* *Мед.* 18 (1) (2018) 178.
- [51] P. Thaklaewphan, J. Ruttanapattanakul, S. Monkaw, M. Buatom, S. Sookkhee, W. Nimlamool, S. Potikanond, Экстракт *Caempferia parviflora* ингибирует TNF α-индуцированное высвобождение MCP-1 в клетках рака яичников посредством подавления передачи сигналов NF κB, *Biomed. фарм.* 141 (2021), 111911.
- [52] Н. Гарзорт-Старк, К. Эйрих, Патогенез псориаза: кератиноциты снова в центре внимания, *J. Invest. Дерматол.* 139 (5) (2019) 995–996.
- [53] JP Ortonne, Этиология и патогенез псориаза, *Вр. Дж. Дерматол.* 135 (c49) (1996) 1–5.
- [54] С. Чоудхари, К. Сардана, Н. Сайни, мир-4516, микроРНК, подавленная при псориазе, ингибирует подвижность кератиноцитов путем нацеливания на передачу сигналов фибронектина/интегрин α9, *Biochim. Эт. Биофиз. Acta (BBA)-мол. Основа Дж.* 1863 (12) (2017) 3142–3152.
- [55] М.-Х. Ли, А.-Р. Хан, М. Джанг, Х.-К. Чой, С.-Ю. Ли, К.-Т. Ким, Т.-Г. Лим, Противовоспалительная активность черного имбиря (*Caempferia parviflora*) против кожи за счет антиоксидантной активности, *Oxid. Мед. Клетка. Лонгев.* 2018 (2018), 5967150.
- [56] Н. Фузизавара, KJCDT-I. Кобаяши, Макрофаги при воспалении, *Сург. Препарат нацелен на воспаление. Аллергия* 4 (3) (2005) 281–286.
- [57] Г. Аранго Дюк, А. Дескто, Цитокины макрофагов: участие в иммунитете и инфекционных болезнях, *Фронт. Иммунол.* 5 (2014), 491.
- [58] JL Zhang T, X. Chen, Y. Peng, H. Long, L. Zhou, J. Huang, Z. Chen, Q. Long, Z. Yang, Резистин повышает экспрессию ЦОГ-2 через TAK1- Сигнальный путь IKK-NF-κB, *Воспаление* 33 (2010) 25–33.
- [59] BA Beutler, Роль фактора некроза опухоли в норме и заболевании, *J. Rheumatol.* 57 (1999) 16–21.
- [60] T. Lawrence, DA Willoughby, DW Gilroy, Противовоспалительные липидные медиаторы и понимание разрешения воспаления, *Nat. Преподобный Иммунол.* 2 (10) (2002) 787–795.
- [61] PJ Barnes, M. Karin, Ядерный фактор-κappaB: ключевой фактор транскрипции при хронических воспалительных заболеваниях, *N. Engl. Дж. Мед.* 336 (15) (1997) 1066–1071.
- [62] S. Jin, MY Lee, Экстракт *Caempferia parviflora* как потенциальное средство против акне с про-воспалительной, себостатической и антипролиферативной активностью, *Int. Дж. Мол. науч.* 19 (11) (2018).

- [63] Ж.-Э. Парк, С.В. Ву, М.-Б. Ким, К. Ким, Дж.-К. Hwang, Стандартизированный экстракт *Caempferia parviflora* ингибирует естественный процесс старения в дермальных фибробластах человека и бесшерстных мышей, ингибируя клеточное старение и митохондриальную дисфункцию, *Evid. -На основе дополнения. Альтерн. Мед.: eCAM* 2017 (2017), 6861085.
- [64] CAJC Dinarello, Провоспалительные цитокины, *Chest* 118 (2) (2000) 503–508.
- [65] HY Lin, SC Shen, CW Lin, MS Wu, YC Chen, Inhi протопорфирина кобальта. часть производства оксида азота, индуцированного липополисахаридом или липотейхоевой кислотой, путем блокирования активации N-концевой киназы c-Jun и активности фермента оксида азота, *Chem. -Биол. Взаимодействовать.* 180 (2009) 202–210.
- [66] JM Hwang, JY Yu, YO Jang, BT Kim, KJ Hwang, YM Jeon, JC Lee, Соединение фенольной кислоты и фенетилмочевины ингибирует липополисахарид-индуцированную продукцию оксида азота и провоспалительных цитокинов в клеточной культуре, *Int. Иммунофармак.* 10 (2010) 526–532.
- [67] C. Chen, W. Nimlamoool, CJ Miller, HJ Lou, BE Turk, Рациональный редизайн функционального взаимодействия протеинкиназы-субстрата, *ACS Chem. биол.* 12 (5) (2017) 1194–1198.