

지방세포에서 TLR4/NF- κ B/ERK 신호조절을 통한 Aloe-Emodin의 염증 억제 효과

†박 미 영

순천향대학교 교육대학원 영양교육전공

Anti-Inflammatory Properties of Aloe-Emodin in Adipocytes through a TLR4/NF- κ B/ERK Signaling Pathway

Mi-Young Park

**Dept. of Food & Nutrition Education, Graduate School of Education, Soonchunhyang University, Asan 31538, Republic of Korea.*

Abstract

Aloe-emodin (AE) is the major bioactive component in aloe and known to exhibit anti-inflammatory activities. However, it has not been elucidated whether its anti-inflammatory potency can contribute to the elimination of obesity. The aim of the current study is to investigate the effect of AE on toll-like receptor 4 (TLR4) pathways in the presence of lipopolysaccharide (LPS) in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with AE (0-20 μ M) for one hour, followed by LPS treatment for 30 min and then, adipokine mRNA expression levels were measured. Next, TLR4-related molecules were measured in LPS-stimulated 3T3-L1 adipocytes. AE significantly decreased the mRNA expression of the tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in a dose-dependent manner. Moreover, AE suppressed TLR4 mRNA expression. Further study showed that AE could suppress the nuclear factor- κ B (NF- κ B) and phosphorylation of extracellular receptor-activated kinase (pERK). The results of this study suggest that AE directly inhibits TLR4/NF- κ B/ERK signaling pathways and decreases the inflammatory response in adipocytes.

Key words: adipocytes, aloe-emodin, inflammation, toll-like receptor 4 (TLR4)

서 론

비만에서의 염증반응은 대사성 질환, 당뇨, 지방간과 같은 비만과 관련된 다양한 질환에 있어서 중요한 역할을 한다 (Divella 등 2016). 지방세포에서 염증반응의 원인 및 이의 전개상황은 아직 정확한 기전이 밝혀져 있지 않지만, 많은 문헌들에서 패턴 인식 수용체(Pattern Recognition Receptors, PRRs)에 의해 중개되는 것으로 알려져 있다(Tsukumo 등 2007; Himes & Smith 2010). 패턴 인식 수용체 중에서 가장 잘 알려진 것은 toll-like receptors (TLRs)이며, TLRs 작용은 면역반응뿐만 아니라, 비만에서의 만성염증에도 깊이 관여하고 있다 (Kim

등 2012). 특히, 지방세포에서 TLR4가 자극을 받으면 ERK와 NF- κ B pathways가 활성화되고, 이는 IL-6와 MCP-1의 분비를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Schaeffler 등 2009). TLR 작용은 리간드에 의해서 개시되는데, TLR 종류에 따라 그 종류가 다르다. Lipopolysaccharide(LPS)는 TLR4의 대표적인 리간드로서, 지방조직에서의 염증 초기반응을 촉진시키는 주요 인자로 알려져 있다(Cani 등 2007). 따라서 LPS로 유도된 TLR4 신호전달 체계는 지방세포의 염증반응에서 중요한 의미를 갖는다.

알로에 에모딘(aloe-emodin, AE)은 알로에의 주요 성분으로 항바이러스, 항암, 항염증 등의 다양한 생리활성능을 소지

† Corresponding author: : Mi-Young Park, Dept. of Food & Nutrition Education, Graduate School of Education, Soonchunhyang University, Asan 31538, Republic of Korea. Tel: +82-41-530-4752; Fax: +82-41-530-4752; E-mail: pmy1222@gmail.com

한 것으로 보고되고 있다(Andersen 등 1991; Arosio 등 2000; Chang 등 2016). Kshirsagar 등(2014)은 관절염 동물모델에서 AE가 염증 매개 물질들의 분비를 감소시킴으로써 관절염 증상을 완화시켰다고 하였으며(Kshirsagar 등 2014), Hu 등 (2014)은 AE가 NF-κB, MAPK 및 PI3K pathways를 억제함으로써 대식세포에서 LPS로 유도된 염증반응을 감소시켰다고 하였다(Hu 등 2014). 그러나 지방세포에서 이의 항염증능과 관련된 분자적 기전 연구는 보고된 바가 없다. 그러므로 지방세포에서 AE의 항염증능 여부와 이의 분자적 기전을 찾는 연구는 매우 중요한 의미를 가질 것으로 생각한다. 이에 본 연구에서는 AE가 LPS로 유도된 3T3-L1 지방세포의 염증반응을 억제하는지 여부와 TLR4 관련 신호전달 체계 인자들의 발현을 측정하여 이의 분자적 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

AE는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 항체 anti-ERK와 anti-actin은 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified eagles medium (DMEM), bovine calf serum(BCS), antibiotic-antimycotic solution, trypsin-EDTA는 Gibco(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. 이외의 모든 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 3T3-L1 세포배양 및 분화유도

마우스 지방전구세포인 3T3-L1 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 배양 받았고, 세포 배양은 10% heat-inactivated BCS, 100 U/mL penicillin, and 100 μg/mL of streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Life Technologies, Carlsbad, CA) 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂조건에서 배양하였다. 신선한 배지를 2~3일에 한 번씩 보충하면서 세포분화가 최대에 도달했을 때 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), 2 μM dexamethasone(DEX), 1.7 μM insulin이 첨가된 분화배지로 교체하였다.

분화시작 8일 후 세포는 분석을 위해 사용되었다. 분화가 완료된 3T3-L1 세포에 5~20 μM AE를 1시간 처리한 후, 100 ng/mL LPS를 30분간 처리하였다. AE는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였다.

3. 세포독성 (MTT assay)

AE의 세포독성을 확인하기 위해 3T3-L1 세포를 6-well plate에 1×10⁵ cells/well로 분주하였다. 지방세포로 유도 후, AE를 농도별로 1시간 처리한 후, LPS(100 ng/mL)를 30분간 처리하였으며, 0.1% DMSO를 처리한 군을 대조군으로 하였다. 실험처리 후, 5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 용액을 첨가한 다음에 4시간 동안 배양하고, 배지를 완전히 제거하였다. 각 well에 150 μL DMSO를 넣고 30분 후에 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Real-time RT-PCR 분석

Total RNA는 Trizol reagent(Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. 세포에 Trizol reagent를 넣고 세포를 떼어낸 후 chloroform을 넣고, 10초간 강하게 vortexing하며, 4°C, 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들여 준 후 실온에 10분간 방치하였다. 그 후, 4°C, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 75% ethanol을 넣고 섞어준 후, 4°C, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 실온에서 RNA pellet을 건조한 후, DEPC(diethyl pyrocarbonate)가 함유된 증류수에 녹여 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 구하였다. Real-time quantitative PCR은 SYBR Green™ kit(Quantitect™ SYBR Green PCR, Qiagen)를 이용하여 수행하였다. 결과물의 상대적인 발현량은 ΔΔCT method(Livak & Schmittgen, 2001)를 이용하여 계산하였으며, 사용된 primer 종류 및 서열은 Table 1에 제시하였다.

5. NF-κB 활성도 측정

Nuclear Extract kit(Active Motif, Carlsbad, CA, USA)를 사용

Table 1. Primer sequences used in RT-PCR analysis

Target gene	Forward	Reverse
TNF-α	aacatccaacctccaacg	ctcttaacccccgaatcccg
IL-6	tcacctctcagaacgaattgaca	agtgcctc ttgctgctttcac
MCP-1	attgggatcatcttgctggt	cctgctgtt cacagttgcc
TLR4	tgatcatcaggactttgctg	tgttcttctctgctgaca
β-Actin	gagcgcaagtactctgtgtg	cggactcatctactctg

하여 세포의 nuclear extract를 추출한 후, PathScan Total NF- κ B p65 Sandwich ELISA kit(Cell Signaling Technology)를 사용하여 NF- κ B 활성 정도를 측정하였다.

6. Western blot 분석

실험이 종료된 세포를 PBS(pH 7.4) 용액으로 2회 세척한 후, RIPA buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, and 0.1% SDS)에 넣고, 4°C에서 10분간 용해시킨다. 세포를 수거하여 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 회수하여 단백질을 정량하였다. 단백질 30 μ g을 취하여 SDS loading buffer(60 mM Tris, 25% glycerol, 2% SDS, 0.5% 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 혼합한 후, 10% SDS polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 이후에 membrane은 5% 무지분유가 첨가된 TTBS(10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% tween 20) 용액에 넣고, 상온에서 1시간 동안 blocking시켰다. TTBS 용액으로 10분간 3회 세척한 후, anti-ERK(Cell Signaling, Beverly, MA, USA) 일차항체로 4°C에서 밤새 반응시킨 다음 TTBS 용액으로 3회 세척하였다. 그 후 peroxidase가 포함된 2차 항체로 1시간 동안 반응시켰고, 항체의 검출은 chemiluminescent substrate 용액을 이용하여 가시화 하고 chemiluminescent detection system LAS3000(Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 분석하였다.

7. 통계분석

실험결과는 mean \pm S.D.으로 표시하였고, 통계 프로그램 SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 각 실험군 간의 유의성 검정은 일원배치 analysis of variance(ANOVA)를 통해 분석하였으며, 각 군간의 차이는 Duncan's multiple range tests로 사후 검정하였다. 실험의 통계적 유의성은 *p* 값이 0.05

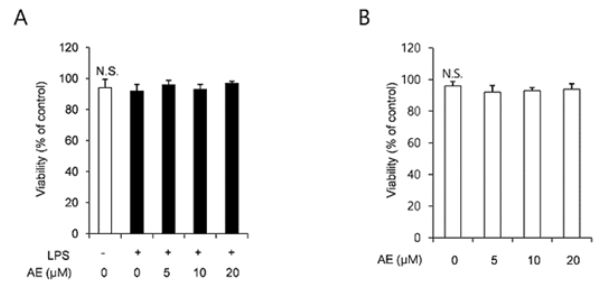


Fig. 1. Effect of AE on viability of differentiated 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cell were pretreated with various concentrations of AE for 1 h and then stimulated with or without LPS(100 ng/mL) for 30 min. After incubation, cell viability was assessed using the MTT method. Values are expressed as mean \pm S.D.(n=4).

이하인 경우에 유의한 것으로 보았다.

Results

1. 세포 독성

AE가 지방세포의 생존율에 미치는 영향을 측정한 결과, 본 연구에서 사용한 농도에서는 LPS를 처리한 군과 처리하지 않는 군 모두 세포사멸에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

2. 사이토카인 mRNA levels 발현 억제 효과

TNF- α , IL-6, MCP-1은 지방세포에서 분비되는 대표적인 사이토카인으로 알려져 있다(Funahashi 등 1999). 본 연구에서는 LPS 자극에 의해 지방세포에서 이들 사이토카인의 발현 여부를 살펴보았다. Real time PCR법을 이용하여 사이토카인 유전자의 발현 정도를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 대

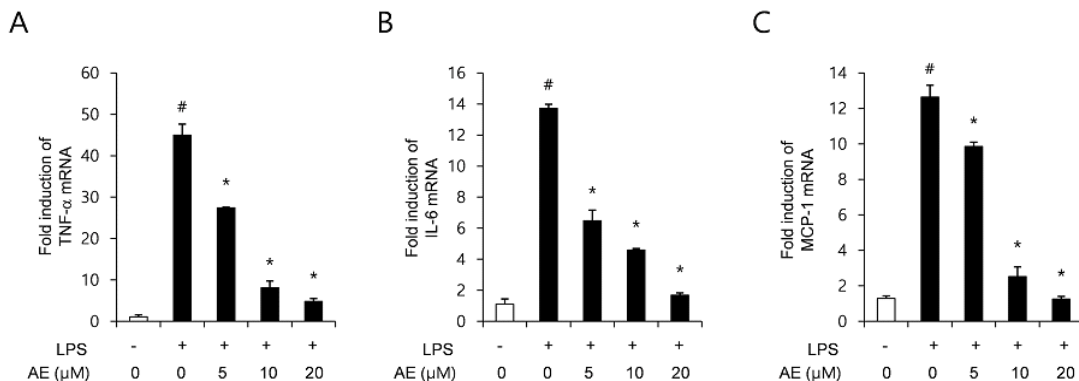


Fig. 2. Effect of AE on LPS-induced TNF- α , IL-6, and MCP-1 mRNA levels in 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cells were pretreated with various concentrations of AE for 1 h. Cells were further stimulated with LPS(100 ng/mL). After 30 min, LPS-induced TNF- α , IL-6, and MCP-1 mRNA levels were determined. Data are expressed as a fold-induction as compared with vehicle(#*P*<0.05 vs. the control; **P*<0.05 vs. the LPS group). Values are expressed as mean \pm S.D.(n=4).

조군에 비해 LPS 처리군의 경우, 모든 사이토카인의 유전자 발현이 유의적으로 증가하였으며(Fig. 2A-C, $P<0.05$), AE를 처리한 모든 군에서 농도의존적으로 사이토카인의 발현이 LPS 처리군에 비해 유의적으로 감소하였다 (Fig. 2A-C, $P<0.05$).

3. TLR4 mRNA 발현 억제 효과

AE의 TLR4에 미치는 영향을 분석하기 위해 TLR4의 유전자 발현을 분석하여 Fig. 3에 나타내었다. TLR4 mRNA는 LPS 자극에 의해 유의적으로 증가하였으며, AE는 LPS 자극에 의한 TLR4 유전자 발현을 농도의존적으로 억제하였다 (Fig. 3, $P<0.05$).

4. NF-κB 활성 억제 효과

사이토카인과 TLR4 발현에는 전사인자인 NF-κB의 활성이 동반된다(Doyle & O'Neill 2006). 이에 지방세포에서 NF-κB 활성도를 측정하였다. 그 결과, LPS 자극에 의해 NF-κB 활성도가 유의적으로 증가함을 알 수 있었고, AE의 10 μM과 20 μM의 처리군에서 유의적으로 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 4, $P<0.05$).

5. ERK 인산화 억제 효과

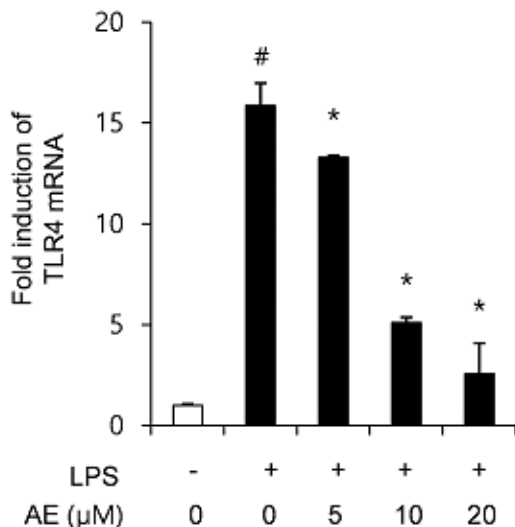


Fig. 3. Effect of AE on LPS-induced mRNA expression of TLR4 in 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cells were pretreated with various concentrations of AE for 1 h. Cells were further stimulated with LPS(100 ng/mL). After 30 min, LPS-induced TLR4 mRNA levels were determined. Data are expressed as a fold-induction as compared with vehicle(# $P<0.05$ vs. the control; * $P<0.05$ vs. the LPS group). Values are expressed as mean±S.D.(n=4).

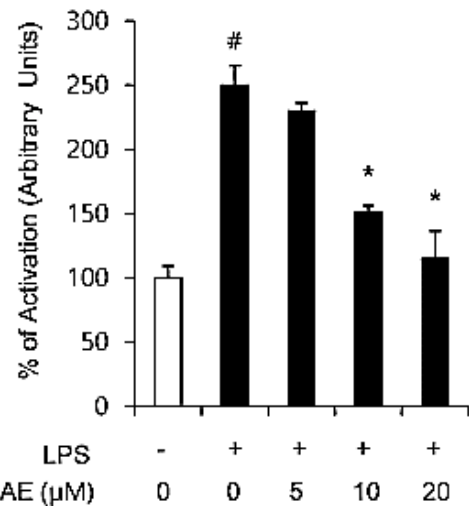


Fig. 4. Effect of AE on LPS-induced activation of NF-κB in 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cells were pretreated with various concentrations of AE for 1 h. Cells were further stimulated with LPS(100 ng/mL). After 30 min, nuclear extracts were analyzed for NF-κB activation. Data are expressed as a % activation as compared with vehicle(# $P<0.05$ vs. the control; * $P<0.05$ vs. the LPS group). Values are expressed as mean±S.D.(n=4).

AE에 의한 NF-κB 억제 효과가 MAP kinase pathway에 의한 것인지를 확인하기 위해 MAP kinase family인 ERK의 인산화 정도를 측정하였다. 그 결과, LPS 자극에 의해 ERK의 인산화가 증가하였으며, AE처리군 10 μM과 20 μM에서 억제됨을 확인하였다(Fig. 5, $P<0.05$). 이는 지방세포에서 AE의 항염증 효과는 MAPK 분자 조절에 의해 야기됨을 의미한다.

고찰

본 연구에서는 지방세포에서 AE의 사이토카인 발현에 미치는 영향과 이의 분자학적 기전을 평가하여 비만에 대한 AE의 잠재적 항염증 역할을 규명하고자 하였다. 이에 지방세포로 분화된 3T3-L1 세포에 LPS를 처리하여 TLR4 관련 염증반응을 유도하고자 하였다. LPS 자극에 의해 지방세포에서 분비되는 대표적인 사이토카인인 TNF-α, IL-6, MCP-1의 mRNA 발현이 유의적으로 증가하여 염증반응이 유도되었음을 확인할 수 있었고, AE 처리군에서 농도의존적으로 이들의 발현이 모두 감소됨을 확인하였다(Fig. 2). 이는 지방세포에서 AE가 항염증 역할을 할 수 있다는 것을 의미한다.

비만 발달 시 지방세포에서는 염증성 사이토카인과 케모카인이 분비되며, 이러한 지방세포에서의 염증 반응은 인슐린 저항성을 야기시킴으로써 대사성 질환과 매우 밀접하게 관련되어 있다(Shoelson 등 2007; Fresno 등 2011). 건강한 성

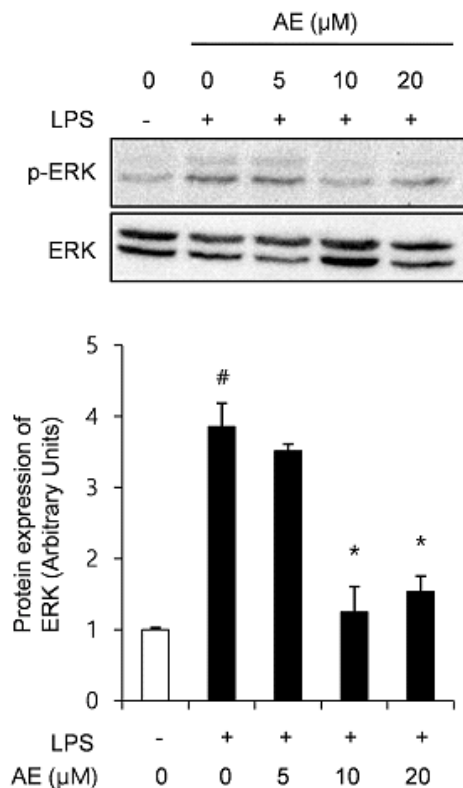


Fig. 5. Effect of AE on LPS-induced expression of phospho-ERK in 3T3-L1 cells. Differentiated 3T3-L1 cells were pretreated with various concentrations of AE for 1 h. Cells were further stimulated with LPS(100 ng/ mL). After 30 min, cell lysates were analyzed for phospho-ERK and ERK immunoblotting. Data are expressed as a fold-induction as compared with vehicle([#] $P < 0.05$ vs. the control; ^{*} $P < 0.05$ vs. the LPS group). Values are expressed as mean \pm S.D.(n=4).

인에게 LPS를 주사한 후 지방조직에서 TNF- α 와 IL-6의 수준이 증가하였다는 임상연구가 발표된 바 있으며(Anderson 등 2007), 내독소(endotoxin) 수준이 상승하면 염증반응과 체중이 증가한다는 동물실험이 보고된 바 있다(Cani 등 2007). 또한 마우스에게 LPS 자극으로 염증반응을 유도시킨 결과 IL-6의 수준이 증가하였으며, 지방조직이 이러한 증가의 주된 원인기관이라는 보고도 있다(Starr 등 2009). 이러한 연구결과들은 LPS로 야기된 염증반응이 비만과 관련된 염증반응에서 주요 인자임을 의미한다. 이에 본 연구에서는 지방세포에서 AE의 사이토카인 mRNA 발현 억제의 기전을 규명하고자 LPS를 처리한 3T3-L1 지방세포에서 TLR4의 mRNA 발현정도를 측정하였다. 그 결과, LPS 자극에 의해 TLR4의 mRNA 발현이 유의적으로 증가함을 확인하였고, AE 처리군의 경우, 농도의존적으로 이의 발현이 감소되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 AE가 TLR4 signaling pathways를 억제할 수 있고, 이러한 억제능

으로 인해 사이토카인 mRNA 발현이 감소되었음을 의미한다. AE의 TLR 발현에 미치는 영향에 관한 연구는 거의 이루어지고 있지 않다. Yin 등(2014)은 LPS로 유도된 전격성 간부전(fulminant hepatic failure, FHF) 동물모델에서 emodin이 TLR4/ MD2 complex를 억제함으로써 염증반응을 호전시켰다고 보고한 바 있다(Yin 등 2014).

다음으로 AE의 TLR4 mRNA 발현 억제능이 NF- κ B signaling에 의존적인지 여부를 확인하고자 NF- κ B의 활성화를 측정하였다. 그 결과, AE의 10 μ M과 20 μ M 처리군에서 NF- κ B 활성도가 유의적으로 감소되었음을 확인할 수 있었고, 이는 AE가 TLR4 signaling pathway에서 NF- κ B 활성을 직접 제어한다는 것을 의미한다.

다음으로 AE의 NF- κ B 활성 억제능이 mitogenactivated protein kinase(MAPK) signaling에 영향을 끼치는지 여부를 확인하고자 하였다. MAPK는 다양한 외부자극을 핵으로 전달하는 중요한 인자이며, 가장 잘 알려진 MAPK signaling pathways로는 ERK, JNK, p38 등이 있다(Johnson & Lapadat 2002). 특히 ERK는 LPS로 유도된 3T3-L1 지방세포의 염증반응에서 JNK나 p38보다 가장 강하게 인산화가 되는 것으로 알려져 있다(Kopp 등 2010). 이에 본 연구에서는 LPS에 의해 유도되는 ERK 인산화를 AE가 억제하는지 여부를 살펴보았다. 그 결과, 10 μ M과 20 μ M의 AE는 ERK의 인산화를 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 따라서 AE는 3T3-L1 지방세포에서 TLR4-의존성 ERK 신호전달 경로를 조절하는 것으로 나타났다. 즉, AE의 항염증 효과는 MAPK 분자 조절에 의해 야기됨을 확인하였다. 지방세포와 지방조직에서 ERK의 인산화는 인슐린 저항성과 관련이 있다. 인슐린 저항성이 있는 비만 환자들의 경우, 내장 지방 조직에서 ERK 인산화와 NF- κ B 활성도가 활발하고, 이는 IL-6 분비를 증가시키며, 염증반응을 지속시킴으로써 인슐린 저항성을 촉진한다(Barbarroja 등 2010). 이러한 결과는 지방세포에 대한 AE의 항염증능이 인슐린 저항성을 완화시킬 수 있음을 의미한다. 본 연구결과, 지방세포에서 AE의 항염증 효과는 TLR4/NF- κ B/MAPK 분자 조절에 의해 야기됨을 확인하였다.

결론

본 연구에서는 지방세포에서 AE의 염증 억제 기전을 밝히기 위해 연구하였다. 연구결과, AE는 LPS로 자극받은 3T3-L1 지방세포에서 TLR4/NF- κ B/MAPK 신호전달경로를 억제하여 사이토카인 발현을 저해하였다. 이러한 연구결과는 AE가 비만 관련 소재 및 다양한 기능성 식품 소재로 활용될 수 있음을 의미하며, 추후 비만 동물 모델에서의 생체내 연구가 고려되어야 한다.

감사의 글

본 연구는 순천향대학교 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

References

- Andersen DO, Weber ND, Wood SG, Hughes BG, Murray BK, North JA. 1991. *In vitro* virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res* 16: 185-196
- Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, Comiskey LL, Tabita-Martinez J, Sellers KF, Rickels MR, Ahima RS, Reilly MP. 2007. Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2272-2279
- Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, De Castri D, Moscheni C, Annoni G. 2000. Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacol Toxicol* 87:229-233
- Barbarroja N, López-Pedraza R, Mayas MD, García-Fuentes E, Garrido-Sánchez L, Macías-González M, El Bekay R, Vidal-Puig A, Tinahones FJ. 2010. The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochem J* 430:141-149
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761-1772
- Chang X, Zhao J, Tian F, Jiang Y, Lu J, Ma J, Zhang X, Jin G, Huang Y, Dong Z, Liu K, Dong Z. 2016. Aloe-emodin suppresses esophageal cancer cell TE1 proliferation by inhibiting AKT and ERK phosphorylation. *Oncol Lett* 12:2232-2238
- Divella R, De Luca R, Abbate I, Naglieri E, Daniele A. 2016. Obesity and cancer: The role of adipose tissue and adipocytokines-induced chronic inflammation. *J Cancer* 7:2346-2359
- Doyle SL, O'Neill LA. 2006. Toll-like receptors: from the discovery of NFκB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 72:1102-1113
- Fresno M, Alvarez R, Cuesta N. 2011. Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Arch Physiol Biochem* 117:151-164
- Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y. 1999. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med* 38:202-206
- Himes RW, Smith CW. 2010. Tlr2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. *FASEB J* 24:731-739
- Hu B, Zhang H, Meng X, Wang F, Wang P. 2014. Aloe-emodin from rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 153:846-853
- Johnson GL, Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912
- Kim SJ, Choi Y, Choi YH, Park T. 2012. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *J Nutr Biochem* 23:113-122
- Kopp A, Buechler C, Bala M, Neumeier M, Schölmerich J, Schäffler A. 2010. Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prodiabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3. *Endocrinology* 151:1097-1108
- Kshirsagar AD, Panchal PV, Harle UN, Nanda RK, Shaikh HM. 2014. Anti-inflammatory and antiarthritic activity of anthraquinone derivatives in rodents. *Int J Inflam* 2014:690596
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25:402-408
- Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, Kopp A, Schoelmerich J, Falk W. 2009. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology* 126:233-245
- Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. 2007. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132:2169-2180
- Starr ME, Evers BM, Saito H. 2009. Age-associated increase in cytokine production during systemic inflammation: adipose tissue as a major source of IL-6. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64:723-730
- Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araújo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. 2007. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1986-1998
- Yin X, Gong X, Jiang R, Kuang G, Wang B, Zhang L, Xu G, Wan J. 2014. Emodin ameliorated lipopolysaccharide-in-

duced fulminant hepatic failure by blockade of TLR4/MD2 complex expression in D-galactosamine-sensitized mice. *Int Immunopharmacol* 23:66-72

Received 10 February, 2017

Revised 31 March, 2017

Accepted 12 April, 2017