诸葛菜碱Ⅰ对H_2O_2所致HepG2细胞氧化损伤的保护作用

刘晨琪[1,2]，朱乃亮[2]，杨淑贤[2]，戴应和[2,3]，李立勇[2]，许旭东[2]，曹丽[2]

（1.哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心，黑龙江哈尔滨 150076）

（2.中国医学科学院药用植物研究所，北京 100193）（3.广西中医药大学药学院，广西南宁 530001）

摘要：本文采用柱色谱技术对诸葛菜种子的提取物进行分离纯化，采用波谱技术结合化学方法进行结构鉴定，首次获得新化合物，命名为诸葛菜碱Ⅰ，并通过建立H_2O_2诱导的细胞损伤模型，对诸葛菜碱Ⅰ保护H_2O_2所致HepG2细胞氧化损伤的作用及其机制进行了研究。于H_2O_2刺激前，加入不同浓度的诸葛菜碱Ⅰ预处理HepG2细胞12 h，然后以400 μmol/L H_2O_2损伤细胞2 h建立模型。MTT法检测细胞存活率，微板法检测细胞培养液中LDH活性和细胞MDA含量及SOD、GSH-PX的活性，Western Blot检测细胞内Nrf 2、HO-1蛋白表达，以评价诸葛菜碱Ⅰ对H_2O_2所致HepG2细胞氧化损伤的保护作用。结果表明，与模型组相比，诸葛菜碱Ⅰ给药组（53.5、107、214 μmol/L）预处理12 h后，增加了细胞存活率（p<0.01），显著降低LDH向细胞外液的释放（p<0.01），显著降低细胞内MDA含量（p<0.05，p<0.01），显著提高细胞内SOD、GSH-PX的活性（p<0.05，p<0.01），增高了Nrf2蛋白水平。因此，诸葛菜碱Ⅰ对H_2O_2所致HepG2细胞氧化损伤具有保护作用。

关键词：诸葛菜；诸葛菜碱Ⅰ；抗氧化；HepG2

文章篇号：1673-9078(2017)6-19-25 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.004

Protective Effect of Orychophragmuspine I Against Oxidative Damage in HepG2 Cells Induced by Hydrogen Peroxide

LIU Chen-qi[1,2], ZHU Nai-liang[2], YANG Shu-xian[2], DAI Ying-he[2,3], LI Li-yong[2], XU Xu-dong[2], CAO Li[2]

(1.Research Center of Life Science and Environment Science, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China) (2.Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China) (3.College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, 530001, China)

Abstract: *Orychophragmus violaceus* seed extract was isolated and purified by silica gel chromatography, and the structures were identified by spectral analysis and chemical methods. A new compound was identified for the first time and named as Orychophragmuspine I. The protective effect and mechanism of Orychophragmuspine I on hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced oxidative damage in HepG2 cells was investigated by establishing a model of H_2O_2-induced cell damage. Before hydrogen peroxide stimulation, HepG2 cells were pretreated with different concentrations of Orychophragmuspine I for 12 h, and then cells were treated with 400 μmol/L H_2O_2 for two hours. The survival rate of cells was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in the medium, cellular malondialdehyde (MDA) content, and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX) were measured using a microplate method, and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) protein expression was measured by western blot. The results showed that, compared with the model group, 12 h of Orychophragmuspine I treatment (53.5, 107, and 214 μmol/L) increased the cell survival rate (p<0.01), significantly reduced the release of LDH to the extracellular fluid (p<0.01), decreased MDA content in cells (p<0.05, p<0.01), and increased the intracellular activities of SOD and GSH-PX (p<0.05, p<0.01) and the level of Nrf2 protein. Therefore, Orychophragmuspine I has a protective effect against H_2O_2-induced oxidative damage in HepG2 cells.

Key words: *Orychophragmus violaceus*; Orychophragmuspine I; antioxidant; HepG2 cells

收稿日期：2017-02-15

基金项目：北京市自然科学基金项目（7164281）

作者简介：刘晨琪，女，在读研究生，研究方向：中药有效成分研究

通讯作者：曹丽，女，博士，研究员，研究方向：天然药物抗肿瘤药理学

诸葛菜(*Orychragmus violaceus*)系诸葛菜属、十字花科的一年生草本植物，又名二月兰，是中国北方常见的一种早春野菜[1]。其嫩茎叶生成量大，营养丰富，诸葛菜的茎叶水解提取物中含有多种黄酮类化合物以

及多种人体所需的蛋白质、氨基酸、维生素和矿物质等[2]。诸葛菜营养价值高，并有一定的药用价值，因此其具有较高开发前景及广阔的应用价值。

肝损伤通常是由病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、酒精滥用和药物中毒所引起的[3]，因为肝脏几乎涉及所有重要的生物过程，故肝损伤的发生可能会使机体代谢、解毒、免疫应答和抗微生物防御功能发生严重的紊乱。目前肝损伤的机制尚未能揭示，但一些新的研究结果表明多种机制参与了肝损伤的过程，如氧化应激、炎症、酒精代谢、多种细胞因子与免疫系统之间的相互作用等[4~6]。其中氧化应激是多种肝损伤的重要机制。

研究发现[7]，诸葛菜种子水提物可缓解白鲜皮所致急性肝毒性作用，提示其具有较好的肝保护作用。因此，本研究从诸葛菜种子中进一步提取分离出新化合物诸葛菜碱Ⅰ，选用 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化应激损伤模型，研究诸葛菜碱Ⅰ的抗氧化作用及其保护机制，为深入研究其在多种肝病治疗上的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物

诸葛菜种子于 2015 年 8 月采于北京市，由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所丁万隆研究员对植物进行鉴定，标本保存于本所标本室(NO.150811)。

1.2 细胞株

人肝癌细胞 HepG2，购于中国科学院上海细胞库。

1.3 主要试剂

DMEM 培养基、青霉素链霉素混合液、胰蛋白酶购自 Gibco 公司，胎牛血清购自四季青公司；3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)，Sigma 公司产品；二甲基亚砜(DMSO)，Amresco 公司产品；乳酸脱氢酶(Lacate dehydrogenase，LDH)、丙二醛（Malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase，GSH-PX）试剂盒均购自于南京建成生物工程有限公司；Sephadex LH-20（Pharmacia，Uppsala，Sweden），MCI 凝胶（CHP 20P，75~150 μm，Mitsubishi Chemical Corporation，Tokyo，Japan），C-18 反相硅胶（40~63 μm，Merck，Darmstadt，德国）和硅胶（100~200 和 300~400 目，青岛海洋化工厂，青岛，中华人民共和国），预涂硅胶 GF254 板（硅胶凝胶开发的 Zhi Fu Huang Wu Pilot Plant，烟台，中国）。实验用其他试剂均为分析纯。

1.4 主要仪器

Perkin-Elmer 341 数字旋光计；Shimadzu UV2550 光谱仪；FT-IR-8400S 光谱仪；Bruker AV Ⅲ 600NMR 光谱仪；LTQ-Obitrap XL 光谱仪；BCN-1360 型生物洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)；5410 型二氧化碳培养箱(NAPCO，美国)；MQX200 型酶标仪(Bio-Tek，美国)；CKX41 倒置荧光显微镜(Olympus，日本)；Labofuge 400R 离心机(Heraeush，德国)

1.5 实验方法

1.5.1 药物分离提取

将风干粉碎的诸葛菜种子（20.0 kg）用水回流提取三次（3×40 L，2h/次），将水提取物浓缩至小体积（3 L），添加于 D-101 大孔吸附树脂（20 kg，20 cm×200 cm）上，并用 H_2O（60 L）和 10% EtOH（80 L）洗脱。10% EtOH 部分减压浓缩，将残余物（400 g）上硅胶（100~200 目，15×60 cm）进行柱层析（CC），并用 CH_2Cl_2/CH_3OH（10:1~1:1，5 L）梯度洗脱，获得 8 个部分（Fr.A~Fr.H）。其中 Fr. F(30 g)经 ODS MPLC 色谱分析及 MeOH-H_2O (10:90；30:70；50:50)洗脱，得到 3 个部分(Fr. F1-3)。其中 Fr. F1 (5.7 g)通过 Sephadex LH-20 column (5×80 cm)分离，MeOH 洗脱，制备型 HPLC 纯化，得到化合物 1（11.8 mg）。

使用 Perkin-Elmer 341 数字旋光计获得旋光数据。用 Shimadzu UV 2550 光谱仪记录 UV 数据。使用 FTIR-8400S 光谱仪记录 IR 数据。使用 Bruker AV Ⅲ 600NMR 光谱仪（化学位移值表示为 TMS 值作为内标的 δ 值）获得 NMR 光谱。使用 LTQ-Obitrap XL 光谱仪进行质谱分析。预涂硅胶 GF254 板进行薄层色谱分析。

化合物 1 以二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide，DMSO）溶解至 100 mg/mL，再以 DMEM 培养基配制成所需浓度。

1.5.2 HepG2 细胞培养

HepG2 细胞接种于 DMEM 培养基(添加 10%的胎牛血清和 1%的青、链霉素混合液)中，并置于 37 ℃、5 % CO_2 条件下培养，细胞长至培养瓶 80%时传代，取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.5.3 建立 HepG2 细胞氧化损伤模型

取对数生长期的细胞，用完全培养基调整细胞密

度至 8×10^4 个/mL，以每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板中，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后，设空白组：加入空白 DMEM 培养基；不同浓度 H_2O_2 模型组：分别加入终浓度为 50、100、200、400、800、4000 μmol/L 的 H_2O_2。H_2O_2 作用 HepG2 细胞 2 h 后，弃上清，加入 MTT 溶液，继续孵育 4 h 后，弃上清，每孔再加入 DMSO 200 μL，混匀后，用酶标仪检测 570 nm 波长处吸光度 A，并依据下式计算细胞存活率。每组设置 5 个复孔。

$$细胞存活率(\%)=\frac{A_1-A_0}{A_2-A_0}\times100\%$$

式中，A_0 为空白组的 OD 值；A_1 为样品组的 OD 值；A_2 为阴性对照组的 OD 值。

1.5.4 实验分组及药物处理

实验分为：正常对照组；损伤模型组；诸葛菜碱Ⅰ实验组。其中诸葛菜碱Ⅰ作用浓度为 53.5、107、214、428、856 μmol/L。将处于对数生长期、状态良好的细胞接种于培养板中孵育 24 h；待细胞生长稳定后，实验组加入含有不同浓度诸葛菜碱Ⅰ、不含血清的 DMEM 培养基溶液，对照组及模型组均加入不含血清的 DMEM 培养基溶液，孵育 12 h；弃去培养液，模型组及实验组加入不含血清、含有 400 μmol/L H_2O_2 的 DMEM 培养液，对照组加入不含血清的 DMEM 基础培养液，孵育 2 h；弃上清液，取细胞进行相应指标检测。

1.5.5 MTT 法检测细胞活力

取对数生长期的细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中，在 5% CO_2、37 ℃条件培养 24 h 后，进行给药及 H_2O_2 处理。处理结束后，每孔加入 150 μL 含 5 mg/mL MTT 的 DMEM 溶液，37 ℃孵育 4 h 后小心移除培养液，每孔加入 150 μL DMSO，微孔板振荡器震荡 5 min，使甲臜结晶充分溶解后，微孔板扫描酶标仪测定 570 nm 处吸光度值（OD 值）。

细胞存活率%=加药细胞 OD 值/对照细胞 OD 值 ×100%。

1.5.6 细胞上清液 LDH 含量及抗氧化生化指标测定

细胞经预给药及 H_2O_2 处理后，收集各组上清以测 LDH 活力；消化收集各组细胞，每组加 1 mL PBS，采取反复冻融的方法(-80 ℃冰箱 15 min，室温 20 min，如此重复 3 次)，3000 r/min 离心 10 min，吸取上清，参考南京建成试剂盒操作步骤进行 LDH、MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力的测定。

1.5.7 Western blot 检测抗氧化相关蛋白的表达

细胞经预给药及 H_2O_2 处理后，收集各组细胞，加入裂解液，冰浴裂解 30 min，12000 r/min 离心 5 min，取上清，即细胞蛋白。用 BCA 法测定蛋白的浓度，并根据蛋白标准品的浓度标准曲线，计算出各组样品的蛋白浓度。制备凝胶，加样，电泳（80 V，1~2 h），电泳结束后电转 55 min，将 PVDF 膜用 5%的脱脂奶粉于室温封闭 2 h，封闭一抗 4 ℃过夜后，TBST 洗膜后，封闭二抗，室温下孵育 2 h，TBST 洗膜后，显色液进行显色后使用凝胶成像仪(BIO-RAD)进行成像。使用 photoshop 图像处理软件对蛋白条带的灰度值进行分析，将 *β*-actin 作为内参，用目的条带与 *β*-actin 条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

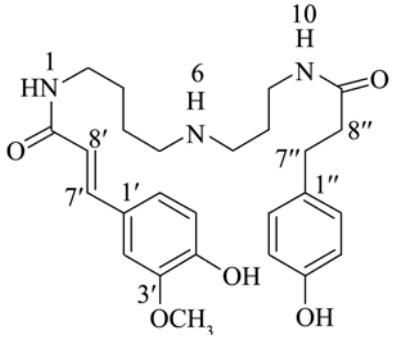
1.5.8 统计结果处理

实际数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件 SPSS 17.0 进行单因素方差分析、*t* 检验等处理，$p<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 结构鉴定

化合物 1 为无定形白色粉末。UV(MeOH) λ_{max}(log ε)：284.8(3.18)，217.0(3.14)；IR(film) νmax：3347，3250(OH，NH)，1653(a,b-unsaturated amide)，1558，1541，1506(aromatic ring)；ESIMS：*m/z* 470 [M+1]+，*m/z* 492[M+Na]+，HRESIMS：*m/z* 470.2645[M+1]+(calcd. for 470.2655)；分子式为 $C_{26}H_{35}N_3O_5$。1H，13C-NMR，见表 1。再根据 HSQC 和 HMBC 鉴定结构如下：



该结构与文献[8]报道的结构 3’-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-N,N’-(4-azaoctane-1,8-diyl)bis[prop-2-enamide]非常类似，只是 7”,8”位的双键变成单键，故该化合物为新化合物，命名为 Orychophragmuspine Ⅰ(诸葛菜碱Ⅰ)。

表 1 化合物 1 的核磁共振数据（600 MHz，DMSO）

Table 1 NMR data (600 MHz, in DMSO) for compound 1

Position	Compounds 1	
	δ_C，type	δ_H(J in Hz)
1		8.40，brs
2	38.0，CH_2	3.17，m
3	24.7，CH_2	1.58，m
4	26.4，CH_2	1.48，m
5	47.3，CH_2	2.68，m
6		8.01，brs
7	45.3，CH_2	2.67，m
8	27.4，CH_2	1.66，m
9	36.0，CH_2	3.08，m
10		8.10，brs
1’	126.4，C	
2’	111.3，CH	7.11，d (1.2)
3’	147.7，C	
4’	148.2，C	
5’	115.6，CH	6.80，d (7.8)
6’	121.1，CH	6.98，dd (7.8，1.2)
7’	138.5，CH	7.31，d (15.6)
8’	119.1，CH	6.45，d (15.6)
9’	165.1，C	
1”	131.0，C	
2”	128.5，CH	6.96，d (8.4)
3”	114.8，CH	6.66，d (8.4)
4”	155.1，C	
5”	114.8，CH	6.66，d (8.4)
6”	128.5，CH	6.96，d (8.4)
7”	29.9，CH_2	2.78，m
8”	37.0，CH_2	2.31，m
9”	171.4，C	
-OCH_3	55.6，CH_3	3.81，s

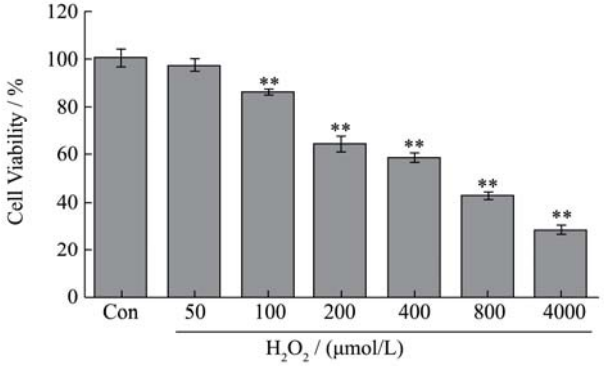


图 1 不同浓度 H_2O_2 对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2) on the survival rate of HepG2 cells

2.2 不同浓度 H_2O_2 对 HepG2 细胞存活率的影响

高浓度的 H_2O_2 可引起 HepG2 细胞氧化应激损伤并降低 HepG2 细胞的存活率。如图 1，实验结果显示，400 μmol/L H_2O_2 能使细胞的存活率降低 50%~60% (p<0.01)，实验结果重复性好，因此选择 400 μmol/L H_2O_2 来建立氧化应激损伤模型。

2.3 诸葛菜碱Ⅰ对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞存活率的影响

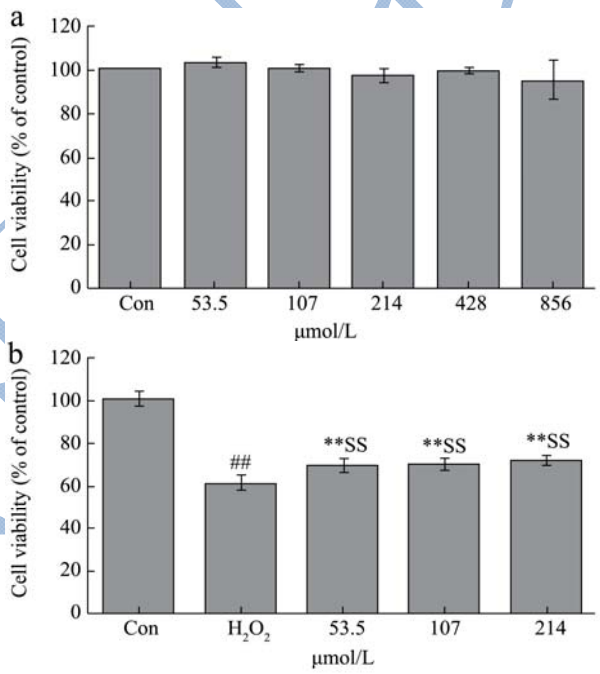


图 2 诸葛菜碱Ⅰ对细胞存活率的影响和其对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of Orychophragmuspine I on HepG2 cell viability and the protective effect of Orychophragmuspine I on HepG2 cells treated with hydrogen peroxide (H_2O_2)

注: ##p<0.01 vs control group, *p<0.05, **p<0.01 vs H_2O_2 group, ^{SS}p<0.01 vs H_2O_2 group。

如图 2a 所示，53.5~856 μmol/L 诸葛菜碱Ⅰ对 HepG2 细胞未见明显的细胞毒性作用（无统计学差异）。

如图 2b，模型组细胞存活率为 60.86%，与正常组相比具有显著性差异（p<0.01），即 400 μmol/L H_2O_2 作用 2 h 可显著降低 HepG2 细胞活力。

与模型组相比，诸葛菜碱Ⅰ预孵育 12 h 可不同程度降低 H_2O_2 引起的细胞损伤，其细胞存活率均有所提高，但仍低于对照组细胞，其中 53.5、107、214

μmol/L 诸葛菜碱Ⅰ的细胞存活率具有显著性差异（p<0.01），即 53.5、107、214 μmol/L 诸葛菜碱Ⅰ对 H_2O_2 引起的细胞损伤具有显著的保护作用。实验结果显示：在本实验检测的浓度范围内，诸葛菜碱Ⅰ抗 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞损伤的活性较显著。

2.4 诸葛菜碱Ⅰ对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞 LDH 漏出量及 MDA 含量的影响

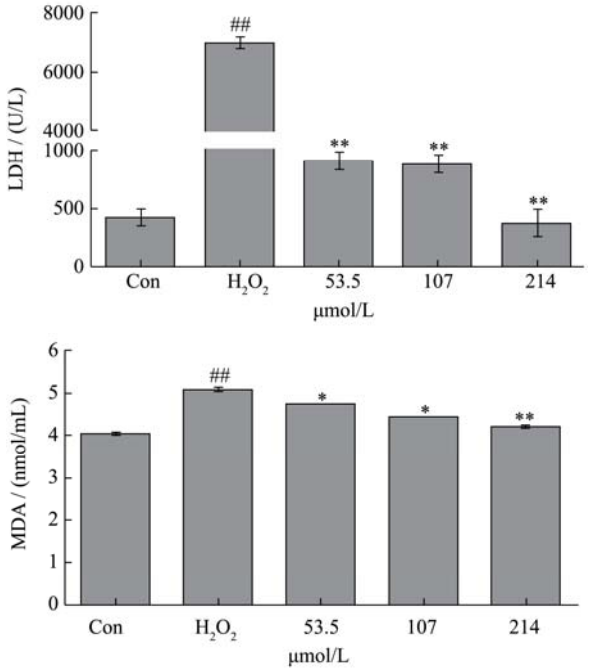


图 3 诸葛菜碱Ⅰ对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞 LDH 漏出量及 MDA 含量的影响

Fig.3 Effects of Orychophragmuspine I on LDH leakage and MDA content in HepG2 cells treated with hydrogen peroxide (H_2O_2)

注: ##p<0.01 *vs* control group, *p<0.05, **p<0.01 *vs* H_2O_2 group。

LDH 在细胞膜损伤时由细胞漏出，可作为细胞损伤的标志。如图 3，H_2O_2 处理 HepG2 细胞引起 LDH 释放显著增加（p<0.01），用 53.5、107、214 μmol/L 诸葛菜碱Ⅰ预处理可显著减轻 HepG2 细胞损伤（p<0.01），说明诸葛菜碱Ⅰ抑制 LDH 的漏出。MDA 作为细胞膜脂质过氧化的降解产物，是氧化性损伤的重要标志。与空白对照组相比，H_2O_2 处理 HepG2 细胞导致细胞内 MDA 水平显著升高（p<0.01），而诸葛菜碱Ⅰ预处理可抑制 MDA 水平的增高（p<0.05，p<0.01）。

2.5 诸葛菜碱Ⅰ对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞内源性抗氧化酶活性的影响

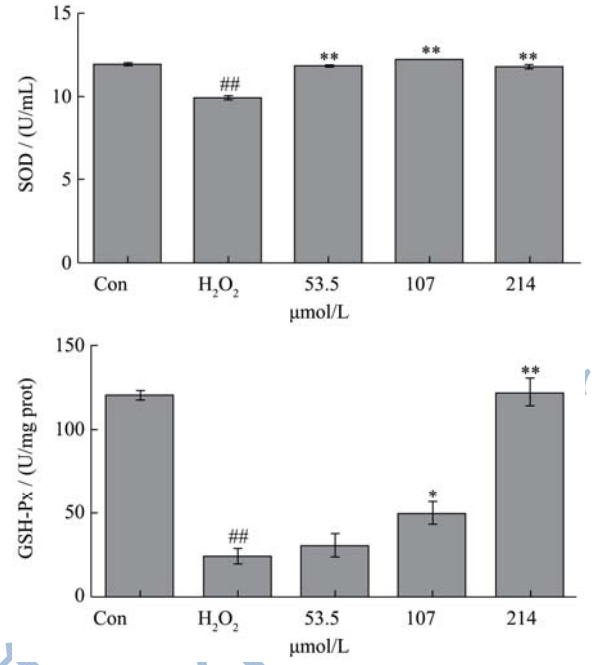


图 4 诸葛菜碱Ⅰ对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞 SOD、GSH-Px 活性的影响

Fig.4 Effects of Orychophragmuspine I on SOD and GSH-Px activities in hydrogen peroxide (H_2O_2)-treated HepG2 cells

注: ##p<0.01 *vs* control group, *p<0.05, **p<0.01 *vs* H_2O_2 group。

SOD 是生物体内广泛存在的一种重要的抗氧化物酶，能清除超氧阴离子自由基，使机体免受氧自由基的损害[9]。GSH-PX 是生物体内一种重要的催化过氧化氢分解的酶，其能特异性催化 GSH 对 H_2O_2 的还原反应，从而保护细胞结构与功能的完整性。SOD、GSH-Px 均具有抗氧化性损伤功能。实验结果（如图 4）显示，与空白对照组相比，以上 2 种抗氧化酶的活性在 H_2O_2 处理后显著下降（p<0.01），诸葛菜碱Ⅰ（53.5、107、214 μmol/L）预处理均可增强内源性抗氧化酶 SOD、GSH-Px 的活性（p<0.05，p<0.01），证实了诸葛菜碱Ⅰ对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞损伤具有保护作用及其抗氧化活性。

2.6 诸葛菜碱Ⅰ对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞内抗氧化蛋白表达的影响

在细胞正常情况下，Nrf2 通过结合其负调节剂 Keap1 保留在细胞质中。细胞处于氧化应激环境时，Nrf2 解离并转移到细胞核中[10]，激活抗氧化基因和酶，如谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）、谷胱甘肽-S-转移酶（GST）、血红素加氧酶（HO）、谷氨酸半胱氨酸连

接酶（GCLc）和超氧化物歧化酶（SOD）[11,12]，随后与抗氧化元件（ARE）结合，Nrf2 的过度表达有助于细胞抵抗由 H_2O_2、NO 和 CCl_4 等引起氧化应激反应，起到保护作用[13]。我们的研究结果显示，诸葛菜碱Ⅰ增强 Nrf2 的表达，且 HO-1 和 GCL 的表达均升高，表明诸葛菜碱Ⅰ介导的肝细胞保护作用涉及 Nrf2-ARE 途径。（图 5）。

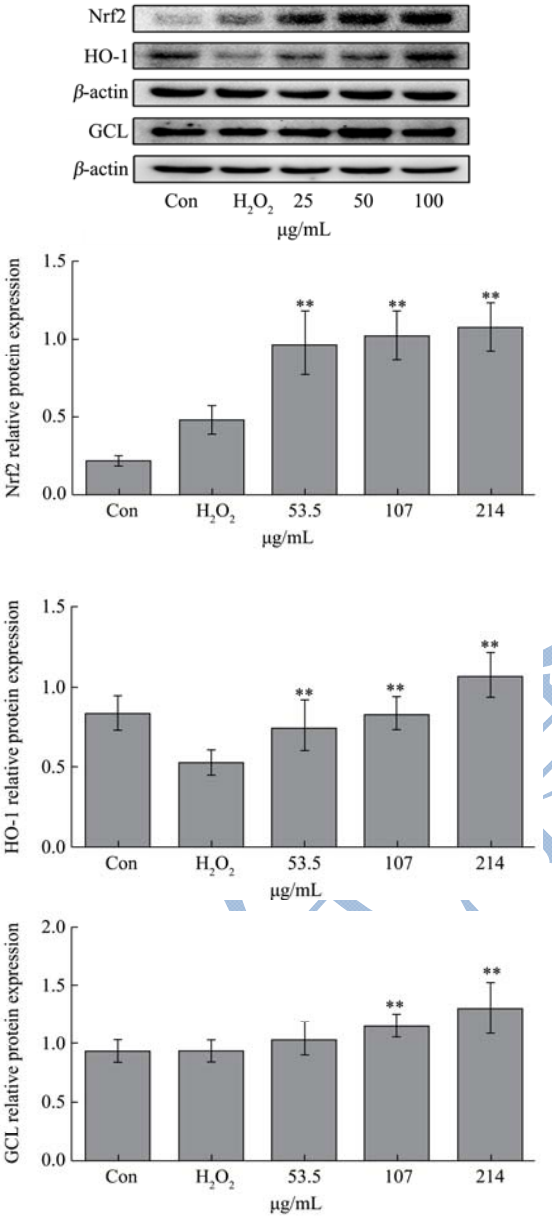


图 5 诸葛菜碱Ⅰ对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞内抗氧化蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of Orychophragmuspine I on the expression of antioxidant proteins in HepG2 cells treated with hydrogen peroxide (H_2O_2)

注: *p<0.05, **p<0.01 *vs* H_2O_2 group。

3 结论

3.1 机体的氧化应激及氧化损伤是导致组织损伤、动脉粥样硬化、炎症、衰老、糖尿病和癌症等疾病发生发展的重要因素[14]。过氧化氢（H_2O_2）是一种重要的活性氧，也是体内重要中间代谢产物。过氧化氢进入细胞后易形成高活性的自由基，通过作用生物大分子物质，引起脂质过氧化等反应，破坏细胞结构，其过程易于获得且性质相对稳定的特点，使其成为研究细胞氧化损伤的重要工具[15]。HepG2 细胞所含的生物转化代谢酶与人正常肝实质细胞具有同源性，还具有生成繁殖快优点，因此被广泛应用于体外实验筛选[16]。

3.2 本研究从诸葛菜种子水提物中首次提取分离出新化合物诸葛菜碱Ⅰ，揭示了诸葛菜碱Ⅰ对 H_2O_2 所致 HepG2 细胞氧化应激损伤具有保护作用，其机制可能是通过激活 Nrf2-ARE 抗氧化信号通路，从而发挥其抗氧化功能，减少 H_2O_2 引起的细胞损伤。因此，诸葛菜碱Ⅰ有望成为一种新型天然抗氧化应激药物，其机制与提高肝细胞的抗氧化能力相关，但仍需更深入的研究。

参考文献

[1] 张婷婷,马国需,许福泉,等.诸葛菜水溶性化学成分的研究[J].中国药学杂志,2014,49(24):2165-2167
ZHANG Ting-ting, MA Guo-xu, XU Fu-quan, et al. Water-soluble constituents from of seeds *Orychophragmus violaceus* [J]. Chin. Pharm. J., 2014, 49(24): 2165-2167

[2] 马密霞,梅燕.诸葛菜的研究现状与开发应用前景[J].安徽农业科学,2012,40(9):5109-5111,5113
MA Mi-xia, MEI Yan. Research status and development prospect of *Orychophragmus violaceus* [J]. J. Anhui Agri. Sci., 2012, 40(9): 5109-5111, 5113

[3] Zhou Y X, Qiu Y Q, Xu L Q, et al. Xiao-Chai-Hu Tang in treating model mice with D-galactosamine-induced liver injury [J]. Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med., 2012, 9(3): 405

[4] Arteel G E. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease [J]. Gastroenterology, 2003, 124(3): 778-790

[5] Dey A, Cederbaum A I. Alcohol and oxidative liver injury [J]. Hepatology, 2006, 43(2 Suppl 1): S63-74

[6] Miller A M, Wang H, Park O, et al. Anti-inflammatory and anti-apoptotic roles of endothelial cell STAT3 in alcoholic liver injury [J]. Alcohol Clin. Exp. Res., 2010, 34(4): 719-725

[7] 战奕巍,徐子茜,郭新慧,等.二月兰籽水煎剂对白鲜皮所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2016,2(30):101-106
ZHAN Yi-wei, XU Zi-qian, GUO Xin-hui, et al. Protective

effect of *Orychophragmus violaceus* seed against acute liver injury induced by *Cortex dictamni* in mice [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2016, 2(30): 101-106

[8] Youhnovski N, Bigler L, Werner C, et al. On-Line coupling of high-performance liquid chromatography to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (HPLC/APCI-MS and MS/MS). The pollen analysis of *Hippeastrum* x hortorum (*Amaryllidaceae*) [J]. Helvetica Chimica Acta, 1998, 81(9): 1654-1671

[9] 高丽苗,俞斌,徐响,等.油菜蜂花粉活性成分对体外肝细胞损伤的保护作用[J].现代食品科技,2016,9:8-12
GAO Li-miao, YU Bin, XU Xiang, et al. Hepatoprotective effects of bioactive compounds from rape bee pollen on L-02 cells injured by CCl_4 [J]. Modern Food Science & Technology, 2016, 9: 8-12

[10] Shen J. Nrf2 signaling and cell survival [J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2010, 244(1): 37-42

[11] Patterson A D, Carlson B A, Li F, et al. Disruption of thioredoxin reductase 1 protects mice from acute acetaminophen-induced hepatotoxicity through enhanced NRF2 activity [J]. Chem. Res. Toxicol., 2013, 26(7): 1088

[12] Kansanen E, Kivelä A M, Levonen A L. Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2 [J]. Free Radical Bio. Med., 2009, 47(9): 1310-1317

[13] Dhakshinamoorthy S, Porter A G. Nitric oxide-induced transcriptional upregulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant response element counteracts apoptosis of neuroblastoma cells [J]. Biol. Chem., 2004, 279(19): 20096-20107

[14] 吴其夏,余应年,卢建.病理生理学[M].北京:中国协和医科大学出版社,2003
WU Qi-xia, YU Ying-nian, LU Jian. Pathologic physiology [M]. Beijing: Pecking Union Medical College Press, 2003

[15] 韩飞,周孟良.过氧化氢诱导 HepG2 细胞产生氧化应激细胞模型的建立[J].食品科学,2011,32(5):55-57
HAN Fei, ZHOU Meng-liang. An experimental HepG2 cell model of hydrogen peroxide induced DNA oxidative injury [J]. Food Science, 2011, 32(5): 55-57

[16] 金明,王玉娇,金梅花,等.两种细胞建立肝细胞氧化损伤模型比较[J].中国公共卫生,2015,31(3):324-326
JIN Ming, WANG Yu-jiao, JIN Mei-hua, et al. Comparative study on utilization of two cell lines in liver cell oxidative damage model [J]. China J. Public Health, 2015, 31(3): 324-326

现代食品科技