

木犀草素肝保护作用的研究

郑瑞¹, 扶雄¹, 赵振刚¹, 刘瑞海²

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)(2. 康奈尔大学食品科学系, 纽约伊萨卡 14853-7201)

摘要: 本研究木犀草素的肝保护作用。以人肝癌细胞 HepG2 为模型, 以 H₂O₂ 为氧化损伤来源, 分为 5 个实验组包括空白组、损伤组、低浓度木犀草素保护组 (0.5 μM+300 μM H₂O₂)、中浓度木犀草素保护组 (5 μM+300 μM H₂O₂) 和高浓度木犀草素保护组 (10 μM+300 μM H₂O₂) 测定细胞活力、活性氧 (ROS) 增长率、LDH、SOD 和 CAT 酶活, 测定细胞周期及细胞凋亡。经过 10 μM 木犀草素保护, 细胞活力提高到 84% 左右, ROS 的增长率与空白组无显著性差异 ($p>0.05$), LDH、SOD 和 CAT 酶活力显著低于损伤组 ($p<0.05$); 流式细胞仪观察到随着木犀草素浓度增加, 细胞的凋亡率减少并呈量效关系, 而加药组的细胞周期与损伤组并无显著性差异 ($p>0.05$)。木犀草素具有很好的肝保护能力, 在食品、保健品和化妆品行业中具有潜在的应用价值。

关键词: 木犀草素; 酚类物质; 肝保护

文章编号: 1673-9078(2017)11-16-22

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.003

Hepatocyte-protective Effect of Luteolin

ZHENG Rui¹, FU Xiong¹, ZHAO Zhen-gang¹, LIU Rui-hai²

(1.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, NY 14850-7201, USA)

Abstract: The hepatocyte-protective effect of luteolin was investigated in this study. Human cancer cells HepG2 were used as the liver model and H₂O₂ was taken as the source of oxidative damage. The experiment was divided into five groups as follows: blank group, damaged group, the protective group with low concentration of luteolin (0.5 μM+300 μM H₂O₂), the protective group with medium concentration of luteolin (5 μM+300 μM H₂O₂) and the protective group with high concentration of luteolin (10 μM+300 μM H₂O₂). Cell viability, reactive oxygen species (ROS) growth rate, cell cycle and apoptosis, as well as lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were measured. With the protection of luteolin, the cell viability of 10 μM luteolin-protective group reached 84%, and the enzyme activities of LDH, SOD and CAT were significantly lower than those of the damaged group ($p<0.05$). The increase rate of ROS had no significant differences with the blank group ($p>0.05$). The results of flow cytometer showed that apoptotic rate decreased in dose-dependent with the increase concentration of luteolin, but there was no significant difference on the cell cycle between the damaged group and the luteolin-protective group ($p>0.05$). Our study demonstrated that luteolin had a good hepatocyte-protective effect and had the potential for application in food, nutraceuticals and cosmetics industry.

Key words: luteolin; phenolics; hepatocyte-protective

多年来, 慢性病例如糖尿病和癌症已成为危害人类健康和生命质量的两大杀手。在这些慢性疾病发生发展过程中, 拥有一个共同的关键因子-活性氧 (ROS)。在正常情况下, 由于体内存在超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶^[1]以及从食物中摄取天然抗氧化剂, 使得体内的自由基的产生与消除处在一个动态平衡的状态。然而由于生活和饮食

收稿日期: 2017-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31301506); 广东省水利厅科技创新项目 (2016-24); 华南理工大学“探索性实验”教学项目

作者简介: 郑瑞 (1990-), 男, 硕士, 研究方向: 食品营养与健康

通讯作者: 赵振刚 (1979-), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 制糖工程, 功能碳水化合物, 碳水化合物分子修饰的研究

习惯的不合理, 或者由于体内生理环境的突然改变会导致体内自由基产生过多或者清除过慢, 自由基就会与生物体内的大分子物质, 如脂肪、蛋白质和核酸反应, 导致 DNA 突变、细胞凋亡或死亡, 造成衰老和多种疾病^[2]。

植物化学成分是指在水果、蔬菜以及有药用价值的天然植物中存在的非营养类的化合物。越来越多的证据显示, 植物化学成分对人类健康的益处大大超过现在我们所了解到的程度, 原因在于人体内的 ROS 在很多慢性疾病的发病进程中起着关键的作用^[3], 而摄入人体内植物化学成分可以有效地和体内过多 ROS 的反应, 从而减弱对机体的氧化损伤。多酚是一类由一个或多个芳香环组成的物质, 且含有一个或多个

个羟基。多酚因其具有多种生物活性而受到了科研工作者极大的关注, 并对其进行了广泛的研究和应用^[4-6]。多酚类物质通常分为酚酸、黄酮、芪类、香豆素类和单宁类。木犀草素(luteolin)是一种黄酮类的多酚化合物, 其分子结构式如图1所示。木犀草素因从草本植物木犀草的叶、茎和枝中分离出而得名, 它具有多种药理生理功能, 如抗炎、抗肿瘤、抗病毒和增强免疫功能等多种生物活性^[7], 且其毒副作用低, 具有很大的临床应用潜力。木犀草素具有 ABTS 自由基清除能力^[8], 氧自由基吸收能力(ORAC), 同时实验也证明了木犀草素具有细胞抗氧化能力(CAA)^[9]。木犀草素可以保护生物组织氧化损伤, 抑制正常细胞凋亡。乔慧敏^[7]报道了木犀草素可以调节 Bcl-2 与 Bax 通路从而减轻小鼠缺血脑组织的过度凋亡过程, 实现缺血后的神经保护作用。而当前文献对木犀草素的肝保护作用却鲜有报道。因此, 本文在此基础上, 对木犀草素的肝保护效果进行研究, 以期有助于全面地了解木犀草素的生理功能, 为木犀草素在各个领域的应用提供理论基础。

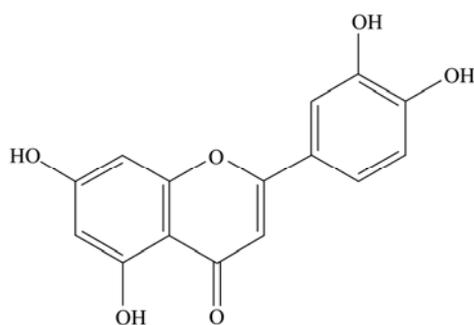


图1 木犀草素分子结构式

Fig.1 The molecular structure of luteolin

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

1.1.1 试剂

木犀草素标准品, 30%过氧化氢溶液, 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)均购自 Sigma-Aldrich 公司; 二甲基亚砜(DMSO)购自 Fisher 公司; HepG2 细胞购自 ATCC 公司; 磷酸盐(PBS), Williams' Medium E (WME)培养基, Hank's 平衡盐溶液(HBSS), 表皮生长因子、胰岛素、肝素、三抗和其他细胞培养试剂均购自 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS)购自浙江天杭生物科技有限公司; LDH 和 SOD 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 CAT 试剂盒均购自碧云天生物技术研究所; 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

Filter Max F5 型多功能荧光/化学分析仪, Molecular Devices 公司; Centrifuge5424R 台式高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; CKX41 倒置显微镜, OLYMPUS 公司; 二氧化碳培养箱, Thermo Scientific 公司; MOFLO XDP 流式细胞仪, Beckman Coulter 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 药物配制

将木犀草素准确称量, 用 DMSO 溶解制备成储备液; 用培养基稀释储备液, 制成所需浓度的木犀草素工作液(DMSO 终浓度为 0.5% V/V)。

1.2.2 细胞培养

HepG2 人肝癌细胞(代数 12~30 代)培养在完全培养基(CM)中, 完全培养基是在 WME 培养基的基础上添加所需的必要成分配制而成(含有 5% FBS, 5 μg/mL 胰岛素, 2 mM 谷氨酸盐, 10 mM HEPES, 0.05 μg/mL 氢化可的松, 1% 的三抗)。细胞培养在 CO₂ 细胞培养箱中, 条件为 37 °C 恒温, 5% CO₂ 浓度。

1.2.3 木犀草素细胞毒性测定

采用 Chen^[10]等人报道的方法。将 HepG2 细胞以 1.5×10^4 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中, 每孔均 100 μL。在培养箱中培养细胞 24 h 后, 加入含有不同浓度的木犀草素的培养基, 每孔均 100 μL。同时在 96 孔板中设置不加药细胞孔作为对照组。放入培养箱中培养 24 h 后, 取出 96 孔板, 用亚甲基蓝法测定药物作用。取出培养板吸出培养基, 加入 100 μL 的 PBS 洗涤后吸出 PBS, 然后在含有细胞的孔中每孔加入 50 μL 的亚甲基蓝溶液, 在培养箱中培养 1 h, 然后用清水漂洗去除细胞上的亚甲基蓝浮色, 在吸水纸上拍打吸干板上的水分, 然后在含有细胞的孔中每孔加入 100 μL 的洗脱溶液。在振荡器上震荡 20 min 后利用酶标仪在 570 nm 下进行读数, 计算木犀草素对肝细胞的毒性。

1.2.4 实验分组

将 HepG2 细胞以 1.5×10^4 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中, 每孔均 100 μL。在培养箱中培养细胞 24 h 后, 按照以下的实验分组处理细胞: 设置 5 个实验组, 分别为空白组, 只加常规培养基; 损伤组, 培养基含有 H₂O₂ (终浓度为 300 μM); 低浓度木犀草素保护组(终浓度为 0.5 μM 木犀草素+300 μM H₂O₂); 中浓度木犀草素保护组(终浓度为 5 μM 木犀草素+300 μM H₂O₂); 高浓度木犀草素保护组(终浓度为 10 μM 木犀草素+300 μM H₂O₂); 作用时间均为 12 h。

1.2.5 细胞活力测定和细胞形态学观察

按照 1.2.4 中的处理方法处理细胞,将细胞放置于倒置显微镜下观察不同处理条件下的细胞形态。观察后,按照 1.2.3 的方法对细胞进行亚甲基蓝染色,计算 H_2O_2 对 HepG2 细胞活力的损伤作用,以及木犀草素对 H_2O_2 损伤细胞的保护作用。

1.2.6 乳酸脱氢酶 (LDH) 活力测定

参照黄钊^[11]的方法并稍加修改。收集 1.2.5 中弃去的培养基于离心管中, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。在低温环境下离心后,取上清液,采用试剂盒进行细胞液 LDH 活力测定。

1.2.7 木犀草素清除细胞内活性氧 (ROS) 能力分析

采用 Wang 等^[12]人报道的方法并稍作修改。具体来讲,将 HepG2 细胞以 1.5×10^4 个/孔的细胞密度接种于黑色 96 孔板中,每孔均 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。在培养箱中培养细胞 24 h 后,按照 1.2.4 的实验分组处理细胞。处理 12 h 后,弃去原培养基,用 PBS 将细胞清洗 3~5 次,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 终浓度为 $100\text{ }\mu\text{M}$ 的 DCFH-DA, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min 后,弃去培养基,用 PBS 将细胞清洗 3~5 次后,加入含有 HBSS 平衡盐的无酚红培养基,置于荧光酶标仪中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温下设定激发波长 485 nm ,发射波长 525 nm ,每 5 min 扫描一次,共 30 min。结果以荧光强度随时间的变化百分比表示 (%)。

1.2.8 超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活力测定

参照 Wen 等^[13]人的方法并稍加修改。具体地, HepG2 细胞以 5×10^5 个/孔的数量接种于 6 孔板中。孵育 24 h 之后,细胞按 1.2.4 的方法处理,用细胞刮收集细胞,离心弃去培养基,加入细胞裂解液(含有 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl and 1% Triton X-100) 裂解细胞,冰浴 10 min。低温离心后,弃去下层沉淀,收集上清液,按照试剂盒的方法对蛋白浓度、胞内 SOD 和 CAT 进行酶活力测定。

1.2.9 流式细胞仪细胞周期测定

细胞按 1.2.8 的方法铺于 6 孔板中,24 h 后,按 1.2.4 的分组处理细胞,12 h 后收集细胞,加入 75% (V/V) 乙醇水溶液固定,存放 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。将细胞重悬于 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ PI 染液(含有 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ RNase 和 0.1% Triton-X-100) 于暗处反应 30 min,上机检测。

1.2.10 流式细胞仪细胞凋亡测定

参照郭春燕^[14]的方法并稍作修改。细胞按 1.2.8 的方法铺于 6 孔板中,24 h 后,按 1.2.4 的分组处理细胞。用无 EDTA 的胰酶消化并收集细胞,加入 $195\text{ }\mu\text{L}$ Annexin V-FITC 结合液,重悬细胞,再加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ Annexin V-FITC,室温避光孵育细胞 10 min,加入

Annexin V-FITC 结合液($190\text{ }\mu\text{L}$)和 PI($10\text{ }\mu\text{L}$),混悬,上机检测。凋亡率为早期凋亡率与晚期凋亡率之和。

1.3 数据分析与处理

采用 Origin 8.0 绘图,采用 SPSS 13.0 统计分析软件包对各个变量进行 ANOVA 分析。各组实验数据均为 3 次重复测定之后取得的,以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

2 结果与讨论

2.1 细胞活力和形态学观察

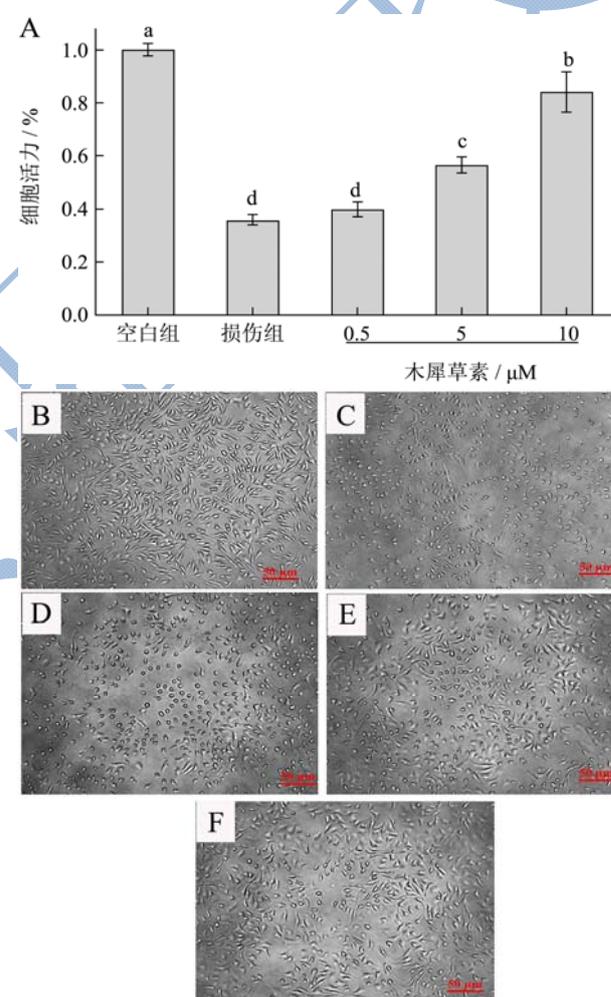


图2 木犀草素对由 H_2O_2 引起的 HepG2 细胞活力和形态学变化影响

Fig.2 Effects of luteolin on the viability and morphological changes in H_2O_2 -induced HepG2 cells

注: A, 细胞存活率; B, 空白组; C, 损伤组; D, 低浓度保护组 ($0.5\text{ }\mu\text{M}$); E, 中浓度保护组 ($5\text{ }\mu\text{M}$); F, 高浓度保护组 ($10\text{ }\mu\text{M}$); 图 A 中标注的不同字母表示两组数据之间具有显著性差异 ($p<0.05$)。

如图 2A 所示,经过 $300\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 损伤 12 h,未

被保护的 HepG2 细胞的活力只有 36%左右,经过 0.5、5、10 μM 的木犀草素保护,细胞的活力分别达到了 40%, 56%和 84%左右,且中高浓度保护组的细胞活力显著高于损伤组 ($p < 0.05$) 并呈一定的浓度依赖性,说明中、高剂量的木犀草素对 H_2O_2 损伤的肝细胞具有显著的保护作用。倒置显微镜细胞形态学观察如图 2B~F 所示,在视野范围内,与空白组相比,损伤组中经过 H_2O_2 处理的 HepG2 正常细胞偏少;空白组的大部分细胞呈自然的梭形,有极少部分细胞出现自然凋亡,而经过 H_2O_2 处理的细胞皱缩变圆,发亮,呈现出大量凋亡甚至畸形的现象;随着木犀草素浓度的增加,细胞数量增多,细胞凋亡和异常的状态也逐渐减弱。如图 2F,在高浓度木犀草素的保护下,细胞状态接近于空白组的正常细胞。

2.2 木犀草素对 HepG2 的 LDH 酶活力、胞内 ROS 清除、SOD 和 CAT 酶活的影响

LDH 酶活力、胞内 ROS 清除、SOD 和 CAT 酶活的影响

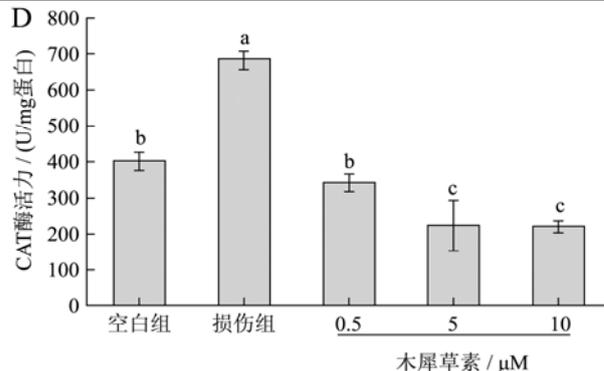
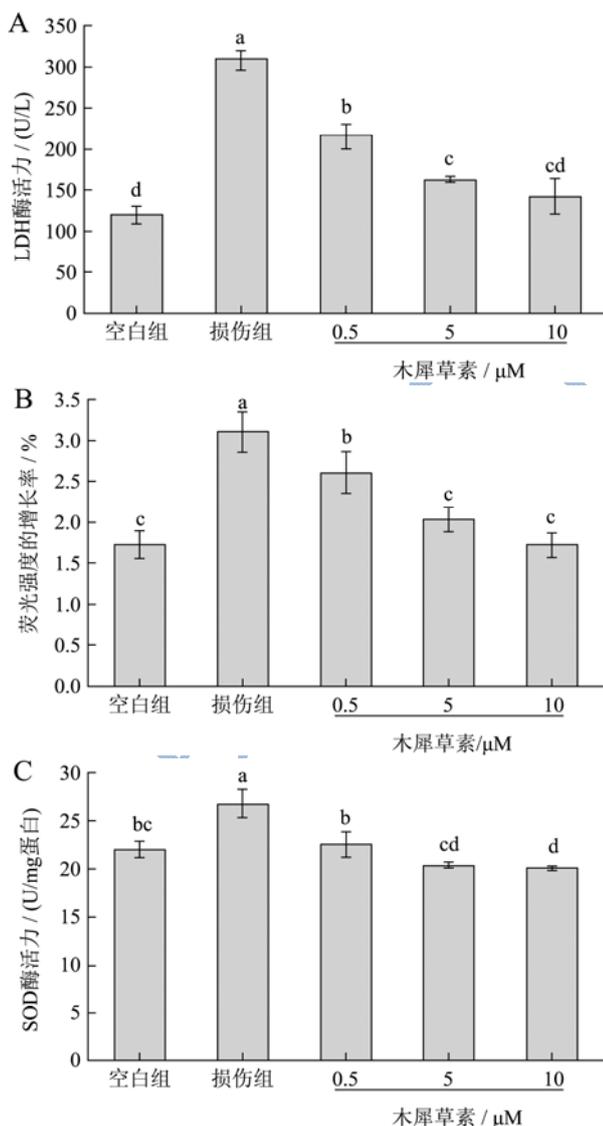


图 3 木犀草素 (0.5~10 μM) 对 LDH 酶活力 (A)、胞内 ROS 清除 (B)、SOD 酶活力 (C) 和 CAT 酶活力 (D) 的影响
Fig.3 Effects of luteolin (0.5~10 μM) on the activity of LDH (A), the scavenging of ROS (B), the activities of SOD (C) and CAT (D)

注: 图上标注的不同字母表示两组数据之间具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

LDH 主要存在于胞内,是一种有稳定酶活性的胞浆酶。当细胞破损时,细胞膜开裂,LDH 从胞内释放到基质中,一般来讲 LDH 的释放量被看做细胞膜完整性的重要指标^[4],检测到的 LDH 酶活力越大,反映了 LDH 释放量越多。如图 3A 所示,相对于空白组 (120.19 U/L),损伤组的 LDH 酶活达到了 308.36 U/L;随着木犀草素浓度的增加,培养基上清液中的 LDH 酶活力逐渐减少,在 0.5 μM 木犀草素的保护下,LDH 酶活力和损伤组已经有了显著性差异 ($p < 0.05$),当木犀草素浓度达到 10 μM 时,LDH 酶活力已经和空白组无显著性差异 ($p > 0.05$)。图 3B 是木犀草素对胞内 ROS 变化率的影响,从图中可以看出,损伤组细胞内部的 ROS 在 1 h 内增加到了原来的 300%左右,随着木犀草素浓度的增加,ROS 随时间的增长率得到了显著的抑制 ($p < 0.05$);当木犀草素达到了中等剂量 (5 μM) 时,和空白组无显著性差异 ($p > 0.05$)。

SOD、CAT 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 是细胞内的主要抗氧化酶,这些酶形成了细胞自身的氧化应激防御系统,当细胞中的 ROS 异常增多时,这些酶的酶活力就会大大增强,然后通过一系列的链式反应将这些多余的 ROS 清除,从而保证细胞内的 ROS 处于正常水平^[15],在正常生理条件下,这些酶的活力处于相对稳定的水平。相对于损伤组 (图 3C 和 3D),受到木犀草素保护的各个实验组的 SOD 和 CAT 酶活都显著降低 ($p < 0.05$),尤其是低浓度木犀草素保护组的酶活与空白组之间并无显著性差异,间接说明了受到木犀草素保护的细胞内 ROS 达到了正常水平。此外,从图中也可看出,当木犀草素浓度继续升高时,SOD 和 CAT 酶活力继续降低且呈量效关

系, 当浓度达到 10 μM 时, 酶活低于空白组(SOD 酶活为 20.08 U/mg 蛋白, CAT 酶活为 221.77 U/mg 蛋白), 说明了在该浓度的木犀草素具有稳定细胞代谢, 从而延长细胞寿命的作用。

2.3 木犀草素对由 H_2O_2 引起的细胞周期和细胞凋亡的影响

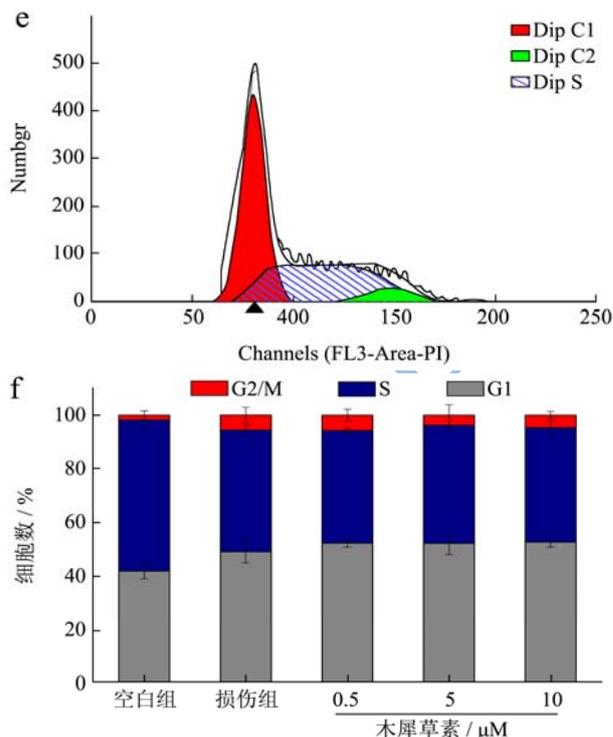
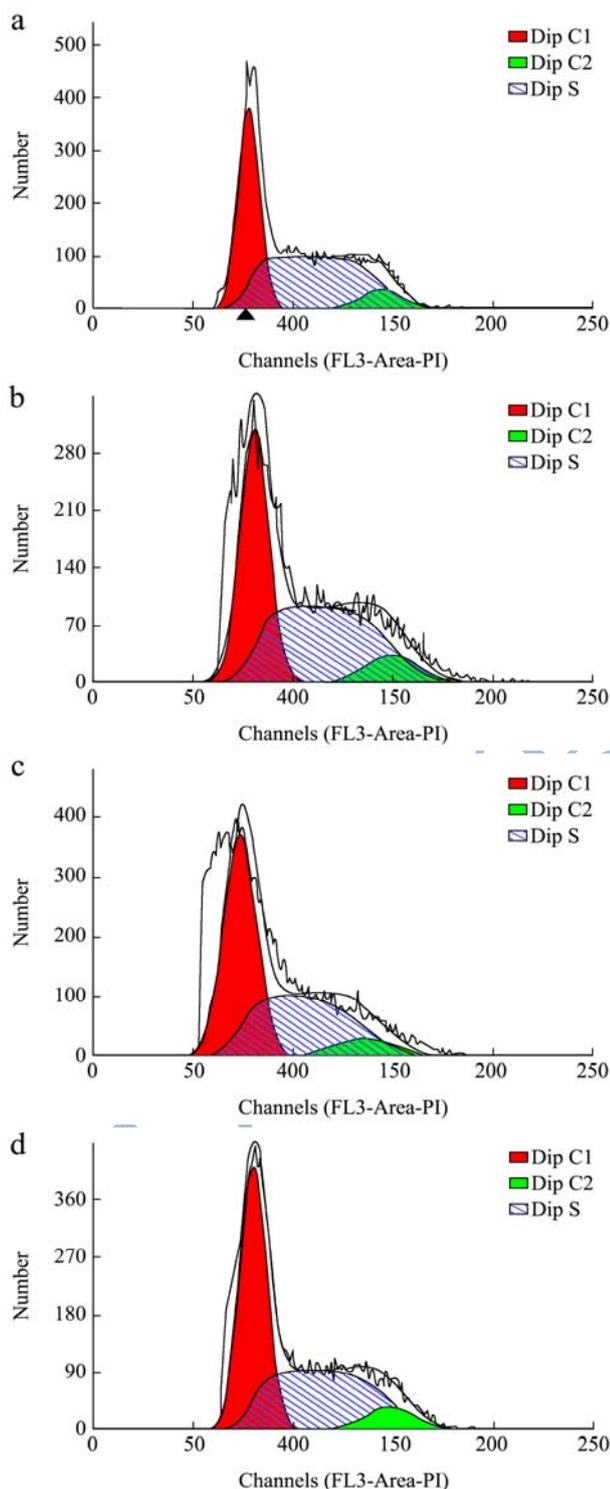
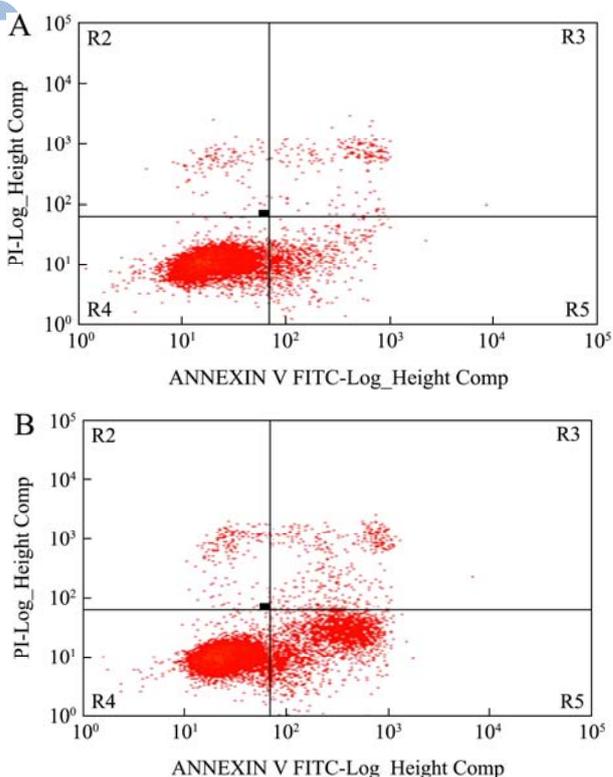


图4 木犀草素对由 H_2O_2 引起的 HepG2 细胞周期的影响
Fig.4 Effects of luteolin on the cell cycle in H_2O_2 -induced HepG2 cells

注: A, 空白组细胞周期分布; B, 损伤组细胞周期分布; C, 低浓度 (0.5 μM) 保护组细胞周期分布; D, 中浓度保护组 (5 μM) 细胞周期分布; E, 高浓度保护组 (10 μM) 细胞周期分布; F, 各实验组细胞于不同周期的细胞数。



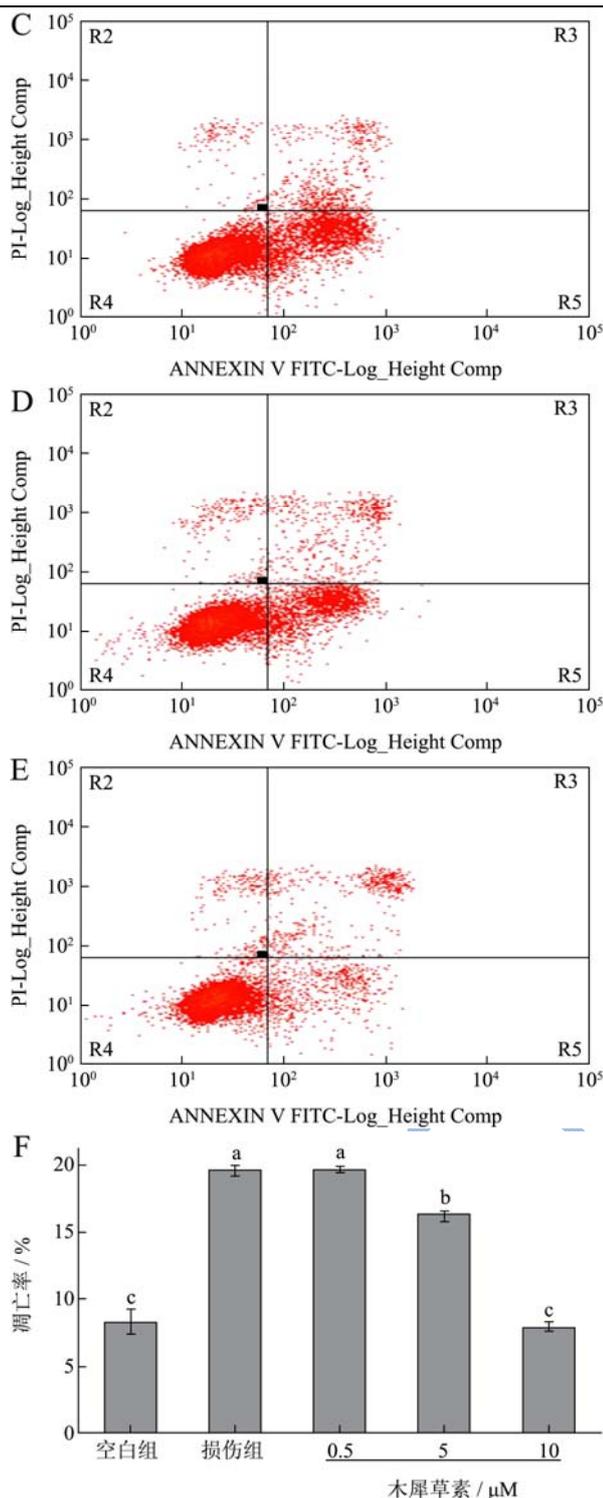


图5 木犀草素对由H₂O₂引起的HepG2细胞凋亡的影响

Fig.5 Effects of luteolin on the apoptosis in H₂O₂-induced HepG2 cells

注：A，空白组细胞凋亡分布；B，损伤组细胞凋亡分布；C，低浓度（0.5 μM）保护组细胞凋亡分布；D，中浓度保护组（5 μM）细胞凋亡分布；E，高浓度保护组（10 μM）细胞凋亡分布；F，各实验组细胞凋亡率，图F中标注的不同字母表示两组数据之间具有显著性差异（ $p < 0.05$ ）。

目前来讲，流式细胞术（FCM）是一种最新的检

测细胞周期和凋亡的技术，它可以直观地检测出细胞周期、证实细胞的凋亡，同时也可以区分细胞的早期凋亡和晚期凋亡。由不同处理方式引起的HepG2细胞周期的变化如图4所示，从图中可以看出，空白组处于G1期、S期和G2/M期的细胞数分别为41.87%、56.34%和1.79%左右，由H₂O₂引起的细胞周期改变主要是G1和S期细胞数量的减少，并与空白组有显著性差异（ $p < 0.05$ ），虽然模型组处于G2/M期的细胞数增加，但是与空白组并无显著性差异；由木犀草素保护的HepG2细胞的细胞周期与模型组之间并没有显著性（ $p > 0.05$ ）。

如图5所示，由300 μM H₂O₂引起的HepG2细胞凋亡主要是早期凋亡，空白组细胞的自然凋亡率低于10%，而损伤组的细胞凋亡率达到了20%左右，显著高于空白组（ $p < 0.05$ ）；随着木犀草素的浓度的增加，细胞凋亡率逐渐减少且呈量效关系，当木犀草素达到中浓度剂量（5 μM）时，细胞凋亡率显著减弱，为16.15%（ $p < 0.05$ ），而高浓度保护组（10 μM）和空白组的细胞凋亡率并没有显著性差异（ $p > 0.05$ ），说明10 μM的木犀草素对300 μM H₂O₂损伤的肝细胞具有显著的保护作用。

3 结论

本文以HepG2细胞为肝细胞模型，以H₂O₂为氧化损伤源，证明了木犀草素具有很好的肝保护作用，且在5 μM和10 μM木犀草素的保护下，肝细胞的细胞活力显著高于损伤组，细胞的ROS增长率、LDH酶活力、SOD酶活力、CAT酶活力以及细胞凋亡率都显著低于损伤组，而保护组的细胞周期和损伤组并无显著性差异。本研究为木犀草素可以作为清除自由基的天然抗氧化剂提供了进一步的理论依据，同时也为木犀草素作为添加剂应用于食品、药品以及化妆品领域提供了研究基础。

参考文献

[1] 郭超卿,王灿,苗明三.浅析氧化应激与糖尿病[J].中医学报,2009,24(6):24-26
 GUO Chao-qing, WANG Can, MIAO Ming-san. Analysis of oxidative stress and diabetes [J]. Journal of Chinese Medicine, 2009, 24(6): 24-26

[2] 孙晓侠.紫甘薯花色苷结构鉴定及抗氧化、降血糖功能的研究[D].天津:天津科技大学,2006
 SUN Xiao-xia. Structure identification, antioxidant and hypoglycemic activities of anthocyanins from purple sweet potato [D]. Tianjin: Tianjin University of Science &

- Technology, 2006
- [3] Ames B N, Gold L S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer [J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1991, 250(1-2): 3-16
- [4] Yang J, Liu R H, Halim L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds [J]. LWT-food Science and Technology, 2009, 42(1): 1-8
- [5] Liu R H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2003, 78(3 Suppl): 517S-520S
- [6] Chu Y, Sun J, Wu X, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(23): 6910-6916
- [7] 乔会敏. 木犀草素对实验性脑缺血大鼠的脑保护作用及机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012
- QIAO Hui-min. The neuroprotective effect of luteolin and the underlying mechanism in rat experimental stroke [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2012
- [8] Kim D O, Lee C Y. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004, 44(4): 253-273
- [9] Wolfe K L, Liu R H. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(18): 8404-8411
- [10] Chen Y, Chen G, Fu X, et al. Phytochemical profiles and antioxidant activity of different varieties of Adinandra Tea (*Adinandra jack*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(1): 169-176
- [11] 黄钊. 高原低氧低温复合作用对大鼠血管内皮细胞的损伤及其防治作用的研究[D]. 天津: 天津体育学院, 2013
- HUANG Zhao. Role of plateau hypoxia hypothermia complex damage to the vascular endothelial cells and the protective effect [D]. Tianjin: Tianjin University of Sport, 2013
- [12] Wang H, Joseph J A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 27(5-6): 612-616
- [13] Wen L, Zheng G, You L, et al. Phytochemical profiles and cellular antioxidant activity of *Malus doumeri* (bois) chevalier on 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP)-induced oxidative stress [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 25: 242-256
- [14] 郭春燕. 几种中药活性成分对H₂O₂诱导Sh-Sy5y细胞氧化损伤的影响及其机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013
- GUO Chun-yan. Effects of active ingredients of chinese medicine on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2013
- [15] Liao W, Ning Z, Chen L, et al. Intracellular antioxidant detoxifying effects of diosmetin on 2,2-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress through inhibition of reactive oxygen species generation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(34): 8648-8654