

中药研究

穿山龙水提物调控 Keap1/Nrf2 通路抗 CCl₄ 诱导小鼠急性肝损伤作用研究刘利平¹ 陶旭锋² 韩旭² 许丽娜²

(1 大连医科大学附属第一医院, 大连, 116011; 2 大连医科大学药学院, 大连, 116044)

摘要 目的:评价穿山龙水提物(AEDN)通过对 Keap1/Nrf2 信号通路的调控实现对 CCl₄ 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用。方法:穿山龙药材经水提取浓缩蒸干即为 AEDN,采用紫外可见分光光度法测定提取物中多糖含量。雄性昆明小鼠经 AEDN 连续灌胃给药 7 d 后,腹腔注射 0.35% CCl₄ 橄榄油溶液诱导急性肝损伤,评价 AEDN 对 CCl₄ 诱导急性肝损伤氧化应激相关指标的影响,并检测 AEDN 对 Keap1/Nrf2 信号通路的调控作用。结果:AEDN 的提取率为 9.64%,其中多糖含量为(53.03±0.70)%。在 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤中,AEDN 能显著降低 MDA 的表达水平,使小鼠肝组织中的 SOD、GSH 和 GSH-Px 含量增多。此外,AEDN 可显著上调 SOD1、SOD2、Nrf2、GST、NQO1 和 HO-1 的蛋白表达,降低 Keap1 的表达,显著下调 iNOS mRNA 的表达水平。结论:穿山龙水提物可通过调控 Keap1/Nrf2 氧化应激信号通路实现对 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用。

关键词 穿山龙水提物;四氯化碳;急性肝损伤;氧化应激;Keap1/Nrf2 信号通路

Study on the Effects of Aqueous Extract from *Dioscorea nipponica* Makino Against Carbon Tetrachloride-Induced Mice Acute Liver Injury via Regulating Keap1/Nrf2 Signal Pathway

Liu Liping¹, Tao Xufeng², Han Xu², Xu Lina²

(1 The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China; 2 College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract Objective: To evaluate the protective effect of the aqueous extracted from *Dioscorea nipponica* Makino (AEDN) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury in mice by regulating Keap1/Nrf2 signal pathway. **Methods:** *Dioscorea nipponica* Makino was extracted and concentrated by water and dried to be powder, which was AEDN. The content of polysaccharide in AEDN was determined by ultraviolet visible (UV) spectrophotometry. The male Kunming mice were administered with AEDN for 7 days, and then acute liver injury was induced by intraperitoneal injection of 0.3% CCl₄ olive oil solution. The effect of AEDN on oxidative stress indexes in CCl₄ induced liver injury mice and the regulation effect of AEDN on Keap1/Nrf2 signal pathway were evaluated. **Results:** The extraction rate of AEDN was 9.64%, and the polysaccharide content was (53.03±0.70)%. In CCl₄-induced mice acute liver injury, AEDN significantly decreased the level of MDA and increased the level of SOD, GSH and GSH-Px in liver tissue of mice. The mechanism of action study found that the protein levels of T SOD1, SOD2, Nrf2, GST, NQO1 and HO-1 were all markedly up-regulated, and the level of Keap1 was down-regulated. The mRNA level of iNOS were also suppressed by AEDN treatment. **Conclusion:** AEDN has protective effect on CCl₄-induced acute liver injury in mice via adjusting Keap1/Nrf2 signaling pathway.

Key Words Aqueous extracted from *Dioscorea nipponica* Makino; Carbon tetrachloride; Acute liver injury; Oxidative stress; Keap1/Nrf2 signal pathway

中图分类号:R575;R965 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.10.053

近年来,肝脏疾病已经成为影响人类健康的最常见疾病之一,寻找有效的防治药物来应对因各种原因所致的肝损伤,也成为目前研究的热点。本研究采用的四氯化碳(Carbon Tetrachloride, CCl₄)诱导肝损伤模型是经典的急性肝损伤模型,并广泛用于保肝药物的筛选。穿山龙(*Dioscorea nipponica* Makino),别名穿山薯蕷,为多年生缠绕草质藤本,其

根茎是一种重要的中药材,具有舒筋活络、止咳化痰、祛风止痛等功效。本研究的目的是评价穿山龙水提物对小鼠 CCl₄ 急性肝损伤的保护作用及其分子机制,为该天然产物的深入研究和开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 昆明小鼠,体重(18~22)g,雄性,由

大连医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(辽)2013-0003。

1.1.2 药物 穿山龙药材(购于云南千草源药业有限公司);水飞蓟素和羧甲基纤维素钠(CMC-Na)(购于Sigma公司)。

1.1.3 试剂与仪器 DAPI、Tris、SDS(购于Sigma公司);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(均购于南京建成生物工程研究所);谷胱甘肽巯基转移酶(GST)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Keap1)、醌氧化还原酶-1(NQO1)、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、SOD1、SOD2、血红蛋白加氧酶-1(HO-1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗及二抗(均购于武汉三鹰生物技术有限公司);iNOS 引物[购于英潍捷基(上海)贸易有限公司]。

AL104 电子天平(METTLER TOLEDO,上海);98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);R-501 旋转蒸发仪(上海科升仪器有限公司);U-3010 紫外可见分光光度计(HITACHI,日本);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);美国 UVP 凝胶成像系统(BioSpectrum 系列,美国);7500 实时定量 PCR 仪(Applied Biosystems,美国)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 小鼠随机分为对照组(Control)、模型组(Model)、AEDN 低剂量组、中剂量组、高剂量组和水飞蓟素阳性对照组,每组 10 只。小鼠第 7 天灌胃 2 h 后,对照组腹腔注射橄榄油,其余各组腹腔注射 0.35% CCl₄ 橄榄油溶液建立急性肝损伤模型。

1.2.2 药物提取方法 取穿山龙药材 500 g,加入 4 000 mL 的水,于电热套中加热回流提取。大火煮沸,转小火煮约 2 h,药液趁热过滤,滤液备用。以上实验过程重复 4 次,共制得滤液约 15 000 mL。滤液用旋转蒸发仪反复蒸掉水分后,加入约 4 200 mL 95% 乙醇溶液,混匀,静置 24 h。沉淀进一步旋蒸、浓缩后,于真空干燥器中干燥数天成粉末,即为穿山龙水提物(AEDN),用小型粉碎机磨成粉末状备用。

1.2.3 多糖含量测量方法 采用紫外-可见分光光度法对 AEDN 中多糖的含量进行测定。首先配制梯度浓度 10~200 μg/mL 的葡萄糖溶液作为标准品,加入 20% 苯酚溶液和 4 mL 浓硫酸显色,以空白试剂作参比,在 490 nm 处测 A 值,以吸光度 A 对葡萄糖标准品浓度 C 进行线性回归。配制浓度为 150 μg/mL 的 AEDN 样品,同法重复测定 3 次其吸光度

值,标准曲线法计算穿山龙多糖含量。

1.2.4 给药方法 称取适量的 AEDN 和水飞蓟素,溶于 0.5% CMC-Na 溶液,研磨均匀后用于小鼠灌胃给药。对照组和模型组小鼠灌胃给予 0.5% CMC-Na 溶液,AEDN 低、中、高剂量组小鼠按 50 mg/kg、100 mg/kg 和 200 mg/kg 灌胃给予 AEDN,水飞蓟素阳性对照组按 250 mg/kg 灌胃给予水飞蓟素,连续灌胃给药 7 d,实验期间各组小鼠正常进食、进水。

1.2.5 检测指标与方法 1)小鼠造模 24 h 后处死,解剖取肝脏。分别称取各小鼠的肝组织 100 mg 加入 0.9% NaCl 溶液匀浆,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 4 ℃ 冷藏备用。按照试剂盒操作说明书,肝组织匀浆上清液测定其 MDA、SOD、GSH 和 GSH-Px 的水平,余下肝组织保存于 -80 ℃ 冰箱。2)采用 Western blot 法测定各组小鼠肝组织中 Keap1、Nrf2、SOD1、SOD2、GST、HO-1 和 NQO1 蛋白的表达。称取于 -80 ℃ 保存的肝组织 100 mg,于装有 1 mL 预冷的 RIPA 裂解液的 EP 管中,用组织匀浆机制备肝组织匀浆。待肝组织充分裂解后,10 000 r/min 4 ℃ 离心 10 min,取上清液即为肝组织总蛋白。以 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定各样本中的蛋白浓度。组织总蛋白稀释至 10 μg/μL,与 2 × loading buffer(100 μl + 4 μl β-巯基乙醇)按体积比 1:1 混匀,煮沸 5 min 变性。取 50 μg 变性后的总蛋白上样,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)在 120V 恒压下电泳,直至溴酚蓝到达胶底部,停止电泳。按湿法转膜将 PVDF 膜在甲醇中浸泡 10 s 后,将其和滤纸、凝胶一同放入转移缓冲液中浸泡后一起放入转膜器,冰水浴中,300 mA 恒流转膜 2~3 h。将载有目标蛋白质的 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉中,摇床上室温封闭 3 h。将 PVDF 膜放入目的蛋白相应的一抗中,4 ℃ 孵育过夜。取出膜后,以 TTBS 洗膜 3 次,10 min/次,再将膜放入二抗中,室温下摇床孵育 2 h,TTBS 洗膜 3 次,10 min/次。ECL 试剂盒显色,采用动态积分模式进行拍照并用 Gel-Pro 4.0 软件对蛋白条带进行灰度分析。以 GAPDH 为内参蛋白,计算 Keap1、Nrf2、SOD1、SOD2、GST、HO-1 和 NQO1 的相对表达量。3)采用 Real-time PCR 法测定各组小鼠肝组织中 iNOS mRNA 的水平。称取肝组织 100 mg,按试剂盒规定方法提取总 RNA,以分光光度法测定其浓度后,将总 RNA 溶液稀释成 0.5 μg/μL 后按照试剂盒说明书进行逆转录,获得的 cDNA 保存于 -20 ℃ 冰箱。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司设计和合成,序列见表 1。按照试剂

盒操作说明进行 Real-time PCR 反应。以 GAPDH 基因作为管家基因,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析肝组织 iNOS 基因的相对表达。

表 1 小鼠相关引物序列

Gene name	Forward Primer(5'-3')	Reverse Primer(5'-3')
iNOS	CACCTTGGAGTTCACCCAGT	ACCACTCGTACTTGGGATGC
GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGAATCTGA	TTCGTGTGAAGTCGCAGGAG

1.3 统计学方法 采用 GraphPad 5.0 统计软件对数据进行统计学分析,计量资料用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间的均数比较采用 t 检验;多组间均数样本比较采用 One-Way ANOVA 方差分析;两两比较采用 p 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 穿山龙水提物的提取率及多糖含量的测定 本实验采用水提取醇沉淀的方法,2 000 g 的穿山龙

药材共制得 192.83 g 穿山龙水提物,提取率为 19.64%。紫外可见分光光度法测定 AEDN 中多糖的含量为 $(53.03 \pm 0.70)\%$ 。

2.2 AEDN 对 CCl₄ 诱导肝损伤小鼠肝组织氧化应激指标的影响 本研究测定了 AEDN 对 CCl₄ 诱导小鼠急性肝损伤肝组织中 MDA、SOD、GSH 和 GSH-Px 含量的影响,结果如图 1 所示。小鼠接受 CCl₄ 干预后,肝组织损伤导致其中 MDA 含量显著上升, SOD、GSH 和 GSH-Px 的含量显著下降。给予 AEDN (200 mg/kg)后,肝组织中 MDA 的含量降低 $(0.70 \pm 0.08 \text{ nmol/mg protein})$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$);SOD、GSH 和 GSH-Px 的含量升高,分别升高至 $(21.15 \pm 2.16) \text{ U/mg protein}$ 、 $(8.53 \pm 1.04) \text{ mg/g protein}$ 和 $(73.34 \pm 12.21) \text{ U}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

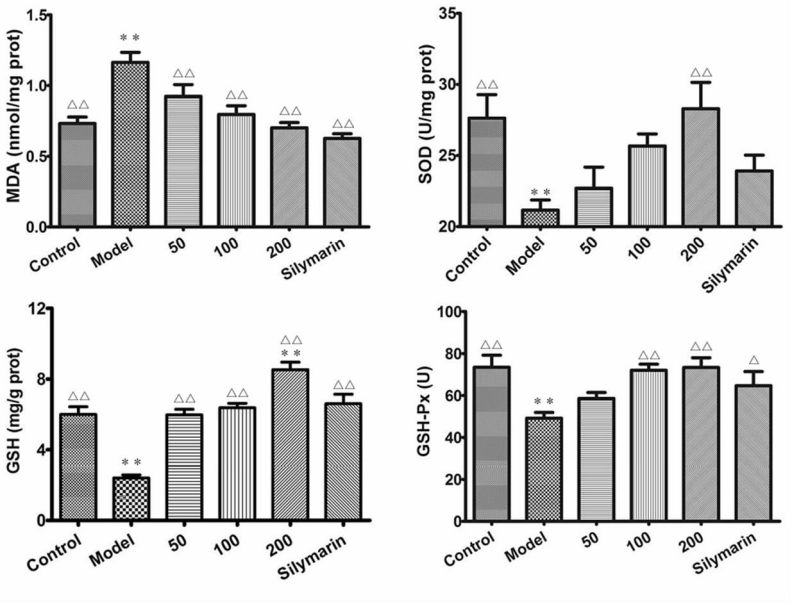


图 1 AEDN 对 CCl₄ 作用下的小鼠肝组织生化指标的影响

注:与对照组比较, $** P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

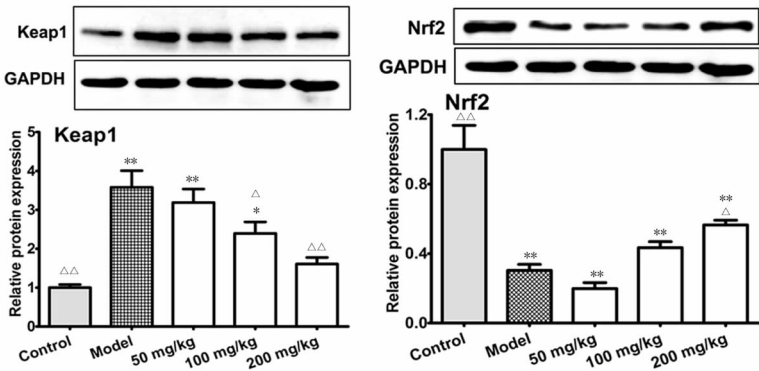


图 2 AEDN 对 CCl₄ 诱导肝损伤小鼠 Keap1 和 Nrf2 蛋白表达的影响

注:与对照组比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

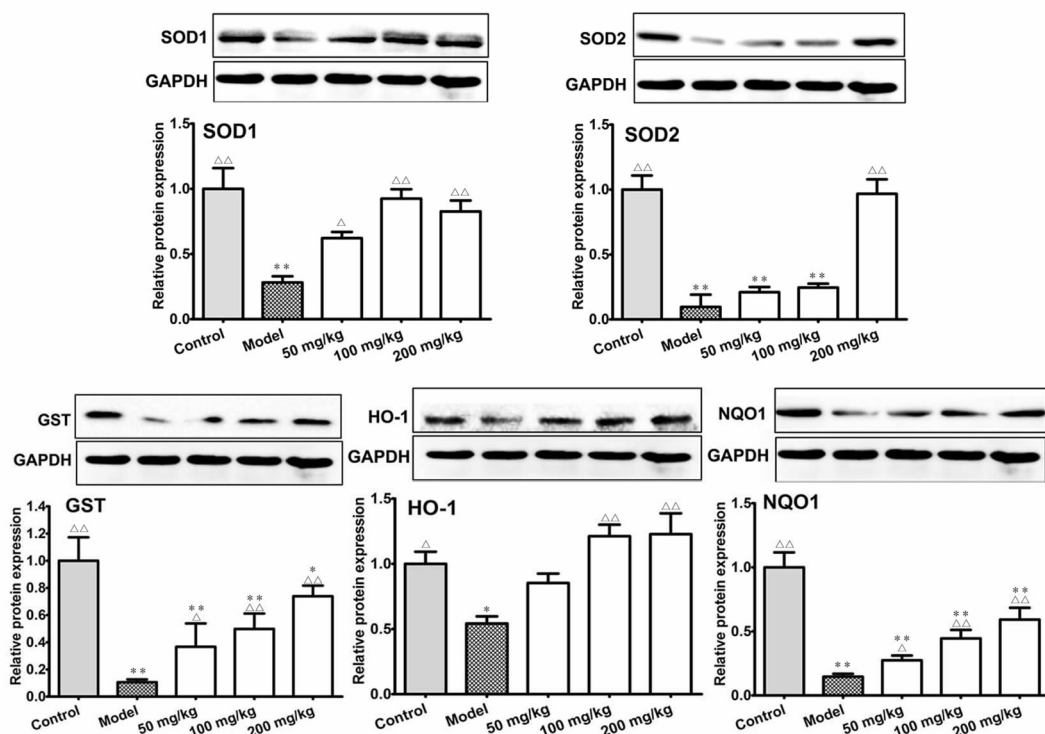


图3 AEDN对CCl₄诱导下肝损伤小鼠氧化应激信号通路蛋白表达的影响

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,Δ $P < 0.05$,ΔΔ $P < 0.01$

2.3 AEDN对CCl₄诱导小鼠肝损伤Keap1/Nrf2信号通路蛋白的影响 本研究采用Western blot法测定了AEDN对小鼠肝损伤氧化应激信号通路蛋白的影响。如图2所示,模型组中的Keap1蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)、Nrf2蛋白表达下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),给予AEDN(200 mg/kg)后,Keap1蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),Nrf2蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时,AEDN能够显著上调SOD1、SOD2、GST和NQO1蛋白的表达水平,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图3。

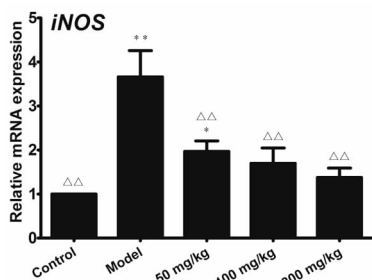


图4 AEDN对CCl₄诱导肝损伤小鼠肝组织iNOS水平的影响

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,Δ $P < 0.05$,ΔΔ $P < 0.01$

2.4 AEDN对CCl₄诱导小鼠肝损伤iNOS的影响 本研究采用了Real-time PCR法测定肝组织iN-

OS的水平,结果如图4所示,与对照组比较,模型组中iNOS水平显著上调,AEDN 3个剂量均能显著降低肝组织中iNOS mRNA的表达水平,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

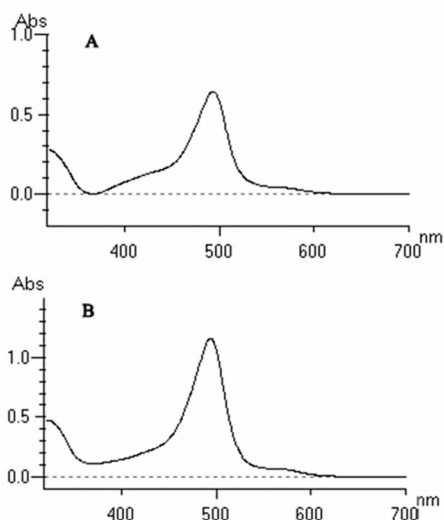


图5 苯酚-硫酸显色法的紫外-可见光扫描光谱图

注:A葡萄糖对照品,B穿山龙水提物

3 讨论

AEDN中含有多糖、水、蛋白质和各种盐类等,但因本研究采用了水提醇沉法进行了初步除杂,因此水提物中的主要成分为多糖。图5是葡萄糖对照品和AEDN样品经苯酚-硫酸显色法显色后,进行紫

外-可见光扫描的光谱图。由图可以看出,AEDN 的紫外扫描图与葡萄糖标准品相似,且最大吸收波长均在 490 nm 处。因此,AEDN 经苯酚-硫酸法显色后,以 490 nm 作为检测波长。

近年来随着对 CC14 诱导的急性肝损伤的分子作用机制不断深入和广泛的研究,发现氧化应激是药物对其发挥保肝作用主要分子机制之一^[1]。MDA 是脂质过氧化的终末降解产物,可与胞质、膜蛋白或某些酶结合成聚合体,损害细胞膜结构,引起肝细胞变性、坏死^[2]。急性肝损伤时,肝组织缺血缺氧,脂质过氧化作用增强,MDA 水平升高^[3]。SOD 是由金属辅酶和蛋白质构成的金属酶,SOD1 是 SOD 的最主要亚型,具有抗氧化、抗炎、抗衰老和维护基因组 DNA 的稳定等功能,同时通过其催化产物 H₂O₂ 参与调节细胞的生长代谢^[4]。SOD2 易受促炎性因子、辐射、氧化应激等因素的诱导,继而大量表达,维持线粒体内氧自由基的动态平衡,减轻氧化应激损伤^[5]。SOD 能特异地与超氧化物阴离子(O²⁻)发生歧化反应,清除 O²⁻,保护机体不受自由基损害。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶,特异地催化 GSH 对过氧化物的还原反应,能清除过氧化物代谢产物,阻断脂质过氧化链锁反应,从而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。本研究中 AEDN 降低了肝组织中 MDA 水平、升高肝组织中 SOD、GSH 和 GSH-Px 含量,缓解了急性肝损伤时的氧化应激反应。

为进一步探讨 AEDN 抗急性肝损伤作用,我们对其作用的分子机制进行了深入研究。在对氧化应激过程中,Keap1/Nrf2 是一条重要的调控通路。Keap1 是 Kelch 家族中的一种阻遏蛋白,正常状态下存在于胞质的肌动蛋白细胞骨架上,是 Nrf2 的负性调节蛋白^[6]。Nrf2 属于 Cap-n-Collar(CNC)调节蛋白家族,是细胞抗氧化应激中的关键转录因子,在生理状态下与胞质中的 Keap1 结合处于非活性状态。当机体受到其他亲核试剂刺激或处于氧化应激状态时,Nrf2 与 Keap1 解离,Nrf2 磷酸化后转入细胞核与抗氧化反应元件(ARE)结合,启动 ARE 调控的下游Ⅱ相代谢酶及抗氧化蛋白基因的表达,提高机体的抗氧化应激能力^[7]。本研究发现 AEDN 能显著下调肝损伤后肝组织 Keap1 的蛋白表达,上调 Nrf2 的蛋白表达。

HO-1、NQO1、GST 等是 Nrf2 下游调控的重要靶蛋白,肝损伤时 NQO1、HO-1 的表达降低,与 Nrf2 呈正相关性^[8-10]。GST 为一种不含硒的 GSH-Px,是体

内最重要的Ⅱ相代谢酶之一,可保护 DNA 和蛋白质免受损害,达到解毒目的。GST 在肝小叶中分布均匀,且分子量较小,在肝损伤后能快速、特异性的反应肝细胞的损伤状态^[11]。血红蛋白加氧酶(HO)是血红蛋白分解代谢的限速酶,HO-1 是 HO 的氧应激诱导型,在急性肝损伤中可被诱导大量表达,一方面通过血红蛋白的 3 种酶解产物,清除自由基,抗氧化;另一方面,减轻脂质过氧化,降低含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)活性和 TNF-α 水平,抗细胞凋亡、抗炎,发挥保肝护肝作用^[12]。在 CC14 诱导的急性肝损伤中,HO-1 mRNA 的表达下调^[13]。NQO1 是一种黄素蛋白酶,能以 NAD(P)H 为电子供体,还原醌类及其衍生物,并使其毒性降低,保护机体的氧化应激损伤,作为Ⅱ相代谢酶之一,在机体的解毒代谢中发挥重要作用^[14]。本研究发现 AEDN 能上调肝损伤后肝组织中 SOD1、SOD2、HO-1、NQO1、GST 蛋白的表达。

iNOS 为一氧化氮合酶(NOS)的诱导型,是产生 NO 的限速酶。生理状态下 NO 有一定的保护肝脏的作用,病理状态下,激活后的 iNOS 产生大量的 NO,高浓度 NO 可引起肝脏损伤,其机制一方面与 NO 自身的细胞毒性有关,另一方面与 NO 激活中性粒细胞的粘附作用和氧化应激等有关^[15-16]。AEDN 显著下调肝损伤所致 iNOS mRNA 水平的异常增高,缓解氧化应激。

本研究发现 AEDN 能够显著下调肝组织中 MDA 水平、iNOS mRNA 表达水平和 Keap1 的蛋白表达,显著上调 GSH、GSH-Px、SOD、SOD1、SOD2、HO-1、NQO1、GST 和 Nrf2 的蛋白表达水平。以上结果表明 AEDN 具有较好的抗 CCl₄ 诱导的急性肝损伤作用,这种作用可能是通过调控 Keap1/Nrf2 信号通路降低氧化应激损伤作用实现的。

参考文献

- [1] Peng W, Qiu XQ, Shu ZH, et al. Hepatoprotective activity of total iridoid glycosides isolated from *Paederia scandens* (our.) Merr. var. *tomentos*a [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 174 (4): 317-321.
- [2] Koruk M, Tayisi S, Savas MC, et al. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2004, 34 (1): 57-62.
- [3] 杨颂华, 任成山, 高全杰, 等. 内毒素致大鼠急性肝损伤时血清 TNF-α、MDA 的变化及其意义 [J]. *重庆医学*, 2003, 32 (1): 82-84.
- [4] 陈长风, 谭俊, 邵雷, 等. SOD1 抑制剂与癌症 [J]. *工业微生物*, 2016, 46 (2): 56-59.
- [5] 张月. HO-1、SOD2 和 Mfn2 在实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中的表达及丁苯酞保护作用的研究 [D]. 河北医科大学, 2015.

(下接第 2589 页)

参考文献

- [1] 陈瑞生, 陈相银. 栀子的鉴别[J]. 首都医药, 2010, 17(13): 38.
- [2] 孟祥乐, 李红伟, 韩永龙, 等. 栀子-连翘药对清热、利胆作用研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, (7): 1486-1491.
- [3] 张利敏, 侯志飞, 崔蕾, 等. 栀子炮制品研究进展[J]. 河北医药, 2013, (19): 2988-2989.
- [4] 徐莘. 焦栀子炮制机制及质量研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2008.
- [5] 杨宜花, 洪婷. 中药栀子复方配伍中的功效发微[J]. 中医文献杂志, 2016, 34(5): 24-26.
- [6] 马丽. 浅论焦栀子的药理作用及用其治疗血证的效果[J]. 当代医药论丛, 2016, 14(9): 21-22.
- [7] 杨全军, 范明松, 孙兆林, 等. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展[J]. 中国现代中药, 2010, 12(9): 7-12.
- [8] 刘益华, 李晶, 林曼婷, 等. 栀子有效成分栀子苷的现代研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(6): 406-409.
- [9] 王亭. 中药栀子有效成分及药理作用的研究进展[J]. 中国药师, 2015, 18(10): 1782-1784.
- [10] 王竞涛, 龚记叶, 黄志远, 等. 黄芩苷与栀子苷相使配伍治疗脑血管病的机制研究进展[J]. 中国全科医学, 2014, (24): 2885-2889.
- [11] 李敏, 王斌, 曹慧, 等. 基于 AQP4、P-gp 黄芩苷、栀子苷配伍对缺血/再灌注损伤大鼠血脑屏障保护机制研究[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(3): 443-444.
- [12] 姚冬冬, 舒雯, 杨蕾, 等. 栀子及其活性成分栀子苷防治糖尿病作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1368-1373.
- [13] 付正伟. 栀子苷治疗脑缺血损伤的分子机制研究[J]. 河南中医, 2014, 6(11): 97-98.
- [14] 张海燕. 栀子苷/黄芩苷心血管作用及应用于血管支架药物涂层研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2014.
- [15] 赵飞, 巩凡, 李晓亮, 等. 急性闭合性跟腱断裂 28 例患者的 5 年随访研究[J]. 中华显微外科杂志, 2017, 40(4): 324-327.
- [16] 万亮琴, 张子剑, 谭琰, 等. 栀子及栀子苷抗炎作用机制的最新研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(3): 80-83.
- [17] 江国杰. 中药栀子不同炮制方法的含量变化与抗炎效果的影响[J]. 北方药学, 2015, 12(12): 106-107.
- [18] 蔡智慧, 王晋, 郑亚萍. 栀子苷对通过 TLR4-NF- κ B 信号通路抑制缺氧/复氧心肌细胞前炎症反应因子释放的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(2): 234-237.
- [19] 冯筱懿. 中药栀子及其成分栀子苷对肾脏毒性及机制初步研究[D]. 北京: 首都医科大学, 2016.
- [20] 王梓淞. 基于单克隆抗体特异性敲除技术的栀子苷与栀子改善 HUVEC 细胞氧化应激损伤作用的相关性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [21] 王艳艳. LPS-TLR4 复合物的内化在 LPS 诱导巨噬细胞活化中的作用及其机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2010.
- [22] 徐志鹏, 左国平, 靳建亮. 巨噬细胞异质性及其在炎症反应调控中的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(12): 1711-1714.
- [23] 董玉, 杨爱雄, 戚好文, 等. 白藜芦醇对小鼠肺泡巨噬细胞释放 IL-6、TNF- α 的影响[J]. 陕西医学杂志, 2007, 36(9): 1131-1133.
- [24] 杨雪梅, 吴刚. 苦参碱抑制 LPS 诱导巨噬细胞 IL-1 β 、TNF- α 分泌及机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(6): 820-824, 837. (2017-12-17 收稿 责任编辑: 芮莉莉)

(上接第 2584 页)

- [6] Gao B, Doan A, Hybertson BM. The clinical potential of influencing Nrf2 signaling in degenerative and immunological disorders[J]. Clin Pharmacol, 2014, 6: 19-34.
- [7] 刘冲, 彭御冰, 王忠. Keap1-Nrf2-ARE 信号通路在多器官疾病中的研究进展[J]. 中国临床医学, 2015, (2): 239-243.
- [8] 胡流芳, 王迎, 任汝静, 等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. 国际药学研究杂志, 2016, (1): 146-152, 166.
- [9] Liu J, Zhou ZX, Zhang W, et al. MPChanges in hepatic gene expression in response to hepatoprotective levels of zinc[J]. Liver International, 2009, 29(8): 1222-1229.
- [10] In Woo Lee, Hee Yoon Choi, et al. Saeng-Kankunbi-Tang Protects Liver against Oxidative Damage through Activation of ERK/Nrf2 Pathway[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2016, 22(8): 1-10.
- [11] 那淑媛, 朱银洪. GST 和 GDH 在抗结核药物引起肝损伤中的水平改变及临床意义[J]. 浙江实用医学, 2014, (5): 319-321.
- [12] 武志明, 任锋, 刘焱, 等. HO-1 诱导对大鼠急性肝损伤的保护作用及其机制[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2007, 16(2): 165-168.
- [13] Zhang JQ, Shi L, Xu XN, et al. Therapeutic detoxification of quercetin against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice and its mechanism[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2014, 15(12): 1039-47.
- [14] Jiang T, Huang Z, Lin Y, et al. The protective role of Nrf2 in STZ-induced diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2010, 59(4): 850-860.
- [15] 邓青芳, 周欣, 陈华国. 多糖抗肝损伤作用及其机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(16): 2958-2967.
- [16] Zhengyang Z, Xiaojin L, Tuo L, et al. Polypeptide from Chlamys farrieri inhibits UVB-induced apoptosis of HaCaT cells via iNOS/NO and HSP90[J]. 中国海洋湖沼学报(英文版), 2009, 27(3): 594-599. (2017-03-30 收稿 责任编辑: 杨阳)