

· 基础研究 ·

二仙汤对过氧化氢诱导的人卵巢颗粒细胞
氧化损伤的保护作用

李 杨 谢 莉 刘 建 聂广宁 杨洪艳

摘要 目的 探讨二仙汤对过氧化氢(H_2O_2)诱导人卵巢颗粒细胞(COV434)氧化损伤的保护作用及其可能机制。**方法** 体外培养 COV434 细胞, 0.5 mmol/L H_2O_2 诱导 COV434 氧化损伤。将细胞分为空白组、模型组(H_2O_2 0.5 mmol/L)、二仙汤水提液低、中、高剂量组(0.5、1、5 mg/mL + H_2O_2 0.5 mmol/L)。MTT 分析细胞存活率, DCFH-DA 荧光探针检测细胞内活性氧簇(ROS)水平, 微量酶标法测定细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)的释放。Annexin V-FITC/PI 双染和 PI 染色, 分别检测细胞凋亡和周期。Western blot 检测 HO-1、NQO-1、P-JNK、P-44/42、P-p38、Bax、Bcl-2、Caspase-9 蛋白表达。**结果** 与空白组比较, 模型组细胞存活率下降, ROS 及 LDH 水平增加, S 期百分率、早期凋亡、晚期凋亡及总凋亡比例显著增高($P < 0.01$), Bax、Caspase-9 及 P-JNK 蛋白表达升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 二仙汤水提液低、中、高剂量组 LDH、S 期百分率降低, G2/M 期百分率升高($P < 0.05$), 二仙汤水提液中、高剂量组细胞存活率升高, ROS 释放量、早期凋亡及总凋亡比例降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 二仙汤水提液低、中剂量组 P-44/42 蛋白表达升高($P < 0.05$)。**结论** 二仙汤在一定剂量范围内对 H_2O_2 诱导的 COV434 细胞损伤具有明显的保护作用, 其保护效应可能与清除 ROS, 减轻 DNA 氧化损伤, 调控 MAPK-Nrf2 信号通路及线粒体通路介导的细胞凋亡有关。

关键词 过氧化氢; 二仙汤; 氧化应激; 卵巢颗粒细胞

Protective Effects of Erxian Decoction on Oxidative Injury of Human Ovarian Granulosa Cells Induced by H_2O_2 LI Yang, XIE Li, LIU Jian, NIE Guang-ning, and YANG Hong-yan *Department of Gynaecology, Guangdong Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510120)*

ABSTRACT Objective To evaluate the protective effects and mechanisms of Erxian Decoction (EXD) on oxidative injury of human ovarian granulosa cells (COV434) induced by H_2O_2 . **Methods** The model of oxidative injury was established by supplement with H_2O_2 (0.5 mmol/L). COV434 cells were divided into control group, model group (H_2O_2 0.5 mmol/L), the low, medium and high dose group of EXD (EXD 0.5, 1, 5 mg/mL + H_2O_2 0.5 mmol/L). Cell growth activity was evaluated by MTT assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production was measured by DCFH-DA. The activity of lactic dehydrogenase (LDH) were determined by microenzyme labeling. The apoptosis and cell cycle of COV434 were detected using Annexin V-FITC/PI. The involvement of HO-1, NQO-1, P-JNK, P-44/42, P-p38, Bax, Bcl-2, Caspase-9 in the oxidative stress-mediated signaling pathway was explored using Western blot analysis. **Results** Compared with the control group, H_2O_2 significantly decreased cell viability which was accompanied by an increase in ROS and LDH production, and the percentage of s-phase, early apoptosis, late apoptosis and total apoptosis increased significantly ($P < 0.01$). Meanwhile, the levels of Bax, Caspase-9, P-JNK protein were increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the LDH production and the percentage of S phase in the low, medium and high dose group of EXD were decreased, while the per-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81303001)

作者单位: 广东省中医院妇科(广州 510006)

通讯作者: 杨洪艳, Tel: 13662465058, E-mail: dryanghongyan@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20190214. 072

centage of G2/M phase increased ($P < 0.05$). The medium and high dose group of EXD increased viability of COV434 and decreased the elevated ROS production and early apoptosis and total apoptosis ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, the low and medium dose group of EXD significantly enhanced the expression of P44/42 ($P < 0.05$). Conclusion Pretreatment with EXD alleviate H_2O_2 -induced apoptosis in COV434 cells through both eliminate ROS, relieve oxidative DNA damage and regulating the MAPK - Nrf2 signaling pathway and mitochondrial pathway mediated apoptosis.

KEYWORDS hydrogen peroxide; Erxian Decoction; oxidative stress; human ovaria granulosa cells

氧化应激(oxidative stress, OS)是指体内氧化与抗氧化作用失衡,是导致衰老和疾病的一个重要因素。OS参与了多种妇科疾病的发生发展,如多囊卵巢综合征^[1]、卵巢功能衰退^[2]、自然流产^[3]等。研究报道指出颗粒细胞凋亡与 OS 密切相关^[4]。颗粒细胞在缺少卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)的条件下培养后,能够检测到的 ROS 的产生,发现了颗粒细胞的凋亡,进而影响卵母细胞和胚胎质量以及早期胚胎发育,从而导致雌性生殖机能的下降^[5,6]。如何降低 OS 对雌性生殖系统造成的危害已成为人类生殖医学中研究热点及难点。

二仙汤是张伯讷教授经过反复筛选验证而研制出的治疗绝经综合征的一首补肾抗衰老方^[7,8],在临床上常用于治疗妇女绝经综合征、卵巢早衰、骨质疏松等衰老性疾病^[9]。对老年大鼠自由基代谢研究提示二仙汤对提高抗氧化酶活性、减少自由基产物的作用^[10,11],但本方是否能直接对衰老卵巢颗粒细胞具有抗氧化作用,从而改善生殖功能还有待更进一步的研究。本实验选择人卵巢来源的颗粒细胞株 COV434^[12],遵循既往建立的 H_2O_2 诱导 COV434 OS 模型方法^[13],从细胞水平上研究二仙汤对卵巢颗粒细胞的抗氧化作用机制。

材料与方法

1 细胞 人卵巢颗粒细胞株 COV434 (美国 Sigma)。

2 药物、试剂及仪器 DMEM/F12(1:1,批号:11330-032)、北美胎牛血清(批号:16000-044)与胰酶(批号:25200-072)均购于美国 Gibco; PBS(批号:SH30256.01B)、双抗(批号:SV30010)均购于美国 Hyclone 公司,MTT(Sigma,批号:M5655); 3% H_2O_2 内源性内源性过氧化物酶阻断剂(武汉博士德)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号:D00149814,美国 Thermo Pierce);抗体:Bax(批号:D2E11)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2,批号:2876)、GAPDH(批号:2118)、P-JNK(批号:

46685)、NQO-1(批号:3187)、P-p38(批号:4631)、P44/42(批号:137F5)、血红素氧合酶-1(heme oxygenase, HO-1,批号:5853)、Caspase-9(批号:9502)均购于美国 Cell Signaling Technology 公司;化学发光液(美国,California, Bio-Rad 公司)。BUCHI 旋转蒸发仪(广州火元器械有限公司);细胞培养箱(德国 Eppendorf 公司);多功能酶标仪(VICTOR X5,美国 PerkinElmer 公司);凝胶成像系统(XR+,上海 Bio-Rad, Laboratories 有限公司);电泳、转膜装置(美国 Bio-Rad 公司)调速振荡器(HS260, IKA 上海圣科仪器设备有限公司);流式细胞仪(FC500,美国加州 Beckman 公司)。

3 药物制备 二仙汤全方药物配比(淫羊藿:仙茅:巴戟天:当归:黄柏:知母比例为 3:3:3:3:2:2)。水提液制备方法如下:精确称量,置于圆底烧瓶中,加入 10 倍纯水,浸泡 30 min 后,加热煮沸 1 h,6 层纱布过滤。转移滤液,与此循环煎煮 3 次,合并 3 次煎煮过滤的滤液。于旋转蒸发仪上浓缩至生药浓度为 1 g/mL, -20 °C 冰箱保存备用。

4 COV434 OS 模型的建立 在课题组前期基础上^[13],将 COV434 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,37 °C, 5% CO_2 培养箱培养 24 h 后,给予 0、0.3、0.4、0.5、0.8 mmol/L H_2O_2 分别孵育 2、4、6、12、24 h;MTT 法检测 OD 值,并计算细胞增殖抑制率(%),取小于或接近细胞的半数抑制率(IC50)值为续实验所需的 H_2O_2 作用的最佳浓度和时间。

5 MTT 法检测细胞存活率 COV434 细胞用 F12 培养基常规培养,待细胞生长至对数期,消化/计数,每孔接种 1×10^4 个细胞于 96 孔板中,分为空白组,模型组,二仙汤水提液低、中、高剂量组(0.5、1、5 mg/mL)。模型组给予 0.5 mmol/L H_2O_2 作用 2 h,药物干预组是预先给予药物作用 24 h 后,再加入 0.5 mmol/L 的 H_2O_2 作用 2 h。 H_2O_2 作用结束后,96 孔板每孔加入 20 μ L 的 MTT(5 g/L),继续培养 4 h,再 150 μ L DMSO,酶标仪检测各组细胞的 OD 值。空白组细胞生长率为 100%,计算各组的存活率

(%) = (实验组吸光值/对照组吸光值) × 100 %, 设 5 个复孔, 所有试验重复 3 次, 并分析与作图。

6 细胞内活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放量检测 细胞经消化计数后, 接种于 96 孔板, 分组给药处理同 5, 药物处理结束后收集上清液, 按照 LDH 试剂盒检测说明书进行 LDH 的释放量检测。采用荧光探针 DCFH-DA 检测胞内 ROS 的含量, 分组给药处理同 5, H_2O_2 加入作用 1 h 后, 各孔加入终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 继续作用 1 h, 待孵育结束后, 用 PBS 清洗 2 遍, 后用多功能酶标仪检测荧光强度, 激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm。设对照组荧光强度为 100%, 其余各组的荧光强度与对照组相比较, 并计算胞内 ROS 值。

7 流式细胞仪检测二仙汤对 H_2O_2 诱导 COV434 细胞周期及凋亡的影响 取对数生长期的 COV434 细胞, 接种于 6 孔板中, 常规培养。分组给药处理同 5, 药物处理结束后, 收集细胞, 加入 0.5 mL DNA Staining solution 和 5 μL Permeabilization solution, 涡旋震荡 10 s, 室温避光染色孵育 30 min。用流式细胞仪检测不同给药组对 COV434 细胞周期变化情况的影响。

另收集细胞, 用空白管及单染管调节 FSC、SSC 和荧光通道的电压和补偿, 建立细胞凋亡流式测定方法。同周期实验一样, 离心收集细胞。加入 500 μL 1 × Binding buffer 重悬细胞, 每管加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI。混匀, 室温避光孵育 5 min, 进行流式细胞凋亡分析。

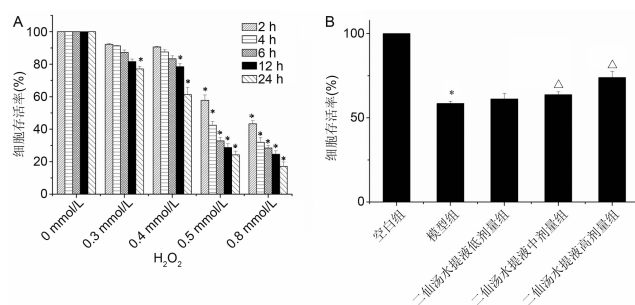
8 Western blot 检测抗氧化及细胞凋亡相关蛋白的表达 分组给药处理同 5, 二仙汤水提液各组于药物作用后及加入 H_2O_2 作用后均检测。具体方法: 加入 60 μL 的 RIPA buffer 用细胞刮将细胞刮下, 提取细胞蛋白质, 此过程在冰上操作。BCA 法测定细胞总蛋白的浓度。取 20 μg 上样, 并加入 Mark, 经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, BSA 封闭, 加入一抗 HO-1、NQO-1、P-JNK、P-44/42、P-p38、Bax、Bcl-2、Caspase-9, -4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用 1 × TBST 洗膜 3 次, 室温下孵育二抗 2 h, 吸出二抗, 加入 1 × TBST 溶液洗膜 3 次, 用镊子小心将膜从孵育盒中取出, 蛋白面朝上置于凝胶成像系统中, 将预先 (A:B = 1:1) 混匀的化学发光液滴在孵好抗体的 PVDF 膜上, 开始曝光, 曝光后予以 Image Lab 进行数据处理分析灰度值。

9 统计学方法 实验数据录入后采用 Ori-

gin8.5 作图, 用 SPSS 19 进行统计学分析, 当满足正态性及方差齐性时, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)、两两比较采用 t 检验; 若不足, 则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

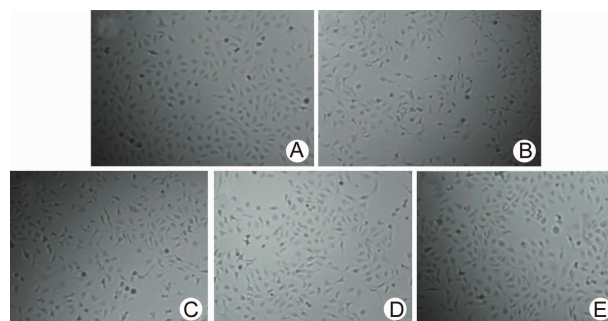
1 各组细胞存活率比较 (图 1) MTT 试验结果显示: H_2O_2 能抑制体外 COV434 细胞的增殖, 不同浓度 (0.3、0.4、0.5、0.8 mmol/L) 的 H_2O_2 作于 COV434 后, 表现为浓度 - 时间依赖性的抑制细胞生长 ($P < 0.01$), 其中 H_2O_2 的浓度是主要因素 (图 1A)。 H_2O_2 浓度为 0.5 mmol/L 作用 2 h 时, 细胞的抑制率为 $(42.2 \pm 3.3)\%$, 最接近细胞的半数抑制率 (IC_{50}), 选取 0.5 mmol/L H_2O_2 作用细胞 2 h 作为后续实验浓度及时间。与空白组比较, 模型组细胞存活率下降 ($P < 0.01$), 而二仙汤水提液中、高剂量组细胞存活率较模型组升高 ($P < 0.05$)。



注: A 为 H_2O_2 对 COV434 细胞增殖抑制作用; B 为各组细胞存活率比较; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 1 细胞增殖抑制作用及各组细胞存活率比较

2 各组细胞形态学比较 (图 2) 空白组细胞正常贴壁生长, 细胞形态较一致, H_2O_2 处理组大部分非正常细胞, 形态由仅圆形变为不规则长形, 细胞发生固缩

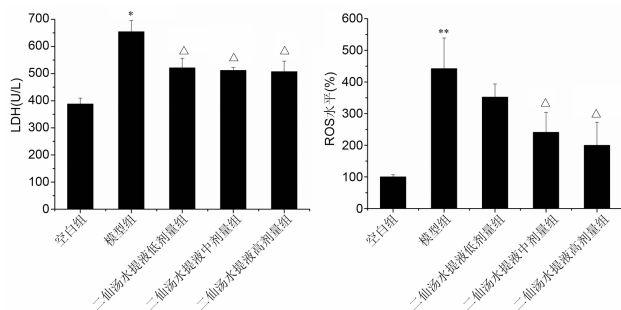


注: A 为空白组; B 为模型组; C 为二仙汤水提液低剂量组; D 为二仙汤水提液中剂量组; E 为二仙汤水提液高剂量组

图 2 各组细胞形态学比较 ($\times 80$)

而凋亡,细胞间隙变大,分界清晰。二仙汤干预组细胞状态均较 H_2O_2 单独处理组好,脱离、悬浮细胞减少,细胞间桥结构减少,其中二仙汤水提液高剂量组细胞接近于空白组细胞形态。

3 各组 ROS 及 LDH 释放量比较(图 3) 与空白组比较,模型组 ROS 及 LDH 释放量增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,二仙汤水提液低、中、高剂量组 LDH 释放量降低,二仙汤水提液中、高剂量组 ROS 释放量降低(均 $P < 0.05$)。



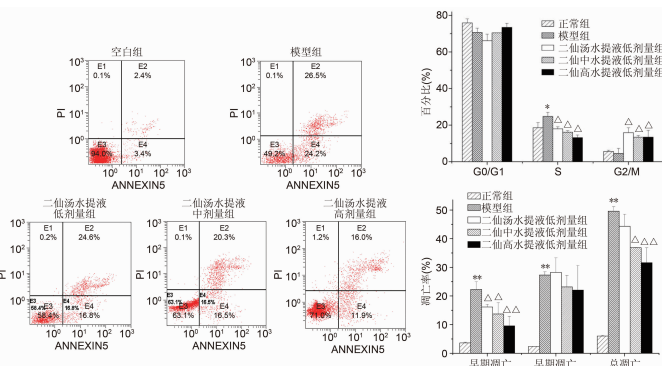
注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较,

$^{\Delta}P < 0.05$

图 3 各组 ROS 及 LDH 释放量比较

4 各组 COV434 周期及凋亡结果比较(图 4) 与空白组比较,模型组 S 期百分率显著升高($P < 0.05$),G0/G1 期及 G2/M 期差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,二仙汤水提液低、中、高剂量组 S 期百分率降低,G2/M 期百分率升高($P < 0.05$),增殖指数(proliferation index, PI%)显著升高。

与空白组比较,模型组细胞早期凋亡、晚期凋亡及总凋亡比例显著增高($P < 0.01$)。与模型组比较,二仙汤水提液低剂量组早期凋亡比例降低,二仙汤水提液中、高剂量组早期凋亡及总凋亡比例降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

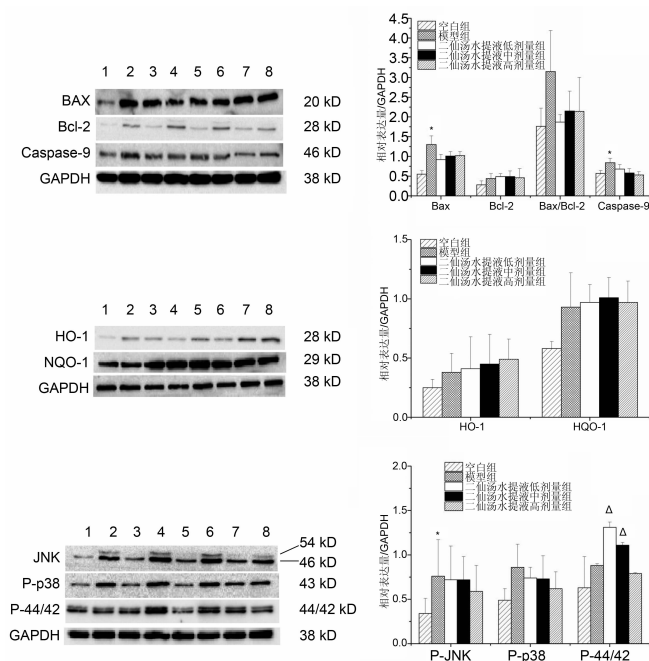


注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较,

$^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

图 4 各组 COV434 细胞周期及凋亡比较

5 各组 HO-1、NQO-1、P-JNK、P-44/42、P-p38、Bax、Bcl-2、Caspase-9 蛋白表达比较(图 5) 与空白组比较,模型组 Bax、Caspase-9 及 P-JNK 蛋白表达升高($P < 0.05$),HO-1、NQO-1、P-44/42、P-p38、Bcl-2 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,二仙汤水提液低、中剂量组 P-44/42 蛋白表达升高($P < 0.05$)。其余各组各蛋白比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:1 为空白组;2 为模型组;3 为二仙汤低剂量组;4 为二仙汤低剂量组(H_2O_2 作用后);5 为二仙汤中剂量组;6 为二仙汤中剂量组(H_2O_2 作用后);7 为二仙汤高剂量组;8 为二仙汤高剂量组(H_2O_2 作用后);与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

图 5 各组 COV434 细胞 HO-1、NQO-1、P-JNK、P-44/42、P-p38、Bax、Bcl-2、Caspase-9 蛋白表达比较($n = 3$)

讨 论

在人体正常发育生长的卵泡环境中,ROS 的产生与卵泡内抗氧化体系之间保持着动态平衡,当有害试剂、重金属环境等因素刺激时,便会产生 OS,进而诱导颗粒细胞、卵母细胞发生凋亡^[14]。在本课题组前期研究基础上^[13],本实验采用 0.5 mmol/L 的 H_2O_2 引起了 COV434 细胞损伤,表现为细胞内 ROS 及 LDH 的释放增加,细胞活力降低及凋亡率增加,进而导致 COV434 的 DNA、蛋白质等氧化损伤,最终导致了细胞的凋亡。

二仙汤由巴戟天、淫羊藿、仙茅、知母、黄柏及当归组成,以补肾阳的淫羊藿、仙茅为君药;温肾阳的巴戟

天为臣药;佐以知母、黄柏滋阴存阴;补血活血的当归为使药^[15]。艾浩等^[16]探讨了二仙汤对顺铂损伤后小鼠卵巢功能的调节作用,结果提示二仙汤可通过抑制氧化损伤作用,改善卵泡和颗粒细胞功能状态,提升卵巢功能。刘波等^[17]研究也提示二仙汤可能具有抗 OS 的作用。基于此,本实验选用氧化剂 H_2O_2 诱导氧化应激模型,展开了二仙汤的抗氧化作用的实验,本实验给予 0.5 ~ 5 mg/mL 的二仙汤水提液干预 24 h 后,COV434 的细胞活力显著增加,凋亡率显著下降,二仙汤不仅降低 H_2O_2 引起的 COV434 细胞 ROS 和 LDH 水平上升,还影响了 H_2O_2 诱导的细胞内 MAPK-Nrf2 及线粒体相关凋亡蛋白的改变。

MAPK 信号通路是许多转录因子活性重要的上游调控者,参与着细胞增殖,分化和凋亡等过程^[18]。研究的最多的为 ERK、JNK 和 P-p38 信号通路。文献研究表明,当细胞处于应激状态下,ERK (P-44/42) 通路发挥着抑制细胞凋亡的作用,而 JNK 和 P-p38 通路则主要参与细胞的应激反应、促进细胞凋亡^[19,20]。在本实验结果中,可以发现在 H_2O_2 组中 ERK、JNK 和 P-p38 信号通路的激活,表现为与对照组相比的 P-44/42、P-JNK 和 P-p38 蛋白的表达量增加,与 H_2O_2 组相比,经二仙汤处理后,P-JNK 和 P-p38 蛋白的表达量呈下降趋势,但 P-44/42 的表达量显著上调,由此可见,MAPK 信号通路参与了二仙汤对 H_2O_2 诱导的细胞凋亡的抑制作用。而大量研究发现认为 ERK、JNK 或 P-p38 的激活的程度和时间长短直接影响了 Nrf2 信号通路的激活水平^[21,22]。Nrf2-ARE 是迄今为止最为重要的抗氧化应激通路,表现在 Nrf2 及其调控的抗氧化基因 NQO-1、HO-1 蛋白水平的增加。在本实验结果中,二仙汤处理后,显著上调了 NQO-1 的蛋白表达,HO-1 的表达也呈上调趋势。提示当 H_2O_2 诱导细胞过氧化、自由基浓度过高时,机体会直接或间接通过 MAPK 信号通路激活 Nrf2 信号通路,使其下游调控的 NQO-1、HO-1 核转位增加,来抵消 ROS 和氧化损伤。

卵巢颗粒细胞凋亡主要分为途径线粒体途径和死亡受体途径。而多项体外研究表明,当 H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤中,细胞凋亡主要通过线粒体途径,并且 Bax 无论是在转录水平还是在蛋白水平的表达都是上调的,而 Bax/Bcl-2 的比值与凋亡细胞的比例呈正相关^[23-25]。本实验就对此一作用的可能机制进行探讨,结果发现,单纯 H_2O_2 损伤组 Bax、Bax/Bcl-2 及 Caspase-9 的表达明显升高,但随着二仙汤的干预而明显受到抑制,其作用呈一定的剂量依赖性。提示二

仙汤对 H_2O_2 诱导的 COV434 细胞凋亡的抑制可能通过抑制线粒体凋亡蛋白来完成。

综上所述,本研究通过 H_2O_2 诱导建立氧化损伤和凋亡离体研究模型,对二仙汤抑制 H_2O_2 诱导的 COV434 氧化损伤和凋亡作用及相关的可能机制进行了系统的研究,发现二仙汤对 COV434 细胞的保护作用主要是通过减少 ROS 的生成,保护细胞内抗氧化、抗凋亡系统。其中 Nrf2、MAPK 信号通路以及调控线粒体依赖的 Bax/Bcl-2、Caspase-9 家族参与了二仙汤抑制 H_2O_2 诱导的氧化应激过程。

利益冲突:本研究与其他基金项目 and 机构无利益冲突,作者之间、作者署名排序均无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] González F, Sia CL, Shepard MK, et al. Hyperglycemia-induced oxidative stress is independent of excess abdominal adiposity in normal-weight women with polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod, 2012, 27(12): 3560-3568.
- [2] Devine PJ, Perreault SD, Luderer U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity[J]. Biol Reprod, 2012, 86(2): 27.
- [3] Karuputhula NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, et al. Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF[J]. Syst Biol Reprod Med, 2013, 59(2): 91-98.
- [4] Tsai-Turton M, Luderer U. Opposing effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles[J]. Endocrinology, 2006, 147(3): 1224-1236.
- [5] Kumar M, Pathak D, Venkatesh S, et al. Chromosomal abnormalities & oxidative stress in women with premature ovarian failure (POF)[J]. Indian J Med Res, 2012, 135(1): 92-97.
- [6] Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(6): 749-762.
- [7] 刘永胜,赵丽慧. 二仙汤的研究及临床应用[J]. 光明中医, 2010, 25(4): 741-742.
- [8] Zhong LL, Tong Y, Tang GW, et al. A randomized, double-blind, controlled trial of a Chinese herbal formula (Er-Xian decoction) for menopausal symptoms in Hong Kong premenopausal women[J]. Menopause, 2013, 20(7): 767-776.
- [9] 缪正来主编. 实用方剂学辞典[M]. 南京: 江苏科技出版社, 1989: 4.

- [10] 沈小珩, 方肇勤, 吴敦序, 等. 二仙汤及其拆方对老年大鼠自由基代谢作用的实验研究[J]. 上海中医药杂志, 1996, 30(3): 40–42.
- [11] 沈小瑜, 方肇勤, 张伯讷, 等. 二仙汤及其拆方对老年大鼠部分抗氧化酶活性及其基因表达水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(11): 672–674.
- [12] Tsai-Turton M, Luong BT, Tan Y, et al. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion[J]. Toxicol Sci, 2007, 98(1): 216–230.
- [13] 刘建, 聂广宁, 杨洪艳. 过氧化氢诱导人卵巢颗粒细胞氧化应激模型的建立[J]. 广东医学, 2017, 38(7): 986–989.
- [14] Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, et al. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development[J]. J Assist Reprod Genet, 2007, 24(2): 91–97.
- [15] 王长海, 张仲海, 马静. 二仙汤治疗骨质疏松症 50 例[J]. 陕西中医, 1998, 19(5): 205.
- [16] 艾浩, 张海英, 张玉立, 等. 二仙汤对顺铂损伤后小鼠卵巢功能调节作用研究[J]. 天津中医药, 2013, 30(5): 298–300.
- [17] 刘波, 陈明, 李姗姗, 等. 二仙汤对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(2): 129–132.
- [18] Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells[J]. Cell Res, 2002, 12(1): 9–18.
- [19] Aggeli IK, Gaitanaki C, Beis I. Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H_2O_2 -induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells[J]. Cell Signal, 2006, 18(10): 1801–1812.
- [20] Liu AL, Wang XW, Liu AH. JNK and p38 were involved in hypoxia and reoxygenation-induced apoptosis of cultured rat cerebellar granule neurons[J]. Exp Toxicol Pathol, 2009 61(2): 137–143.
- [21] Park EJ, Kim YM, Park SW, et al. Induction of HO-1 through p38 MAPK/Nrf2 signaling pathway by ethanol extract of Inula helenium L. reduces inflammation in LPS-activated RAW 264.7 cells and CLP-induced septic mice[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 55: 386–395.
- [22] Sun Z, Huang Z, Zhang DD. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by map kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response[J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6588.
- [23] Liu X, Zhang J, Wang S, et al. Astragaloside IV attenuates the H_2O_2 -induced apoptosis of neuronal cells by inhibiting α -synuclein expression via the p38 MAPK pathway[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(6): 1772–1780.
- [24] Huang Y, Ma T, Ye Z, et al. Carbon monoxide (CO) inhibits hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced oxidative stress and the activation of NF- κ B signaling in lens epithelial cells[J]. Exp Eye Res, 2017, 166: 29–39.
- [25] Heo J, Lee BR, Koh JW. Protective effects of epigallocatechin gallate after UV irradiation of cultured human lens epithelial cells[J]. Korean J Ophthalmol, 2008, 22(3): 183–186.

(收稿: 2017–11–27 在线: 2019–03–07)

责任编辑: 汤 静