

麻欠精油对脂多糖诱导的 THP-1 细胞氧化应激的影响

甘小青^{1,2} 郭娟¹ 张红霞³ 杜芝芝³ 张萍^{1*}¹中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源可持续利用重点实验室, 西双版纳 666303;²中国科学院研究生院, 北京 100049; ³中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650201

摘要: 本研究主要探讨麻欠精油对脂多糖(LPS)诱导的 THP-1 细胞氧化应激的影响。溶剂对照、地塞米松或不同浓度的麻欠精油预处理 THP-1 细胞后,再用 LPS 培养 24 h,用 DCFH-DA 荧光探针标记细胞后流式检测细胞内活性氧 ROS;用 FITC Annexin V/PI 双染法流式检测细胞凋亡;用 Griess 试剂测定 NO;用比色法检测总超氧化物歧化酶(SOD);用 Western Blot 法检测 NADPH p47 phox 的表达。结果发现麻欠精油处理组与溶剂对照组相比,LPS 诱导的 ROS 和 NO 水平显著降低、SOD 水平显著增加、NADPH p47 phox 蛋白表达减低,细胞凋亡降低。以上实验结果表明麻欠精油对 LPS 诱导的 THP-1 细胞的氧化应激有明显抑制作用并对细胞凋亡有保护作用。

关键词: 麻欠精油; THP-1; 氧化应激; 细胞凋亡

中图分类号: R967

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.6.004

Effect of Maqian (*Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens* Huang) Essential Oil on Oxidative Stress in THP-1 Cells Stimulated by LPSGAN Xiao-qing^{1,2}, GUO Juan¹, ZHANG Hong-xia³, DU Zhi-zhi³, ZHANG Ping^{1*}¹Key Laboratory of Tropical Plant Resources and sustainable Use, Xishuangbanna Tropical BotanicalGarden, Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna 666303, China; ²University of ChineseAcademy of Science, Beijing 10049, China; ³Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: In this study, the effect of Maqian (*Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens* Huang) essential oil (MQEO) on oxidative stress in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated THP-1 cells was investigated. Cells were pretreated with vehicle, Dex or different doses of MQEO, and then cultured with LPS for 24 h. The intracellular reactive oxygen species (ROS) were determined by staining the cells with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) followed by flow cytometry analysis. Cells were stained with Annexin V-FITC/PI and assayed for apoptosis by flow cytometry. NO was determined by Griess reagent method. Cell lysates were prepared and assayed for the activity of intracellular superoxide dismutase (SOD) by a colorimetric method and the expression of p47 phox (the cytoplasmic subunit of NADPH oxidase) by western blotting. The results showed that, compared with cells treated with vehicles, cells treated with MQEO exhibited significantly reduced LPS-stimulated ROS and NO production in a concentration-dependent manner. In addition, cells treated with MQEO showed significantly less LPS-induced decrease in SOD activity as well as the increase of expression of cytoplasmic subunit of NADPH oxidase (p47 phox). Furthermore, cells treated MQEO exhibited markedly reduced LPS-stimulated apoptosis. Collectively, these findings suggested that MQEO had the ability to suppress oxidative stress in LPS-stimulated THP-1 cells and protect cells from apoptosis. MQEO had the potential application for the prevention and treatment of various diseases related to oxidative stress.

Key words: Maqian essential oil; THP-1; oxidative stress; apoptosis

麻欠 [*Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens* Huang], 又名毛大叶臭花椒, 芸香科花椒属植物。

因其果实具有特殊的柠檬香气, 在西双版纳地区被广泛用作食用香料。另外, 当地居民也将其用于通气除寒、消肿止痛、毒虫咬伤以及肠道疾病等。从麻欠果实中提取的麻欠精油 (Maqian essential oil, MQEO), GC-MS 和 GC-FID 分析显示其含有 D-柠檬烯为主的多种萜类成分。研究表明富含柠檬烯的柠

收稿日期: 2016-03-08 接受日期: 2016-04-29

基金项目: 中国科学院百人计划 (Y3ZK101B01)

* 通讯作者 Tel: 86-018313223296; E-mail: zhangping@xtbg.org.cn

檬精油具有抗氧化活性^[1];另外,D-柠檬烯在链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠中也显示抗氧化作用^[2]。因此我们猜想麻欠精油亦应具有抗氧化活性。

研究发现,不仅体内多种代谢产物,如氧化的低密度脂蛋白、7-酮胆固醇、5-氨基乙酰丙酸等^[3-5]能引起 THP-1 细胞氧化应激反应及凋亡,而且环境中的有害因素如环境污染和吸烟释放的巴豆醛^[6],以及新型材料如石墨烯量子点^[7]也都能引起 THP-1 细胞氧化应激反应和凋亡,最终导致肺癌、动脉粥样硬化等多种疾病的发生。所以利用 THP-1 细胞研究氧化应激为寻求天然产物对于这类疾病的治疗作用提供了一种有价值的评价模型。本研究利用 LPS 刺激的 THP-1 细胞模型初步探讨麻欠精油对氧化应激的影响。

1 材料与试剂

1.1 细胞株

人急性单核白血病细胞系 THP-1 (ATCC Number: TIB-202TM) 细胞购于中科院典型培养物保藏中心昆明细胞库。

1.2 主要试剂及仪器

脂多糖(LPS)、地塞米松(Dex)、2',7'-二氢二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)、PMA、DMSO(Sigma 公司);RPMI 1640、胎牛血清(Gibco 公司);青/链霉素双抗(P/S)(Hyclone 公司);NO 检测试剂盒(Griess Reagent System)(Promega 公司);总超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司);FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I(BD 公司);兔抗人 p47 phox 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(Cell signaling Technology 公司);兔抗人 β -actin 抗体(Proteintech 公司);ECL 显色试剂盒(Millipore 公司)。7890A-5975C 气相色谱质谱联用仪(Agilent Technologies, 美国);流式细胞仪(BD FACSVerse, 美国);高速冷冻离心机(Eppendorf 5810R, 德国);多功能酶标仪(Thermo scientific, 美国);凝胶成像系统(Bio-rad, 美国)。

2 实验方法

2.1 麻欠精油(MQEO)提取及成分测定

麻欠果实采自西双版纳勐旺乡,干燥粉碎后用水蒸气蒸馏法提取精油,挥发性成分用 GC-FID 和 GC-MS 进行分析。

色谱条件:色谱柱:Agilent 19091J-415, HP-5 (5% Phenyl Methyl Siloxan, 50 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.52 μ m);经过色谱柱分离的组分通过分流器按一定比例分流至质谱检测器(MSD)和 FID 检测器。进样口温度:250 $^{\circ}$ C;进样量:1 μ L;分流比 20:1;进样口压力:102.28 kPa;程序升温:50 ~ 100 $^{\circ}$ C, 2 $^{\circ}$ C/min; 100 $^{\circ}$ C, 20 min; 100 ~ 250 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C/min; FID(氢火焰离子化检测器)温度:250 $^{\circ}$ C;载气:高纯 He($\geq$ 99.999%) 流速:2.2 mL/min。

质谱条件:电离方式:EI;电子能力 70 eV;MSD 传输线温度:280 $^{\circ}$ C;离子源温度:230 $^{\circ}$ C;四级杆温度:150 $^{\circ}$ C;扫描范围:55 ~ 550。

定量方法:数据用 MSD 化学工作站进行分析,采用峰面积归一化法进行相对定量。精油中化合物的鉴定是通过其质谱碎片与数据库(NIST 08)中的质谱进行比较,并与数据库或文献报道的保留指数(RIs)进行对比。化合物的保留指数(RI)是通过与正构烷烃(n-alkanes C₈-C₃₀)的相对保留时间计算而来。

2.2 细胞培养

用 RPMI 1640 培养基[含 10% 胎牛血清(FBS),含青霉素、链霉素各 1000 U/L]培养细胞。将细胞置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中进行传代培养,并取长至对数生长期的细胞用于试验。通过预实验发现用 DMSO 溶解麻欠精油至不同浓度(v/v, 0.01‰、0.02‰、0.04‰、0.05‰、0.06‰、0.08‰)处理细胞 24 h 后,0.06‰及以上浓度的麻欠精油对细胞有毒性,而 0.06‰以下浓度对细胞活力无影响,所以后续实验使用的精油浓度为 0.01‰ ~ 0.05‰(v/v)。同样浓度的 DMSO 用于后面所有实验溶剂对照组。

2.3 活性氧(ROS)检测

将处于对数生长期的 THP-1 细胞按 1×10^6 个/mL 接种于 24 孔板中,1 mL 每孔,设置阴性对照组, LPS + 溶剂对照组(简称 LPS 组), LPS + 阳性对照组(Dex)以及 LPS + 药物处理组,每组 3 个平行。分别用 5 μ M Dex 及不同浓度的麻欠精油(v/v, 0.01‰、0.02‰、0.04‰、0.05‰)预处理细胞 30 min,之后 LPS 组与给药组均用 1 μ g/mL LPS 刺激细胞 3 h。离心收集细胞,用 DCFH-DA 染色 30 min 后用 PBS 洗掉未结合的探针,最后将细胞重悬于流式管中,用流式细胞仪检测。

2.4 一氧化氮(NO)含量检测

将处于对数生长期的 THP-1 细胞按 1×10^6 个/mL 接种于 24 孔板中, 设置阴性对照组, LPS 组及 LPS + 药物处理组, 每组 3 个平行。首先加入 PMA 培养细胞 72 h, 然后用不同浓度的麻欠精油 (v/v, 0.01%、0.02%、0.04%、0.05%) 预处理细胞 30 min。之后 LPS 组与给药组均用 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 刺激细胞 24 h。离心收集上清, 按照 Griess 试剂盒操作说明检测上清中 NO 含量。

2.5 总 SOD 检测

将处于对数生长期的 THP-1 细胞按 1×10^6 个/mL 接种于 24 孔板中, 1 mL 每孔, 设置阴性对照组, LPS 组及 LPS + 药物处理组, 每组 3 个平行。分别用不同浓度的麻欠精油 (v/v, 0.01%、0.02%、0.04%、0.05%) 预处理细胞 30 min, 之后 LPS 组与给药组均用 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 刺激细胞 3 h。离心收集细胞, 用 PBS 洗 3 次后收集细胞, 用玻璃匀浆器裂解细胞提蛋白, 然后离心收集裂解液。经 BCA 法测定蛋白浓度, 然后按照碧云天总超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒操作说明书检测总 SOD 活性。

2.6 Western Blot 检测

将对数生长期的 THP-1 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 24 孔培养板中, 分别用不同浓度的麻欠精油

(v/v 0.01%、0.02%、0.04%、0.05%) 预处理细胞 30 min, 之后用 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 刺激细胞 30 min。离心收集细胞, 用细胞裂解缓冲液 (RIPA 及蛋白酶抑制剂) 冰上裂解细胞 30 min 后收集裂解液, 4°C 离心提取蛋白。经 BCA 法测定蛋白浓度后, 用沸水浴煮蛋白 10 min, 然后进行蛋白上样电泳, 蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳 (浓缩胶 60 V 约 30 min, 分离胶 100 V 约 1 h 30 min), 然后转移到 PVDF 膜上 (4°C 200 mA 转移 2 h), 然后用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 PVDF 膜 1 h, 再用兔抗人 p47 phox 抗体 (1:1000) 孵育 4°C 过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:2000) 室温孵育 1 h, 然后进行 ECL 显影, 最后用凝胶成像系统曝光检测。以 β -actin 作为内参, 半定量分析蛋白的表达水平。

2.7 细胞凋亡检测

将处于对数生长期的 THP-1 细胞按 1×10^6 个/mL 接种于 24 孔板中, 1 mL 每孔, 设置阴性对照组, LPS 组及 LPS + 药物处理组, 每组 3 个平行。分别用不同浓度的麻欠精油 (v/v, 0.01%、0.02%、0.04%、0.05%) 预处理细胞 30 min, 之后 LPS 组与给药组均用 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 刺激细胞 12 h。离心收集细胞, 预冷的 PBS 洗细胞一次后按照 BD 公司 FITC

表 1 麻欠果实精油成分及含量

Table 1 Composition and contents of Maqian essential oil from its fruits

序号 No.	保留时间 RT	保留指数 RI (cal) ^a	保留指数 RI (lit) ^b	化合物 ^c Compound ^c	百分含量 ^d Content (%) ^d
1	17.831	881	—	1,3-dimethyl-Benzene(间二甲苯)	—
2	22.38	938	939	α -Pinene(α -蒎烯)	6.53
3	26.369	992	979	β -Pinene(β -蒎烯)	3.70
4	27.822	1008	1002	α -Phellandrene(α -水芹烯)	25.09
5	28.337	1013	1011	3-Carene(3-萜烯)	0.55
6	29.601	1024	1026	<i>O</i> -Cymene(邻伞花烃)	2.91
7	30.134	1029	1029	D-Limonene(D-柠檬烯)	25.34
8	30.248	1030	1029	β -Phellandrene(β -水芹烯)	20.05
9	30.528	1033	1037	cis- β -Ocimene(顺式- β -罗勒烯)	2.98
10	31.667	1044	1050	trans- β -Ocimene(反式- β -罗勒烯)	5.91
11	49.605	1197	1188	α -Terpineol(α -松油醇)	0.46
12	50.315	1208	1201	n-Decanal(正葵醛)	0.73
13	50.572	1214	—	Acetic acid octyl ester(乙酸辛酯)	0.63

注: RI(cal)^a: 线性保留指数; RI(lit)^b: 参考 RI 值; c: 化合物鉴定: MS, NIST08 质谱数据库用于比较质谱相似度。

Note: RI(cal)^a: Linear retention index; RI(lit)^b: Reference value RI; C: Compound identification: MS, NIST08 MS spectrometry database for comparing similarity.

Annexin V Apoptosis Detection Kit I 试剂盒操作说明书进行 FITC Annexin V/PI 双染色, 室温避光孵育 30 min, 最后收集细胞重悬于流式管中进行流式检测。

2.8 数据分析

实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析以及用 GraphPad Prism 5.0 软件进行图像处理。应用 One-way ANOVA 及 Dunnett's *t*-test 检验进行显著性分析, 数据用 Mean $\pm$ SD 表示, $P < 0.05$ 即为差异显著。

3 结果与分析

3.1 麻欠果实精油的提取结果

麻欠果实精油成分如表 1 所示, 共检测出 12 种

化合物, 其中含量最高的是柠檬烯、 β -水芹烯、 α -水芹烯, 这三种成分都在 20% 以上。另外, 含量 3% 的成分有反式- β -罗勒烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯等, 其余成分均在 3% 以下。

3.2 麻欠精油对 LPS 刺激 THP-1 细胞活性氧 ROS 增加的影响

对 ROS 的影响由图 1 所示, 细胞在未受到刺激时会产生一定量的 ROS, 而与未受刺激组相比, LPS 作用 3 h 后的 THP-1 细胞内 ROS 水平明显上升, 而加入麻欠精油预处理 30 min 的实验组与 LPS 组相比, 细胞内的 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$), 并有剂量依赖性关系。其中浓度为 0.05% 的麻欠精油几乎完全抑制 LPS 刺激的 ROS 的增加, 而阳性对照 Dex 处理组效果远不如 0.05% 的麻欠精油处理组。

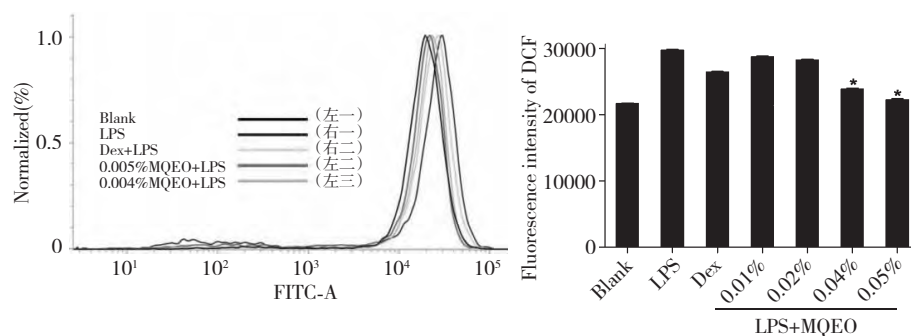


图 1 麻欠精油对 LPS 诱导的 THP-1 细胞产生 ROS 的影响

Fig. 1 Effect of MQEO on ROS level in THP-1 cells stimulated by LPS

注: A: 流式细胞仪检测结果; B: 与 LPS 组相比, * $P < 0.05$ 。

Note: A: The flow cytometry analysis result; B: Compared with LPS group. * $P < 0.05$.

3.3 麻欠精油对 LPS 诱导 THP-1 细胞产生 NO 的影响

如图 2 所示, 经 PMA 分化的 THP-1 细胞中, 在

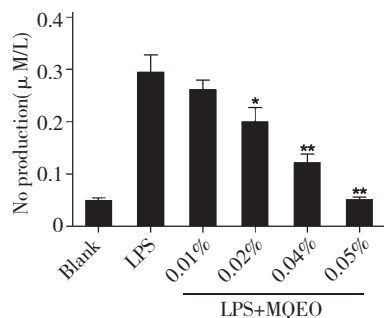


图 2 麻欠精油对 LPS 诱导 THP-1 细胞产生 NO 的影响

Fig. 2 Effect of MQEO on NO production in THP-1 cells stimulated by LPS

注: 与 LPS 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with LPS group. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

LPS 作用 24 h 后, 与未刺激组相比 NO 的产量明显升高, 加入麻欠精油预处理的实验组 NO 的产量较 LPS 组显著降低 ($P < 0.05$), 而且降低程度依赖于麻欠精油剂量。其中浓度为 0.05% 的麻欠精油几乎完全抑制 LPS 刺激的 NO 的增加。

3.4 麻欠精油对 LPS 诱导的 THP-1 细胞总 SOD 的影响

如图 3 所示, LPS 作用后, 与未刺激组相比细胞内总 SOD 活性水平显著降低 ($P < 0.01$), 而加入麻欠精油预处理的实验组, 随着麻欠精油浓度的增加, 细胞内总 SOD 活性水平上升。高浓度 (0.04% ~ 0.05% v/v) 的麻欠精油可基本恢复 SOD 活性到未刺激细胞的 SOD 活性水平。

3.5 麻欠精油对 LPS 诱导的 NADPH 氧化酶 (Nox) 胞质亚基 p47 phox 表达的影响

Western blot 检测结果如图 4 所示, 未受 LPS 刺

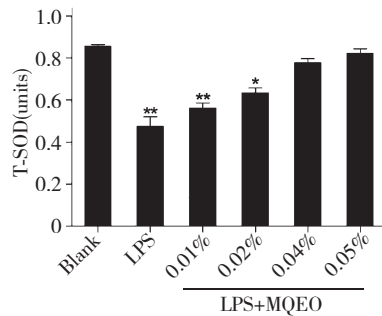


图3 麻欠精油对 LPS 诱导 THP-1 细胞总 SOD 活性水平的影响

Fig. 3 Effect of MQEO on SOD activity in THP-1 cells stimulated by LPS

注: 与未刺激组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

激的细胞表达一定水平的 Nox, LPS 刺激后, Nox 胞质亚基 p47 phox 表达较未刺激组相比明显增加, 而加入麻欠精油的处理组能显著抑制 p47 phox 的表达, 且呈现剂量依赖效果, 其中浓度为 (0.04%, 0.05% v/v) 的麻欠精油几乎能够完全抑制 LPS 刺激的 Nox 胞质亚基 p47 phox 的增加。

3.6 麻欠精油对 LPS 诱导的 THP-1 细胞凋亡的影响

如图 5 所示, LPS 作用后与未刺激组相比, 晚期细胞凋亡率明显增多, 加入麻欠精油预处理 30 min

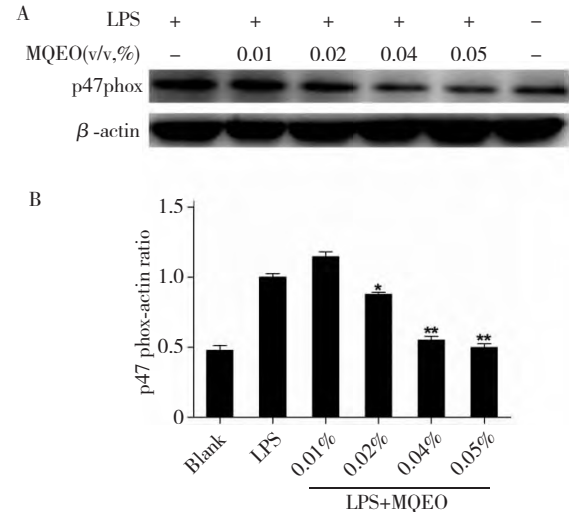


图4 麻欠精油对 LPS 诱导 THP-1 细胞 NADPH 氧化酶胞质亚基 p47 phox 表达的影响

Fig. 4 Effect of MQEO on p47 phox expression of THP-1 cells stimulated by LPS

注: A: Western Blot 检测结果; B: 与 LPS 组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Note: A: The western blot analysis result; B: Compared with LPS group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

的处理组较 LPS 相比, 晚期细胞凋亡率随着麻欠精油浓度的增加逐渐减少。当麻欠精油的浓度为 0.05% 时, 与 LPS 组对比, 晚期细胞凋亡率由 89.09%

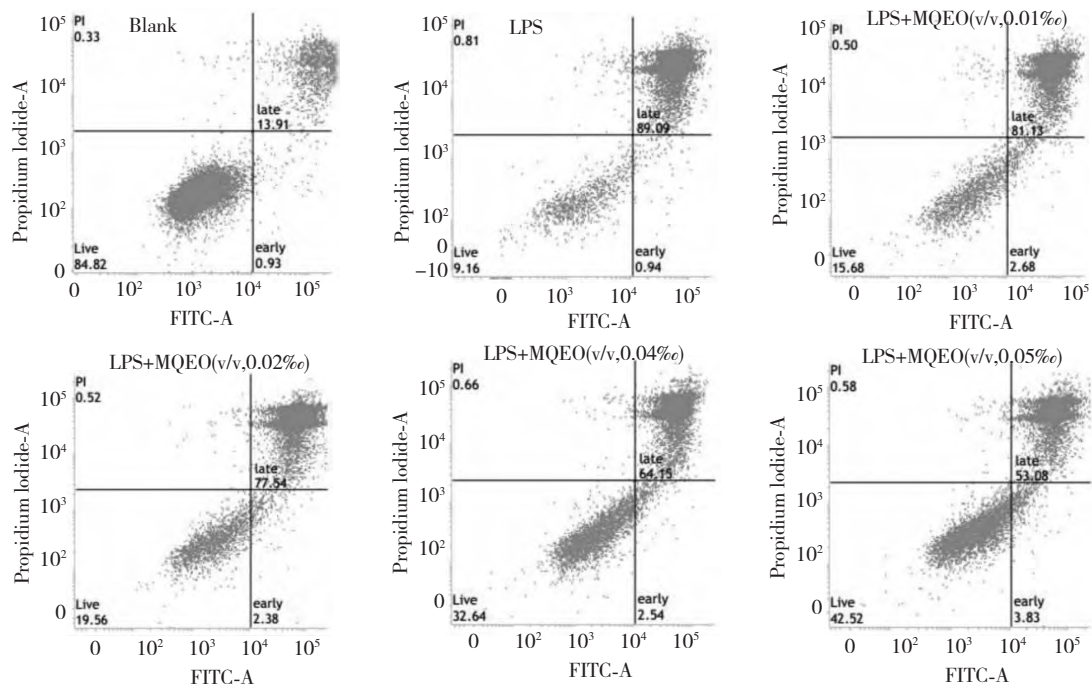


图5 麻欠精油对 LPS 诱导 THP-1 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of MQEO on cell apoptosis on THP-1 cells stimulated by LPS

下降到 53.08% ,说明麻欠精油对 LPS 诱导的细胞凋亡有明显的抑制作用。表明麻欠精油可减缓细胞死亡过程。

4 讨论与结论

研究表明氧化应激参与了多种疾病的发生发展,如糖尿病^[8]、心血管疾病^[9]、血液系统疾病^[10,11]以及眼表疾病^[12]等。很多天然产物,如从中草药沙棘中提取的异鼠李素等多种黄酮类化合物、以及从仙人掌果实中提取出的梨果仙人掌黄质等都可以抑制 THP-1 细胞氧化应激以及凋亡^[3,4,13],从而对多种与氧化应激相关疾病的治疗显示了积极作用。因此,通过抑制氧化应激是天然产物治疗各种与氧化应激相关疾病的一条有效途径^[14,15]。本实验研究结果显示,麻欠精油能够剂量依赖性地降低由 LPS 诱导的 ROS 及 NO 水平的升高。SOD 是细胞内一种重要的抗氧化酶,它能清除过量的自由基,麻欠精油能显著恢复由 LPS 诱导的 SOD 活性水平的降低。体内的 ROS 主要由 NADPH 氧化酶催化产生,麻欠精油通过抑制 NADPH 氧化酶胞质亚基 p47 phox 的表达来抑制 ROS 的产生。最后发现,麻欠精油还能抑制氧化应激引起的 THP-1 细胞凋亡。

综上所述,我们得出麻欠精油能抑制 LPS 刺激的 THP-1 细胞氧化应激反应并且能减缓细胞由于氧化应激反应引起的凋亡过程。本研究显示了麻欠精油具有优异的抗氧化作用。可以推断,麻欠精油可能对多种与氧化应激密切相关疾病的治疗有很好的作用。麻欠精油在体内的抗氧化作用及作用机制还需要进一步研究。

致谢:部分实验的测定在中国科学院西双版纳热带植物园中心实验室完成,对中心实验室工作人员表示由衷的感谢。

参考文献

- Chen SJ (陈思佳), Liu YL (刘雅丽), Zhang C (张晨). Antioxidant activity of lemon essential oil. *J Pract Stomatol* (实用口腔医学杂志) 2015 31: 343-346.
- Murali R, Karthikeyan A, Saravanan R. Protective effects of D-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Basic Clinic Pharmacol Toxicol* 2013 112: 175-181.
- Luo Y, Sun GB, Dong X, et al. Isorhamnetin attenuates atherosclerosis by inhibiting macrophage apoptosis via PI3K/AKT activation and HO-1 induction. *Plos One* 2015 10(3): 1-19.
- Tesoriere L, Attanzio A, Allegra M, et al. Phytochemical indicaxanthin suppresses 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis by preventing cytosolic Ca^{2+} increase and oxidative stress. *British J Nutr* 2013 110: 230-240.
- Chen HB, Gao WW, Yang Y, et al. Inhibition of VDAC1 prevents Ca^{2+} mediated oxidative stress and apoptosis induced by 5-aminolevulinic acid mediated sonodynamic therapy in THP-1 macrophages. *Apoptosis* 2014 19: 1712-1726.
- Yang BC, Yang ZH, Pan XJ, et al. Transcript profiling analysis of *in vitro* cultured THP-1 cells after exposure to crotonaldehyde. *J Toxicol Sci* 2014 39: 487-497.
- Qin YR, Zhou ZW, Pan ST, et al. Graphene quantum dots induce apoptosis, autophagy, and inflammatory response via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B mediated signaling pathways in activated THP-1 macrophages. *Toxicology* 2015 327: 62-76.
- Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxidant Redox Signal* 2007 9: 343-353.
- Wang QW (王全伟), Fan WB (凡文博), Wang ZH (王智昊). Progress of studies on the correlation between oxidation stress and cardiovascular diseases. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志) 2014 34: 270-273.
- Nur E, Biemond BJ, Otten HM, et al. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *Am J Hematol* 2011 86: 484-489.
- Wang HT (汪海涛), Lin J (林洁), Zhu HL (朱宏丽). Oxidative stress and hematological diseases. *Acade J Chinese Pla Med School* (解放军医学院学报) 2014 35: 512-515.
- Wang WJ (王雯婕), Chen J (陈剑), Wang YY (王园园). Research progress on relationship between oxidative stress and ocular surface diseases. *Recent Adv Ophthalmol* (眼科新进展) 2014 36: 585-588.
- Lombardo E, Sabellico C, Hájek J, et al. Protection of cells against oxidative stress by nanomolar levels of hydroxyflavones indicates a new type of intracellular antioxidant mechanism. *Plos One* 2013 8: 1-12.
- Wang XH (王晓红), Li WZ (李万忠). Protective effect of *Toona sinensis* seed extracts on diabetic peripheral neuropathy. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2016 28: 120-124.
- Ge Q (葛勤), Min BF (敏边帆), Su Q (苏青). Role of NADPH oxidase in oxidative stress. *Int J Endocrinol Metabol* (国际内分泌代谢杂志) 2007 27: 395-402.