

文章编号 1006-8147(2018)01-0020-05

论著

蒿鳖养阴软坚方通过激活 Nrf2/NQO1 信号通路抑制肝纤维化发生

刘悦, 李杉杉, 唐诗慧, 方步武

(天津医科大学药理学系, 天津 300070)

摘要 目的:探讨蒿鳖养阴软坚方通过激活 Nrf2/NQO1 信号通路对四氯化碳复合因素所致大鼠肝纤维化的抑制作用。方法:选用健康 Wistar 大鼠作为研究对象,将大鼠随机分为正常组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和秋水仙碱组。除正常组大鼠外,其余大鼠均给予自制高脂饲料饲养,每周两次皮下注射 40%CCl₄花生油混合溶液,隔日灌胃给予 30%乙醇,各给药组每日灌胃给药的同时给予正常组和模型组以等容积的蒸馏水,直至造模时间(共6周)结束后,乌拉坦麻醉大鼠并收集肝组织标本,比色法检测肝组织中羟脯氨酸(Hyp)的含量,免疫组织化学法检测各组大鼠肝组织中 Nrf2 和 NQO1 的分布情况,Western blot 法检测各组大鼠肝组织中 Nrf2 和 NQO1 的表达水平。结果:与正常组相比,模型组 Hyp 含量明显升高($P<0.05$);各给药组的 Hyp 含量显著低于模型组,且肝组织中 Nrf2 和 NQO1 的表达水平显著升高($P<0.05$)。结论:蒿鳖养阴软坚方可以通过激活 Nrf2/NQO1 通路,上调 Nrf2 和 NQO1 的表达,降低肝组织中 Hyp 的含量,从而发挥抑制由四氯化碳复合因素所致大鼠肝纤维化的作用。

关键词 肝纤维化;四氯化碳;蒿鳖养阴软坚方;羟脯氨酸;Nrf2;NQO1

中图分类号 R96

文献标志码 A

Effects of HaobieYangyinRuanjian prescription on inhibition of hepatic fibrosis through upregulated Nrf2/NQO1 pathway

LIU Yue, LI Shan-shan, TANG Shi-hui, FANG Bu-wu

(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effect of HaobieYangyinRuanjian on activation of Nrf2 / NQO1 signaling pathway on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride complex. **Methods:** Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, low dose group, middle dose group, high dose group and colchicine group. Except the normal group, other rats were given homemade high-fat diet, subcutaneous injection of 40% CCl₄ peanut oil mixed solution twice a week, and intragastric administration of 30% ethanol for 1mL every day. The rats in the model group were treated with equal dose of distilled water until the end of the experiment for 6 weeks. Uralan rats were anesthetized and the liver tissue samples were collected. The content of hydroxyproline (Hyp) in liver tissue was detected by colorimetry. The distribution of Nrf2 and NQO1 in liver tissue was detected by chemical method. The expression of Nrf2 and NQO1 in liver tissue was detected by Western blot. **Results:** Compared with the normal group, the content of Hyp of the model group was significantly higher than that of the normal group ($P<0.05$). The expressions of Nrf2 and NQO1 in the liver tissue were significantly higher than those in the model group ($P<0.05$). **Conclusion:** The activation of Nrf2/NQO1 pathway can up-regulate the expressions of Nrf2 and NQO1 and decrease the content of Hyp in liver tissue, so as to inhibit the hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride complex factors.

Key words hepatic fibrosis; carbon tetrachloride; HaobieYangyinRuanjian; hydroxyproline; nuclear factor 2 protein; quinone oxidoreductase I

肝纤维化是当肝脏受到反复的炎症或慢性致病因素刺激时所进行的肝脏代偿性修复反应,是所有慢性肝病发展成肝硬化乃至肝癌过程中所共同经历的病理阶段,以原本处于静止状态的肝星状细胞(HSCs)被激活,细胞外基质(ECM)合成和降解失衡,ECM过度沉积于肝内为主要特征^[1]。Frideman等^[2-3]指出,肝脏在肝纤维化阶段尚有逆转的可能性,但如不加以控制和治疗,极有可能发展成肝硬

化甚至是肝癌。现阶段西医对于肝纤维化的治疗途径主要包括:(1)病因治疗,从根本上减少与造成肝损伤的慢性致病因素接触;(2)刺激正常肝细胞的再生和修复;(3)有效控制HSCs增殖,并且促进其凋亡;(4)促进ECM的分解,使得其合成和降解重新达到平衡。中医对肝纤维化的研究起源于对活血化瘀的研究,属“微积”范畴,中药用于防治肝纤维化的药物大致可以分为活血化瘀类、疏肝理气类和清热解毒类^[4]。本课题组在过往的研究中已经证实蒿鳖养阴软坚方(HBYRJ)对于治疗免疫性肝纤维

作者简介 刘悦(1992-),女,硕士在读,研究方向:中药药理学;通信作者:方步武, E-mail:fangdch@aliyun.com。

化、四氯化碳复合因素所致肝纤维化、血吸虫肝纤维化模型以及酒精性肝纤维化均有显著的治疗作用,保护肝脏免受酒精、化学毒物和自身代谢性疾病的损伤^[5-9]。本研究主要从蒿鳖养阴软坚方抗由 CCl₄ 诱导的肝脏过氧化损伤着手,首先建立 CCl₄ 复合因素所致的大鼠肝纤维化模型,给予蒿鳖养阴软坚方不同治疗剂量的治疗,测定肝组织内羟脯氨酸(Hyp)含量来评估大鼠肝脏肝纤维化程度,测定肝组织内 Nrf2 和 NQO1 的表达水平和分布情况来评估蒿鳖养阴软坚方抗肝纤维化发生的作用与抗氧化应激通路 Nrf2/NQO1 之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 SPF 级健康 Wistar 大鼠共 60 只,体质量 100~130 g,雌雄各半,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,动物饲养室温 20~24 °C,实验前正常饲养动物 1 周以适应环境。

1.1.2 蒿鳖养阴软坚方 由青蒿、鳖甲、虎杖等 9 味药材组成,称取一定质量该复方,量取 6 倍体积蒸馏水,先将鳖甲煮至微沸状态 2 h 后,将其余药材倒入,浸泡 2 h,微沸状态煮沸 1 h 后,将所得药液滤至烧杯,量取等体积 60%乙醇,微沸状态提取 2 次,每次 2 h,将两次醇提所得药液和上述水提所得药液混匀,悬蒸至所称药材的体积,即可得到生药浓度为 1 mg/mL 的蒿鳖养阴软坚方药液,密封,4 °C 保存备用。

1.1.3 试剂 四氯化碳、高氯酸、枸橼酸、枸橼酸钠、对二甲氨基苯甲醛、氯胺 T 和异丙醇(天津市光复精细化工厂);秋水仙碱(Sigma 公司);兔抗 Nrf2 抗体(北京博奥森生物技术有限公司);鼠抗 NQO1 抗体(美国 Santa Cruz 公司);PV-9001 兔超敏二步法检测试剂盒(中杉金桥生物公司);PV-9002 鼠超敏二步法检测试剂盒(中杉金桥生物公司);DAB 染色液(上海博士德生物技术有限公司);SDS、甘氨酸和丙烯酰胺均为天津市鼎国生物科技有限公司产品;免疫组化一抗稀释液、RIPA 裂解液、蛋白印记一抗稀释液、蛋白印记二抗稀释液、蛋白印记一抗二抗去除液(强碱性)、PMSF、EeyoEcl Plus 试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 A 盒、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 B 盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)和 DTT 均为碧云天生物科技有限公司产品。

1.1.4 仪器 FA1004 型电子天平(上海 HANG PING 精密仪器有限公司);B600 型低速自动平衡离心机(河北安新县白洋离心机厂);OLYMPUS CK-40 显微镜(上海赖氏电子科技有限公司);整合分光光度计(UV-200);WD-9405A 型脱色摇床(北京市

六一仪器厂沃德生物医学仪器分公司);4360 型鼓风干燥烘箱(Thermo Scientific);XMTE-8222 型水浴锅(上海惊鸿仪器);PHS-3C 型 pH 计(上海雷磁仪器厂);LS-B50L 立式压力蒸汽灭菌锅(上海华线医用核子仪器有限公司);HQ-60-II 型漩涡混合器(杭州瑞成仪器股份有限公司);680 型酶标仪、垂直电泳槽和小型电泳仪均为 BIO-RAD 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及设计 将购入的 60 只 Wistar 按照随机区组分组的方法随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组、蒿鳖养阴软坚方高剂量组(8.2 g·kg⁻¹)、中剂量组(2.59 g·kg⁻¹)和低剂量(0.82 g·kg⁻¹)组共 6 组。正常饲养 1 周后,开始建立 CCl₄ 复合因素所致的大鼠肝纤维化模型,除正常组外,其余大鼠均第 1 次皮下注射 40%CCl₄ 花生油的容量为 5 mL·kg⁻¹,从第 2 次至建立模型完毕,给药剂量均为 3 mL·kg⁻¹;实验前两周,除正常组大鼠给予正常鼠粮饲养外,其余大鼠均进食自制高脂高胆固醇饲料,第 3 周至造模结束期间,自制鼠粮将不再添加猪油;给药组大鼠隔日灌胃给予 30%乙醇,每只灌胃容量为 1 mL;蒿鳖养阴软坚方高、中、低剂量组和秋水仙碱组则每日分别灌胃给予蒿鳖养阴软坚方药液和秋水仙碱,模型共建立 6 周。

1.2.2 标本采集 模型周期结束后,所有大鼠均再持续饲养 1 周,用 0.5 mL·kg⁻¹ 腹腔注射 25%乌拉坦生理盐水溶液麻醉后,方可采集标本,腹腔静脉取血后,取肝组织分别保存于 Ep 管中放置于-80 °C超低温保存箱中冻存,以及盛有固定液和脱水液的西林瓶中,脱水液需要每日更换,直至换够 6 次。

1.2.3 指标测定

1.2.3.1 比色法测定肝组织内 Hyp 的含量:用研钵将脱水后的肝组织研磨成粉,称取一定量的粉末于西林瓶中,放置于 105 °C烤箱内高温烘烤至衡重,称取烘烤后的粉末 40 mg 于安瓿瓶中,吸入 8 mL 6 mmol/L 盐酸,酒精喷灯封口,重新放入 105 °C烤箱内水解 18 h 后,过滤,各样本吸取 50 μL 于离心管内,放入 60 °C烘干,依次加入 1.2 mL 50%异丙醇和 0.2 mL 0.56%氯胺 T 溶液反应 10 min 后,加入 1 mL ER 液,50 °C水浴 90 min 后,用紫外分光光度计测定各样本的吸光度值,制作标准曲线,按照公式 Hyp 含量(μg/mg)=(检测管吸光度值-空白管吸光度值)/(标准管吸光度-空白管吸光度)×标准管 Hyp 浓度×稀释倍数,计算各样本 Hyp 含量。

1.2.3.2 检测肝组织内 Nrf2 和 NQO1 的分布情况:将切片置于玻片架,60 °C烘烤 2 h,依次放入二甲

苯、无水乙醇、95%、85%和70%乙醇中脱蜡后,转入3%过氧化氢甲醇溶液中灭活15 min,浸泡于pH=6的醋酸-柠檬酸缓冲液中,126℃修复5 min,待液体自然放凉后,正常羊血清封闭30 min后,孵育一抗Nrf2(1:100)和NQO1(1:80),4℃过夜,次日,弃去一抗,分别滴加试剂I和试剂II,并37℃孵育30 min, DAB显色后,苏木素染色,中性树胶封片,晾干,使用荧光显微镜采图进行分析。

1.2.3.3 检测肝组织内Nrf2和NQO1表达水平:使用匀浆器将冻存的肝组织制备成匀浆,按照PIRA:PMSF=99:1的比例,冰上裂解1 h后,以2 000×g的转速,4℃离心10 min后,收集上清,按照BCA蛋白浓度检测盒说明书步骤进行蛋白定量,计算上样量,蛋白变性后即可上样,30%聚丙烯酰胺凝胶电泳,全湿式电转将蛋白从凝胶转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉水平摇床上封闭2 h后,将各条带放入相应的杂交袋中孵育一抗Nrf2(1:400)和NQO1(1:100),4℃摇床过夜,次日,将条带取出, TBST充分漂洗3次,5 min/次,重新放入杂交袋内孵育二抗抗鼠β-actin(1:1 000)和抗兔β-actin(1:1 000),常温水平摇床孵育2 h后, TBST充分震荡洗涤4~5次,5 min/次,按照EeyoEcl Plus试剂盒说明书,曝光。使用Quantity One凝胶软件分析系统分析各蛋白条带的光密度值。

1.3 统计学分析 所有统计分析均采用SPSS 16.0软件进行处理,计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,样本间均数的比较采用单因素方差分析(one-way, ANOVA)的方法进行比较。

2 结果

2.1 蒿鳖养阴软坚方对四氯化碳复合因素所致大鼠肝纤维化肝组织内Hyp含量的影响 与正常组相比,模型组的Hyp含量显著升高($P<0.05$),说明CCl₄复合因素所致大鼠肝纤维化建模成功;与模型组相比,给药组的Hyp含量明显降低($P<0.05$)(表1)。

表1 蒿鳖养阴软坚方对四氯化碳复合因素所致大鼠肝纤维化肝组织内Hyp含量的影响

Tab 1 Effect of HBYYRJ on the content of Hyp of CCl₄-induced rats hepatics fibrosis ($\bar{x}\pm s$)

分组	含量 of Hyp/($\mu\text{g}/\text{mg}$)
正常组	0.210±0.012 ^{#△□}
模型组	0.368±0.013 ^{*△□}
秋水仙碱组	0.280±0.047 [#]
HBYYRJ 8.2 g·kg ⁻¹	0.272±0.027 [#]
HBYYRJ 2.59 g·kg ⁻¹	0.298±0.021 [#]
HBYYRJ 0.82 g·kg ⁻¹	0.322±0.051 ^{#△}

与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与HBYYRJ高剂量相比,[△] $P<0.05$;与HBYYRJ中剂量组相比,[□] $P<0.05$

2.2 蒿鳖养阴软坚方对四氯化碳复合因素所致大鼠肝纤维化各组大鼠肝组织内Nrf2和NQO1分布的影响 Nrf2的分布情况见图1,与正常组和模型组相比,秋水仙碱组以及蒿鳖养阴软坚方各剂量组Nrf2核转位显著增加,且高剂量组和中剂量组Nrf2核转位显著高于低剂量组。NQO1的分布情况见图2,各组NQO1的分布与Nrf2的核转位比较结果基本保持一致。

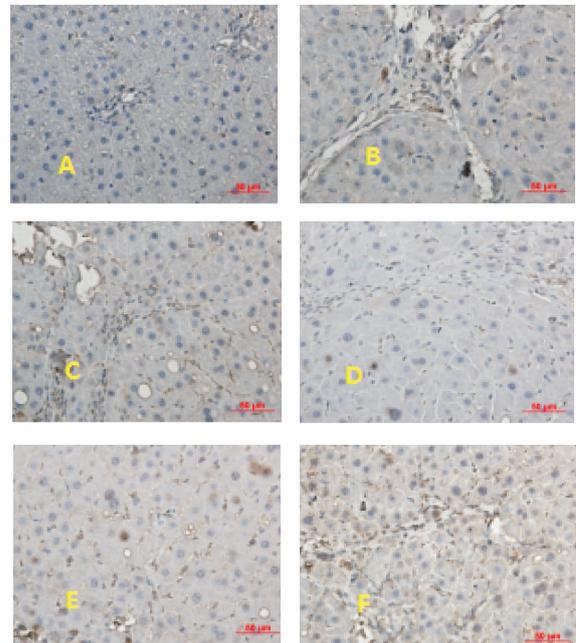


图1 各组大鼠肝组织内Nrf2分布情况的检测结果

Fig 1 The distribution of Nrf2 in the liver tissue of each group

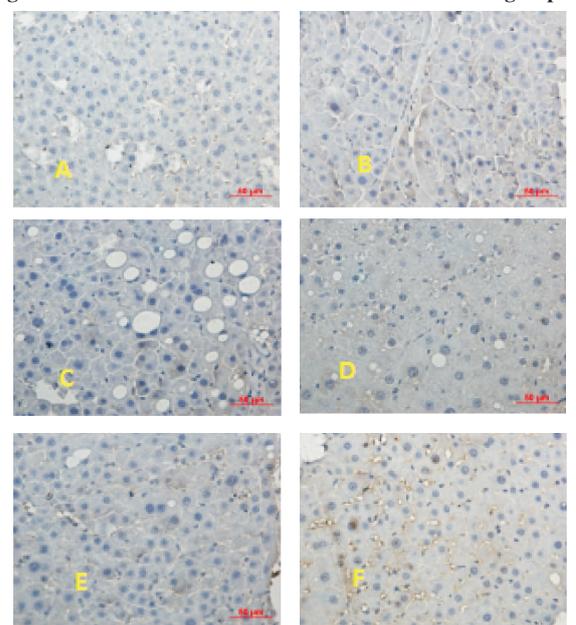


图2 各组大鼠肝组织内NQO1分布情况的检测结果

Fig 2 The distribution of NQO1 in the liver tissue of each group

2.3 葛鳖养阴软坚方对四氯化碳复合因素所致大鼠肝纤维化各组大鼠肝组织内 Nrf2 和 NQO1 表达水平的影响 各组大鼠肝内 NQO1 的表达水平见图 3, Nrf2 的表达水平见图 4。实验结果显示:与模型组相比, HBYYRJ 高中低 3 个剂量组 NQO1 和 Nrf2 的表达水平明显升高($P < 0.05$), 与高剂量组相比, 中剂量组大鼠肝组织内 Nrf2 和 NQO1 表达水平并没有统计学意义, 但低剂量组肝组织内的 Nrf2 和 NQO1 表达水平明显降低($P < 0.05$)。

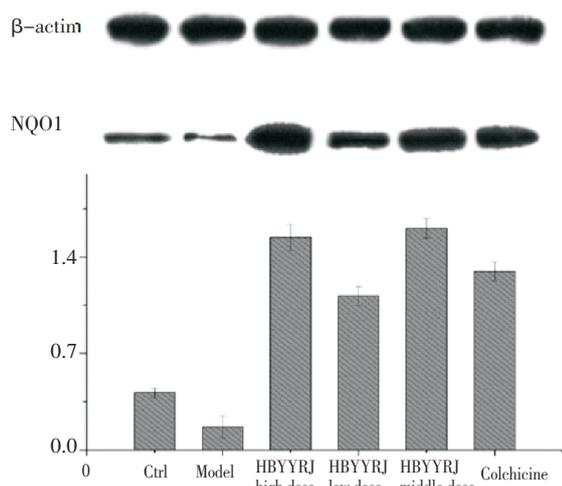


图 3 各组大鼠肝组织中 NQO1 表达水平的检测结果

Fig 3 The expression level of NQO1 in liver tissue of each group

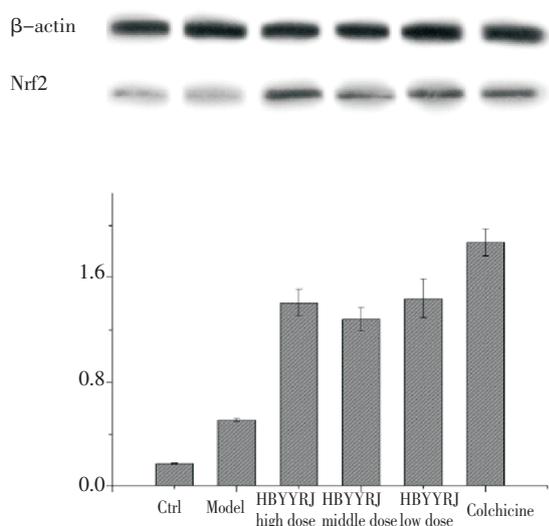


图 4 各组大鼠肝组织中 Nrf2 表达水平的检测结果

Fig 4 The expression level of Nrf2 in liver tissue of each group

3 讨论

HSCs 作为正常肝组织非实质细胞的组成部分, 正常生理状态下, 处于静息状态存在于狄氏间隙中, 但当肝脏受到各种慢性致病因素如酒精、脂

肪蓄积、化学毒物、胆汁淤积或某些代谢性疾病长期损伤时, 会刺激库弗细胞和窦内皮细胞等分泌大量的炎症因子、趋化因子和 ROS 等, 从而激活 HSCs, 被活化的 HSCs 开始逐渐转化为具有弹性的肌成纤维细胞(MFB), 并通过自分泌和旁分泌的途径不断合成大量的 ECM, ECM 合成和降解失衡, 在肝组织内过度蓄积, 就直接导致了肝纤维化的发生^[10]。胶原蛋白是 ECM 的主要成分, 而羟脯氨酸, 作为人体的一种非必须氨基酸, 也是胶原蛋白的主要成分, 所以肝组织中 Hyp 的含量即可直接反映胶原蛋白的含量, 从而客观反映肝组织内 ECM 的沉积状况和肝纤维化程度。研究表明, 与正常组相比, 模型组 Hyp 含量大大提高($P < 0.05$), 说明此次建立四氯化碳复合因素所致的大鼠肝纤维化模型成功; 与模型组相比, 葛鳖养阴软坚方各给药组 Hyp 的含量显著降低($P < 0.05$), 说明葛鳖养阴软坚方可以有效缓解肝组织内 ECM 的沉积, 从而抑制肝纤维化发生。

四氯化碳作为最经典、最常见的广泛用于诱导动物或者细胞建立急性实验性肝纤维化模型的化学毒性物质^[11], 其诱导原理为: CCl_4 进入细胞后, 细胞色素 P450 首先将其代谢为三氯甲基自由基($\text{CCl}_3\cdot$), $\text{CCl}_3\cdot$ 与氧反应, 生成三氯甲基过氧化自由基($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$), 刺激库弗细胞生成大量的 ROS 和细胞因子, 激活 HSCs, 导致氧化应激损伤和脂质过氧化反应, 生成的最终产物丙二醛等, 会损伤细胞膜的流动性和完整性, 从而损伤肝组织结构和功能, 进而诱发肝纤维化^[12-13]。本研究就肝纤维化形成过程中发生的氧化应激反应展开探讨, 着重研究 Nrf2/ARE 信号通路在葛鳖养阴软坚方发挥抗肝纤维化发生中的作用。正常生理状态下, Nrf2 与 Keap1 蛋白藕联存在于胞浆中, 遵循正常的合成和降解的过程, 但是当细胞受到氧化应激或者亲电试剂刺激时, Nrf2 与 Keap1 解偶联, 转位进入细胞核, 与胞核内的抗氧化反应元件 ARE 结合, 从而启动该通路下游抗氧化酶和 II 相解毒酶的转录和表达, 从而发挥抗氧化应激。由此可见, 在 Nrf2/ARE 信号通路保护细胞免受过氧化损伤的过程中, Nrf2 与 Keap1 解偶联, 进入细胞核是该过程的关键性环节, 所以 Nrf2 与细胞核的结合数量, 就可以体现该通路的表达程度, Nrf2 与细胞核结合的越多, 说明该通路信号表达越强, 相应地, 其下游转录的抗氧化酶和 II 相解毒酶表达水平也就越高。受到该通路调控表达的酶有许多, 比如血红素加氧合酶-1(HO-1)、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)以及本实验重点研究

的 NAD(P)H:醌氧化还原酶 I(NQO1)^[14]。NQO1 是一种溶解于细胞质,普遍存在的同型二聚体黄素酶,属于 II 相解毒酶范畴,可以直接催化醌类化合物失去 2 个电子从而被还原为水合醌类(氢醌),大多数氢醌均可与谷胱甘肽或者葡萄糖醛酸形成共轭稳定地存在于细胞内或者直接被排除体外,区别于其他氧化还原酶的是,该催化过程中没有单电子还原产物、半醌以及自由基等氧化产物的形成,从而保护细胞免受一系列过氧化损伤^[15]。

本研究结果显示,就 Nrf2 的核转位以及 NQO1 的表达而言,模型组明显低于正常组,而正常组又明显低于蒿鳖养阴软坚方各给药剂量组,该结果与上述实验猜想一致,蒿鳖养阴软坚方可以有效地上调 Nrf2/NQO1 通路的表达,进而促进 Nrf2 的核转位,上调 NQO1 的表达水平,促进醌类化合物还原为氢醌,形成稳定的共轭结构或者直接排除体外,从而缓解由 CCl₄ 所诱导的氧化应激反应,保护细胞免受过氧化损伤。蒿鳖养阴软坚方抑制由 CCl₄ 复合因素诱导的大鼠肝纤维化发生的作用机制是多方面的,本实验主要从抗氧化应激的层面逐步展开探讨,证实了蒿鳖养阴软坚方可以有效地上调抗氧化应激通路 Nrf2/NQO1 的表达,促进 Nrf2 的核转位,上调其下游抗氧化酶的表达,同时有效降低肝组织内 Hyp 的含量,缓解 ECM 的过度沉积,达到抵抗 CCl₄ 复合因素诱导的大鼠肝纤维化发生的作用,为临床上提供了新的治疗肝纤维化疾病的思路,为研究开发抗肝纤维的新药提供了新的依据和治疗靶点。

参考文献:

- [1] Chatterjee R, Mitra A. An overview of effective therapies and recent advances in biomarkers for chronic liver diseases and associated liver cancer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015,24(3):335
- [2] Sun M, Kisseleva T. Reversibility of liver fibrosis[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015,39(suppl1):S60
- [3] Frideman S L, Bansal M B. Reversal of hepatic fibrosis -fact of fantasy[J]. *Hepatology*, 2006,43(2 suppl 1):S82
- [4] Hazem S H, Shaker M E, Ashamalla S A, et al. The novel Janus kinase inhibitor ruxolitinib confers protection against carbon tetrachloride -induced hepatotoxicity via multiple mechanisms [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 5(220):116
- [5] 杨凤蕊, 娄建石, 方步武. 蒿鳖养阴软坚方抗 CCl₄ 复合因素所致大鼠肝纤维化的作用[J]. *中草药*, 2011,42(3):530
- [6] 邢伟, 孔维涵, 方步武. 蒿鳖养阴软坚方对免疫性肝纤维化大鼠的治疗作用[J]. *中草药*, 2010 (10): 1667
- [7] 率红莉, 方步武, 邢伟, 等. 蒿鳖养阴软坚方对四氯化碳复合因素所致肝纤维化的预防作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(16): 197
- [8] 寇咏梅, 刘洁莹, 方步武. 蒿鳖养阴软坚方抗小鼠血吸虫病肝纤维化及其机制的研究[J]. *现代药物与临床*, 2013(3):288
- [9] 冯硕, 王永臻, 张玉萍, 等. 蒿鳖养阴软坚方给药大鼠体内乙醛含量的测定[J]. *现代中药研究与实践*, 2011,25(4):44
- [10] Han X Y, Hu J N, Wang Z, et al. 5-HMF attenuates liver fibrosis in CCl₄-plus-alcohol-induced mice by suppression of oxidative stress[J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2017,63(1):35
- [11] Xu J Y, Su Y Y, Cheng J S, et al. Hepatoprotective effects of fullerene on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats [J]. *Carbon*, 2010, 48(5): 1388
- [12] Shi F, Li X, Pan H, et al. NQO1 and CYP450 reductase decrease the systemic exposure of rifampicin-quinone and mediate its redox cycle in rats[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017,5(132):17
- [13] Elaify M S, Adly A A, Attia A A, et al. Effect of antioxidant therapy on hepatic fibrosis and liver iron concentrations in β -thalassemia major patients[J]. *Hemoglobin*, 2013,37(3):257
- [14] Wu K C, Cui J Y, Klaassen C D. Effect of graded Nrf2 activation on phase -I and -II drug metabolizing enzymes and transporters in mouse liver[J]. *PLoS One*, 2012,7(7):e39006
- [15] Faig M, Bianchet M A, Winski S, et al. Structure-based development of anticancer drugs: complexes of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 with chemotherapeutic quinones[J]. *Structure*, 2001,9(8):659

(2017-05-19 收稿)