

汪秀,李菲,黄利辉. 油茶籽壳总黄酮对黄曲霉毒素 B1 致肝细胞氧化应激的保护作用及机制[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):308-311,577. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.088

油茶籽壳总黄酮对黄曲霉毒素 B1 致肝细胞氧化应激的保护作用及机制

汪秀,李菲,黄利辉

(嘉兴学院南湖学院,浙江嘉兴 314000)

摘要:研究油茶籽壳总黄酮(CSF)对黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 诱导的人肝细胞(HL-7702)氧化应激的保护作用及其机制。以 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFB1 处理 2 d 建立 HL-7702 细胞 AFB1 损伤模型;与 AFB1 损伤组比较,25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSF 预处理 HL-7702 细胞 1 d,细胞存活率显著上升($P < 0.05$),细胞内活性氧(ROS)和脂质过氧化物丙二醛(MDA)水平显著下降($P < 0.05$),超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性显著升高($P < 0.05$),核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)及其下游谷胱甘肽 S 转移酶 A2(GSTA2)的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$),核转录因子 κB (NF- κB)及下游炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)的 mRNA 表达显著下降($P < 0.05$)。因此,油茶籽壳总黄酮通过上调 Nrf2,提高 Nrf2 下游抗氧化酶系的活性,阻断了由 ROS 引起的脂质过氧化链式反应,同时下调 NF- κB ,减少炎症因子相关基因的表达,从而拮抗 AFB1 对肝细胞的毒性损伤,提高了肝细胞存活率。

关键词:油茶籽壳;总黄酮;黄曲霉毒素 B1;氧化应激;细胞保护

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0308-04

由黄曲霉、寄生曲霉产生的黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 经常被发源于发霉变质的饲料、食物中,被认为是中毒性最强、危害最大的一种霉菌毒素^[1]。生物体摄入 AFB1 后,在不同器官诱发产生细胞内活性氧(ROS),破坏机体的氧化-抗氧化平衡,从而使脂质过氧化物丙二醛(MDA)积累,对脂类、蛋白质、DNA 等生物大分子造成损伤^[2],由此形成的氧化应激对肝脏的损伤是最大的^[3]。研究表明,植物黄酮类物质能吸收包括 AFB1 在内的多种霉菌毒素,减轻其对动植物的损伤,保护肝脏,从而改善牲畜健康,提高畜产品产量。人参皂苷^[4]、槲皮苷^[5]、柚皮苷^[6]、藤黄双黄酮^[7]等都被发现具有黄曲霉毒素细胞保护作用。然而,至今仍然没有一种商业化的 AFB1 生物保护剂,主要是由于上述具有细胞保护作用的化合物来源十分有限,价格昂贵。因此,寻找易获得、廉价的此类化合物来源(如农副产品)十分必要。我国是世界上油茶籽产量最大的国家,油茶籽壳是油茶籽榨油前除去的种皮,大量的废弃油茶籽壳一般被丢弃或用作燃料,既污染环境又浪费资源。研究表明,油茶籽壳中含有丰富的黄酮类物质^[8],关于这类黄酮类物质提取工艺的研究已经很多,但对其功能研究目前仅局限在证明其具有较好的体外抗氧化性能^[9-10]。因此,笔者推测油茶籽壳中的黄酮类物质所具有的抗氧化能力可以减轻 AFB1 对细胞的毒性作用。本研究采用 AFB1 最易损伤的正常肝细胞 HL-7702 细胞为材料,建立 AFB1 肝细胞损伤模型,探讨油茶籽壳中黄酮类物质对 AFB1 肝细胞损伤的保护作用及其可能机制,旨在为油茶籽壳的综合高效利用和天然 AFB1 生物保护剂开发提供理论依据。

收稿日期:2015-01-04

基金项目:嘉兴学院校级一般 SRT 计划。

作者简介:汪秀(1985—),女,浙江嘉兴人,硕士,讲师,主要从事天然产物开发与研究。E-mail:xiuwangjx@163.com。

1 材料与方 法

1.1 油茶籽壳总黄酮(CSF)样品制备

油茶籽购自浙江省嘉兴市农贸市场,剥壳后自然晒干即得油茶籽壳,粉碎后备用。取 5 g 油茶籽壳粉碎样品,依照姜天甲等^[9]和高扬等^[11]的方法,按 1 g : 30 mL 比例加入 60% 乙醇溶液,浸泡 30 min,40 $^{\circ}\text{C}$ 超声波提取 45 min,滤液减压浓缩后加蒸馏水定容至 50 mL,加等体积石油醚充分振荡,静置分层后分离收集,经 40 $^{\circ}\text{C}$ 真空减压旋转蒸发后,制备得油茶籽壳总黄酮并用 DMSO 配成 20 mg/mL 储备液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 材料

人正常肝细胞系 HL-7702 购于中国科学院上海细胞库;AFB1、DMSO、MTT 均为 Sigma 公司产品,AFB1 溶解于 DMSO 中,配成 1 mg/mL 母液;RPMI-1640 培养基、胰酶、青链霉素均为 HyClone 公司产品;胎牛血清购于四季青公司;MDA 试剂盒,SOD、CAT、GSH-Px 测定试剂盒购于南京建成工程研究所;ROS 检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、PCR 试剂盒、TRIzol、脱脂牛奶(BSA)均为碧云天公司产品;PrimeScript RT 反转录试剂盒购于 TaKaRa 公司;小鼠抗人 Nrf2、GSTA2 β -actin 单克隆抗体均为 Santa Cruz 公司产品;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购于武汉博士德生物公司;PCR 引物均合成自上海博尚生物公司。

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养 人 HL-7702 正常肝细胞以 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 双抗)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养。

1.3.2 AFB1 致 HL-7702 细胞损伤模型建立 采用 MTT 法检测 HL-7702 细胞增殖抑制率,试验分为对照组和 AFB1 组。HL-7702 细胞按 5 000 个细胞/孔接入 96 孔板中,每组设 5 个复孔,过夜培养待细胞贴壁后加化合物。对照组每孔

加入含 1% DMSO 的完全培养基 100 μL , AFB1 组每孔加入含 5、10、15、20、25、30、35、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFB1 的完全培养基 100 μL 。各组分别培养 0.5、1、2 d 后弃去孔内培养基,并加入 100 μL 含 MTT 溶液(终浓度 0.5 mg/mL)的无血清培养基,避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h,弃上清液,每孔加 100 μL DMSO,振荡使结晶物充分溶解,570 nm 下测定各孔吸光度,细胞抑制率 = $(D_{\text{对照}} - D_{\text{试验}}) / D_{\text{对照}} \times 100\%$ 。根据 MTT 结果,选择 AFB1 的最佳浓度进行后续试验。

1.3.3 油茶籽壳总黄酮对 AFB1 致细胞损伤的预保护试验

细胞接板和 MTT 检测方法同“1.3.2”节,试验分组如下:设正常对照组、AFB1 模型组和油茶籽壳总黄酮低剂量、中剂量、高剂量保护组。正常对照组:细胞先用含 1% DMSO (CSF 的溶剂)的完全培养基培养 1 d,换液后再加入含 1% DMSO (AFB1 的溶剂)的完全培养基继续培养 2 d; AFB1 模型组:细胞先用含 1% DMSO (CSF 的溶剂)的完全培养基培养 1 d,换液后加入含有最佳损伤浓度 AFB1 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的完全培养基继续培养 2 d; CSF 保护组:细胞先分别与含 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSF 的完全培养基预孵 1 d,换液后加入含有最佳损伤浓度 AFB1 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的完全培养基继续培养 2 d。3 d 培养结束后检测细胞存活率,细胞存活率计算公式如下:

$$\text{细胞存活率} = D_{\text{试验}} / D_{\text{对照}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.4 HL-7702 细胞内 MDA 生成量的检测 采用“1.3.3”节所述方法处理 HL-7702 细胞,用硫代巴比妥酸 (TBA)法测定 MDA 含量^[12]。将各组细胞裂解后按照试剂盒

说明书操作步骤进行操作,在 532 nm 处测定各孔吸光度,采用 BCA 试剂盒说明书规定的方法测定总蛋白浓度。

1.3.5 HL-7702 细胞内 ROS 水平的检测 采用“1.3.3”节所述方法处理 HL-7702 细胞,采用二氯荧光素双乙酸 (DCFH-DA)法测定细胞内 ROS 水平。将各组细胞裂解后按照试剂盒说明书操作步骤进行,细胞裂解液与 10 nmol/L DCFH-DA 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, PBS 洗细胞 2 次。荧光强度用荧光酶标仪以激发波长 485 nm 和发射波长 535 nm 检测。ROS 相对含量计算公式如下:

$$\text{ROS 相对含量} = \text{处理组荧光强度} / \text{对照组荧光强度} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.6 HL-7702 细胞内抗氧化酶系含量测定 采用“1.3.3”节所述方法处理 HL-7702 细胞,收集各组细胞,用冰 PBS 洗,然后在冰上用超声破碎机 200 V、30 s,间隔 5 s,3 次破碎细胞,取 100 μL 细胞裂解液,按照试剂盒说明书操作步骤测定 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性。酶活性以酶比活力单位 (U/mg)表示,并用细胞总蛋白质含量作校正。

1.3.7 RT-PCR 检测相关基因的改变 采用“1.3.3”节所述方法处理 HL-7702 细胞,收集各组细胞,提取细胞总 RNA,采用 PrimeScript RT 反转录试剂盒并进行逆转录,得到各组细胞 cDNA。PCR 扩增条件均为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min; 循环数 30。最后 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳分离,检测基因引物见表 1, GAPDH 为内参。

表 1 PCR 相关基因引物序列

基因	正义链	反义链
<i>NF-kB</i> ^[13]	5'-GAAGGAATCGTACCGGGAACA-3'	5'-CTCAGAGGGCCTTGTGACAGTAA-3'
<i>TNF-α</i> ^[14]	5'-TGTGTATGTGCAGCAACCCGTAGT-3'	5'-GGCATTGCAATTTGGACAGAAGT-3'
<i>IL-6</i> ^[15]	5'-CAAGGTGACGGAGGAGGAC-3'	5'-TGGCGAGGAGGGATTTC-3'
<i>IL-1β</i> ^[15]	5'-TGGGCATCAAGGGCTACA-3'	5'-TCGGGTTGGTTGGTGATG-3'
<i>Nrf2</i>	5'-TCACTCAGCGACGGAAAGAGTA-3'	5'-TGTGGGCAACCTGGGAGTAG-3'
<i>GSTA2</i>	5'-TGGAGATTGATGGGATGAAG-3'	5'-CAATCAGGGCTCTCTCCTTC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-GTCAGCAATGCATCGTGCA-3'	5'-GGCATGGACAGTGGTGATAAGA-3'

1.3.8 Western blot 检测蛋白表达的改变 采用“1.3.3”节所述方法处理 HL-7702 细胞,收集细胞,用 PBS 洗涤 3 次,加入裂解液,冰上充分裂解 1 h,总蛋白样品进行 SDS-PAGE 分离,转移到硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别用稀释的 Nrf2、GSTA2 和标准内参 β -actin 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后加稀释的二抗室温孵育 2 h,加 ECL 发光试剂,显影、定影。

1.3.9 统计学分析 所有试验均重复 3 次,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 软件统计分析,采用 Duncan's 检验多重比较。

2 结果与分析

2.1 HL-7702 细胞 AFB1 受损模型的建立

由图 1 可见, AFB1 对 HL-7702 的细胞毒性呈现出剂量和时间依赖性。0.5、1 d 组各浓度虽也可以明显抑制细胞增殖,但彼此之间差异不大, 2 d 组各浓度对应的细胞抑制率之间差异明显,且浓度与抑制率之间相关性好 ($r^2 = 0.99$),因此以 2 d 组数据确定 AFB1 的 IC_{50} 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以此作为

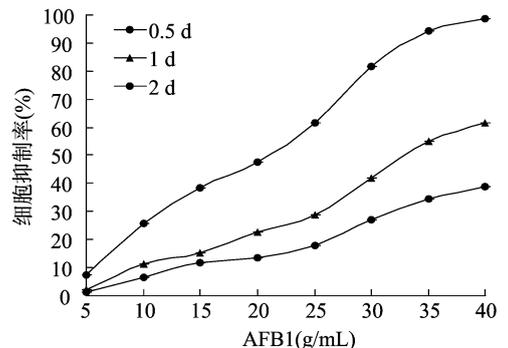


图 1 AFB1 对 HL7702 细胞增殖的影响

AFB1 对 HL-7702 细胞损伤模型的最佳浓度。

2.2 油茶籽壳总黄酮对 AFB1 损伤的 HL-7702 细胞存活率的影响

将未经油茶籽壳总黄酮预处理的 HL-7702 细胞暴露于 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFB1 2 d,与对照组相比,细胞存活率明显下降(表 2)。经 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 油茶籽壳总黄酮预保护过的 HL-

7702 细胞再接受同样剂量 AFB1 暴露相同时间后,细胞存活率较 AFB1 损伤组明显提高,且其保护效果呈显著的剂量效应关系。油茶籽壳总黄酮对 HL-7702 细胞进行预处理可以有效抑制 AFB1 造成的细胞增殖抑制。

表2 油茶籽壳总黄酮对 AFB1 损伤的 HL-7702 细胞存活率的影响

组别	浓度 (μg/mL)	细胞存活率 (%)
对照组	0	99.0 ± 0.6a
AFB1 损伤组	20	44.7 ± 1.4e
油茶籽壳总黄酮 + AFB1	25	52.6 ± 1.0d
	50	67.5 ± 0.9c
	100	83.1 ± 1.6b

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),下同。

2.3 HL-7702 细胞内 ROS 和 MDA 水平的改变

由表3可知,与对照组相比,20 μg/mL AFB1 作用 HL-7702 细胞 2 d,显著增加了 HL-7702 细胞内 ROS 活性和 MDA 含量,说明 AFB1 造成了 HL-7702 细胞的氧化损伤。经 25、50、100 μg/mL 油茶籽壳总黄酮预处理后,受损细胞内的 ROS 活性逐渐降低,与 AFB1 损伤组相比差异显著,MDA 含量也随着油茶籽壳总黄酮浓度升高而显著下降。

表3 油茶籽壳总黄酮对 AFB1 损伤的 HL-7702 细胞内 ROS 活性、MDA 含量的影响

组别	浓度 (μg/mL)	ROS 活性 (%)	MDA 含量 (nmol/mg)
对照组	0	100.00e	0.43 ± 0.05e
AFB1 损伤组	20	240.00 ± 15.48a	1.64 ± 0.10a
油茶籽壳总黄酮 + AFB1	25 + 20	214.10 ± 8.77b	1.10 ± 0.07b
	50 + 20	177.49 ± 13.33c	0.87 ± 0.04c
	100 + 20	129.04 ± 9.16c	0.73 ± 0.06d

2.4 HL-7702 细胞内抗氧化酶系的改变

由表4可见,与对照组相比,20 μg/mL AFB1 作用 HL-7702 细胞 2 d,显著降低细胞内抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 活性,说明细胞内源性抗氧化酶系统功能失调。经 25、50、100 μg/mL 油茶籽壳总黄酮预处理 HL-7702 细胞 1 d,与 AFB1 损伤组相比,25 μg/mL 保护组没有显著提升 HL-7702 细胞内 CAT、GSH-Px 活性。

表4 油茶籽壳总黄酮对 AFB1 损伤的 HL-7702 细胞内 SOD、CAT、GSH-Px 酶活的影响

组别	浓度 (μg/mL)	SOD 活性 (U/mg)	CAT 活性 (U/mg)	GSH-Px 活性 (U/mg)
对照组	0	25.58 ± 1.62a	8.48 ± 0.45a	5.08 ± 0.19a
AFB1 损伤组	20	9.48 ± 0.38e	2.32 ± 0.23d	1.66 ± 0.14d
油茶籽壳总黄酮 + AFB1	25 + 20	14.46 ± 1.23b	2.98 ± 0.11d	1.83 ± 0.10d
	50 + 20	16.97 ± 0.52c	4.05 ± 0.61c	2.35 ± 0.14b
	100 + 20	19.01 ± 0.58d	6.43 ± 0.14b	3.49 ± 0.23c

2.5 HL-7702 细胞内 Nrf2 及其下游抗氧化酶表达的改变

Nrf2 被称为氧化还原敏感转录因子,是调节抗氧化应激

反应的重要转录因子^[16]。与对照组相比,AFB1 损伤组 Nrf2 及其下游 GSTA2 的 mRNA(图2-a)和蛋白表达水平(图2-b)均明显下调。随着油茶籽壳总黄酮预保护浓度的提高,与 AFB1 损伤组相比,Nrf2 及 GSTA2 的 mRNA 和蛋白表达水平都呈现剂量依赖性上调。GSTA2 是 Nrf2 调控的下游众多抗氧化蛋白之一,SOD、CAT、GSH-Px 也受 Nrf2 的调控,由此可知,油茶籽壳总黄酮在细胞氧化应激的情况下,通过上调 Nrf2 表达,提高了其下游一系列抗氧化酶的活性,从而对抗由 AFB1 造成的细胞氧化损伤。

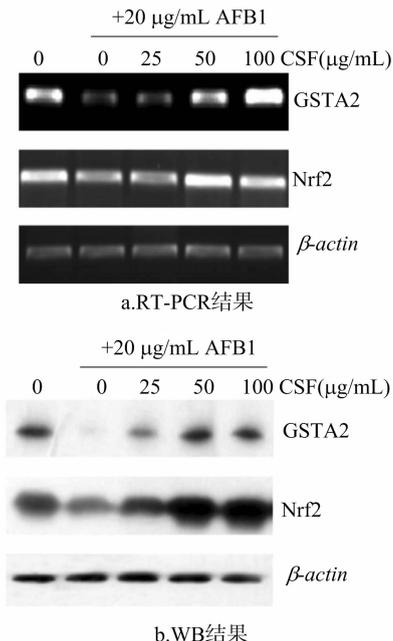


图2 HL-7702细胞内 Nrf2 及其下游基因表达的改变

2.6 细胞内 NF-κB 及下游炎症因子 mRNA 表达的改变

研究表明,肝细胞遭受氧化受损及肝炎、肝癌发生时 NF-κB 信号通路被显著激活^[17-18]。由图3可知,与对照组相比,AFB1 损伤组核转录因子 NF-κB 表达明显上调,其相关下游炎症介导因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 也随之高表达。随着油茶籽壳总黄酮预保护浓度的提高,与 AFB1 损伤组相比,NF-κB 及炎症因子表达都呈现剂量依赖性下调。由此可知,油茶籽壳总黄酮对 HL-7702 细胞的预处理下调了由 AFB1 引起的 NF-κB 信号通路的激活,相关炎症因子表达随之减少,提示其在预防、治疗肝炎方面可能具有的功能。

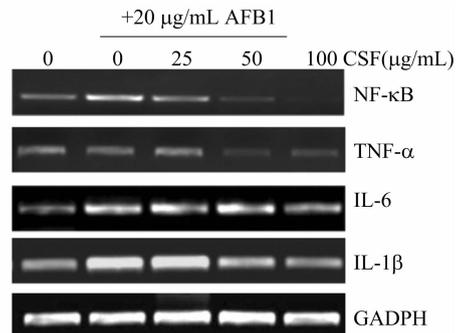


图3 HL-7702细胞内NF-κB及下游炎症因子 mRNA表达的改变

3 结论与讨论

生物有氧代谢过程中产生的过多活性氧(ROS)会导致氧化应激,肝脏因含有丰富的线粒体,是产生 ROS 较多的器官,也是较易受到 ROS 攻击的器官。氧化应激会引起脂质过氧化,破坏酶活性,损伤 DNA,造成肝损伤。研究表明,氧化应激与多种肝脏疾病、肝功能障碍密切相关^[19]。AFB1 进入肝细胞后,通过环氧化反应转变为有活性的 AFB1-8,9 环氧化合物,进而引发肝细胞内产生过量 ROS,造成细胞的氧化应激,这是 AFB1 生物毒性尤其是肝脏毒性发生的主要机理^[20]。

本研究表明,当肝细胞遭遇 AFB1 损伤时,油茶籽壳总黄酮与肝细胞的预孵显著降低了细胞内 ROS、MDA 水平,同时提升了肝细胞内抗氧化酶系(SOD、CAT、GSH-Px)的活性,因此改善了肝细胞 AFB1 暴露下的氧化-抗氧化平衡环境,提高了细胞存活率。El-Nekeety 等^[3]、Zhang 等^[21]、Hou 等^[22]都曾报道过:当细胞暴露于霉菌毒素时,天然抗氧化剂可以增强细胞内抗氧化酶活性,阻断脂质过氧化,从而缓解细胞的氧化应激。Nrf2 是公认的细胞防御过氧化应激的重要调节因子,在氧化应激状态下,Nrf2 与细胞核内抗氧化反应元件 ARE 结合,上调一系列解毒酶和抗氧化蛋白表达,从而增强肝细胞的解毒及抗氧化能力,减轻活性氧(ROS)和亲电子物质介导的细胞损害,对保护肝脏功能、阻止多种肝脏疾病的发生有着重要意义^[23]。已经证明能通过 Nrf2 途径改善肝细胞氧化应激状态,进而发挥保护肝细胞作用的化合物有白藜芦醇^[24]、姜黄素^[25]、齐墩果酸^[26]、熊去氧胆酸^[27]等,这些化合物主要集中在对肝细胞的乙醇或其他药物损伤方面的保护,由于这些化合物的来源十分有限,限制了其更为广泛的应用。本研究表明,来自油茶籽壳中的总黄酮物质与肝细胞的预孵上调了 Nrf2、GSTA2 表达,GSTA2 是 Nrf2 调控的下游众多抗氧化蛋白之一,与肝脏解毒功能有关,SOD、CAT、GSH-Px 也受 Nrf2 调控,抗氧化酶是细胞内对抗 ROS 的主要防御机制,因此可以认为油茶籽壳总黄酮预处理肝细胞后激活了 Nrf2 信号通路,上调其下游多种抗氧化酶基因的表达,提高细胞内抗氧化酶活性,从而对抗由 ROS 引起的肝细胞氧化损伤,起到保护肝细胞的作用。Costa 等也报道了黄酮类物质在上调 Nrf2 蛋白和提高抗氧化酶活性方面的重要作用^[28]。

细胞内产生过量 ROS 除了会导致 MDA 积累外,还可激活 NF- κ B 信号通路,进而使其下游调控的许多炎症因子(包括 TNF- α 等)表达增加,持续释放,肝细胞氧化应激、凋亡,炎症细胞大量浸润,最终导致肝炎甚至引发肝癌^[29]。本研究表明,油茶籽壳总黄酮的预处理使得肝细胞 NF- κ B 表达下降及其调控的炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)下调,这提示其在预防、治疗肝炎方面可能具有的功能。油茶籽壳总黄酮通过上调 Nrf2,提高 Nrf2 下游抗氧化酶系(SOD、CAT、GSH-Px、GSTA2)的活性,阻断了由 ROS 引起的脂质过氧化链式反应,同时下调 NF- κ B,减少炎症因子相关基因(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)的表达,从而拮抗 AFB1 对肝细胞的毒性损伤,提高肝细胞存活率。油茶籽壳作为一种农业副产品,在我国资源丰富、价格低廉,本研究证明了其中的黄酮类物质具有拮抗 AFB1 肝细胞毒性的功能,为油茶籽壳的环保、高效利用提供了新途径。

参考文献:

- [1] Rawal S, Kim J E, Coulombe R. Aflatoxin B1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention [J]. *Research in Veterinary Science*, 2010, 89(3): 325-331.
- [2] Abdel-Aziem S H, Hassan A M, El-Denshary E S, et al. Ameliorative effects of thyme and calendula extracts alone or in combination against aflatoxins-induced oxidative stress and genotoxicity in rat liver [J]. *Cytotechnology*, 2014, 66(3): 457-470.
- [3] El-Nekeety A A, Mohamed S R, Hathout A S, et al. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats [J]. *Toxicol*, 2011, 57(7/8): 984-991.
- [4] Hassan A M, Abdel-Aziem S H, El-Nekeety A A, et al. Panax ginseng extract modulates oxidative stress, DNA fragmentation and up-regulate gene expression in rats sub-chronically treated with aflatoxin B1 and fumonisin B1 [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(5): 861-871.
- [5] El-Nekeety A A, Abdel-Aziem S H, Hassan A M, et al. Quercetin inhibits the cytotoxicity and oxidative stress in liver of rats fed aflatoxin-contaminated diet [J]. *Toxicology Reports*, 2014, 1: 319-329.
- [6] Guengerich F P, Kim D H. In vitro inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids [J]. *Carcinogenesis*, 1990, 11(12): 2275-2279.
- [7] Farombi E O, Adepoju B F, Ola-Davies O E, et al. Chemoprevention of aflatoxin B1-induced genotoxicity and hepatic oxidative damage in rats by kolaviron, a natural bioflavonoid of *Garcinia kola* seeds [J]. *European Journal of Cancer Prevention*, 2005, 14(3): 207-214.
- [8] 杨俊换, 周建平, 胡尧超. 油茶籽壳的化学成分分析与扫描电镜观察 [J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2013, 39(5): 554-558.
- [9] 姜天甲, 应铁进, 陈秋平, 等. 油茶籽壳总黄酮的提取及抗氧化研究 [J]. *中国食品学报*, 2010, 10(1): 93-99.
- [10] 杨彤晖, 于修焯, 蔡学标, 等. 超声波辅助提取油茶籽壳总黄酮及对猪油抗氧化能力研究 [J]. *粮油食品科技*, 2012, 20(1): 26-29.
- [11] 高扬, 易若琨, 宋家乐. 竹叶总黄酮对 UVB 诱导 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *南京中医药大学学报*, 2015, 31(2): 165-169.
- [12] Fraga C G, Leibovitz B E, Tappel A L. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices; characterization and comparison with homogenates and microsomes [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1988, 4(3): 155-161.
- [13] Zhong X L, Shi Y R, Chen J J, et al. Polyphenol extracts from *Punica granatum* and *Terminalia chebula* are anti-inflammatory and increase the survival rate of chickens challenged with *Escherichia coli* [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2014, 37(10): 1575-1582.
- [14] He Y, Fang J, Peng X, et al. Effects of sodium selenite on aflatoxin B1-induced decrease of ileac T cell and the mRNA contents of IL-2, IL-6, and TNF- α in broilers [J]. *Biological Trace Element Research*, 2014, 159(1/2/3): 167-173.
- [15] Pan Z M, Fang Q, Geng S Z, et al. Analysis of immune-related gene expression in chicken peripheral blood mononuclear cells following *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection *in vitro* [J]. *Research in Veterinary Science*, 2012, 93(2): 716-720.

- of e - business risk by UK small and medium sized enterprises (SMEs) [J]. *International Journal of Information Management*, 2014, 34(2):99 - 122.
- [10] Nguyen H O. Critical factors in e - business adoption; evidence from Australian transport and logistics companies [J]. *Production Economics*, 2013, 146(1):300 - 312.
- [11] Schwanen T, Dijst M. Shopping online and/or in - store? A structural equation model of the relationships between e - shopping and in - store shopping [J]. *Transportation Research Part A*, 2007, 41(2):125 - 141.
- [12] Morganti E, Dablan L, Fortin F. Final deliveries for online shopping: the deployment of pickup point networks in urban and suburban areas [J]. *Research in Transportation Business & Management*, 2014(11):23 - 31.
- [13] 胡志丁, 葛岳静, 徐建伟, 等. 空间与经济地理学理论构建 [J]. *地理科学进展*, 2012, 31(6):676 - 685.
- [14] Kilpeläinen A, Seppänen M. Information technology and everyday life in ageing rural villages [J]. *Journal of Rural Studies*, 2014, 33(1):1 - 8.
- [15] Wen W. A knowledge - based intelligent electronic commerce system for selling agricultural products [J]. *Computer and Electronics in Agriculture*, 1994, 57(1):51 - 52.
- [16] Wrigley N, Currah A. Globalizing retail and the 'new e - economy': the organizational challenge of e - commerce for the retail TNCs [J]. *Geoforum*, 2006, 37(3):51 - 52.
- [17] Iglesias - Pradas S, Pascual - Miguel F, Hernández - García Á, et al. Barriers and drivers for non - shoppers in B2C e - commerce: a latent class exploratory analysis [J]. *Computers in Human Behavior*, 2013, 29(2):314 - 322.
- [18] 俞金国, 王丽华, 李娜. 电子商铺空间分布特征分析——来自淘宝网的实证 [J]. *经济地理*, 2010, 30(8):1248 - 1253.
- [19] 汪明峰, 卢 娟, 邱 娟. 网上购物对城市零售业空间的影响: 以书店为例 [J]. *经济地理*, 2010, 30(11):1835 - 1840, 1896.
- [20] 王贤文, 徐申萌. 中国 C2C 淘宝网络店铺的地理分布 [J]. *地理科学进展*, 2011, 30(12):1564 - 1569.
- [21] 席广亮, 甄 峰, 魏宗财, 等. 南京市居民移动信息化水平及其影响因素研究 [J]. *经济地理*, 2012, 32(9):97 - 103.
- [22] 席广亮, 甄 峰, 汪 侠, 等. 南京市居民网络消费的影响因素及空间特征 [J]. *地理研究*, 2014, 33(2):284 - 295.
- [23] 王益澄, 马仁锋, 孙东波, 等. 宁波城市老年人的购物行为及其空间特征 [J]. *经济地理*, 2015, 35(3):120 - 126.
- [24] 孙中伟, 金凤君, 王 杨. 信息化对区域经济发展的组织作用 [J]. *地理与地理信息科学*, 2008, 24(4):44 - 49.
- [25] 孙中伟, 张 兵, 王 杨, 等. 互联网资源与我国省域经济发展的关系研究 [J]. *地理与地理信息科学*, 2010, 26(3):44 - 48.
- [26] 丁疆辉, 刘卫东. 信息技术应用对农村居民行为空间的影响——以河北省无极县为例 [J]. *地理研究*, 2012, 31(4):733 - 744.
- [27] 胡乔利, 沈彦俊, 陈福军, 等. 冀中南地区农田生物生产力与碳截获能力时空变化分析 [J]. *地理科学*, 2012, 32(2):219 - 224.
- [28] 河北省统计局. 河北经济年鉴: 2014 年 [M]. 北京: 中国统计出版社, 2014.
- [29] 刘彦随. 中国东部沿海地区乡村转型发展与新农村建设 [J]. *地理学报*, 2007, 62(6):563 - 570.
- [30] 中国互联网络信息中心 (CNNIC). 中国农村互联网络发展状况调查报告: 2007—2013 年 [R]. 北京: 中国互联网络信息中心, 2007.
- [31] 付 伟, 丁疆辉. 国内涉农网站的研究进展及其地理学视角 [J]. *河北师范大学学报: 自然科学版*, 2015, 39(1):85 - 92.
- [32] 中国农村网. 2014 年中国农业互联网行业分析报告 [EB/OL]. (2014 - 10 - 10) [2015 - 03 - 18]. <http://www.nongcun5.com/news/20141010/32208.html>.
- (上接第 311 页)
- [16] 李 平, 李 芬, 叶 昉, 等. Nrf2 信号通路在铅致 SH - SY5Y 细胞氧化应激中作用 [J]. *中国公共卫生*, 2012, 28(7):933 - 935.
- [17] 于晨辉, 杜仲燕, 高 佳, 等. 4 - HNE 通过抑制 TNF - α 介导的 NF - κ B 活化诱导酒精性肝损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(6):1046 - 1052.
- [18] 李亚萍, 党双锁, 翟 嵩, 等. NF - κ B, α - SMA 及 TGF β 1 在实验性肝损伤中的表达 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2011, 27(11):1207 - 1210.
- [19] Cederbaum A I, Lu Y K, Wu D F. Role of oxidative stress in alcohol - induced liver injury [J]. *Archives of Toxicology*, 2009, 83(6):519 - 548.
- [20] Beyki M, Zhavah S, Khalili S T, et al. Encapsulation of mentha piperita essential oils in chitosan - cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against aspergillus flavus [J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 54(4):310 - 319.
- [21] Zhang A H, Sun H, Wang X J. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 63(33):570 - 577.
- [22] Hou Y J, Zhao Y Y, Xiong B, et al. Mycotoxin - containing diet causes oxidative stress in the mouse [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e60374.
- [23] 邵洛林, 郭建强, 许伟华. Nrf2 在肝细胞中作用的研究进展 [J]. *国际消化病杂志*, 2009, 29(6):381 - 383, 423.
- [24] Rubiolo J A, Mithieux G, Vega F V. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 591(1/3):66 - 72.
- [25] Farombi E O, Shrotriya S, Na H K, et al. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine - induced liver injury in rats through Nrf2 - mediated induction of heme oxygenase - 1 [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(4):1279 - 1287.
- [26] Reisman S A, Aleksunes L M, Klaassen C D. Oleonic acid activates Nrf2 and protects from acetaminophen hepatotoxicity via Nrf2 - dependent and Nrf2 - independent processes [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2009, 77(7):1273 - 1282.
- [27] Kawata K, Kobayashi Y, Souda K, et al. Enhanced hepatic Nrf2 activation after ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, 13(3):259 - 268.
- [28] Costa S, Schwaiger S, Cervellati R, et al. *In vitro* evaluation of the chemoprotective action mechanisms of leontopodic acid against aflatoxin B1 and deoxynivalenol - induced cell damage [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2009, 29(1):7 - 14.
- [29] Martindale J L, Holbrook N J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2002, 192(1):1 - 15.