

· 论著 ·

槟榔醇提物对 H9C2 心肌细胞的抗缺氧保护作用

赵安鹏¹, 靳 婷^{1,2}, 王 荣^{1,2} (1. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院全军高原损伤防治实地重点实验室, 甘肃兰州, 730050; 2. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州, 730000)

[摘要] **目的** 研究槟榔无水醇提物对低氧 H9C2 心肌细胞的作用及其保护机制。**方法** 建立 H9C2 心肌细胞低氧模型, CCK-8 法检测槟榔无水醇提物对 H9C2 细胞存活率的影响; 通过检测细胞内丙二醛(MDA)含量, 过氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)活力, 研究槟榔无水醇提物对 H9C2 细胞的保护作用; RT-PCR 法检测细胞内 Nrf2、Caspase-3 mRNA 水平的表达, 从分子水平研究槟榔无水醇提物对低氧 H9C2 细胞的保护机制。**结果** 与常氧对照组相比, 低氧 24 h 时细胞存活为 28.46% ($P < 0.01$), 细胞内 MDA 含量升高 44.33% ($P < 0.05$), SOD、GSH 活力分别下降 16.18%、30.64% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。RT-PCR 实验结果表明, Nrf2 被激活, 其 mRNA 表达上升 1.74 倍 ($P < 0.05$)。与低氧模型组相比, 槟榔无水醇提物处理组 H9C2 细胞存活率明显升高 ($P < 0.01$), 且呈现剂量依赖性, 槟榔无水醇提物处理组细胞内 SOD、GSH 活力分别增加 14.90%、28.94% ($P < 0.05$), Nrf2 基因 mRNA 相对表达下降 66% ($P < 0.05$)。**结论** 槟榔无水醇提物对低氧 H9C2 细胞有显著的保护作用, 其保护机制可能与提高细胞内抗氧化物酶活力, 减轻细胞氧化应激损伤, 提高细胞耐低氧能力有关。

[关键词] 槟榔; 提取物; 心肌细胞; 抗缺氧; 氧化应激

[中图分类号] R966

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2019)04-0294-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.002

Protective effect of areca catechu linn ethanol extract against hypoxia in H9C2 cells

ZHAO Anpeng¹, JIN Ting^{1,2}, WANG Rong^{1,2} (1. PLA Field Key Laboratory for Prevention and Remediation of Plateau Environmental Damage, Hospital 940 of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730000, China; 2. College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective** To study the protective effect and mechanism of anhydrous ethanol extract of areca catechu linn against hypoxia in H9C2 cells. **Methods** Myocardial cell hypoxic mold was established by H9C2 cell line. The effect of areca catechu linn anhydrous ethanol extract on cells livability was studied by CCK-8. The intracellular content of MDA, activities of SOD and GSH were measured to determine the protective effect of the extract. The mRNA of Nrf-2 and caspase-3 were detected by real-time PCR to explore the protective mechanism. **Results** Compared to the normoxic control group, the cell survival rate in hypoxic group was 28.46% ($P < 0.01$) after 24 hour hypoxia. The intracellular content of MDA increased 44.33% ($P < 0.05$). The activities of SOD and GSH decreased by 16.18% and 30.64%, respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The result of RT-PCR showed the activation of Nrf2 with a 1.74 times increase of mRNA expression ($P < 0.05$). Compared with hypoxic group, there was an dose-dependent increase of cell survival rate in H9C2 cells ($P < 0.01$) when treated with areca catechu linn anhydrous ethanol extract during hypoxia. The intracellular activities of SOD and GSH also increased by 14.90% and 28.94% ($P < 0.05$). The relative expression of Nrf2 mRNA decreased significantly by 66% ($P < 0.05$). **Conclusion** The anhydrous alcohol extract of areca catechu linn has a significant protective effect on H9C2 cells against hypoxia. Its protective mechanism may relate to the improvement of intracellular antioxidant enzyme activity, the reduction of oxidative stress damage and the improvement of cell hypoxic tolerance.

[Key words] areca catechu linn; extracts; myocardial cells; anti-hypoxia; oxidative stress

[基金项目] 国家科技重大专项(2018ZX09J18109-001); 国家自然科学基金(81673508)

[作者简介] 赵安鹏, 硕士, 药师, 研究方向: 高原低氧药代动力学研究, Email: z_anpeng@163.com

[通讯作者] 王 荣, 教授、博士生导师, 主要研究方向: 高原药物分析与药物代谢, Email: wangrong-69@163.com

足够的氧气对于机体各部分的生存是至关重要的, 对于具有高能量需求的组织(例如心脏)尤为重要。然而, 急进高原时, 低氧将是机体需要应对的最大挑战。心肌组织具有耗能、耗氧高的特点, 处于低氧环境的心肌出现氧合不足, 组织受损, 心功能也会产生一定程度的障碍^[1]。

氧化应激是引起细胞受损的重要原因之一, 出

现氧化应激时,细胞内生成大量具有毒性的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)和自由基,而心肌细胞非常容易受 ROS 影响。低氧时,心肌细胞生成大量 ROS 及氧自由基,引起蛋白质变性、核酸链断裂及膜脂质的过氧化,其主要产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)可以作为氧化应激损伤的重要检测指标。与此同时,心肌细胞内产生的抗氧化物及自由基清除剂也发挥着保护细胞免受损伤的作用,如过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)^[2]。所以,抑制自由基的产生或促进内源性的抗氧化作用都能够减轻心肌细胞的损伤。

槟榔,棕榈科槟榔属植物,生物活性较为复杂^[3-5]。本课题组的前期研究结果表明^[6],在常压密闭缺氧实验中,槟榔无水醇提物能够显著增加小鼠的生存时间;在模拟高原急性缺氧及急进高原实地缺氧实验中,其对大鼠具有显著的保护作用,但保护机制尚不明确。为了进一步探讨槟榔醇提物的心脏保护作用及机制,本研究将使用心肌 H9C2 细胞构建低氧损伤模型,通过检测细胞存活率,细胞内抗氧化酶活力的变化及低氧损伤相关基因的变化,研究槟榔无水醇提物对 H9C2 细胞损伤的保护作用,探讨相关机制。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

H9C2 细胞株(编号:GNR 5,上海中科院细胞库);高糖 DMEM 培养基、1×PBS 溶液(美国,HyClone);胎牛血清(德国, PAN Biotech);100×青霉素-链霉素混合液(美国, Gibco);D-Hanks 溶液、BCA 蛋白测定试剂盒(北京, Solarbio);Cell Counting Kit-8 试剂盒(日本, Dojindo);MDA 试剂盒、SOD 试剂盒、GSH 试剂盒(南京建成);RIPA 强效蛋白裂解液(上海碧云天公司);95% N₂, 5% CO₂ 混合器(兰州芮康商贸有限公司);TRIzol® Reagent、PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)、RNA-free Water、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(大连, TakaRa 宝生物工程公司);核因子相关因子 E2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteiny l aspartate specific proteinase 3, caspase-3)引物,由 TakaRa 合成;没食子酸标准品(上海源叶生物科技有限公司);槟榔由联勤保障部队第九四〇医院药剂科中药室提供,购自甘肃陇脉药材有限公司(批号 160501);槟榔提取物为联勤保障部队第九四

〇医院高原损伤防治实地重点实验室制备;红景天胶囊(中国人民解放军西藏军区红景天研制中心,规格 0.38 g)。

1.2 仪器

细胞培养箱(德国, Memmert);细胞培养瓶(25 cm², 美国, Corning Costar);Microfuge22R 台式冷冻离心机(美国, Beckman);倒置显微镜(日本, Olympus);ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪(美国, Applied Biosystemes);Modular Incubator Chamber 模块化培养室(美国, Brincubator);EST-10-02 氧气检测仪(深圳希特森环保设备商行);超微量紫外分光光度计(德国, IMPLÉN)。

2 实验方法

2.1 槟榔无水醇提物的制备

取槟榔切片 2 kg,粉碎后过 100 目筛,取粉末 1 kg,加 30 倍物料体积的无水乙醇后置于回流提取浓缩机(50~60)℃ 4 h,得提取液^[7],将提取液泵入浓缩罐中浓缩至 1L,再用旋转蒸发器挥干乙醇,浓缩液用冷冻干燥机干燥,收集;加水溶解为 3 mg/ml,加入 AB-8 型大孔吸附树脂,以 60%乙醇洗脱并收集,(40~50)℃旋转蒸发,浓缩液放入冷冻干燥机干燥,得槟榔无水醇提物^[8]。

2.2 总酚含量测定

2.2.1 试剂的配制

称取硫酸亚铁 1.00 g,酒石酸钾钠 5.00 g,加蒸馏水溶解定容到 1 L,得酒石酸亚铁溶液;称取磷酸氢二钠 60.20 g,磷酸二氢钠 5.00 g,加蒸馏水溶解定容到 1 L,得磷酸盐缓冲溶液(pH 7.5)。

2.2.2 标准曲线的制作

以酒石酸亚铁比色法测定总酚含量^[7],称取 5 mg 没食子酸标准品,加蒸馏水定容至 10 ml,得 0.5 mg/ml 的对照品溶液,分别吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml 对照品溶液于 5 ml 容量瓶,蒸馏水补至 1 ml,加入 1 ml 酒石酸亚铁溶液后以磷酸盐缓冲液(pH 7.5)定容至刻度,混匀后静置 15 min,以蒸馏水作为空白参比,在 540 nm 波长处测定吸光度值(A)。

2.2.3 槟榔无水醇提物总酚含量的测定

以 60%乙醇为溶剂,配制 1 mg/ml 的槟榔无水醇提物溶液。取 0.2 ml 置于 5 ml 容量瓶,加蒸馏水至 1 ml,加入 1 ml 酒石酸亚铁溶液,以磷酸盐缓冲液(pH 7.5)定容至刻度,混匀静置 15 min 后,以蒸馏水作为空白参比,在 540 nm 波长处测定其吸光度值(A),平行测定 3 份。

2.3 H9C2 心肌细胞的培养

将 H9C2 细胞以 2×10^6 个/瓶,接种于 25 cm^2 细胞培养瓶(透气盖)中,放入细胞培养箱进行培养,条件为 37°C , $5\% \text{ CO}_2$, $95\% \text{ RH}$ 。等细胞融合度 $\geq 75\%$,进行传代,置于 25 cm^2 细胞培养瓶(透气盖)中继续培养。

2.4 H9C2 细胞低氧处理

选择对数生长期且状态良好的细胞,用 0.25% 胰酶消化,离心,去上清,重悬,接种于细胞培养板中进行相应实验。常氧组置于细胞培养箱中正常培养。低氧组和给药组置于模块化培养室中,给予含有 $95\% \text{ N}_2$ 和 $5\% \text{ CO}_2$ 的二元气,使用氧检测仪检测培养小室中氧浓度为 0% 时停止送气,关闭阀门,将低氧装置置于细胞培养箱中培养。

2.5 CCK-8 法检测槟榔醇提取物对 H9C2 细胞存活率的影响

细胞消化、重悬后,吹散到单个细胞数量 $\geq 95\%$ 后,以 $10\,000$ 个/孔,接种于 96 孔板,每孔体积 $100\text{ }\mu\text{l}$ 。分别为常氧对照组、低氧模型组、阳性对照红景天胶囊组、无水醇提取物组,其中非给药组及给药组的各剂量组均做 3 个复孔。继续以正常条件培养 $24\sim 48\text{ h}$,待细胞融合度 $\geq 70\%$ 后,阳性对照组和无水醇提取物组分别加入终浓度为 5 、 10 、 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的含有红景天或槟榔醇提取物的培养基溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$ 。常氧对照组、低氧模型组加入 $100\text{ }\mu\text{l}$ /孔的完全培养基。低氧处理 24 h 、 48 h 后,吸弃原培养液,用等体积的新鲜培养基清洗细胞 2 次后,重新加入 $100\text{ }\mu\text{l}$ 培养基及 $10\text{ }\mu\text{l}$ CCK-8 液, 37°C 孵育 1 h ,使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度。

2.6 槟榔无水醇提取物对低氧 H9C2 细胞内氧化应激指标的影响

把 H9C2 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞融合度 $\geq 70\%$ 后各组分别加入终浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的红景天或无水醇提取物的含药培养基 1.5 ml 。低氧处理 24 h ,吸弃原培养基,用预冷的 PBS 液清洗 3 次,每孔加入 $400\text{ }\mu\text{l}$ RIPA 强效蛋白裂解液(含蛋白酶抑制剂 PMSF $4\text{ }\mu\text{l}$),冰上裂解、破碎后吸取上清,严格依照说明书测定相关指标。

2.7 槟榔无水醇提取物对低氧 H9C2 细胞内 Nrf2、Caspase3 基因 mRNA 的影响

用 Trizol 法提取细胞内总 RNA,参考 TakaRa 公司 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒的操作说明书进行逆转录 cDNA 合成。按照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 试剂盒的操作说明书,按表 1 所示配制反应体系,在 ViiATM 7 DX 实时定量荧

光 PCR 仪(Applied Biosystems)上进行 PCR 扩增反应。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算定量 PCR 的数值进而比较正常对照组与高海拔缺氧组中药物转运体的基因表达变化。

表 1 Real-Time PCR 反应体系

试剂	体积(μl)	终浓度
SYBR ^P remix ExTaq TM II ($2\times$)	10	$1\times$
PCR Forward Primer($10\text{ }\mu\text{mol}$)	0.8	$0.4\text{ }\mu\text{mol}$
PCR Reverse Primer($10\text{ }\mu\text{mol}$)	0.8	$0.4\text{ }\mu\text{mol}$
ROX ReferenceDye I ($50\times$)	0.4	$1\times$
cDNA 模板	2	—
dH ₂ O	6	—
总体积	20	—

2.8 引物设计与合成

采用 Primer 6.0 合成引物,并在 NCBI 官网进行验证以保证引物设计正确。引物合成由 Takara 公司完成,如表 2 所示。

表 2 基因引物序列

基因名称	引物序列
Nrf2	F:5-AACCAGTGGATCTGCCAACTACTC-3
	R:5-CTGCGCCAAAAGCTGCAT-3
Caspase3	F:5-TGAGGAGTTGTCGTTGGT-3
	R:5-GGAGCGTTACTAATGATGGT-3
β -actin	F:5-GTCCACCTTCCAGCAGATGTG-3
	R:5-GCATTGTGCGGTGGACGAT-3

2.9 统计学处理

统计学分析采用 SPSS 11.0 统计软件进行。结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示组间差异具有显著性, $P < 0.01$ 为极显著差异。

3 结果

3.1 槟榔无水醇提取物中的总酚含量

以对照品浓度为横坐标(X),吸光度值为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算得对照品线性回归方程为 $Y = 15.46X - 0.004$, $r = 0.9999$,表明没食子酸在 $0.01\sim 0.05\text{ mg/ml}$ 范围内线性关系良好。根据线性回归方程,计算得出槟榔无水醇提取物中总酚含量为 $(41.32 \pm 2.61)\%$ 。

3.2 不同低氧时间对细胞存活率的影响

实验结果如图 1 所示,细胞存活率随低氧时间的增加而减小。与常氧组相比,低氧 24 h 时细胞存活为 28.46% ($P<0.01$),低氧 48 h 时细胞存活为 16.08% ($P<0.01$)。而低氧 48 h 与低氧 24 h 两组之间进行比较,细胞存活率无显著性差异 ($P>0.05$)。所以选择低氧 24 h 作为低氧时间进行后续试验。

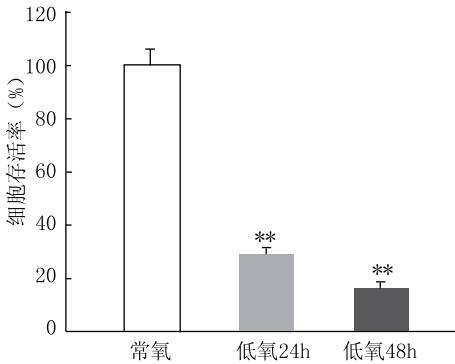


图 1 不同低氧时间对细胞存活率的影响

* $P<0.05$, ** $P<0.01$,与常氧组比较

3.3 不同浓度槟榔无水醇提取物对 H9C2 细胞存活率的影响

由表 3 可知,与低氧模型组相比,终浓度为 5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 的槟榔无水醇提取物能显著增加低氧时 H9C2 细胞的存活率 ($P<0.01$),细胞存活率分别为 38.97%、40.77%、51.65%,与同剂量的红景天相比,保护作用优于红景天。20 $\mu\text{g/ml}$ 给药时对低氧细胞保护作用最明显,所以后续试验中选择 20 $\mu\text{g/ml}$ 给药。

表 3 槟榔无水醇提取物对细胞存活率的影响

组别	给药剂量($\mu\text{g/ml}$)	细胞存活率(%)
常氧空白组	—	100
低氧模型组	—	28.37 $\pm$ 0.03**
红景天胶囊组	5	31.03 $\pm$ 0.01
红景天胶囊组	10	34.67 $\pm$ 0.01 [#]
红景天胶囊组	20	35.17 $\pm$ 0.02 [#]
无水醇提取物	5	38.97 $\pm$ 0.04 [#] Δ
无水醇提取物	10	40.77 $\pm$ 0.06 [#] Δ
无水醇提取物	20	51.65 $\pm$ 0.05 [#] Δ

** $P<0.01$ 与常氧空白组比较;[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 与低氧模型组比较; Δ $P<0.05$,与红景天组比较

3.4 槟榔无水醇提取物对低氧 H9C2 细胞内氧化应激指标的影响

实验结果如表 4,与常氧对照组相比,低氧模型

组细胞内丙二醛含量增加了 44.33% ($P<0.05$),SOD、GSH 活力分别下降 16.18%、30.64% ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),给予浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 无水醇提取物处理后,SOD、GSH 活力分别增加 14.90%、28.94% ($P<0.05$)。无水醇提取物处理组细胞内 MDA 含量,SOD、GSH 活力与红景天处理组无显著性差异,无水醇提取物与红景天作用无显著性差异。

表 4 槟榔无水醇提取物对细胞内 MDA 含量、SOD 活力、GSH 活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

分组	MDA (nmol/mgprot)	SOD (U/mgprot)	GSH (nmol/mgprot)
常氧对照组	2.70 $\pm$ 0.12	47.47 $\pm$ 2.00	17.92 $\pm$ 1.78
低氧模型组	4.85 $\pm$ 0.55*	39.79 $\pm$ 2.61*	12.43 $\pm$ 0.85**
红景天组	4.05 $\pm$ 0.18 [#]	44.32 $\pm$ 1.85 [#]	16.48 $\pm$ 1.32 [#]
无水醇提组	4.52 $\pm$ 0.33	45.72 $\pm$ 3.81 [#]	17.49 $\pm$ 1.94 [#]

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与常氧空白组比较;[#] $P<0.05$,与低氧模型组比较

3.5 槟榔无水醇提取物对低氧 H9C2 细胞内 Nrf2、Caspase3 基因 mRNA 的影响

实验结果如图 2 所示,与常氧组相比,低氧组细胞内 Nrf2 基因 mRNA 相对表达量升高 1.74 倍 ($P<0.05$)。与低氧模型组相比,无水醇提取物处理组细胞内 Nrf2 基因 mRNA 相对表达量降低 66% ($P<0.05$),作用与红景天无显著性差异。

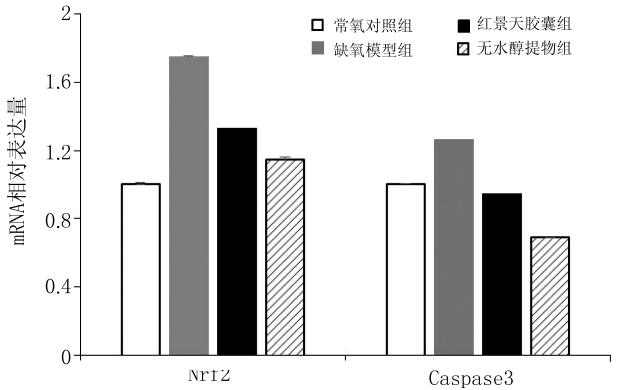


图 2 槟榔无水醇提取物对 H9C2 细胞内 Nrf2、Caspase3 基因 mRNA 相对表达量的影响

* $P<0.05$ 与常氧空白组比较;[#] $P<0.05$ 与低氧模型组比较

4 讨论

本研究建立了 H9C2 细胞体外低氧模型,探究了槟榔无水醇提取物对低氧受损 H9C2 细胞的保护作用,初步阐明其对细胞的保护机制。

在正常情况下,生物体由于细胞代谢而产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),ROS 水平

的稳态是细胞维持正常形态及功能所必需的。相反,ROS 的过量产生将导致细胞基本组成的受损,如 DNA、蛋白质和脂质。当自由基的生成量超过了细胞的抗氧化能力时,氧化剂与抗氧化剂比例失衡,细胞发生氧化应激,这也是低氧时组织损伤的最常见原因。Nrf2 是近年发现的参与氧化还原平衡调节的重要因子之一,在细胞内源性保护系统中具有重要作用,同时,其对细胞内部氧化还原稳态的改变极为敏感。当机体受到自由基或化学物质等刺激产生氧化应激时,Nrf2 被激活,活化的 Nrf2 迁移入核后与抗氧化反应元件(ARE)结合,发挥调节细胞氧化还原稳态的作用^[9-10]。本研究结果显示低氧细胞内 Nrf2 基因 mRNA 表达较常氧组增高,提示低氧导致细胞受到氧化应激刺激,相应的 Nrf2 被激活。与低氧组相比,无水醇提物处理后细胞内 Nrf2 基因 mRNA 表达下调,与常氧对照组趋于一致。虽然提高 Nrf2 的表达有助于细胞内抗氧化物的转录与表达,但我们认为 Nrf2 的升高也是细胞氧化应激程度的指针,槟榔无水醇提物降低了低氧细胞内 Nrf2 的 mRNA 水平可能与其改善细胞的氧化应激状态有关,相应的降低了 Nrf2 的应答。其减轻氧化应激的原因可能与增加细胞耐低氧能力,增强细胞内抗氧化酶活性,清除氧自由基等有关。Nrf2 信号通路中包含多种蛋白激酶,为了更好的阐明槟榔无水醇提物的抗氧化应激机制,还需要对这些关键的蛋白进行相关的检测,我们将在后期对其进行深入研究。

此外,氧化应激也是诱导心肌细胞凋亡的常见诱因之一。细胞内 ROS 的异常积累可能导致细胞重要大分子的有害修饰,这些损害累积最终可能通过不同途径引起细胞凋亡。因此,调节细胞内的 ROS 可能是减少病理性细胞凋亡的有效方式^[11]。Caspase 家族在调节细胞凋亡的过程中发挥关键作用,可被多种刺激诱导,其中包括氧化应激。Caspase-3 是凋亡的关键执行者,参与 DNA 降解,染色质的调控因子冷凝和核碎裂^[12]。本研究结果表明,低氧刺激使 Caspase-3 在转录水平有升高趋势,而槟榔无水醇提物处理能降低 Caspase-3 mRNA 水平,这可能是其提高低氧情况下 H9C2 心肌细胞存活率的原因之一。更加深入的研究还有待于细胞凋亡的直接检测以及细胞内促凋亡/抗凋亡蛋

白的研究等相关研究等。

综上所述,槟榔无水醇提物对低氧 H9C2 细胞有明显的保护作用,其能提高细胞内抗氧化酶活性,具有使细胞免受氧化应激损伤的作用。

【参考文献】

- [1] ZARNDT R,PILOTO S,POWELL F L,et al. Cardiac responses to hypoxia and reoxygenation in *Drosophila* [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2015, 309 (11): 1347-1357.
- [2] PARK E S,KANG D H,KANG J C,et al. Cardioprotective effect of KR-33889, a novel PARP inhibitor, against oxidative stress-induced apoptosis in H9C2 cells and isolated rat hearts [J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(5): 640-654.
- [3] CHAVAN Y V, SINGHAL R S. Separation of polyphenols and arecoline from areca nut (*Areca catechu* L.) by solvent extraction, its antioxidant activity, and identification of polyphenols [J]. *J Sci Food Agric*, 2013, 93(10): 2580-2589.
- [4] LIN E S, LI C C. Evaluation of superoxide radical scavenging capacity and reducing power of areca flower extracts [J]. *J Med Plant Res*, 2010, 4(10): 975-981.
- [5] LEE KK, CHO J J, PARK E J, et al. Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from *Areca catechu* as a new anti-ageing agent [J]. *Int J Cosmet Sci*, 2001, 23 (6): 341-346.
- [6] 靳婷. 槟榔提取物抗高原缺氧药效学及其机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
- [7] 普义鑫. 槟榔多酚提取、纯化及组分分析[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2012.
- [8] 吴秋生, 宋菲, 黄玉林, 等. 大孔树脂分离纯化槟榔花多酚研究[J]. *广东农业科学*, 2015, 42(23): 122-126.
- [9] TKACHEV V O, MENSCHIKOVA E B, ZENKOV N K. Mechanism of the Nrf2/Keap1/Are signaling system [J]. *Biochemistry Mosc*, 2011, 76(4): 407-422.
- [10] ABDO S, ZHANG S L, CHAN J S. Reactive oxygen species and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in diabetic nephropathy: A hidden target [J]. *J Diabetes Metab*, 2015, 6(6): 1375-1379.
- [11] KANNAN K, JAIN S K. Oxidative stress and apoptosis [J]. *Pathophysiology*, 2000, 7(3): 153-163.
- [12] EARNSHAW W C, MARTINS L M, KAUFMANN S H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68(1): 383-424.

【收稿日期】 2018-12-27 【修回日期】 2019-06-24

【本文编辑】 陈盛新