

大豆异黄酮对大鼠海马神经干细胞分化的影响

龙军¹, 袁冬平^{2*}, 周玲玲², 周静³, 许立³, 刘娟¹

(1. 南京中医药大学临床药学教研室, 南京 210046; 2. 南京中医药大学
药理教研室, 南京 210046; 3. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210029)

[摘要] **目的:** 研究过氧亚硝基阴离子(ONOO^-)对新生大鼠海马神经干细胞(NSCs)分化的影响以及大豆异黄酮(ISO)对抗 ONOO^- 致脑神经细胞氧化损伤的作用及其可能的作用机制。**方法:** 制备新生大鼠海马神经干细胞并经免疫荧光鉴定。以吗啉-斯得酮亚胺(SIN-1, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)作为 ONOO^- 供体引起海马神经干细胞出现分化障碍, 再分别用氧合血红蛋白(HbO_2 , $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 超氧化物歧化酶/过氧化氢酶(SOD/catalase, $50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), 褪黑激素($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)以及ISO($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)进行干预, 免疫荧光检测神经干细胞及其分化情况。**结果:** SIN-1引起海马神经干细胞巢蛋白阳性(NSE⁺)细胞数量明显减少, 已分化神经细胞形态变化很明显。单独使用一氧化氮阴离子(NO^-)清除剂 HbO_2 或超氧阴离子(O_2^-)清除剂SOD/catalase可以增加NSE⁺细胞数量, 改善形态变化。但 ONOO^- 清除剂(褪黑激素)和ISO能够更明显地增加NSE⁺细胞数量并改善形态变化, 尤以前者效果更加明显。**结论:** ONOO^- 可对新生大鼠海马神经干细胞的分化产生不利影响。ISO可以对抗 ONOO^- 引起的海马神经干细胞的分化障碍, 在脑神经细胞氧化损伤的修复方面具有良好的应用潜力。

[关键词] 大豆异黄酮; 过氧亚硝基阴离子; 海马; 神经干细胞; 分化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0167-05

Effect of Soy bean Isoflavones on Dysdifferentiation of Cultured Hippocampus Neural Stem Cells Originated from Neonatal Rat

LONG Jun¹, YUAN Dong-ping^{2*}, ZHOU Ling-ling², ZHOU Jing³, XU Li³, LIU Juan¹

(1. Department of Clinic Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Department of Pharmacology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

3. Jiangsu Key Laboratory of Efficacy and Safety Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of peroxynitrite anion (ONOO^-) on the differentiation of hippocampus neural stem cells (NSCs) of primary rat, and the action and potential mechanisms of soy bean isoflavones against oxidative damage produced by ONOO^- in brain nerve cells. **Method:** Hippocampus NSCs of primary rat were prepared according to the methods of trypsin digestion combined with mechanical dissociation, and differentiated nerve cells were identified with the method of immunofluorescence. Dysdifferentiation of hippocampus NSCs were induced by SIN-1 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) as a ONOO^- donor, then the cells were treated with HbO_2 ($0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), SOD/catalase ($50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), melatonin ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and isoflavones ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), respectively, and the differentiation of NSCs was detected with the method of immunofluorescence. **Result:** Differentiation of hippocampus NSCs were limited by the SIN-1, the number of nestin-positive (NSE⁺) cells was significantly decreased and the morphological changes of differentiated neural cells were obvious. The number of

[收稿日期] 20110117(011)

[基金项目] 南京中医药大学青年自然科学基金课题(07XZR07); 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室开放课题(P09005)

[第一作者] 龙军, 讲师, 博士, 从事中药心脑血管药理研究, Tel: 025-86798625, E-mail: long_ydp@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 袁冬平, 讲师, 博士, 从事心肺血管药理研究, Tel: 025-86798939, E-mail: annieyuan99@163.com

NSE⁺ cells was increased and the morphological changes were alleviated with the treatment of NO⁻ scavenger (HbO₂) or O₂⁻ · scavenger (SOD/catalase) alone, but that could be alleviated significantly with the treatment of ONOO⁻ scavenger (melatonin) or soy bean isoflavones and the former was better. **Conclusion:** The dysfunction in the differentiation of hippocampus NSCs of neonatal rat can be produced by ONOO⁻, which can be improved moderately by soy isoflavones showing the potential of isoflavones in application to the repair of oxidative damages in brain nerve cells.

[**Key words**] soy bean isoflavones; peroxynitrite anion; hippocampus; neural stem cell; differentiation

研究发现,生物体在包括缺血/再灌注在内的多种疾病过程中都会产生超氧阴离子(O₂⁻)和一氧化氮阴离子(NO⁻),O₂⁻可与NO⁻迅速反应生成过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻)。ONOO⁻是比O₂⁻和NO⁻氧化能力更强的氧化剂,可引起缺血缺氧组织出现更严重的氧化损伤。因此,ONOO⁻的清除剂可能对缓解脑缺血损伤具有更现实的应用价值。

大豆异黄酮(soy bean isoflavone, ISO)是大豆中的异黄酮类物质,具有抗氧化作用,可以消除一些有害的氧自由基及过氧化导致的DNA损伤^[1-3]。进一步研究发现,ISO的抗氧化作用对脑缺血也有保护效应^[4-5]。然而,ISO是否对ONOO⁻引起的脑组织损伤时神经的再生修复有积极作用尚不清楚。本文将从ONOO⁻对新生大鼠海马神经的氧化作用出发,研究ISO对脑缺血神经干细胞分化的影响及其机制。

1 材料

1.1 动物 新生24 h的SD大鼠,雄性,由南京中医药大学实验动物中心提供,合格证号SYXK(苏)2005-0008。

1.2 药物与试剂 大豆异黄酮提取物(纯度84%),陕西天成植物工程有限公司;Ham's F12、阿糖胞苷(批号Z0121)、Neurobasal™-A Medium(批号P9023BL)、B27(批号568642),均为Gibco公司;无支原体新生牛血清、无支原体胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;吗啉-斯得酮亚胺(SIN-1,批号0405594-12),Cayman chemical company; 5-bromodeoxyuridine(BrdU),Sigma公司;小鼠抗BrdU单克隆抗体、兔抗大鼠Nestin抗体、兔抗大鼠NSE抗体,武汉博士德生物工程有限公司;山羊抗小鼠Cy5、山羊抗兔Cy3、抗荧光淬灭封片液,碧云天生物技术研究所。

1.3 仪器 超净工作台,苏州市华宇净化设备有限公司;HS-4S数显恒温水浴锅,南京大学普阳科学仪

器研究所;CO₂孵箱,SANYO;自动平衡微型离心机,北京医用离心机厂;倒置相差显微镜,德国LEICA;隔水式电热恒温培养箱,上海市跃进医疗器械厂;IX71型荧光显微镜,日本Olympus。

2 方法

2.1 神经干细胞的培养^[6] 选取新生24 h的SD大鼠,无菌条件分离并剪碎双侧海马组织,加入5倍量0.25%的胰蛋白酶,37℃条件下CO₂培养箱内消化15 min左右。以1 000 r·min⁻¹离心5 min,用无血清培养液调整细胞密度为1×10⁶个/mL,接种,置于37℃5%CO₂培养箱中培养。24 h后,将培养液全量换成neurobasal/B27培养液。以后每7 d换液2次,每次换半量,7 d后细胞传代。

2.2 神经干细胞的鉴定 原代神经球接种于含有多聚赖氨酸处理过的盖玻片的24孔培养板中,培养2 h后进行神经干细胞nestin的免疫荧光鉴定。

2.3 神经干细胞的传代能力检测 原代神经球接种于浓度为5 μmol·L⁻¹的BrdU培养液中,BrdU免疫荧光检测法检测神经干细胞的传代能力,一抗采用小鼠抗BrdU单克隆抗体(1:200),二抗采用山羊抗小鼠Cy5(1:1 000)。

2.4 单细胞克隆试验^[6] 原代神经球培养液移至培养皿中,吸取单个神经球,放入96孔培养板中,轻轻吹打制备单细胞悬液。采用有限稀释法将单细胞悬液稀释,使每孔中含1~2个细胞,继续培养,倒置显微镜下观察细胞分裂及单克隆形成情况。

2.5 神经干细胞的分化及药物影响 收集悬浮生长的神经球,转移至24孔培养板(预先放置多聚赖氨酸处理过的无菌盖玻片)中,加入终浓度为10%胎牛血清继续培养。诱导分化7 d后,在含各组受试药物的Earle缓冲盐(EBSS,5%CO₂,37℃)培养液中过夜孵育。弃培养液,0.02 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.2)中洗涤3次,4%多聚甲醛(溶于0.05 mol·L⁻¹磷酸钠中,pH 7.4,含0.8%氯化钠)固定,同法进行

免疫荧光检测,一抗为兔抗大鼠 NSE(1:200),二抗为山羊抗兔 Cy3(1:1 000)。每个标本随机选取 10 个视野,计数 NSE 阳性细胞数和总细胞数,计算两者比率,采用 χ^2 检验进行统计分析。

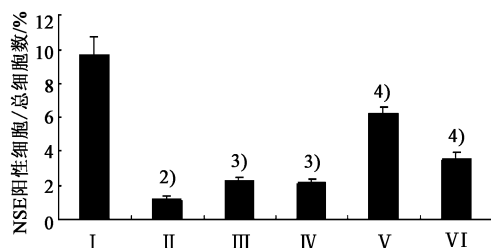
在转接种第 48 h 加入终浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿糖胞苷,以抑制非神经元细胞的过度生长。分化的神经干细胞随机分组,每组 12 孔细胞。对照组:正常培养;ONOO⁻供体组:给予 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SIN-1;ONOO⁻供体 + NO⁻清除剂组:给予 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SIN-1 和 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HbO₂;ONOO⁻供体 + O₂⁻清除剂组:给予 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SIN-1 和 $50 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ SOD/catalase;ONOO⁻供体 + ONOO⁻清除剂组:给予 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SIN-1 和 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 褪黑激素;ONOO⁻供体 + 大豆异黄酮组:给予 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SIN-1 和 大豆异黄酮($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

3 结果

3.1 神经干细胞的培养及其鉴定 无血清培养获得的神经球内绝大部分细胞呈神经干细胞特异性抗原巢蛋白(nestin)阳性。单细胞培养发现,少数细胞可持续分裂,并最终形成边界清楚,折光性强的神经球,表明其具有自我增殖能力。神经干细胞传代能力实验发现,在新形成的神经球中绝大多数为 BrdU⁺ 细胞,表明其具有传代能力。神经球加入胎牛血清诱导分化后,可见神经球迅速贴壁,边缘细胞向外迁移。5~6 d 后细胞进一步呈多形性分化。诱导分化 7 d 后,神经细胞中大部分为神经元,胞体饱满,突起粗长且有较多分支,少部分为神经胶质细胞,胞体较大,突起多而短,表明神经球具有多分化潜能。由以上实验结果可知,本实验培养获得的细胞是神经干细胞。继续培养 10~14 d,神经元依然呈现最佳状态,但培养 30 d 以上的细胞数量明显减少,可见变性的神经元细胞及细胞碎片。

3.2 神经干细胞的分化及药物影响 由于实验中加入低浓度阿糖胞苷以抑制非神经元细胞的过度生长,因此,在正常情况下海马区神经干细胞的培养物中富含神经元,核清晰,突起走形清楚,形态良好,神经元网络连接较为稳定。在神经干细胞分化培养 7 d 后,ONOO⁻供体组的神经元受损严重且数量减少,大部分突触向胞体收缩,折光性明显减弱,神经元网络连接消失,且贴壁不牢或呈悬浮状,甚至可见部分变性神经元细胞及细胞碎片。在 ONOO⁻供体 + NO⁻清除剂组和 ONOO⁻供体 + O₂⁻清除剂组

中,神经元的损伤情况相似,但与 ONOO⁻供体组相比,损伤程度略微减轻,仍可见零星神经网络。在 ONOO⁻供体 + ONOO⁻清除剂组,神经元的形态特征明显优于 ONOO⁻供体 + NO⁻清除剂组和 ONOO⁻供体 + O₂⁻清除剂组,损伤情况较轻,NSE⁺细胞数量较多。ONOO⁻供体 + 大豆异黄酮组,神经元的形态特征接近 ONOO⁻供体 + ONOO⁻清除剂组,神经元轮廓较为清晰,折光性较好,NSE⁺细胞数量较多,神经网络连接依然良好,表明大豆异黄酮减轻了 ONOO⁻引起的分化的神经元的形态学损伤。各组 NSE⁺细胞数量见图 1。



I. 对照组;II. ONOO⁻供体组;III. ONOO⁻供体 + NO 清除剂组; IV. ONOO⁻供体 + O₂⁻清除剂组;V. ONOO⁻供体 + ONOO⁻清除剂组;VI. ONOO⁻供体 + 大豆异黄酮组。与I组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与II组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

图1 大豆异黄酮对新生大鼠海马神经干细胞分化的影响

4 讨论

本实验采用胰酶化学消化与机械分离相结合的方法,从初生 24 h 大鼠海马培养获得具有分裂增殖能力的细胞,并在无血清培养条件下形成神经球。培养细胞经巢蛋白免疫荧光染色鉴定,证实为巢蛋白阳性神经干细胞^[7-8]。BrdU 免疫荧光检测发现,这些细胞具有扩增产生子代细胞的能力,同时还可分化为神经元及神经胶质细胞,具有多分化潜能。以上实验结果提示本实验成功获得了神经干细胞。

SIN-1 可以同时产生 NO⁻ 和 O₂⁻,继而反应生成 ONOO⁻,因而是理想的 ONOO⁻供体^[9]。本实验结果表明,新生大鼠海马神经干细胞在向神经细胞分化的过程中,由 SIN-1 产生的 ONOO⁻对细胞(包括神经干细胞及其分化的神经细胞)产生了明显的损伤作用。这种神经毒性的机制可能与酶的氧化失活、细胞膜脂质的过氧化、DNA 损伤以及线粒体功能障碍有关^[10]。研究还发现,ONOO⁻产生神经毒性的机制可能是通过 cGMP-I_{Na}-AP 信号级联系统作用于海马神经元产生的^[11]。此外,单纯使用 NO⁻清除剂或 O₂⁻清除剂并没有明显改善 ONOO⁻引起的神经毒性损伤,充分

说明 O_2^- 或 NO^- 本身并不是引起脑缺血神经损伤的直接或关键因素,与文献报道一致。

褪黑激素(MT)是一种神经内分泌激素,能抑制神经细胞死亡、保护海马区神经元、促进神经干细胞向神经元的分化^[12-13]。本实验研究发现褪黑素对 $ONOO^-$ 引起的神经细胞氧化损伤有较好的保护作用,其机制可能与褪黑素对 $ONOO^-$ 有很好的清除效应有关^[12]。该结果同时提示,脑缺血缺氧引起神经细胞死亡时,以及短期脑缺血时的神经细胞的自我再生修复过程中, $ONOO^-$ 的清除可能都会对脑缺血产生积极的保护作用。实际上, $ONOO^-$ 已成为近年来自由基研究领域的热点。尽管至今尚未发现专一的 $ONOO^-$ 清除剂,但已发现一些对 $ONOO^-$ 有很强清除能力的活性物质,如维生素、多酚和黄酮类化合物槲皮素、茶多酚、黄芩苷等^[14-15]。

大豆异黄酮是大豆中含有多个酚羟基的一类多酚化合物的总称。有研究表明,大豆异黄酮具有许多生物活性,近年来大豆异黄酮的清除自由基和抗氧化作用^[1-3,16] 日益受到学者们的重视。本实验结果显示,作为生物黄酮的一种,大豆异黄酮对 $ONOO^-$ 引起的神经干细胞分化障碍以及已分化神经细胞的氧化损伤具有一定的保护作用,其保护效果优于单纯使用 NO^- 清除剂或 O_2^- 清除剂。有研究表明,大豆异黄酮具有直接熄灭自由基的能力,并能通过定位于膜的内部,限制膜成分的流动性,从而降阻止自由基的渗入,减慢自由基反应,抑制脂质的过氧化。另外大豆异黄酮还可诱导抗氧化蛋白的表达^[17]。本实验中大豆异黄酮对神经细胞的保护作用可能与此有一定关系。此外,体外研究已证实黄酮类化合物能与 $ONOO^-$ 反应^[18-19]。大豆异黄酮作为生物黄酮的一种,可能也具有这种与 $ONOO^-$ 反应的能力,但目前尚无确切的证据支持这种观点。因此,进一步的研究还需明确大豆异黄酮对抗 $ONOO^-$ 引起的神经细胞损伤的方式,即是防止、清除还是修复。对这个问题的思考将加深我们对大豆异黄酮作用机制的理解,并寻求脑缺血神经损伤修复的新的治疗方法。

[参考文献]

[1] Wijeratne S S, Cuppett S L. Soy isoflavones protect the intestine from lipid hydroperoxide mediated oxidative damage [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(24):9811.
[2] Kang K A, Zhang R, Piao M J, et al. Inhibitory effects of

glycitein on hydrogen peroxide induced cell damage by scavenging reactive oxygen species and inhibiting c-Jun N-terminal kinase [J]. Free Radic Res, 2007, 41(6):720.

[3] Raschke M, Rowland I R, Magee P J, et al. Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defence against oxidative stress[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(11):2322.
[4] 常红, 黄国伟, 王晓峰, 等. 大豆异黄酮对脑缺血大鼠保护作用的研究[J]. 营养学报, 2007, 29(5):490.
[5] 李智慧, 田庆伟, 邢岩, 等. 大豆异黄酮对脑缺血再灌模型小鼠抗氧化系统的影响[J]. 天津医科大学学报, 2005, 11(1):45.
[6] Sen A, Kallos M S, Behie L A. Passaging protocols for mammalian neural stem cells in suspension bioreactors [J]. Biotechnol Prog, 2002, 18(2):337.
[7] Knerlich-Lukoschus F, von der Ropp-Brenner B, Lucius R, et al. Chemokine expression in the white matter spinal cord precursor niche after force-defined spinal cord contusion injuries in adult rats [J]. Glia, 2010, 58(8):916.
[8] Mareschi K, Novara M, Rustichelli D, et al. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K^+ channel types [J]. Exp Hematol, 2006, 34(11):1563.
[9] Yu D, Neeley W L, Pritchard C D, et al. Blockade of peroxynitrite-induced neural stem cell death in the acutely injured spinal cord by drug-releasing polymer [J]. Stem Cells, 2009, 27(5):1212.
[10] 陈敏, 李强, 陈彬. 过氧亚硝基阴离子的研究进展 [J]. 生命的化学, 2003, 23(6):465.
[11] 刘朝巍, 韩大东, 杨茜, 等. 过氧亚硝酸阴离子通过鸟苷酸环化酶途径抑制钠电流影响海马神经元兴奋性 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(2):195.
[12] Chowdhury I, Sengupta A, Maitra S K. Melatonin: fifty years of scientific journey from the discovery in bovine pineal gland to delineation of functions in human [J]. Indian J Biochem Biophys, 2008, 45(5):289.
[13] 刘廷磊, 杨春, 韦迎娜, 等. 新生大鼠海马齿状回神经干细胞的鉴定及褪黑激素对其分化的影响 [J]. 河南医学研究, 2004, 13(1):28.
[14] Jourd' heuil D, Jourd' heuil F L, Kutchukian P S, et al. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions *in vivo* [J]. J Biol Chem, 2001, 276(31):28799.

2 种慢性间歇性缺氧小鼠模型模拟气阴 两虚证临床指征的比较研究

王文萍,柴程芝,寇俊萍,余伯阳*

(中国药科大学中药复方研究室,南京 211198)

[摘要] 目的:比较钠石灰和低压氧仪 2 种不同缺氧方式诱导的慢性间歇性缺氧小鼠模型的整体行为变化,为进一步构建气阴两虚证动物模型奠定基础。方法:分别采用氧分压从 21% 逐渐降至 6%,平均下降速度为 0.5%/min ~ 1%/min 的钠石灰缺氧法和氧分压在短时间内骤降后维持在 7% ~ 8% 的低压氧仪缺氧法,考察 2 种缺氧模式对小鼠体重,摄食量,自发活动以及心率、T 波等气阴两虚临床相关指标变化的影响。结果:钠石灰和低压氧仪 2 种不同的缺氧方式均能够导致小鼠体重下降;摄食量减少;行走格数减少,直立次数增加等自发活动改变;心率加快,T 波持续抬高等心电图变化,二者对各项指标的影响呈基本一致的趋势,其结果具有显著相关性。结论:钠石灰和低压氧仪 2 种缺氧方式诱导的慢性间歇性缺氧小鼠模型均能够模拟形体消瘦,食欲不振,体倦乏力,烦躁,心悸,脉细数等气阴两虚证的主要临床特征。

[关键词] 慢性间歇性缺氧;气阴两虚证;动物模型;低压氧仪;钠石灰

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0171-06

Comparison of Clinical Indications Simulating Deficiency of Both Qi and Yin Syndrome Induced by Two Types of Chronic Intermittent Hypoxia in Mice

WANG Wen-ping, CHAI Cheng-zhi, KOU Jun-ping, YU Bo-yang*

(Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] **Objective:** To establish foundation for constructing a suitable animal model of deficiency of both Qi and Yin syndrome (DQYS) induced by two types of chronic intermittent hypoxia (soda lime and low-pressure

[收稿日期] 20110228(004)

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划(2008BAI51B03);中央高校科研专项基金(JKY2009006)

[第一作者] 王文萍,硕士研究生,主要从事中药复方作用机制研究

[通讯作者] *余伯阳,教授,博士生导师,主要从事中西医结合药理学研究,Tel:025-83271321,E-mail:boyangyu59@163.com

[15] Alvarez S, Zaobornyj T, Actis-Goretta L, et al. Polyphenols and red wine as peroxynitrite scavengers: a chemiluminescent assay [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 957:271.

[16] Balabhadrapathruni S, Thomas T J, Yurkow E J, et al. Effects of genistein and structurally related phytoestrogens on cell cycle kinetics and apoptosis in MDA-MB-468 human breast cancer cells [J]. Oncol Rep, 2000, 7(1):3.

[17] Ho K P, Li L, Zhao L, et al. Genistein protects primary

cortical neurons from iron-induced lipid peroxidation [J]. Mol Cell Biochem, 2003, 247(1/2):219.

[18] Haenen G R, Paquay J B, Korthouwer R E, et al. Peroxynitrite scavenging by flavonoids [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 236(3):591.

[19] Wang N, Li D, Lu N H, et al. Peroxynitrite and hemoglobin-mediated nitrate/oxidative modification of human plasma protein; effects of some flavonoids [J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12(4):257.

[责任编辑 聂淑琴]