

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.29.002

孕期和哺乳期暴露壬基酚对仔鼠肝脏细胞色素 P450 2E1 mRNA 及蛋白表达的影响*

罗 娅¹, 俞 捷¹, 杨雪峰², 杨雪松¹, 杨 静¹, 许 洁^{1△}

(1. 遵义医学院公共卫生学院, 贵州遵义 563099; 2. 遵义医学院附属医院胃肠外科, 贵州遵义 563099)

[摘要] 目的 探讨孕期和哺乳期暴露壬基酚(NP)对仔鼠肝脏细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)mRNA 和蛋白表达的影响。

方法 将孕鼠分为低、中、高剂量染毒组(分别给予 50、100、200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ NP 染毒)和对照组,孕鼠受孕第 6 天到仔鼠出生 21 d 灌胃染毒 NP。仔鼠出生 90 d 后处死,检测血清肝功能指标及血脂水平,观察肝脏病理学变化,测定肝组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)水平,检测 CYP2E1 mRNA 和蛋白表达水平。结果 与对照组比较,各染毒组仔鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平及 AST/ALT 比值均升高($P<0.05$),且随染毒剂量的增加呈上升趋势;血清三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平均较对照组升高($P<0.05$)。对照组仔鼠肝组织结构正常,低剂量染毒组仔鼠肝脏肝窦轻度扩张,中剂量染毒组仔鼠肝脏有轻度炎症细胞灶性浸润,高剂量染毒组仔鼠肝脏有大量脂滴存在。各染毒组仔鼠肝组织 SOD、GSH-PX 活性明显低于对照组($P<0.05$),MDA 水平明显高于对照组($P<0.05$)。中、高剂量染毒组与对照组比较 CYP2E1 mRNA 和蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。结论 孕期和哺乳期暴露 NP,可致仔鼠肝脏脂质代谢紊乱及炎症损伤,可能与肝脏 CYP2E1 表达上调有关。

[关键词] 壬基酚;孕期;哺乳期;肝脏;细胞色素 P450

[中图分类号] R114

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)29-4036-04

Effects of nonylphenol exposure during pregnant and lactation period on expressions of CYP2E1 mRNA and protein of hepatic tissues in offspring rats*

Luo Ya¹, Yu Jie¹, Yang Xuefeng², Yang Xuesong¹, Yang Jing¹, Xu Jie^{1△}

(1. School of Public Health, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563099, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563099, China)

[Abstract] Objective To investigate the effects of nonylphenol (NP) exposure during pregnant and lactation period on expression of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) mRNA and protein of hepatic tissues in offspring rats. Methods Pregnant rats were assigned to four groups; the exposure groups received gavage with NP at dose levels of 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (low dose group), 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (medium dose group), 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (high dose group) and the control group was treated with corn oil alone, NP exposure time was limited from gestational day 6 to postnatal day 21. The newborn rats were sacrificed at 90 days after birth, followed by blood collection and serum separation. Then, serum biochemical indicators of liver function and lipid levels were detected. Glutathione peroxidase (GSH-PX), superoxide dismutase (SOD) activities, malondialdehyde (MDA) level and CYP2E1 mRNA and protein levels were determined in hepatic tissues. Pathologic changes in hepatic tissues were observed with HE staining.

Results Compared with the control group, the aspartate aminotransferase (ALT), alanine aminotransferase (AST) levels and AST/ALT ratio of offspring rats in exposure groups were increased in a dose-dependent manner ($P<0.05$), as well as serum TG, TC and LDL-C levels were increased ($P<0.05$). The liver tissue structure of the control group was normal. The hepatic sinus of the medium dose group was showed mild expansion and inflammatory cellular infiltration. Otherwise, the liver of high dose group had a large amount of lipid droplets. Compared with the control group, SOD and GSH-PX activities were obviously decreased, while MDA level was significantly decreased in each exposure group ($P<0.05$). CYP2E1 mRNA and protein expression levels of medium and high dose groups were higher than those in the control group ($P<0.05$). Conclusion Exposure to NP during gestation and lactation period can induce lipid metabolism disorders and inflammatory lesions in hepatic tissues of offspring rats, and it maybe associated with up-regulation of CYP2E1 expression.

[Key words] nonylphenol; gestation period; suckling period; liver; cytochrome P450

壬基酚(nonylphenol, NP)作为环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors, EEDs)的典型代表之一,主要应用于化学工业,其对环境的污染极为广泛。NP的化学结构与雌二醇相似,具有拟雌激素作用,可以通过不同途径进入机

体,例如污染的水源、食物或经皮肤吸收,还可以透过胎盘屏障、通过乳汁进入下一代体内,产生毒性作用^[1-3]。细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)是肝脏内的主要代谢酶,参与体内激素的合成、降解及外源性化合物的生物转化,在肝脏

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360439, 81560527);贵州省科技厅基金资助项目(黔科合 LH 字[2014]7543, [2015]7521 号,黔科合 J 字[2014]2177 号, [2014]2185 号);贵州省优秀青年科技人才([2017]5612);贵州省卫生计生委科学技术基金(gzwwkj2016-1-045, gzwwkj2017-1-053);遵义医学院硕士科研启动基金资助项目(F-835);遵义医学院重点学科建设经费基金资助项目(2015)。作者简介:罗娅(1983-),高级实验师,硕士,主要从事预防医学与卫生学研究。△ 通信作者, E-mail: xujie60@sina.com。

表 1 引物序列

基因名称	基因编号	上游	下游	扩增长度(bp)
CYP2E1	NM_0315431	5'-GGG GAA TGG GGA AAC AGG GTA-3'	5'-CAA TCA GAA ATG TGG GGT CAA AAG G-3'	111
β -actin	NM_031144.2	5'-CTG AAC CCT AAG GCC AAC CG-3'	5'-GAC CAG AGG CAT ACA GGG ACA A-3'	112

第一相反应代谢过程的解毒功能中起关键作用。CYP450 2E1 (CYP2E1)属于 CYP450 基因家族,主要参与激素的调控,其在肝脏中的表达水平与肝脏内自由基和脂质过氧化物的生成有显著的相关性。本课题组前期研究发现,孕期和哺乳期暴露 NP 对仔鼠肝脏有脂质过氧化损伤,但其影响机制尚未明确^[4]。故本研究采用实时荧光定量反转录 PCR(RT-PCR)法检测 CYP2E1 mRNA 的表达,并利用免疫组织化学技术和蛋白质印迹法(Western blot)检测 CYP2E1 蛋白的表达,进一步探讨 NP 对肝脏的氧化损伤机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级成年雌性 SD 大鼠 80 只,雄性大鼠 40 只,体质量 185 g 左右,购自第三军医大学动物中心[动物合格证号:SCXK(渝)2012-0005]。饲养条件:室温 22 ℃,自由饮水、进食,每 5 天换垫料 1 次。

1.1.2 实验仪器 R2245 型组织石蜡切片机(德国 Leica 仪器公司),BX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司),凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),RT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),DM 2500 型图像分析系统(德国 Leica 仪器公司),恒温培养箱 HPX-9082MBE(上海博讯公司),手持式匀浆机(上海弗鲁克科技发展有限公司),制冰机(常熟雪科电器有限公司)。

1.1.3 实验试剂 一抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA,货号:GB13044,武汉谷歌生物科技有限公司),二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(货号:K5007,丹麦 DAKO 公司)。CYP2E1 和 β -actin 引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成(货号:GENERAY, ID:140929 A25)。CYP2E1 一抗(货号:19937-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司),NP 灌胃试剂(成都西亚试剂有限公司),玉米油。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的分组及处理 SD 大鼠适应性饲养 1 周后,将雌鼠和雄鼠以 2:1 的比例合笼,发现阴栓的雌鼠定为妊娠 0 d,依次收集交配成功的孕鼠。根据孕鼠妊娠日期分层后随机分为 4 组,即对照组(未进行 NP 染毒)和低、中、高剂量染毒组(NP 50、100、200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹),共 64 只受孕成功的母鼠,对照组和各染毒组每组 16 只,从受孕第 6 天到出生后 21 d 灌胃染毒 NP。仔鼠出生后第 90 天,10%水合氯醛麻醉下处死,取血,检测肝功能指标,取肝脏,分为 4 个部分:(1)用 10%多聚甲醛固定,观察肝脏病理学变化并进行免疫组织化学分析;(2)放入冰上预冷的 Trizol 中,测定肝组织 CYP2E1 mRNA 水平;(3)直接放入冰存管测定肝组织匀浆谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)水平。

1.2.2 仔鼠指标观测 从妊娠 0 d 开始记录,称量孕鼠体质量,每周 1 次,并观察孕鼠的一般健康状况。仔鼠出生后,每周称体质量,记录仔鼠的一般生长情况。

1.2.3 主要观察指标及测定方法

1.2.3.1 肝功能指标测定 腹主动脉结扎后取血,3 000 r/min 离心,分离血清,用全自动生化分析仪进行检测,具体步骤按丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)

检测说明书操作完成。

1.2.3.2 血脂检测 采用全自动生化分析仪检测血清三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,检测方法为免疫比浊法,按试剂盒说明书操作完成。

1.2.3.3 肝脏形态学检查 取各组仔鼠肝脏相同部位以 10%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,行苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肝脏的病理变化。

1.2.3.4 肝脏 SOD、GSH-PX 活性及 MDA 水平测定 冰上制作肝脏匀浆,按试剂盒方法测定。

1.2.3.5 免疫组织化学法 仔鼠肝组织用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 5 次,除去多聚甲醛,透明、石蜡包埋、切片,行抗原修复,孵育,PBS 洗 4 次,阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,滴加一抗、二抗,DAB 显色,复染细胞核,梯度乙醇脱水、树脂封片,最后显微镜镜检,进行图像采集分析。

1.2.3.6 RT-PCR 法检测 CYP2E1 mRNA 表达 用 Trizol-酚-氯仿一步法提取肝组织总 RNA,测定 RNA 总纯度:260 nm 与 280 nm 处吸光度值比值(A₂₆₀/A₂₈₀)在 1.8~2.0 之间,表明纯度满足分子生物学实验要求。反转录条件:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,反转录的 cDNA 4 ℃ 保存。引物设计及合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成,以 β -actin 作为内参。循环条件:95 ℃ 2 min 变性,95 ℃ 45 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 30 s 扩增 35 个循环,72 ℃ 10 min 延伸。收集荧光信号,进行标准化转换得到各样品的拷贝数(Ct 值),以 Ct 值的均数反映目的基因的表达,引物序列见表 1。

1.2.3.7 Western blot 检测 CYP2E1 蛋白的表达 提取蛋白并用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白水平,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,免疫反应,稀释一抗[TBST 溶解的 5%脱脂牛奶,磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5%牛血清清蛋白(BSA)],4 ℃ 孵育过夜,二抗用 TBST 稀释 3 000 倍,室温下孵育 30 min,洗涤,采用电化学发光(ECL)法曝光、显影,凝胶成像仪扫描,Alpha 软件处理系统分析目标带的灰度值,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)表达水平作为内参照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝功能指标变化 各染毒组仔鼠血清 ALT、AST 水平及 AST/ALT 比值均升高,且随染毒剂量的增加呈上升趋势,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组肝功指标比较(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	AST/ALT
对照组	25.64±5.13	37.47±4.62	1.69±0.15
低剂量染毒组	187.65±10.07*	399.32±19.44*	2.13±0.51*
中剂量染毒组	354.36±17.50*	758.84±29.27*	2.14±0.68*
高剂量染毒组	488.52±23.62*	1 299.34±44.16*	2.84±0.67*

*: $P < 0.05$, 对照组比较

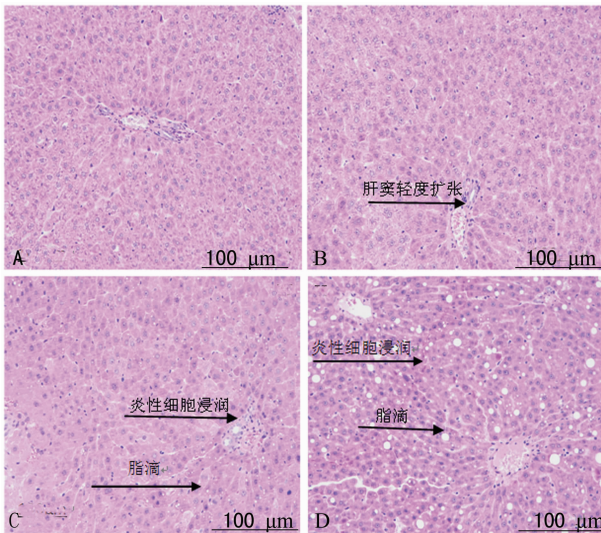
2.2 大鼠血脂变化 各染毒组仔鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平均高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 而血清 HDL-C 水平与对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 各组血脂水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	TG (U/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (U/L)	LDL-C (mmol/L)
对照组	1.12 ± 0.27	2.80 ± 0.45	1.09 ± 0.22	1.56 ± 0.67
低剂量染毒组	1.34 ± 0.43*	4.20 ± 0.59*	1.45 ± 0.26	2.13 ± 0.24*
中剂量染毒组	2.96 ± 0.85*	5.49 ± 0.79*	1.25 ± 0.40	2.40 ± 0.74*
高剂量染毒组	4.38 ± 0.57*	5.70 ± 1.00*	1.69 ± 0.45	3.74 ± 0.38*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较

2.3 大鼠肝脏病理变化 肝组织切片镜下显示: 对照组仔鼠肝组织结构正常, 低剂量染毒组仔鼠肝窦轻度扩张, 中剂量染毒组仔鼠肝脏轻度炎性细胞灶性浸润和少量小脂滴, 高剂量染毒组仔鼠肝脏中度炎性细胞灶性浸润和大量脂滴, 见图 1。



A: 对照组; B: 低剂量染毒组; C: 中剂量染毒组; D: 高剂量染毒组

图 1 各组仔鼠肝组织 HE 染色 (×200)

2.4 大鼠肝组织 SOD、GSH-PX 活性及 MDA 水平 各染毒组大鼠肝组织匀浆中 SOD、GSH-PX 活性明显低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 中、高剂量染毒组 MDA 水平高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 各组肝组织 SOD、GSH-PX 活性及 MDA 水平比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD (kU/g)	GSH-PX (kU/g)	MDA ($\mu\text{mol/g}$)
对照组	52.64 ± 4.01	622.74 ± 45.21	1.76 ± 0.25
低剂量染毒组	42.43 ± 5.11*	541.32 ± 33.86*	2.13 ± 0.34
中剂量染毒组	35.10 ± 2.33*	321.41 ± 25.55*	2.86 ± 0.45*
高剂量染毒组	17.37 ± 1.92*	198.63 ± 34.72*	3.46 ± 0.59*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较

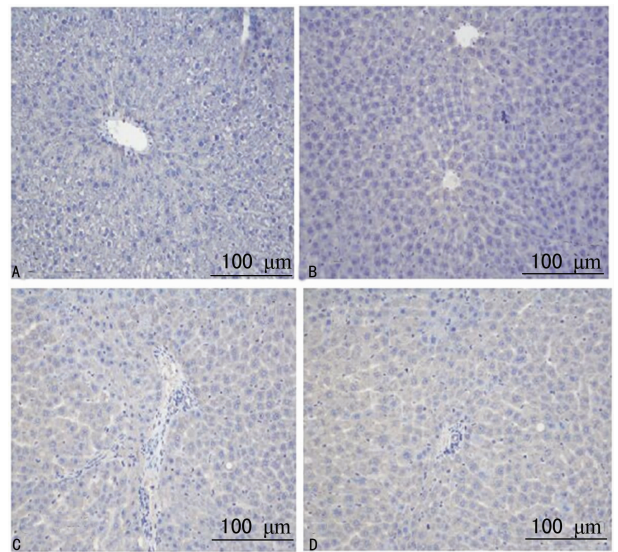
2.5 仔鼠肝脏 CYP2E1 mRNA 表达 RT-PCR 法检测结果显示: 低剂量染毒组肝脏 CYP2E1 mRNA 表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 中、高剂量染毒组与对照组比较, CYP2E1 mRNA 表达水平均增加 ($P < 0.05$), 见表 5。

2.6 仔鼠肝脏 CYP2E1 蛋白表达 肝脏组织细胞质内黄色颗粒为 CYP2E1 阳性表达。各染毒组与对照组比较, 肝组织中央静脉周围均有 CYP2E1 沉积, 见图 2; 各染毒组 A 值与对照组比较均增加 ($P < 0.05$), 见表 5。Western blot 检测结果显示: 中、高剂量染毒组 CYP2E1 蛋白表达水平较对照组高, 见图 3; 灰度值见表 5。

表 5 各组肝组织 CYP2E1 mRNA 相对表达水平、灰度值及 A 值 ($n=5$)

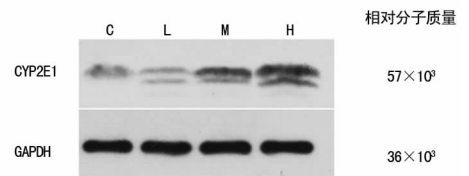
组别	mRNA 相对表达 ($\bar{x} \pm s$)	灰度值相对 内参比值	A 值 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	2.8 ± 1.2	0.36	1 312.7 ± 1 136.5
低剂量染毒组	2.9 ± 1.1	0.23	2 255.4 ± 1 534.1*
中剂量染毒组	5.9 ± 1.4*	0.67	2 963.0 ± 560.2*
高剂量染毒组	7.3 ± 2.4*	1.04	3 702.5 ± 1 553.5*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较



A: 对照组; B: 低剂量染毒组; C: 中剂量染毒组; D: 高剂量染毒组

图 2 免疫组织化学法检测各组仔鼠肝脏 CYP2E1 表达 (×200)



C: 对照组; L: 低剂量染毒组; M: 中剂量染毒组; H: 高剂量染毒组

图 3 Western blot 检测各组仔鼠 CYP2E1 蛋白表达

3 讨论

肝脏作为人体的重要组织器官, 参与机体的代谢、解毒、排泄、凝血、合成血脂等多种生理功能。AST 和 ALT 是肝脏损伤诊断中重要的检测指标, 肝脏损伤严重与否在很大程度上决定了血脂水平和载脂蛋白水平^[5]。本研究中, 各染毒组仔鼠血清 ALT、AST 水平及 AST/ALT 比值与对照组比较均升高; 病理结果显示染毒组肝脏较多炎性细胞浸润, 中、高剂量染毒组有大小不一的脂滴存在; 血脂检测结果显示各染毒组血清 TG、TC 和 LDL-C 水平高于对照组。说明 NP 透过胎盘屏障或者通过乳汁进入到仔鼠体内, 并在肝脏中蓄积, 推测孕期和哺乳期暴露 NP 可能是导致仔鼠肝脏血清酶升高和血脂异常的原因之一。

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,也称为自由基清除剂,它可以对抗、阻断自由基对各种细胞的损伤,及时修复受损细胞。而 GSH-PX 为生物体内广泛存在的重要的过氧化物分解酶,可以由活性氧和羟基诱发的脂质过氧化物还原成无毒的羟基化合物,从而保护细胞膜结构及其功能的完整性。因此,SOD 和 GSH-PX 构成了生物体内的抗氧化防御系统^[6]。MDA 是大量高活性自由基作用于脂质,发生过氧化反应而生成的过氧化终产物,可引起大蛋白质、核酸等大分子交联聚合,产生细胞毒性,MDA 水平反映了体内脂质过氧化损伤程度^[7-8]。本实验结果显示,抗氧化指标 SOD 和 GSH-PX 活性降低,氧化终产物 MDA 水平增加,提示仔鼠肝细胞内 SOD、GSH-PX 消耗增加,活性降低,导致氧化应激,与本课题组前期研究结果相同,也与本次病理切片显示的结果一致:对照组肝脏组织结构正常,低剂量染毒组仔鼠肝窦轻度扩张,中剂量染毒组仔鼠肝脏轻度炎性细胞灶性浸润,高剂量染毒组仔鼠肝脏中度炎性细胞灶性浸润,并有脂滴存在,说明染毒组仔鼠肝脏发生了脂质代谢紊乱和炎性损伤。

CYP450 在肝脏中最丰富,参与广泛的内外源性化合物的合成代谢,可被多种内外源化合物诱导和抑制,从而影响其对特异性底物的催化作用^[9]。目前人类确定的 CYP450 同工酶有 20 多种,CYP2E1 是最主要的同工酶,在肝脏中占肝细胞色素酶总量的 7%,参与许多低分子有机化合物及药物的体内代谢,并能催化多种前致癌物和前毒物的活化过程^[10-11]。CYP2E1 可引起许多毒物的代谢和激活,催化产生活性氧(ROS),如超氧阴离子基团和过氧化氢等,与氧化应激关系密切^[12]。由氧化应激产生的过多的 ROS 会增强脂质过氧化程度,从而损伤细胞生物膜功能,并通过协同细胞因子及肝细胞凋亡使肝细胞产生炎症、坏死,肝纤维化加重。根据文献报道,肝细胞内 CYP2E1 表达增加是 ROS 产生的主要原因^[13-14]。

综上所述,母鼠孕期和哺乳期暴露 NP,其仔鼠肝脏过氧化损伤程度随染毒剂量增加而加重,且中、高剂量染毒组 CYP2E1 mRNA 和蛋白表达较对照组明显上调,说明 CYP2E1 参与了肝脏脂质过氧化损伤,其上调可能会进一步加剧肝脏脂质代谢紊乱。

参考文献

- [1] 俞捷,龚磊,张鏢. 壬基酚对子代影响研究进展[J]. 中国工业医学杂志,2013,26(1):31-34.
- [2] 张诺,贾瑞宝,孙韶华,等. 壬基酚的检测及毒理学研究进展[J]. 环境与健康杂志,2013,30(4):362-365.
- [3] Vom Saal FS, Nagel SC, Coe BL, et al. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A(BPA) and obesity[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 354(1/2):74-84.
- [4] 许洁,李研,陈佳瑜,等. 母体暴露壬基酚对仔鼠肝脏的损伤作用[J]. 现代预防医学,2008,35(1):37-38.
- [5] Wang PW, Chen ML, Huang LW, et al. Nonylphenol exposure is associated with oxidative and nitrative stress in pregnant women[J]. *Free Radic Res*, 2015, 49(12):1469-1478.
- [6] 袁乐媛,韩惠芳,高君,等. 酒精性肝病与血脂代谢相关性分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2015,24(8):973-976.
- [7] Deng P, Zhong D, Nan F, et al. Evidence for the bioactivation of 4-nonylphenol to quinone methide and ortho-benzoquinone metabolites in human liver microsomes[J]. *Chem Res Toxicol*, 2010, 23(10):1617-1628.
- [8] 王新敏,景欣悦,彭蕴茹,等. 体内、体外相结合评价 CYP2E1 酶活性的方法学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):187-193.
- [9] 李晋,徐尚福,张晓洁,等. 小柴胡汤对肝纤维化大鼠肝脏 CYP2E1 表达的影响[J]. 2014,37(4):393-396.
- [10] 赵雪珂,程明亮. 茅台酒对大鼠肝组织中 CYP2E1 基因及蛋白质表达的影响[J]. 2013,38(6):573-577.
- [11] Jie X, Yang W, Jie Y, et al. Immune effects of nonylphenol on offspring of rats exposed during pregnancy[J]. *Hum Ecol Risk Assess*, 2010, 16(2):444-452.
- [12] Jie X, Yang W, Jie Y, et al. Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on female rats[J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2010, 89(5):418-428.
- [13] Jubendradass R, D'Cruz SC, Rani SJ, et al. Nonylphenol induces apoptosis via mitochondria- and Fas-L-mediated pathways in the liver of adult male rat[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2012, 62(3):405-411.
- [14] Jubendradass R, D'Cruz SC, Mathur PP. Short-term exposure to nonylphenol induces pancreatic oxidative stress and alters liver glucose metabolism in adult female rats[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2011, 25(2):77-83.
- [9] Tsai YC, Lin CL, Chen BH. Preparative chromatography of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* and their antiproliferation effect on hepatoma cell[J]. *Phytomedicine*, 2010, 18(1):2-10.
- [10] 崔鹏,田春雨,张艳萍,等. 双益方对 2 型糖尿病大鼠 SOD、MDA、FFA 影响的实验研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(8):1840-1842.
- [11] 刘永生,李晓坤,王金菊. 苦瓜总皂苷对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗、脂联素和瘦素的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):177-179.
- [12] 陈璇,徐凇峰,汪悦,等. 白虎二地汤改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗分子机制的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31(4):364-367.
- [13] Gandhi GR, Jothi G, Antony PJ, et al. Gallic acid attenuates high-fat diet fed-streptozotocin-induced insulin resistance via partial agonism of PPAR γ in experimental type 2 diabetic rats and enhances glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 745: 201-216.
- [14] 刘率男,刘泉,侯少聪,等. 磷酸西格列汀改善 2 型糖尿病 KKAy 小鼠糖脂代谢及作用机制探讨[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(3):206-211.

(收稿日期:2017-03-21 修回日期:2017-06-19)

(上接第 4035 页)

(收稿日期:2017-03-18 修回日期:2017-06-16)