

小米谷糠多肽对肝损伤及癌前病变的抑制作用

于书佳, 王常青*, 原 敏, 连伟帅, 訾 艳, 陈晓萌, 郝志萍
(山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006)

摘 要: 目的: 观察小米谷糠多肽的抗肿瘤和抑制化学性肝损伤作用。方法: 分别用菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、537酸性蛋白酶水解小米谷糠, 得到3种多肽; 先用噻唑蓝法检测3种谷糠多肽的体外抗肿瘤作用, 然后用抗肿瘤效果最好的多肽喂食经氨基比林- NaNO_2 诱导的肝损伤小鼠, 并作肝组织学观察。结果: 当菠萝蛋白酶水解的谷糠多肽质量浓度为50 mg/mL时, S180和H22肿瘤细胞的抑制率可达到56.28%和53.73%, 该多肽在10 g/(kg·d)剂量可显著降低小鼠肝脏丙二醛含量和血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶活性 ($P < 0.01$), 并提高肝脏谷胱甘肽过氧化物酶活性 ($P < 0.01$)。组织切片显示, 模型组小鼠肝细胞损伤严重, 谷糠多肽高剂量组动物的肝细胞形态基本正常。结论: 菠萝蛋白酶水解的谷糠多肽具有抑制肝损伤及癌前期病变的作用。

关键词: 小米谷糠多肽; 氨基比林; 抗肿瘤; 肝损伤; 肝癌前病变

Inhibitory Effect of Millet Bran Polypeptides on Liver Injury and Precancerous Lesions

YU Shu-jia, WANG Chang-qing*, YUAN Min, LIAN Wei-shuai, ZI Yan, CHEN Xiao-meng, HAO Zhi-ping
(College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Objective: This study was aimed to investigate the antitumor activity of millet bran polypeptides (MBPEs) and their inhibitory effect on chemically induced liver injury. Methods: Three kinds of polypeptides were obtained by enzymatic hydrolysis of millet bran with bromelain, papain and 537 acid protease, respectively. MTT assay was applied to detect the *in vitro* antitumor effect of MBPEs. The mice with hepatic injury chemically induced by aminopyrine and sodium nitrite were fed with the polypeptide with the strongest antitumor effect, and the liver was histologically observed. Results: The inhibitory rates of MBPE (50 mg/mL) prepared with bromelain on S180 and H22 tumor cells were 56.28% and 53.73%, respectively. In the high-dose MBPE group (10 g/(kg·d)), the serum levels of aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) and the liver content of malondialdehyde (MDA) were significantly decreased ($P < 0.01$). The activity of liver glutathione peroxidase (GSH-Px) was significantly increased ($P < 0.01$). The histological examination of the liver tissue showed that liver cells were severely injured. However, the morphology of hepatocytes in the high-dose group was basically normal. Conclusion: The polypeptides from millet bran hydrolyzed by bromelain have significantly inhibitory effects on liver injury and precancerous lesions.

Key words: millet bran polypeptide; aminopyrine; antitumor; liver injury; hepatic precancerous lesions

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)05-0213-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201405042

小米谷糠是小米在加工过程中的副产品, 其中含有丰富的蛋白质、脂肪、膳食纤维、B族维生素、VE等营养素^[1]。小米谷糠多肽(millet bran polypeptide, MBPE)是蛋白酶水解小米谷糠中蛋白的产物, 由多种小分子肽和少量游离氨基酸组成。肿瘤是当今发病率很高的疾病, 而且死亡率还在逐年递增, 食疗已成为预防及治疗癌症的一种重要辅助手段, 寻找高效、安全的抗肿瘤辅助食品是当前的研究热点之一。在国内外, 已经有玉米多肽和大豆低聚肽等植物多肽抗肿瘤的研究报道^[2], 但目前对小米谷糠的研究极少, 尚未见到用小米谷糠研制抗肿瘤肽的研究报道。

本实验比较小米谷糠水溶性蛋白经菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶和537酸性蛋白酶3种酶多肽的体外抗肿瘤作用及抑制肝组织癌前期病变的效果(已申报发明专利), 为小米谷糠多肽保健食品的开发和研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

雄性昆明小鼠, 6周龄, SPF级, (20±2)g, 购于山西医科大学动物中心。

收稿日期: 2013-03-17

作者简介: 于书佳(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能性食品开发。E-mail: shujiayu9967@163.com

*通信作者: 王常青(1956—), 男, 教授, 学士, 研究方向为食品生物技术与功能食品的开发。E-mail: wcq@sxu.edu.cn

S180、H22细胞购自山西省肿瘤医院。

脱脂小米谷糠, 由山西榆次黄彩苑农业食品科技有限公司提供。

菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、537酸性蛋白酶 广西庞博生物工程有限公司; 氨基比林 成都西亚化工股份有限公司; 注射用环磷酰胺 江苏恒瑞医药股份有限公司; RPMI1640培养基 美国Gibco公司; 噻唑蓝、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO) 美国Amresco公司; 青链霉素混合液 Solarbio公司; 胎牛血清 浙江天杭生物科技有限公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST) 南京建成生物工程研究所; 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

CO₂培养箱 北京中科环试仪器有限公司; 冷冻高速离心机 赛默飞世尔科技有限公司; Leica RM2255切片仪 德国徕卡仪器公司; 生物显微镜 日本Olympus公司; Sephadex G-25凝胶分子筛层析柱 上海亚荣生化仪器厂; UVD-680-3紫外检测仪和色谱工作站 上海金达生化仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 MBPE的制备方法

取一定量脱脂米糠, 按料液比1:10 (m/V) 浸提水溶性蛋白, 经透析脱盐后, 分别用菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶和537酸性蛋白酶在各自最适水解条件下对其酶解, 水解液90℃灭酶, 冷却后, 4 500 r/min离心收集多肽上清液备用。

1.3.2 3种MBPE的分子质量测定^[3]

上述多肽的分子质量分布采用Sephadex G-25凝胶色谱法测定, 检测仪波长为280 nm。以胰岛素、杆菌肽和还原型谷胱甘肽作为Marker。以Marker的分子质量对数为横坐标(X)、Marker的洗脱体积(Y)为纵坐标制作标准曲线回归方程: $Y = -47.25X + 220.4$ ($R^2 = 0.9987$)。对质量浓度为10 mg/mL的MBPE进行Sephadex G-25凝胶色谱分析, 通过峰面积归一法计算出MBPE的分子质量分布范围。

1.3.3 氨基酸组成与谷胱甘肽含量分析

氨基酸组成与谷胱甘肽含量委托山西粮食质量检测中心检测。氨基酸分析依据GB/T5511—2008《谷物和豆类 氮含量测定和粗蛋白质含量计算 凯氏法》进行检测。谷胱甘肽含量采用荧光光度法^[4]检测。

1.3.4 MBPE对S180、H22肿瘤细胞的体外抑制实验

参照文献[5], 将S180、H22细胞置于含100 μg/mL

青霉素、100 μg/mL链霉素的1%青链霉素混合液、10%胎牛血清的RPMI1640培养液中, 在37℃、5% CO₂环境下培养。取对数生长期的S180、H22肿瘤细胞, 将细胞浓度调为 5×10^4 个/mL^[6]。文献[7]报道, 环磷酰胺是一种常用的广谱抗癌化疗药物, 抗癌机制主要表现在直接破坏DNA并阻止其复制, 常用作抗肿瘤实验对照品。预实验表明, 环磷酰胺、MBPE的质量浓度为10 mg/mL以上时有抑制S180、H22细胞株的作用, 因此, 阳性对照组加入20 mg/mL的环磷酰胺100 μL、实验组加入等体积的MBPE (10、30、50 mg/mL), 对照组加等体积的培养液, 于37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h, 弃去上清液, 每孔加5 mg/mL的噻唑蓝10 μL, 继续培养4 h, 弃上清后每孔加入DMSO 200 μL, 轻轻振荡10 min, 在波长550 nm处测光密度值。计算3种小米糠多肽对肿瘤细胞生长抑制率, 选取对S180、H22肿瘤细胞增殖抑制率最高的一种小米谷糠多肽, 进行下一步小鼠抗肝损伤及癌前病变的抑制实验。

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率}/\% = \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{实验组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}}\right) \times 100$$

1.3.5 MBPE抑制小鼠肝损伤及癌前病变方法

1.3.5.1 动物分组与处理

小鼠适应性喂养后, 随机分为基础组、模型组、阳性对照组、小米糠多肽高剂量组、低剂量组, 每组10只。实验期间, 基础组、模型组、阳性对照组喂食基础饲料, 高、低剂量组分别按10、4 g/(kg·d)喂食多肽, 阳性对照组隔天灌胃环磷酰胺20 mg/kg。除基础组外, 其他组小鼠灌胃氨基比林和NaNO₂各80 mg/(kg·d), 实验共13周。实验过程中每日观察记录小鼠进食状况、活动及外表征象, 每周称量鼠体质量。

1.3.5.2 血清中ALT和AST活性测定方法

实验第84天, 小鼠禁食12 h。称体质量, 各组动物眼眶取血后, 全血1 500 r/min离心10 min, 分离血清, 按照试剂盒标注的方法测定血清ALT和AST的活性。

1.3.5.3 肝脏中MDA含量和GSH-Px活性测定

结束实验后, 小鼠脱臼处死, 切取适量的肝组织, 冰水浴中用4℃生理盐水将其制成10%的肝匀浆, 4 000 r/min冷冻离心10 min, 取上清液, 按照试剂盒的说明测肝组织MDA含量和GSH-Px活性。

1.3.5.4 肝组织形态学观察

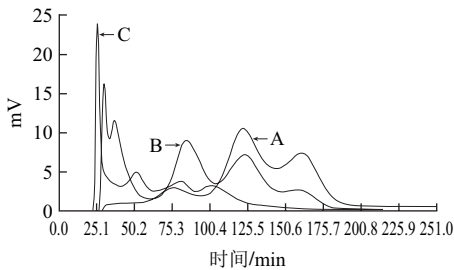
取小鼠肝脏右叶的相同部位, 用10%的中性甲醛固定, 包埋, 切片, HE染色。用普通光学镜观察、记录组织形态。

1.4 统计分析

实验数据使用SPSS17.0软件处理与方差分析。

2 结果与分析

2.1 3种MBPE的分子质量分布范围



A. 菠萝蛋白酶解MBPE; B. 木瓜蛋白酶解MBPE; C. 537酸性蛋白酶解MBPE。

图1 3种MBPE的Sephadex G-25凝胶洗脱图谱

Fig.1 Elution profiles of three MBPEs on Sephadex G-25 column

由图1可知,不同蛋白酶水解的多肽分子质量分布在较大差异,通过峰面积归一法分析得到3种多肽的分子质量分布,其中菠萝蛋白酶解MBPE<1 000 D的比例最高,高达89.47%;而木瓜蛋白酶和537酸性蛋白酶解MBPE分子质量<1 000 D分别占70.28%和53.64%。具体数据统计见表1。

表1 3种MBPE的分子质量分布范围

Table 1 Molecular weight distribution of three MBPEs

组别	多肽质量浓度/ (mg/mL)	分子质量分布/%		
		<1 000 D	1 000~6 000 D	>6 000 D
菠萝蛋白酶解MBPE	10	89.47	9.25	1.28
木瓜蛋白酶解MBPE	10	70.28	22.03	7.69
537酸性蛋白酶解MBPE	10	53.64	26.94	19.42

2.2 3种MBPE的氨基酸组成与谷胱甘肽含量分析

表2 3种MBPE的氨基酸组成与谷胱甘肽含量

Table 2 Amino acid composition and GSH content of three MBPEs

氨基酸	氨基酸含量/%		
	菠萝蛋白酶解MBPE	木瓜蛋白酶解MBPE	537酸性蛋白酶解MBPE
天冬氨酸 (Asp)	8.72	6.63	5.75
丝氨酸 (Ser)	3.14	4.36	3.49
谷氨酸 (Gln)	11.37	11.26	10.94
脯氨酸 (Pro)	3.19	2.85	3.66
甘氨酸 (Gly)	5.27	4.58	3.19
丙氨酸 (Ala)	3.97	2.64	3.26
缬氨酸 (Val)	2.65	3.53	2.37
蛋氨酸 (Met)	1.64	1.38	1.15
半胱氨酸 (Cys)	2.94	2.21	1.58
异亮氨酸 (Ile)	5.13	5.22	4.39
亮氨酸 (Leu)	11.67	10.80	10.02
苏氨酸 (Thr)	4.23	4.49	4.57
苯丙氨酸 (Phe)	5.17	3.32	2.27
酪氨酸 (Tyr)	1.35	0.96	1.14
赖氨酸 (Lys)	4.86	4.27	3.49
组氨酸 (His)	3.99	2.26	2.97
精氨酸 (Arg)	6.82	6.26	5.11
谷胱甘肽含量/(μg/mL)	124	103	92

一般谷物食品中亮氨酸的含量为5%左右,由表2可见,而3种MBPE中亮氨酸含量均较高,菠萝蛋白酶解多肽的亮氨酸含量最高,为11.67%;这和菠萝蛋白酶解MBPE抗肿瘤作用较好可能有一定关系。精氨酸在体内可以通过转化为NO而抑制肿瘤细胞的合成^[8],在3种MBPE中,精氨酸的含量比一般谷物食品多,可能与MBPE的抗肿瘤作用有联系。本实验的菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶和537酸性蛋白酶3种酶水解多肽的谷胱甘肽含量均远高于大豆肽溶液中谷胱甘肽的含量(28.5 μg/mL)^[9]。研究证实,谷胱甘肽具有保肝解毒和抗氧化的生理功能,已用于肝病和抗肿瘤等临床治疗^[10]。

2.3 MBPE体外抑制S180、H22肿瘤细胞的作用分析

表3 3种MBPE对S180、H22肿瘤细胞的抑制率

Table 3 *in vitro* Inhibitory effects of different polypeptides on S180 and H22

组别	质量浓度/ (mg/mL)	抑制率/%	
		S180	H22
537酸性蛋白酶解MBPE	10	16.79	20.52
	30	21.75	24.63
	50	28.36	29.53
木瓜蛋白酶解MBPE	10	27.93	25.16
	30	34.62	33.87
	50	43.31	41.27
菠萝蛋白酶解MBPE	10	39.64	34.98
	30	47.53	41.76
	50	56.28	53.73
环磷酰胺	20	61.75	59.42

由表3可知,3种酶解多肽对S180、H22肿瘤细胞均有抑制作用,并且其抑制率随着多肽质量浓度的增加而升高,以上3种蛋白酶解物对肿瘤细胞生长的抑制率,高低顺序为菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、537酸性蛋白酶。当质量浓度为50 mg/mL时,菠萝蛋白酶MBPE对S180、H22肿瘤细胞生长的抑制率分别为56.28%、53.73%;木瓜蛋白酶MBPE的抑制率为43.31%、41.27%;而537酸性蛋白酶MBPE的抑制率为28.36%、29.53%。通过以上3种蛋白酶解多肽的体外抗肿瘤实验,选取效果最好的菠萝蛋白酶解MBPE,作为下一步抑制小鼠化学性肝损伤及癌前期病变的材料。

2.4 小米糖多肽抑制氨基比林-NaNO₂诱导小鼠肝癌前期病变实验结果

2.4.1 小鼠血清和肝脏生化指标分析

由表4可知,模型组与基础组小鼠相比,肝组织MDA含量、血清AST和ALT活性均显著增高,肝脏GSH-Px活性显著下降($P<0.01$),说明肝脏受到了氧化攻击,其抗氧化能力受到严重破坏^[11],说明肝损伤和癌前病变建模成功。与模型组相比,阳性对照组的肝组织MDA含量、GSH-Px活性、血清AST和ALT活性均存在显著差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$),与基础组处于同一水平,说明环磷酰胺具有抑瘤作用。与模型组相比,MBPE

高剂量组肝脏MDA含量、血清AST、ALT活性极显著降低, 肝脏GSH-Px活性明显升高 ($P<0.01$); MBPE低剂量组MDA含量、血清AST、ALT活性显著降低 ($P<0.05$), 肝脏GSH-Px活性升高 ($P<0.05$)。由此可知, MBPE高、低剂量组对氨基比林- NaNO_2 诱导的肝损伤或癌前期病变的小鼠均有抑制作用, 且MBPE高剂量组抑制效果更明显。

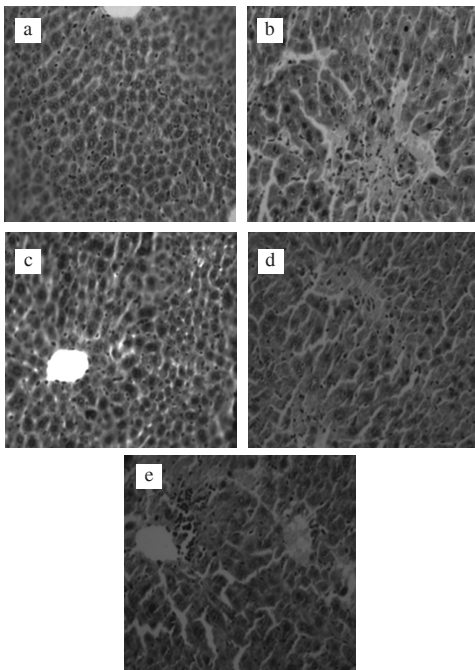
表4 MBPE对小鼠血清AST、ALT和肝脏MDA、GSH-Px的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of the strongest antioxidant MBPE on serum AST and ALT as well as hepatic MDA and GSH-Px in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	肝脏MDA含量/ (nmol/mg pro)	肝脏GSH-Px活力/ (U/mg pro)	血清AST 活力/ (U/L)	血清ALT 活力/ (U/L)
基础组	1.67±0.35 ^b	70.62±4.26 ^b	41.58±3.62 ^b	34.67±1.52 ^b
模型组	2.93±0.42	59.35±3.09	58.61±1.45	61.53±4.54
阳性对照组	1.82±0.31 ^b	67.63±4.83 ^a	39.73±3.43 ^b	37.42±2.87 ^a
MBPE高剂量组	1.95±0.16 ^b	69.12±4.64 ^b	43.59±4.09 ^b	35.75±4.62 ^b
MBPE低剂量组	2.21±0.28 ^a	67.94±4.36 ^a	47.26±1.92 ^a	38.23±3.19 ^a

注: a. 与模型组相比, 差异显著 ($P<0.05$); b. 与模型组相比, 差异极显著 ($P<0.01$)。

2.4.2 小鼠肝组织切片分析



a.基础组; b.模型组; c.阳性对照组; d.MBPE高剂量组; e.MBPE低剂量组。

图2 氨基比林- NaNO_2 致小鼠肝组织形态学变化比较 ($\times 200$)

Fig.2 Morphological changes of mouse liver tissue induced by AP- NaNO_2 ($\times 200$)

由图2可知, 基础组小鼠肝细胞大小均匀, 分布规则, 肝小叶内网状纤维支架完整, 肝索围绕中央静脉呈放射状整齐排列, 细胞核圆, 核膜清楚, 无坏死或变性。模型组小鼠肝细胞有明显的变性与增生现象^[12], 肝细胞出现异常增生, 浑浊且体积增大, 染色深浅不同,

肝索排列相对紊乱, 肝小叶内部分肝细胞坏死, 汇管区可见淋巴细胞浸润, 胞浆内出现轮廓不清晰的细小颗粒。环磷酸胺阳性对照组肝细胞形态与基础组相比, 肝索围绕中央静脉呈放射状排列, 但细胞大小有差异, 核膜不够清晰, 但肝组织形态基本正常。MBPE高剂量组肝细胞病变性质与模型组相比, 其病变程度明显减轻, 肝索略呈放射状排列, 细胞异型性增生程度减小, 双核细胞明显少见, 肝小叶未见大片的坏死细胞。MBPE低剂量组肝细胞病变性质与模型组类似, 但其病变程度稍有减轻, 肝索排列相对整齐, 细胞异常增生程度减小, 汇管区可见淋巴细胞浸润。以上分析表明, MBPE高剂量组可显著减轻氨基比林- NaNO_2 诱导小鼠的肝损伤, 从而抑制其肝癌前期病变。

3 讨论

我国是世界上最大的小米生产国家, 每年加工小米产生的小米谷糠大约40万 $\text{t}^{[13]}$, 如果将小米谷糠中的蛋白加工成功能性多肽食品, 可以大大提高小米谷糠的经济效益和利用率, 并减少浪费与污染。据相关资料报道, 一些特定的小分子肽易于穿透肿瘤细胞, 通过巨噬细胞与肿瘤细胞相互作用抑制肿瘤的生长^[14], 因此, 小分子多肽含量高的多肽往往抗肿瘤效果较好^[15]。本实验得到的3种多肽中的小分子肽比例都较高, 其中菠萝蛋白酶酶解MBPE中, $<1\,000\text{D}$ 多肽的比例最高, 为89.47%, 抗肿瘤效果也最好, 这可能与该多肽中小分子抗肿瘤肽较多有联系。目前尚未确定MBPE中抗肿瘤寡肽的分子组成和氨基酸序列, 可能与MBPE中亮氨酸、精氨酸和谷胱甘肽含量较高有重要的关系。有研究表明^[16], 亮氨酸具有螯合金属离子的作用, 通过降低金属离子的氧化还原电势, 减小金属离子的催化氧化, 达到抗氧化作用, 提高肽的抗氧化能力有助于抑制肝损伤。精氨酸能抑制肿瘤细胞的多胺生物合成, 进而抑制肿瘤细胞核酸和蛋白质的合成; 谷胱甘肽可以通过抗氧化、解毒起到抵抗化学性肝损伤和癌前病变的作用。

亚硝胺是一种强化学致癌物, 小鼠在亚硝胺诱导22周后产生肝癌^[17], 但亚硝胺建模过程中会出现大量动物死亡。本实验采用氨基比林- NaNO_2 建立化学性肝损伤和癌前期组织病变模型, 与亚硝胺诱癌相比, 具有实验时间短, 癌前期组织病变明显和动物死亡率低的优点。有研究证明^[18], 随着实验时间的推移。氨基比林- NaNO_2 所致肝损伤细胞会恶变, 生物膜上的脂质过氧化损伤程度加重, 最终导致肝癌的形成。肝损伤或病变肝细胞受损动物往往表现为血清AST、ALT活性异常升高; 而肝损伤和癌前病变小鼠的肝组织往往表现为脂质过氧化严重, 抗氧化酶活性下降, GSH-Px活力下降和MDA含量

显著增高^[19-20]。本研究通过喂食菠萝蛋白酶解MBPE,可显著抑制AST、ALT活性和MDA含量升高,显著升高GSH-Px活力,因此具有一定的抗肝损伤和癌前期病变作用。MBPE在10 g/(kg·d)剂量时对氨基比林-NaNO₂诱导的肝损伤及癌前期病变有明显抑制作用,可以开发为保健食品或抗肿瘤药品原料。

参考文献:

- [1] 赵陈勇,王常青,许洁,等. 小米谷糠油降血脂和抗氧化作用的研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(7): 67-70.
- [2] 朱艳华. 玉米多肽的制备、理化性质及生物活性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007: 1-8.
- [3] 刘志国, 吴琼, 吕玲肖. 酶解米糠蛋白分离提取 ACE抑制肽及其结构研究[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 223-227.
- [4] 陈俭梅, 周琳. 几种谷胱甘肽的检测方法[J]. 山东食品发酵, 2007(3): 26-29.
- [5] 曾永长, 梁少瑜, 罗佳波, 等. 白花蛇舌草水提部位体内外抗肿瘤实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 521-524.
- [6] HAMID R, ROTSHTYN Y, RABADI L, et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening[J]. Toxicol in Vitro, 2004, 18(5): 703-710.
- [7] 迟淑萍, 白冰珂, 谢进, 等. 环磷酸胺在动物模型体内抗肿瘤影响及抑瘤机制的研究[J]. 中国医药导报, 2012, 9(14): 20-22.
- [8] BRATT J, ZEKI A, LAST J, et al. Competitive metabolism of L-arginine: arginase as a therapeutic target in asthma[J]. Journal of Biomedical Research, 2011, 25(5): 299-308.
- [9] 郭黎平, 刘国良, 张卓勇, 等. 荧光光度法测定大豆提取液中还原型谷胱甘肽[J]. 东北师范大学学报: 自然科学版, 2001, 33(1): 34-38.
- [10] 王朝霞. 还原型谷胱甘肽对化疗药物性肝功能损害的防治作用[J]. 中外医疗, 2012(8): 87-89.
- [11] 焦艺博, 刘晓婷, 毛文超, 等. 姜黄素对二乙胺基亚硝胺诱发小鼠肝癌前病变的预防作用[J]. 中国药师, 2012, 15(9): 1218-1221.
- [12] HUANG Baoxu, WANG Hongbin, QU Zhina, et al. Study on the antitumor effects of low-energy laser irradiation combined with cyclophosphamide[J]. 东北农业大学学报: 英文版, 2003, 10(1): 43-38.
- [13] 赵陈勇, 王常青, 许洁, 等. 富含甾醇小米谷糠油提取工艺研究[J]. 中国油脂, 2011, 36(7): 12-14.
- [14] 张冉, 劳兴珍, 郑珩. 抗肿瘤小分子多肽的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(4): 42-46.
- [15] 吕方, 米沙, 王士贤, 等. 酶法制备大豆多肽的分子量分布和抑瘤实验观察[J]. 营养学报, 2008, 30(3): 274-277.
- [16] 周薇, 胡世莲. 氨基酸与肿瘤[J]. 中国临床保健杂志, 2007, 10(2): 209-211.
- [17] 周峥珍, 章宗籍, 钱忠义, 等. DEN诱发大鼠肝癌模型的实验病理研究[J]. 昆明医学院学报, 2005(3): 15-19.
- [18] 杨错, 刘玉兰, 张红梅. 肝细胞损伤机制及防治药物研究进展[J]. 实验药物与临床, 2005, 8(6): 44-46.
- [19] HUANG Haili, WANG Yajing, ZHANG Qingyu, et al. Hepatoprotective effects of baicalein against CCl₄-induced acute liver injury in mice[J]. World Journal Gastroenterol, 2012, 18: 6605-6613.
- [20] KUSHIDA M, KAMENDULIS L M, PEAT T J, et al. Dose-related induction of hepatic preneoplastic lesions by diethylnitrosamine in C57BL/6 mice[J]. Toxicol Pathol, 2011, 39(5): 776-786.