

芜菁酸性多糖对肺损伤小鼠过氧化损伤及细胞凋亡的影响

海力茜·陶尔大洪*, 吴美美,
卡迪尔亚·库尔班, 欧阳成宣, 王鑫, 徐茜*

新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054

摘要: 研究芜菁酸性多糖 (*Brassica rapa* L. acidic polysaccharide-1, BRAP-1) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的肺损伤小鼠的保护作用及机制。建立 LPS 诱导肺损伤小鼠模型进行 BRAP-1 干预, 通过生化试剂检测小鼠肺泡灌洗液中髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、过氧化氢 (H_2O_2) 水平; Western blot 法检测肺组织中蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PI3K)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、磷酸化蛋白激酶 B (phospho-protein kinase B, p-AKT) 蛋白表达水平及与凋亡相关的 B 淋巴细胞瘤-2 样蛋白关联 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2-associated X protein, BAX)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Cleaved Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 样蛋白 (B-cell lymphoma-2, BCL-2) 表达水平。结果表明与模型组相比, BRAP-1 不同程度降低小鼠肺泡灌洗液中 MDA、MPO、 H_2O_2 及肺组织中 PI3K、AKT 蛋白表达水平以及凋亡因子 BAX、凋亡关键因子 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平, 增强抗凋亡因子 BCL-2 蛋白表达水平。研究表明, BRAP-1 可通过清除肺损伤小鼠的肺组织自由基、抑制氧化应激, 调节肺组织细胞凋亡, 从而起到保护作用。

关键词: 芜菁酸性多糖; 肺损伤; 过氧化损伤; 细胞凋亡

中图分类号: R961

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)12-2116-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.12.012

Effects of *Brassica rapa* L. acidic polysaccharide on peroxidation injury and apoptosis in mice with lung injury

TAOERDAHONG Hailiqian*, WU Mei-mei,
KUERBAN Kadierya, OUYANG Cheng-xuan, WANG Xin, XU Qian*

College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China

Abstract: The aim of this study is to investigate the protective effect and mechanism of *Brassica rapa* L. acidic polysaccharide-1 (BRAP-1) on lipopolysaccharide (LPS)-induced lung injury in mice. LPS-induced lung injury mouse model was established for BRAP-1 intervention, and the levels of myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA) and H_2O_2 in alveolar lavage fluid of mice were detected by biochemical reagents. Western blot was used to detect the protein expression levels of protein kinase B (AKT), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K), extracellular regulated protein kinases (ERK), phospho-protein kinase B (p-AKT) and B-cell lymphoma-2-associated X protein (BAX), apoptosis-related Cleaved Caspase-3, B-cell lymphoma-2 (BCL-2) in lung tissue. The results showed that compared with the model group, BRAP-1 reduced the expression levels of MDA, MPO, H_2O_2 in alveolar lavage fluid and PI3K, AKT protein in lung tissue, as well as the expression levels of apoptosis factor BAX and apoptosis key factor Cleaved Caspase-3 protein, and enhanced the expression level of anti-apoptotic factor Bcl-2 protein. In conclusion, BRAP-1 can play a protective role by scavenging free radicals in lung tissue of mice with lung injury, inhibiting oxidative stress and regulating apoptosis of lung tissue cells.

Key words: *Brassica rapa* L. acidic polysaccharide; lung injury; peroxidation damage; cell apoptosis

收稿日期: 2024-04-26

接受日期: 2024-10-14

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项 (2022A03007-3); 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目 (XJDX1713); 国家自然科学基金地区科学基金 (81960765)

* 通信作者 E-mail: xuqian1973@163.com, hailiqian2471@sina.com

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是指除心源性外的各种直接或间接因素所致的肺组织结构特征性病理改变而出现的临床综合征,年死亡率达30%~40%,是临床常见危重症^[1]。肺损伤的发生发展由多种致病因素导致。氧化/抗氧化失调导致的氧化应激是肺泡、肺血管细胞损伤的主要原因,将导致肺血管通透性改变,促进肺水肿,进一步恶化肺损伤症状,然而氧化/抗氧化失调的主要原因是大量细胞因子在肺部聚集^[2]。组织损伤必将引起细胞坏死,肺损伤发展过程中在免疫炎症损伤及过氧化损伤双重刺激下大量肺泡细胞凋亡是必然结果,造成肺功能障碍进一步恶化,加重病理状态^[3]。由于缺乏特效药物,目前对于ALI患者仍以机械通气作为主要支持治疗方式^[4]。但是近年来,药物治疗作为一种辅助手段也有一定进展。研究发现中药有效成分牛蒡子苷元可以通过减轻炎症,促进鼻黏膜上皮屏障修复,减轻急性肺损伤^[5]。喜炎平注射液可改善ALI小鼠肺组织病理损伤,减轻炎症反应^[6]。

芜菁(*Brassica rapa* L.)为十字花科芸薹属二年生蔬菜植物,主要分布在我国西北地区,如西藏、青海、四川、新疆等地^[7]。芜菁中含有多种有效元素和营养成分,其中有维生素C、蛋白质、粗脂肪、无机盐、钙、铁等^[8]。此外,芜菁中还有黄酮、多糖、皂苷、硫代葡萄糖苷、挥发油等化学成分^[9,10]。芜菁多糖是芜菁的主要化学成分之一,具有多种药理作用。芜菁中性多糖对人肺腺癌细胞A549生长具有抑制作用,可提高A549荷瘤小鼠的脾脏指数和胸腺指数,下调BCL-2蛋白,上调BAX蛋白的表达,减轻荷瘤小鼠脏器病理损伤^[11]。此外,还有研究发现芜菁中性多糖具有降血糖作用^[12]。

随着对生物大分子研究热度增加,多糖研究者发现多种动植物多糖有较好的免疫调节活性多糖免疫调节机制有多种,如增强免疫器官^[13]、巨噬细胞活性及增殖能力等^[14]。例如,芜菁酸性多糖可调节受损肺组织抗炎-促炎免疫调节平衡,从而减轻肺组织损伤^[15]。黄芪多糖对PM_{2.5}染毒大鼠的肺损伤有干预作用,给药干预组肺组织免疫细胞因子减少、血清免疫球蛋白含量增加、肺损伤各项指标(肺干/湿重比值、肺泡灌洗液细胞数)降低^[16]。

本研究旨在探讨芜菁酸性多糖(*Brassica rapa* L. acidic polysaccharide-1, BRAP-1)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的肺损伤小鼠的保护作用及机制,以期为芜菁多糖药理活性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

SPF级BALB/c雌性实验小鼠(20 ± 2 g),自新疆医科大学动物实验中心购入并饲养,许可证号:SYXK(新)2018-0003。经新疆医科大学实验动物伦理委员会批准,伦理审批号:IACUC-20180222-56。

芜菁采收于新疆柯坪县,经北京大学药学院张英涛副教授鉴定为十字花科芸薹属植物芜菁(*Brassica rapa* L.)的干燥块茎。

高效RIPA裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号:R0010)、4 × Loading buffer(北京索莱宝科技有限公司,批号:P1015);BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo Fisher公司,批号:23225);10% SDS-PAGE彩色(红色)凝胶超快速配制试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G2043-50T);AKT单克隆抗体(批号:2810275)、Phospho-AKT单克隆抗体(批号:2834120)、ERK多克隆抗体(批号:2833336)、鼠抗Caspase-3单克隆抗体(批号:2835326)、鼠抗BAX单克隆抗体(批号:2833304)、鼠抗BCL-2单克隆抗体(批号:2835021)(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

5424R型离心机(德国Eppendorf公司);SPW-DSE电泳仪、电转仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);Azure 600凝胶成像仪(美国Azure biosystems公司);WD-9405B型摇床(北京六一生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 BRAP-1制备

水提醇沉法从芜菁干燥块茎中得到芜菁粗多糖,将芜菁粗多糖经DEAE-650M柱、Sephacryl 6B柱、Sephacryl S-300柱分离纯化后得到分子质量均一、高纯度芜菁酸性均一多糖BRAP-1;BRAP-1平均相对分子质量为6 080 Da,总糖质量分数为56.7%,糖醛酸质量分数为13.1%,蛋白质量分数为8.9%;由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成,物质的量比为4.53:2.20:2.07^[15]。

1.3.2 动物分组及给药

参考文献中方法,进行一定改动^[17]。将小鼠随机分成5组,每组8只,分别为BRAP-1低(BRAP-1 in low dose, BRAP-1-L)、中(BRAP-1 in middle dose, BRAP-1-M)、高剂量组(BRAP-1 in high dose, BRAP-1-H)、正常组(control group, Con)、模型组(model group, Mod)。各小鼠给药剂量根据小鼠体重计算。BRAP-1-L灌胃50 mg/kg的BRAP-1;BRAP-1-M灌

胃 100 mg/kg 的 BRAP-1; BRAP-1-H 灌胃 200 mg/kg 的 BRAP-1^[18], 其他两组灌胃 0.5 mL/d 生理盐水。连续给药 10 日, 第 11 日给药 2 h 后用 0.5% 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉小鼠, 正常组气管滴注无菌磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered, PBS), Mod 组及 BRAP-1 给药组气管滴注 LPS (5 mg/kg, 50 μ L), 滴注后继续保持垂直并轻轻左右摆动小鼠, 让 LPS 均匀分布在小鼠的肺里, 出现明显呛咳音, 说明滴注成功。造模结束后待小鼠苏醒观察一般状态。模型建立 24 h 后, 在小鼠的眼眶内采集血液, 取其脏器称重, -80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

1.3.3 小鼠肺泡灌洗液中氧化因子 MPO、MDA、H₂O₂ 含量的测定

取小鼠肺泡灌洗液, 按照试剂盒说明书测定肺泡灌洗液中髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、过氧化氢 (H₂O₂) 含量。

1.3.4 小鼠肺组织中 PI3K/AKT 相关蛋白表达量的测定

取小鼠肺组织适量, 放入加有混合裂解液的预冷研磨管进行组织研磨, 提取总蛋白后测定其浓度。样本蛋白体系制备结束后放入提前开机升温至 100 $^{\circ}$ C 的金属浴仪器蛋白变性 10 min, 变性反应结束后冷却至室温。测定磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PI3K)、细胞外

调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 蛋白表达量。

1.3.5 小鼠肺组织中细胞凋亡通路相关蛋白表达量的测定

取小鼠肺组织适量, 放入预冷研磨管中, 加入混合裂解液进行组织研磨, 提取总蛋白并测定其浓度。总蛋白制备结束后放入 100 $^{\circ}$ C 的金属浴仪器蛋白变性 10 min, 变性反应结束后冷却至室温。测定胱氨酸蛋白酶-3 (Cleaved Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 样蛋白关联 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2-associated X protein, BAX)、B 淋巴细胞瘤-2 样蛋白 (B-cell lymphoma-2, BCL-2) 蛋白表达量。

1.3.6 统计分析

采用 SPSS、ImageJ 等软件进行数据分析, 结果用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。采用 GraphPad Prism 9.1.0 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 BRAP-1 对小鼠肺泡灌洗液中 MDA、MPO、H₂O₂ 含量的影响

与 Con 组比较, Mod 组肺泡灌洗液中 MDA、MPO、H₂O₂ 水平显著升高 ($P < 0.001$), 与 Mod 组相比, BRAP-1-H 组小鼠肺泡灌洗液中 MDA、MPO、H₂O₂ 水平显著降低 ($P < 0.01$) (见图 1)。

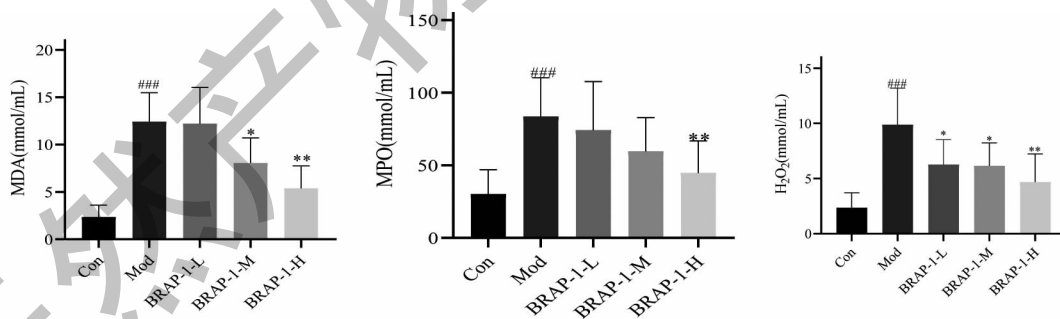


图 1 小鼠肺泡灌洗液中 MDA、MPO、H₂O₂ 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Content of MDA, MPO and H₂O₂ in alveolar lavage fluid of mouse ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注: 与 Con 相比, ^{###} $P < 0.001$; 与 Mod 相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con, ^{###} $P < 0.001$; Compared with Mod, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.2 BRAP-1 对小鼠肺组织中 PI3K、AKT、ERK 蛋白表达量的影响

与 Con 较, Mod 组肺组织中 PI3K、AKT、ERK 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与 Mod 组比 BRAP-1-H 组可以显著调节 PI3K、AKT、ERK 的蛋白表达, 降低 AKT 磷酸化水平 ($P < 0.05$) (见图 2)。

2.3 BRAP-1 对小鼠肺组织中凋亡相关蛋白表达量的影响

与 Con 组比较, Mod 组肺组织中 Cleaved Caspase-3、BAX 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), BCL-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。

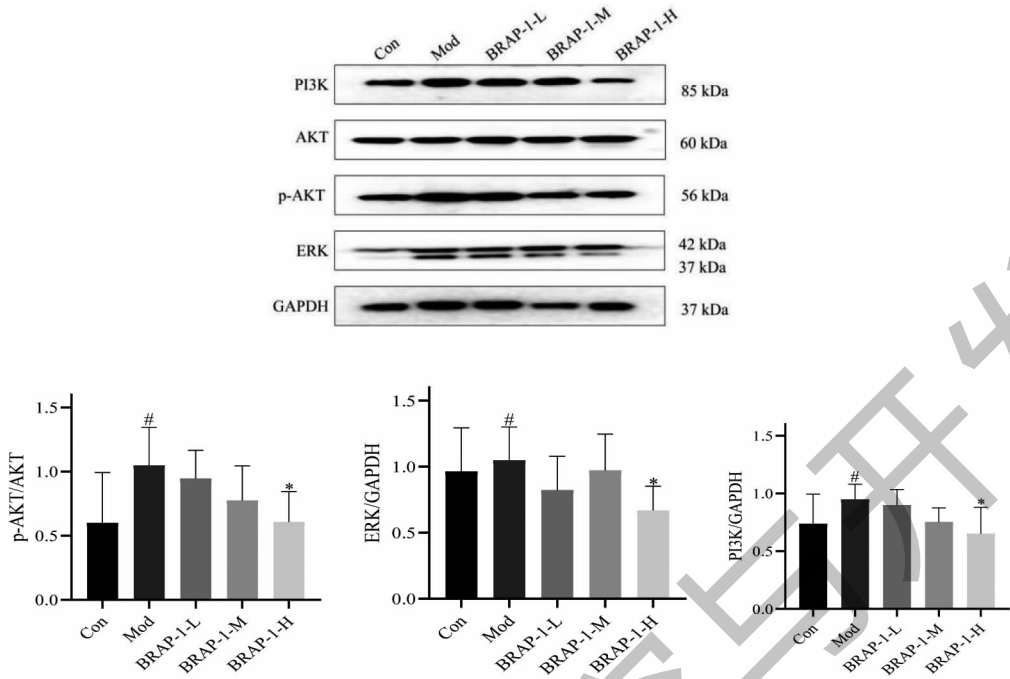


图2 小鼠肺组织中 PI3K、AKT、ERK 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Expression of PI3K, AKT and ERK proteins in mouse lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注: 与 Con 相比, [#] $P < 0.05$; 与 Mod 相比, ^{*} $P < 0.05$ 。Note: Compared with Con, [#] $P < 0.05$; Compared with Mod, ^{*} $P < 0.05$ 。

与 Mod 组比, BRAP-1 各剂量组不同程度降低 Cleaved Caspase-3、BAX 蛋白表达水平, 升高 BCL-2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。结果说明 LPS 诱导肺损伤小鼠肺组织受到严重炎症反应, 氧化应激刺激后

导致肺细胞凋亡, BRAP-1 可调节凋亡蛋白表达水平, 因此其肺损伤保护作用另一方面可能通过调节凋亡相关蛋白表达减轻肺组织病理性改变 (见图 3)。

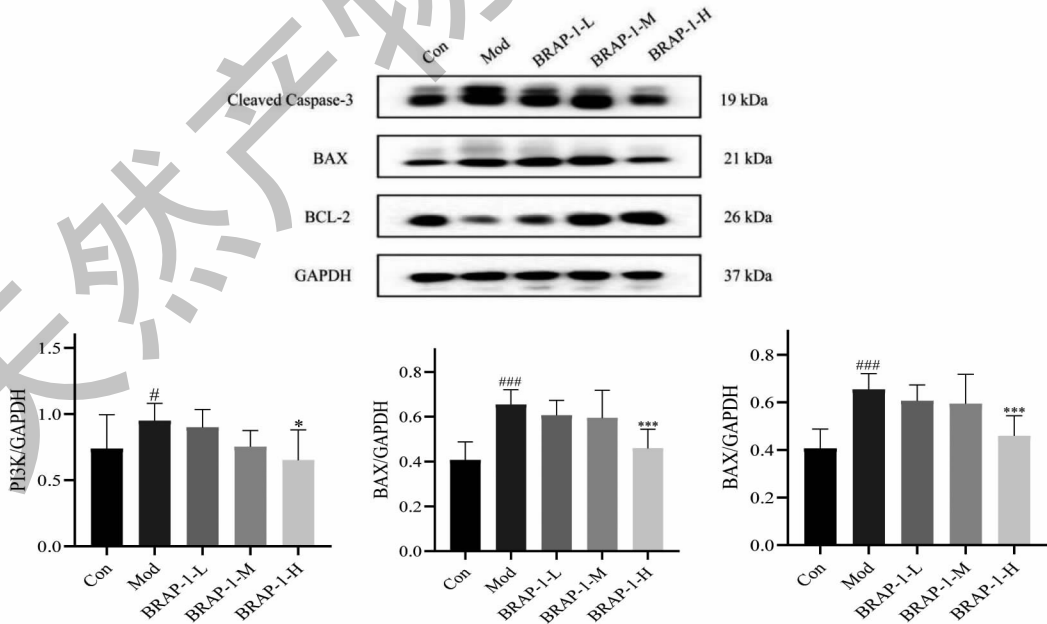


图3 小鼠肺组织中凋亡相关蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Expression of apoptosis-related protein in mouse lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注: 与 Con 相比, ^{###} $P < 0.001$; 与 Mod 相比, ^{***} $P < 0.001$ 。Note: Compared with Con, ^{###} $P < 0.001$; Compared with Mod, ^{***} $P < 0.001$ 。

3 讨论与结论

LPS 诱发的肺损伤炎症反应可导致肺泡上皮细胞严重受损,并且发生炎症细胞浸润,最终引起肺水肿以及肺功能障碍^[19]。严重的炎症也可诱导氧化应激,使得机体大量合成 MDA、MPO、H₂O₂ 等氧化因子,导致氧化/抗氧化稳态失调,加重炎症并引起细胞凋亡^[20]。磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 信号通路在细胞增殖、代谢等多种关键生命活动中起重要作用。

凋亡的发生发展受多种信号通路的调控,大量研究表明凋亡在肺损伤病理发展过程中起着重要的作用。机体器官组织损伤必将引起细胞坏死,凋亡是坏死的必然结果^[21]。细胞凋亡的发生发展受到多种基因调控,抗凋亡基因 BCL-2 可抑制 BAX 形成二聚体,BAX 可诱导启动细胞凋亡,而 Cleaved Caspase-3 是凋亡的关键执行蛋白^[22,23]。因此,Cleaved Caspase-3、BAX 表达水平上调或抗凋亡基因 BCL-2 表达水平下调会促进细胞凋亡^[24,25]。

在本实验研究中发现,Mod 组小鼠肺泡灌洗液中 MDA、MPO、H₂O₂ 水平及肺组织中 PI3K、AKT 蛋白表达水平显著升高($P < 0.001$),说明 LPS 诱导肺损伤可引起肺部大量自由基的产生、诱发氧化应激反应、激活 PI3K/AKT 信号通路,可对肺组织细胞产生毒性,加重受损。与 Mod 组相比 BRAP-1 给药组小鼠肺泡灌洗液中 MDA、MPO、H₂O₂ 及肺组织中 PI3K、AKT 蛋白表达水平不同程度降低,可能是由于 BRAP-1 具有清除自由基、抑制氧化应激的作用。另一方面,Mod 组小鼠肺组织中 Cleaved Caspase-3、BAX 蛋白表达水平显著升高,BCL-2 蛋白表达水平显著降低;而与 Mod 组相比 BRAP-1 各剂量组可降低促凋亡因子 BAX、凋亡关键因子 Cleaved Caspase-3 蛋白表达,增强抗凋亡因子 BCL-2 蛋白表达,说明 BRAP-1 可以通过调节肺组织细胞凋亡对肺损伤起保护作用。

综上所述,BRAP-1 可通过清除肺组织自由基、抑制氧化应激,以及调节肺组织细胞凋亡,从而对小鼠肺损伤起到保护作用。此作用机制可为临床上肺损伤治疗药物的开发提供一定参考。

参考文献

1 Zhu L, Bao XJ, Wang QX, et al. Protective effect and mechanism of *Anoectochilus roxburghii* extract on acute lung injury induced by LPS in mice [J]. Zhejiang Med (浙江医学),

2024, 46: 341-346.

2 Liu Y, Zhou SJ, Xiang D, et al. Friend or Foe? The roles of antioxidants in acute lung injury [J]. Antioxidants, 2021, 10: 1956.

3 Jiang RD, Xu JQ, Zhang YZ, et al. Ligustrazine alleviate acute lung injury through suppressing pyroptosis and apoptosis of alveolar macrophages [J]. Front Pharm, 2021, 12: 680512.

4 Jing PF. Advances in clinical trials of drugs for acute lung injury [J]. J Med Theor Pract (医学理论与实践), 2021, 34: 926-928.

5 Zhu ZM, Cui BM, Nie FL, et al. Arctigenin alleviates acute lung injury by inhibiting the inflammation reaction and repairing the nasal epithelial barrier [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2024, 36: 1298-1306.

6 Nie SY, Fan SS, Zhu YS, et al. Prevention and treatment of Xiyanping injection based on network pharmacology and molecular docking mechanism of acute lung injury [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2024, 40: 1165-1171.

7 Yu CC, Chen F, Ma LK, et al. Comprehensive evaluation of the quality of *Brassica rapa* L. ssp. *rapa* from different regions in Tibet based on principal component and cluster analysis [J]. J Food Saf Qual (食品安全质量检测学报), 2022, 13: 6312-6319.

8 Wei J. Bioactivity and metabolomics analysis of metabolites of endophytic fungi isolated from *Brassica rapa* L. [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University (新疆医科大学), 2020.

9 Ma J. Study on extraction, purification and the microcapsule of Xingjiang Qiamagu [D]. Shihezi: Shihezi University (石河子大学), 2010.

10 Chen WB, Shi Y, Zhang BW, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activity of flavonoids [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med (江西中医药大学学报), 2019, 31: 115-118.

11 Taoerdahong HLQ, Kadeer GLML, Qiao LJ, et al. Effects of neutral polysaccharide from *Brassica rapa* L. on immune function of A549 tumor-bearing mice [J]. J Food Saf Qual (食品安全质量检测学报), 2023, 14: 234-241.

12 Maimaiti HRGL, Abulimite ZLPY, Taoerdahong HLQ. Preliminary study on the hypoglycemic effect of neutral polysaccharide from *Brassica rapa* L. [J]. J Food Saf Qual (食品安全质量检测学报), 2020, 11: 387-392.

13 Yan HX, Qiu X, Liu SY, et al. Research progress on immunomodulatory effects of fucoidan [J]. Food Nutr Chin (中国食物与营养), 2023, 29: 67-71.

14 Yuan PF, Liu LT, Aipire A, et al. Evaluation and mechanism of immune enhancement effects of *Pleurotus ferulae* polysaccharides-gold nanoparticles. [J]. Int J Biol Macromol, 2023,

- 227:1015-1026.
- 15 Kuerban KDEY, Abula AJRM, Chen ZE, et al. Structure of an acidic polysaccharide from *Brassica rapa* L. and its protective effect on lipopolysaccharide-induced lung injury in mice [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2023, 44: 52-59.
- 16 Xu SG, Cao YQ, Meng JL, et al. Intervention effect of astragalus polysaccharide on lung injury in rats exposed to PM_{2.5} [J]. *Chin J Gerontol (中国老年学杂志)*, 2023, 43: 430-433.
- 17 Wang YF. Ursolic acid attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice and its mechanism [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University (山西医科大学), 2023.
- 18 Geng GQ, Xie XR, Wang YL, et al. Influence of total Hedysaripolysaccharide on the level of cytokine and anti-oxidative function in acute lung injury of mice [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2017, 33: 1443-1446.
- 19 Shah SL, Barie PS, Bronstein ME, et al. Burns and fatal acute lung injury ignited by a smartphone charger during non-invasive ventilation for COVID-19 [J]. *Surg Infect*, 2021, 22: 1097-1098.
- 20 Xiao JT, Tu BJ, Zhou X, et al. Autophagy deficiency exacerbates acute lung injury induced by copper oxide nanoparticles [J]. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19: 162.
- 21 Yildiz IE, Topcu A, Bahceci I, et al. The protective role of fosfomicin in lung injury due to oxidative stress and inflammation caused by sepsis [J]. *Life Sci*, 2021, 279: 119662.
- 22 El SM, Atef H, Eladl MA, et al. Leflunomide induces dose-dependent lung injury in mice via stimulating vimentin and NLRP3 inflammasome production [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 631216.
- 23 Akpınar E, Kutlu Z, Kose D, et al. Protective effects of idebenone against sepsis induced acute lung damage [J]. *J invest surg*, 2022, 35: 560-568.
- 24 Zhang C, Ning D, Pan J, et al. Anti-inflammatory effect fraction of *Bletilla striata* and its protective effect on LPS-induced acute lung injury [J]. *Mediators Inflammation*, 2021, 2021: 6684120.
- 25 Mao JY, Li DK, Zhang HM, et al. Plasma mitochondrial DNA levels are associated with acute lung injury and mortality in septic patients [J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21: 66.
-
- (上接第 2115 页)
- 20 Mohammed MJ, Tadros MG, Michel HE. Geraniol protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats: Possible role of MAPK and PPAR- γ signaling pathways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 139: 111251.
- 21 Jin J, Lv XH, Wang B, et al. Limonin Inhibits IL-1 β -induced inflammation and catabolism in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis by activating Nrf2 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 7292512.
- 22 Wu GA, Prochnik S, Jenkins J, et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 656-662.