研究论文

甲状腺素对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用

陈立立[1]，唐 雪[1,2]，徐圆媛[1]，余 静[1]，乐国伟[1,2]，施用晖[*1,2]
（1. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；2. 食品科学与技术国家重点实验室 江南大学，江苏 无锡 214122）

摘要：研究甲状腺激素(T3)对人肝癌细胞(HepG2)氧化损伤的保护作用。体外建立 HepG2 细胞 H_2O_2 氧化损伤模型，添加不同浓度 T3 进行保护，测定 T3 对细胞 ROS、存活率、抗氧化酶及相关基因的影响。10^{-9}、10^{-7}、10^{-5} mol/L 的 T3 预处理 24 h 可分别有效降低 50、100、200 μmol/L H_2O_2 处理细胞的 ROS 水平，提高细胞存活率($p<0.05$)。但 10^{-5} mol/L 的 T3 反而会增加 50 μmol/L H_2O_2 处理细胞的 ROS 水平，降低存活率($p<0.05$)。适量 T3 可显著降低 H_2O_2 氧化损伤的 HepG2 细胞 MDA 含量($p<0.05$)，显著提高 T-AOC、GSH-Px 以及 SOD 活性($p<0.05$)。但过量 T3 会增加细胞 MDA 水平，降低酶活。基因表达也有类似趋势，T3 预处理使损伤细胞内 PI3K、Nrf2 的表达显著提高($p<0.05$)，且与 T3 作用剂量相关。可见 T3 对 H_2O_2 氧化损伤的 HepG2 细胞的氧化还原状态具有明显的改善作用，其抗氧化保护功能与提高抗氧化酶的活性及细胞内抗氧化相关基因的表达有关，且 T3 作用效果与其剂量及细胞损伤水平相关。

关键词：甲状腺激素；HepG2 细胞；过氧化氢；抗氧化
中图分类号：TS 201.4　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)09—0935—06

Protective Effect of Thyroid Hormone on Oxidative Damage in HepG2 Cells

CHEN Lili[1]，*TANG Xue*[1,2]，*XU Yuanyuan*[1]，*YU Jing*[1]，*LE Guowei*[1,2]，*SHI Yonghui*[*1,2]
（1. School of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. State Key Laboratory of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：To investigate the protect effects of thyroid hormone (T3) on HepG2 with oxidative damage. Establishing an oxidative stress model of HepG2 cells cultured in vitro，adding different concentrations of T3 for protection，determining the differentiation of cellular ROS，survival，antioxidant enzymes and related genes. Pretreatment of 10^{-9}，10^{-7}，10^{-5} mol/L T3 for 24 h，the level of ROS significantly reduced and the survival rate of cells was significantly increased($p<0.05$)in cells of 50，100，200 μmol/L H_2O_2 processing respectively. While，10^{-5} mol/L T3 increased the level of ROS. The amount of T3 can significantly reduce MDA content ($p<0.05$)，increase T-AOC，GSH-Px and SOD activity of cells of H_2O_2 oxidative damage($p<0.05$). But excess T3 increased MDA content and decreased the antioxidant activity. The results of gene expression showed that T3 pretreatment significantly increased PI3K，Nrf2 in the damaged cells($p<0.05$). T3 can improve the redox state of

收稿日期：2014-01-03
基金项目：国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD33B05)；江苏高校优势学科建设工程资助项目。
* **通信作者**：施用晖(1955—)，女，上海人，农学博士，教授，博士研究生导师，主要从事营养代谢调控研究。
E-mail：yhshi@jiangnan.edu.cn

HepG2 cells of H_2O_2 oxidative damage because of the effect on antioxidant enzyme activities and the expression of anti-oxidation genes and the effect is related to the dose and cell damage levels.
Keywords: thyroid hormone(T3), HepG2, H_2O_2, apoptosis

氧化应激是指机体氧化系统和抗氧化系统失衡,从而导致组织损伤。过多自由基会作用于生物大分子,破坏细胞、组织结构,是导致动脉粥样硬化、糖尿病、炎症、衰老、癌症等的发生发展的重要因素[1]。有研究表明,糖尿病患者体内自由基活性增强,各种抗氧化酶如 SOD、CAT 等活力都降低,GSH、VC、VE 等具有抗氧化能力的物质水平也会降低[2]。T3 是机体内甲状腺激素的主要生物活性形式[3]。既往临床工作中发现,许多 2 型糖尿病患者血清 FT3 水平较正常组显著下降,且随着病龄的延长 T3 水平降低越显著[4]。肝硬化患者体内血清 T3 水平与血清 MDA 水平呈负相关,与 GSH 和 GSH-Px 水平呈正相关[5]。张洪梅等[6]研究表明,随着甲状腺激素缺乏时间的延长,大鼠脑组织氧化应激状态会发生改变,抗氧化损伤能力不足以代偿活性氧造成的损伤,最后出现脑损伤。另有研究表明,T3 预处理可逆转肝脏缺血再灌注损伤引起的 GSH、MDA 改变,有效保护小鼠肝脏缺血再灌注损伤[7]。且有研究表明,T3 可作为促进胰岛 β 细胞存活和抗其凋亡的保护因子[8]。因此,推测 T3 可能具有抗氧化保护功能。

核转录相关因子(Nrf2)是重要的转录因子,在氧化应激等情况下与 Kelch 样 ECH 联合蛋白质 1(Keap1)解离,进入胞质启动Ⅱ相解毒酶及抗氧化酶基因(如 NQO1、HO-1)的表达,增加细胞对氧化应激和亲电子化学物质的抗性[9]。已有研究表明,T3 处理大鼠可导致 N-乙酰半胱氨酸预处理的肝脏 Nrf2 活性的提高[10]。PI3K 是 Nrf2 的上游调节因子,抑制 PI3K 会阻断 Nrf2 的核易位及诱导应激蛋白质表达,因此在维持细胞氧化还原状态方面也起到重要作用[11]。

过氧化氢是一种重要的活性氧,其易于获得,性质相对稳定,所以它已成为研究细胞氧化损伤的重要工具[12]。作者以人肝癌细胞(HepG2)为基础,以过氧化氢为氧化应激诱导剂,构建体外氧化应激细胞模型,加入不同浓度的 T3 处理,从细胞自由基水平、存活率、多种抗氧化酶活及 PI3K、Nrf2、NQO1、HO-1 等基因表达水平等多角度,全面分析 T3 的抗氧化作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2 细胞,购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 试剂及仪器

DMEM 基础培养基,购自 Gibco 公司;T3,购自 Sigma 公司;胰蛋白酶(Trypsin),购自 Amresco 公司;新生小牛血清,购自中国杭州四季青生物技术有限公司;活性氧检测试剂盒、细胞裂解液、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、Trizol、RT-PCR 相关试剂,均购自碧云天生物技术研究所;T-AOC 测试盒、SOD 测试盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒,均购自南京建成生物工程研究所;其他试剂均为国产分析纯。

多功能酶标仪,Biotek 公司制造;CO_2 细胞培养箱,Thermo 公司制造;还有日立 7000 型荧光分光光度计,Olympus 倒置显微镜等。

实验中部分引物用 Primerpremier5.0 软件设计,由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.3 细胞培养

将 HepG2 细胞按 5×10^5 个/mL 接种在含体积分数 10%灭活新生小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中(pH 7.2),37 ℃、质量分数 5% CO_2 的细胞培养箱中培养。细胞为多角形贴壁生长,每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.4 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞损伤模型的建立

1.4.1 *实验分组及药物处理* 实验分组:正常对照组,加入常规培养液;H_2O_2 处理 2 h 组,加入培养液和 H_2O_2,H_2O_2 终浓度分别为 10、50、100、200 μmol/L;H_2O_2 处理 4 h 组,加入培养液和 H_2O_2,H_2O_2 终浓度分别为 10、50、100、200 μmol/L。

1.4.2 *噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活率* 取对数生长期 HepG2 细胞以 10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板上,每组 6 孔,于 37 ℃、质量分数 5% CO_2 培养箱中

培养，待细胞长至 80%左右，去除培养液，加药物处理，每孔 100 μL，处理结束后弃上清液，每孔加入 100 μL 培养基和 20 μL 5 g/L 的 MTT，温育 4 h，去除培养液及 MTT，每孔加入 200 μL 二甲基亚砜，用酶标仪测定各孔在波长 570 nm 处的吸光度。

1.4.3 ROS 探针法检测细胞自由基水平 取对数生长期 HepG2 细胞以 10^5 个/mL 密度接种于 96 孔的透明底黑板，待细胞增长 80%左右，加探针 DCFH-DA（事先用无血清的培养基以体积比 1∶1 000 稀释）100 μL，30 min 后弃去孔内液体，用 PBS 洗两遍，加 H_2O_2，处理完后用荧光酶标仪检测，激发波长 488 nm，发射波长 525 nm，检测细胞平均荧光强度。

1.5 检测 T3 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞 ROS 及存活率的影响

实验分组：正常对照组；高中低浓度 H_2O_2 处理组；H_2O_2+T3 组（T3 浓度为 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L，用无血清培养基配制）；阳性对照 H_2O_2+硫辛酸 LA 组（LA 浓度为 100 μmol/L）。取对数生长期 HepG2 细胞以 10^4 个/mL 密度接种于 96 孔板，24 h 后加 T3 孵育，24 h 后弃上清液，加 H_2O_2 处理，检测细胞存活率及 ROS 水平。

1.6 检测 T3 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞抗氧化物/酶的影响

实验分组：正常对照组，100 μmol/L H_2O_2 处理组，H_2O_2+高中低 T3 组，H_2O_2+LA 组。取对数生长期 HepG2 细胞以 3×10^5 个/mL 密度接种于 6 孔板，24 h 后加 T3 孵育，48 h 后弃上清液，加 H_2O_2 处理。处理完后每孔加入 300 μL 细胞裂解液收集。3 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液，进行 BCA 蛋白质测定，然后按试剂盒说明书进行 T-AOC、GSH-Px、SOD、MDA 的测定。

1.7 RT-PCR 法检测目的基因的表达

以 1.6 方法处理细胞，处理完后每孔加入 1 mL Trizol，用氯仿/异丙醇/乙醇法提取细胞内总 RNA，并用微量核酸检测仪测定所提取 RNA 的浓度及纯度。RT-PCR 扩增目的片段，引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。引物序列为：内参 β-actin 上游引物 5′-TCCCTCAAGATTCTCAGCA-3′，下游引物 5′-ACATCCACAACGCATACA-3′；Nrf2 上游引物 5′-GATGGGTTGGACTGGTGGTGGTT-3′，下游引物 5′-CTCTCGGAGCGGGCGTAGTTTCT-3′；PI3K 上游引物 5′-TGTACTGGGCCTCATGCACCT-3′，下游引物 5′-GGCAAAGCGGCAGTAGTAGAGTAG-3′；NQO1 上游引物 5′-GTGGTGGAGTCGGACCTCTATG-3′，下游引物 5′-AAGCCAGAACAGACTCGGCAG-3′；HO-1 上游引物 5′-ATGACACCAAGGACCAGAG-3′，下游引物 5′-TAAGGACCCATCGGAGAAG-3′。按以下条件进行 PCR 扩增反应：95 ℃作用 5 min；95 ℃反应 20 s，62 ℃反应 30 s，72 ℃反应 20 s；72 ℃作用 2 min。其中第 2 步到第 4 步（变性、退火、延伸）设置 40 个循环。

1.8 数据统计

实验数据经 Excel 初步处理后，用 SPSS 16.0 统计软件进行单因子方差分析和邓肯氏多重比较，分析各组间的差异显著性。显著水平为 $p<0.05$，极显著水平为 $p<0.01$。数据用垂直条形图和 mean±S.D. 形式表示。

2 结果分析

2.1 H_2O_2 对 HepG2 细胞 ROS 及存活率的影响

10、50、100、200 μmol/L 的 H_2O_2 处理 HepG2 细胞 2、4 h 后检测细胞存活率及 ROS（图 1）。

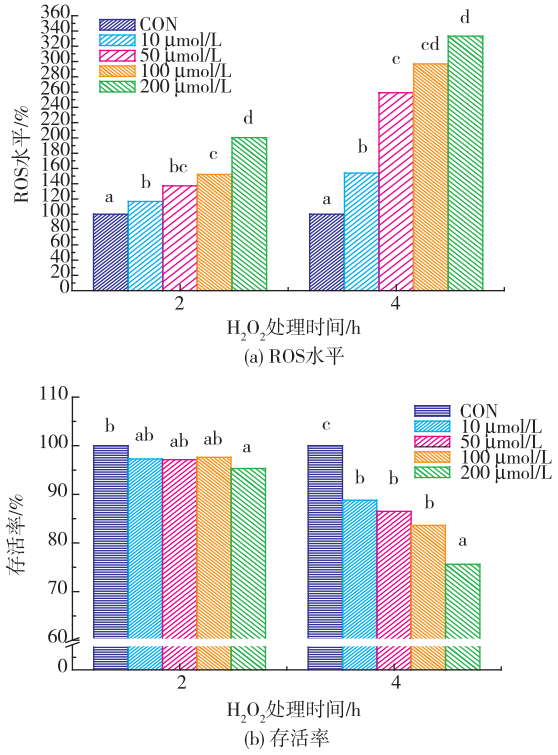


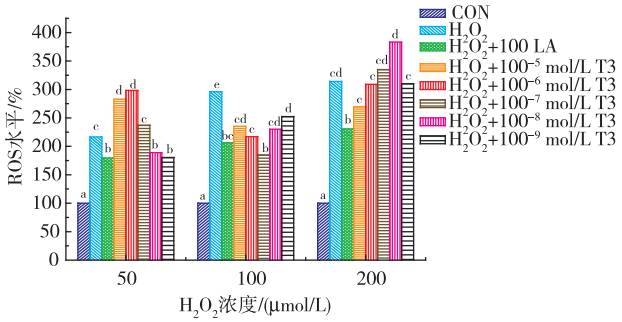
图 1 H_2O_2 对 HepG2 细胞 ROS 及存活率的影响

Fig. 1 Effects of H_2O_2 on ROS and cell viability in HepG2

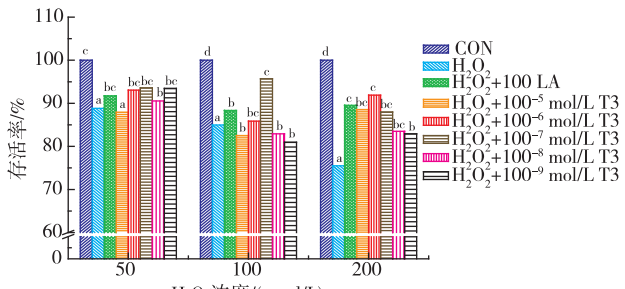
由图 1 可以观察到,随着 H_2O_2 浓度的提高及作用时间的延长，细胞存活率逐渐下降,ROS 水平逐渐提高。100 μmol/L 的 H_2O_2 处理 HepG2 细胞 4 h 后,细胞存活率为 80%左右,ROS 提高至 300%左右,与正常细胞差异显著 (P<0.05)，提示此浓度可建立 HepG2 细胞体外氧化应激模型。这与韩飞、Farombi 等的实验结果一致[12-13]。

2.2 T3 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞 ROS 及存活率的影响

HepG2 细胞贴壁生长 24 h 后,加入不同浓度的 T3 继续培养 48 h 后再用 H_2O_2 处理,测定细胞存活率及 ROS。如图 2 所示,不同浓度的 T3 对细胞存活率及 ROS 产生了不同影响。10^{-9}、10^{-7}、10^{-5} mol/L 的 T3 可分别显著提高 50、100、200 μmol/L H_2O_2 氧化损伤的细胞的存活率,降低细胞 ROS(P<0.05),但 10^{-5} mol/L 的 T3 反而降低 50 μmol/L H_2O_2 氧化损伤的细胞的存活率,增加细胞 ROS。最佳作用剂量的 T3 效果与 100 μmol/L LA 效果相当。



(a) ROS水平



(b) 存活率

图 2 T3 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞 ROS 及存活率的影响

Fig. 2 Effects of T3 on ROS and cell viability of H_2O_2 reduced HepG2 cells

2.3 T3 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞抗氧化酶的影响

见表 1。与对照组相比,100 μmol/L H_2O_2 组细胞内 T-AOC、SOD 及 GSH-Px 活性均显著降低,MDA 含量显著提高 (P<0.05)。加入 10^{-5}、10^{-7}、10^{-9} mol/L 的 T3 可不同程度地提高细胞 T-AOC、SOD 及 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量。其中 10^{-7} mol/L T3 处理组与 H_2O_2 组细胞差异最显著(P<0.01)。结果表明,T3 对氧化损伤的 HepG2 细胞的氧化还原状态起到了明显的改善作用，且 T3 作用效果与使用剂量相关。

2.4 T3 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞抗氧化相关基因的影响

见表 2。与对照组相比,100 μmol/L H_2O_2 组细胞内 PI3K、Nrf2、NQO1、HO-1 表达均显著降低,加入 T3 可不同程度地提高细胞这些基因的表达。其中 10^{-7} mol/L T3 对 PI3K、Nrf2、NQO1 的表达提高作

表 1 T3 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响($x\pm s$,n=3)

Table 1 Effect of T3 on T-AOC,SOD,GSH-Px activities and MDA content in H_2O_2 reduced HepG2 cell($x\pm s$,n=3)

HepG2 细胞抗氧化酶	对照组	H_2O_2	H_2O_2+LA	H_2O_2+T3 浓度/(mol/L)		
				10^{-5}	10^{-7}	10^{-9}
T-AOC (U/mg)	2.16±0.11	1.40±0.15*	1.80±0.12#	1.68±0.06	2.12±0.01##	1.77±0.01#
SOD (U/mg)	9.94±0.51	7.62±0.65*	8.72±0.55	11.05±0.92#	12.90±1.09##	9.37±0.71
GSH-Px (U/mg)	5.33±0.29	3.10±0.11*	5.25±0.25#	4.87±0.17#	6.51±0.43##	5.32±0.28#
MDA (U/mg)	2.21±0.11	8.64±0.56*	3.42±0.23##	4.35±0.33#	4.29±0.38#	5.37±0.24

注:* 与正常对照组相比,差异显著(p<0.05);# 与 H_2O_2 组相比,差异显著(p<0.05),## 与 H_2O_2 组相比,差异极显著(p<0.01)。

表 2　T3 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞 PI3K、Nrf2、NQO1、HO-1 表达的影响（$x\pm s$，n=3）

Table 2　Effect of T3 on the expression of PI3K，Nrf2，NQO1 and HO-1 in H_2O_2 reduced HepG2 cell（$x\pm s$，n=3）

HepG2 细胞抗氧化基因	对照组	H_2O_2	H_2O_2+LA	H_2O_2+T3 浓度/(mol/L)		
				10^{-5}	10^{-7}	10^{-9}
PI3K	1.00±0.04	0.78±0.05*	1.04±0.12#	0.68±0.06	1.12±0.09##	0.92±0.05#
Nrf2	1.00±0.08	0.62±0.05*	1.42±0.15##	1.35±0.09#	1.45±0.09##	1.27±0.11
NQO1	1.00±0.09	0.40±0.01*	0.85±0.05	1.07±0.10#	1.81±0.13##	1.32±0.11#
HO-1	1.00±0.03	0.64±0.06*	1.12±0.13#	0.75±0.03	1.09±0.08#	1.27±0.09##

注：* 与正常对照组相比，差异显著（p<0.05）；# 与 H_2O_2 组相比，差异显著（p<0.05），## 与 H_2O_2 组相比，差异极显著（p<0.01）。

用最显著（P<0.01），10^{-9} mol/L T3 对 HO-1 的表达提高作用最显著（P<0.01）。结果表明，T3 对氧化损伤的 HepG2 细胞的抗氧化关键基因的表达有影响，且与剂量有关。

3 讨　论

氧化应激是体内氧化和抗氧化水平失去平衡的后果，过量的活性氧会引起分子、细胞和机体的损伤[14]。大量研究表明[15]，氧化应激是代谢综合征发生和发展的重要病因之一。甲状腺激素参与机体的正常代谢，与组织器官的氧化和抗氧化状态有着重要关系。

通过体外建立 HepG2 细胞 H_2O_2 氧化损伤模型，初步研究了 T3 对氧化损伤细胞存活率、ROS 水平、抗氧化酶活性及相关基因表达的影响。结果显示，10、50、100、200 μmol/L H_2O_2 可显著提高胞内 ROS 水平，降低细胞存活率，表明 HepG2 细胞的 ROS 水平和存活率与 H_2O_2 作用浓度存在剂量效应。为了更好地探究 T3 作用剂量与细胞损伤程度之间的关系，选择低中高 3 个 H_2O_2 浓度。比较发现，对 50、100、200 μmol/L H_2O_2 处理的 HepG2 细胞，T3 抗氧化保护作用存在差异。10^{-9}、10^{-7}、10^{-5} mol/L T3 可分别显著降低 50、100、200 μmol/L H_2O_2 处理的细胞的 ROS 水平，增加细胞存活率（p<0.05），表明 T3 最佳作用剂量与细胞氧化损伤程度有关。有研究表明，补充外源性甲状腺激素对外科重症时的器官有保护作用，这已在心、肺、器官移植中得到初步证实[16]。虽然甲状腺激素的器官保护作用的机制尚不清楚，但已有研究显示可能与甲状腺激素可以抑制细胞凋亡等有关[17]。因此，T3 对 H_2O_2 氧化损伤的 HepG2 细胞有保护作用可能与 T3 能抑制 HepG2 细胞凋亡和清除 ROS 有关。近年来越来越多证据表明，VA、VC、VE、异黄酮、硫辛酸等被用作抗氧化的物质，在低剂量使用条件下表现抗氧化作用，而在高剂量作用下却表现促氧化作用[18]。本实验结果中也有类似发现，10^{-5} mol/L T3 反而增加 50 μmol/L H_2O_2 处理的细胞的 ROS 水平，降低细胞存活率，说明在低程度损伤时，细胞有自行调节氧化还原状态的能力，而高浓度 T3 会通过增加细胞代谢而产生更多自由基，从而损害细胞；而随着损伤加重，T3 逐渐显现抗氧化作用，且损伤程度越严重，T3 所需浓度越大。

为了进一步探究 T3 抗氧化保护作用的可能机制，作者检测了胞内 T-AOC、GSH-Px 及 SOD 活性和 MDA 含量及一些抗氧化相关基因表达。结果显示，与对照组相比，100 μmol/L H_2O_2 组细胞内 T-AOC、GSH-Px 及 SOD 活性显著降低，MDA 含量显著升高（p<0.05），说明细胞内氧化还原平衡被打破，造成细胞内氧化应激。加入 T3 可显著降低细胞 MDA 含量，提高 T-AOC、GSH-Px 及 SOD 活性，其中 10^{-7} mol/L T3 作用效果最显著，这与自由基及存活率结果一致。核转录相关因子（Nrf2）是重要的转录因子，在氧化应激时被激活，由胞质转移到核内启动Ⅱ相解毒酶及抗氧化酶基因的表达，增加细胞对氧化应激的抗性[19]。研究发现，T3 添加 1 h 和 2 h 后，细胞核内诱导产生的 Nrf2 水平显著提高，胞质内 Nrf2 水平减少，即 T3 处理会诱导大鼠肝细胞 Nrf2 活化。

4 结　语

本研究结果显示，加入 T3 可显著提高细胞 Nrf2 的表达，同时，Nrf2 的上游调控因子 PI3K 及下游Ⅱ相酶基因 NQO1 及 HO-1 的表达均显著提高。但是本实验测定的是细胞总的 Nrf2 的表达，下一步可以将 T3 处理的细胞进行核质分离，分别测定 Nrf2 水平的变化。

本实验结果表明，T3 可通过提高 PI3K 的表达从而提高 Nrf2 的表达，继而提高下游Ⅱ相酶基因的表达，进而提高细胞内 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶活

性,降低 MDA 生成,从而降低细胞自由基水平,提高细胞存活率,进而发挥抗氧化保护作用。但过高浓度 T3 反而可能因刺激细胞代谢增强,产生过多自由基而起促进氧化的作用。

参考文献:

[1] 吴其夏,余应年,卢建. 病理生理学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2003.

[2] Palanisamy P,Govindasamy B,Ganesan S,et al. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in patients with diabetes mellitus[J]. **Journal of Applied Sciences Research**,2009,5(7):770-775.

[3] Yen P M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action[J]. **Physiological Reviews**,2001,81(3):1097-1142.

[4] 张秀华,郗光霞,魏正俐,等. 甲状腺激素及促甲状腺素在 2 型糖尿病中的变化[J]. 山西医科大学学报,2011,42(2):130-131.
ZHANG Xiuhua,XI Guangxia,WEI Zhengli,et al. Changes in thyroid hormone and thyrotropin in type 2 diabetes[J]. **Journal of Shanxi Medical University**,2011,42(2):130-131.(in Chinese)

[5] Abdel H A M,Ehab M M A,Tarek M M,et al. Oxidative stress and thyroid hormones in patients with liver diseases[J]. **European Journal of Internal Medicine**,2009,20:703-708.

[6] 张洪梅,苏青,罗敏. 甲状腺激素缺乏对不同发育时期大鼠脑组织氧化应激指标的影响[J]. 吉林大学学报,2010,36(5):854-857.
ZHANG Hongmei,SU Qing,LUO Min. Effect of thyroid hormone deficiency on oxidative stress parameters in different developing stages of rat brain[J]. **Journal of Jilin University**,2010,36(5):854-857.(in Chinese)

[7] 刘平果,李敏,王效民,等. 甲状腺素预处理对 Pringle 法诱导小鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华肝胆外科杂志,2011,17(7):592-593.
LIU Pingguo,LI Min,WANG Xiaomin,et al. Thyroid hormone preconditioning protects from Pringle manoeuvere of ischemia reperfusion induced liver injury[J]. **Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery**,2011,17(7):592-593.(in Chinese)

[8] Falzacappa C V,Mangialardo C,Madaro L,et al. Thyroid hormone T3 counteracts STZ induced diabetes in mouse [J]. **PloS One**,2011,6(5):19839.

[9] Nguyen T,Nioi P,Cecil B P. The Nrf2 antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress[J]. **Biol Chem**,2009,284(20):13291-13295.

[10] Romanque P,Cornejo P,Valdés S,et al. Thyroid hormone administration induces rat liver Nrf2 activation:Suppression by N-Acetylcysteine pretreatment[J]. **Thyroid**,2011,21(6):655-662.

[11] Nakaso K,Yano H. PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells[J]. **FEBS Letters**,2003,546:181-184.

[12] 韩飞,周孟良. 过氧化氢诱导 HepG2 细胞产生氧化应激细胞模型的建立[J]. 食品科学,2011,32(5):55-57.
HAN Fei,ZHOU Mengliang. An Experimental HepG2 cell model of hydrogen peroxide induced DNA oxidative injury [J]. **Food Science**,2011,32(5):55-57.(in Chinese)

[13] Farombi E O,Moller P,Dragsted L O. Ex-vivo and in vitro protective effects of kolaviron against oxygen-derived radical-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocyles and rat liver cells[J]. **Cell Biol Toxicol**,2004,20:1-12.

[14] Hirooka Y,Sagara Y,Kishi T,et al. Oxidative stress and central cardiovascular regulation[J]. **Circ J**,2010,74(5):827-835.

[15] Hopps E,Noto D,Caimi G,et al. A novel component of the metabolic syndrome:the oxidative stress[J]. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**,2009,20(1):72-77.

[16] 六继海,杨连粤. 甲状腺激素对脏器功能保护作用机制的研究进展[J]. 中国实用外科杂志,2001,21(6):272-276.
LIU Jihai,YANG Lianyue. Advance and development of research of protective mechanism of organ function by thyroxin[J]. **Chinese Journal of Practical Surgery**,2001,21(6):272-276.(in Chinese)

[17] Schneider J J,Hood D A. Effect of thyroid hormone on mtHsp70 expression,mitochondrial import and processing in cardiac muscle[J]. **Journal of endocrinology**,2000,165(1):9-17.

[18] 黄更文,杨恋月,刘继海,等. 一些抗氧化剂的抗/促氧化作用及其机制[J]. 动物营养学报,2012,24(4):595-605.
HUANG Gengwen,YANG Lianyue,LIU Jihai,et al. Effects of exogenous thyroid hormone on intestinal barrier in sepsis[J]. **Chinese Journal of General Surgery**,2012,24(4):595-605.(in Chinese)

[19] 王豫萍,程明亮. Nrf2-Keap1 抗氧化系统与肝脏疾病[J]. 世界华人消化杂志,2010,18(18):1907-1911.
WANG Yuping,CHENG Mingliang. Nrf2-Keap1 antioxidant system and hepatic diseases [J]. World Chinese Journal of Digestology,2010,18(18):1907-1911. (in Chinese)