

柑橘黄酮类化合物的提取新技术及生物活性研究进展

Research progress on new extraction technologies and bioactivities of flavonoids from orange

刘 丹^{1,2} 郭 欢² 吴 笛¹ 甘人友^{1,2,3}

LIU Dan^{1,2} GUO Huan² WU Di¹ GAN Ren-you^{1,2,3}

(1. 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610106; 2. 中国农业科学院都市农业研究所,

四川 成都 610213; 3. 国家成都农业科技中心, 四川 成都 610213)

(1. School of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106, China;

2. Institute of Urban Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 610213, China;

3. Chengdu National Agricultural Science & Technology Center, Chengdu, Sichuan 610213, China)

摘要:综述了近 5 年来柑橘黄酮类化合物提取的新技术, 主要包括低共熔溶剂提取法、亚临界流体萃取技术和磁性分子印迹选择性提取法等环保高效的提取技术, 并对柑橘黄酮类化合物的抗氧化、抗炎、抗菌、抗肥胖、抗糖尿病、抗癌、肠道保护、心血管保护、肝脏保护和神经保护等生物活性及其相关作用机制进行了阐述, 对柑橘黄酮的深入研究提出了建议。

关键词:柑橘; 黄酮类化合物; 提取技术; 生物活性; 作用机制

Abstract: The new extraction technologies of citrus flavonoids in recent five years were reviewed, including low eutectic solvent extraction, subcritical fluid extraction and magnetic molecular blot selective extraction. The bioactivities and mechanisms of citrus flavonoids, such as antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, anti-obesity, anti-diabetes, anti-cancer, intestinal protection, cardiovascular protection, liver protection and neuro-protection, were also expounded, and suggestions for further study of citrus flavonoids were proposed.

Keywords: orange; flavonoids; extraction technologies; bioactivities; mechanisms of action

柑橘(*Citrus*)属芸香科柑橘亚科植物, 含有丰富的生

物活性物质, 其中黄酮类化合物是柑橘中重要的功能活性物质。黄酮类化合物的基本骨架为 $C_6-C_3-C_6$, 即中央三碳链连结两个芳香环构成^[1]。柑橘品种较多, 不同品种中黄酮类化合物含量不同。目前, 柑橘黄酮类化合物的提取方法主要有碱提法、醇提法、酶法、微波辅助提取法和超声波辅助提取法等。近年来, 许多研究学者建立新的安全、环保高效的提取方法, 大大增加了柑橘黄酮类化合物的提取率, 且大量研究学者对柑橘中黄酮类化合物的生物活性进行了研究, 如抗癌、抗肥胖和肠道保护等。研究拟综述近 5 年有关柑橘中黄酮类化合物提取新技术及其生物活性, 并重点阐述其相关作用机制, 以期对柑橘黄酮类化合物的开发利用提供科学依据。

1 柑橘黄酮提取新技术

1.1 低共熔溶剂提取技术

低共熔溶剂通常是由季铵盐、季盐等氢键受体和酰胺、羧酸、醇等氢键供体在一定比例下通过氢键结合形成的低熔点混合物^[2]。Xu 等^[3]以柑橘皮为原料, 探讨了基于氯化胆碱的低共熔溶剂的黏度、pH 值、极性对黄酮提取效率的影响。结果表明, 柑橘黄酮的提取率与氢键供体的极性呈线性关系, 且氯化胆碱-乙酰丙酸-N-甲基尿素的总黄酮提取率最高。在最佳提取条件下, 柑橘果皮中多甲氧基类黄酮为 18.75 mg/g, 类黄酮苷为 47.07 mg/g, 回收率分别为 95.87%, 86.32%。Jokic 等^[4]采用 15 种不同的以氯化胆碱为氢键受体的低共熔溶剂对 4 个不同品种柑橘的柑橘皮进行提取, 以橙皮苷得率为指标进行筛选。结果表明, 氯化胆碱-乙酰胺(摩尔比为 1:2)的提取效率最高, 橙皮苷得率为 112.14 mg/g。与传统溶剂提取相

基金项目: 成都农业科技中心地方财政专项资金项目(编号: NASC2021KR01)

作者简介: 刘丹, 女, 成都大学在读硕士研究生。

通信作者: 甘人友(1985—), 男, 中国农业科学院都市农业研究所副研究员, 博士。E-mail: ganrenyou@163.com

收稿日期: 2022-01-28 改回日期: 2022-07-13

比,低共熔溶剂具有降解性好、易制备、低成本和低毒性等优点。

1.2 亚临界流体萃取技术

亚临界萃取是根据有机物相似相溶的原理,利用亚临界流体作为萃取溶剂,在密闭、无氧、低压的压力容器内萃取物料脂溶性成分,再通过减压蒸发将萃取剂与目的产物分离的萃取技术^[5]。Kim 等^[6]用亚临界水半连续模式提取蜜柑皮中的生物活性黄酮类化合物。结果表明,橙皮苷和芸香柚皮苷的得率随温度(145~165 °C)升高而增加。此外,Lachos-Perez 等^[7]以脱脂橘皮为原料,研究了温度和溶剂流速对亚临界水提取黄酮得率的影响。结果表明,在 150 °C、10 mL/min 条件下获得最大产率,即橙皮苷(188.74±0.51) mg/g,柚皮芸香苷(21.98±1.39) mg/g。与索氏提取法、常规溶剂提取法和超声波提取法 3 种传统提取方法相比,亚临界水提取是一种高效提取活性化合物的方法。

1.3 磁性分子印迹聚合物选择性提取法

分子印迹技术是一种由模板、功能单体和交联剂制备的高分子功能材料以展示其选择性分子识别行为的技术,具有专一识别性、预定性和实用性等特点^[8]。磁性分子印迹聚合物是利用分子印迹技术在磁性微粒表面合成具有超顺磁性、高选择性、高吸附性和特异性识别的聚合物,是一种能在外加磁场的作用下实现快速分离的新型高分子材料^[9]。贺美艳^[10]利用分子印迹技术的原理,以单一类黄酮橙皮素、桔皮素为模板分子,分别使用 2-乙烯基吡啶、丙烯酸胺为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,乙腈为致孔剂,采用沉淀聚合法制备得到具有类特异性吸附、高选择性的分子印迹聚合物微球,用聚合物微球做填充材料制备分子印迹固相萃取柱,利用其类特异性吸附的特点实现了柑橘复杂基质中类黄酮的高效分

离与纯化。而 Wang 等^[11]采用以功能化 Fe₃O₄ 颗粒为磁芯,橙皮素为模板,N-异丙基丙烯酸酰胺为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,2,2-偶氮二异丁腈为引发剂,乙腈—甲醇(V_{乙腈}:V_{甲醇}=3:1)为致孔剂的表面分子印迹法成功制备了新型橙皮素磁性分子印迹聚合物作为吸附剂,用于提取和富集干柑橘皮中的橙皮素。结果表明,干橘皮中橙皮素的回收率为 90.5%~96.9%。线性范围为 0.15~110.72 g/mL,相关系数大于 0.999 1,该磁性分子印迹聚合物是一种具有选择性吸附的材料。磁性分子印迹聚合物选择性提取法与传统提取方法相比具有更好的选择性。

1.4 其他提取技术

除了上述提取新技术之外,还有闪式提取、3D 打印技术等应用于柑橘黄酮提取。Liu 等^[12]将橙皮粉和乙醇置于 120 V 闪式提取器中进行提取,黄酮提取率为 437 mg/g。与热提取相比,闪式提取法耗时更少,且能减少提取过程中热敏性化合物的损失。Subhi 等^[13]建立了涂布 C₁₈ 树脂的 3D 打印光盘在线流动系统耦合 HPLC-DAD 用于提取、分离和测定柑橘外皮中的黄酮类化合物的方法,能有效测定柑橘皮中的 6 种黄酮类化合物。该方法为黄酮类化合物的提取测定提供了一种全自动的、能有效减少提取时间和溶剂的消耗,且灵敏性高的方法。

2 柑橘黄酮类化合物的生物活性

柑橘黄酮具有多种生物活性,主要包括抗氧化、抗炎、抗菌、抗肥胖、抗糖尿病、抗癌、肠道保护、心血管保护、肝脏保护和神经保护等(图 1)。

2.1 抗氧化

一些体外研究^[14-15]采用 DPPH、ABTS、FARAP 等抗氧化评价方法证实了柑橘黄酮的抗氧化活性。对抗氧

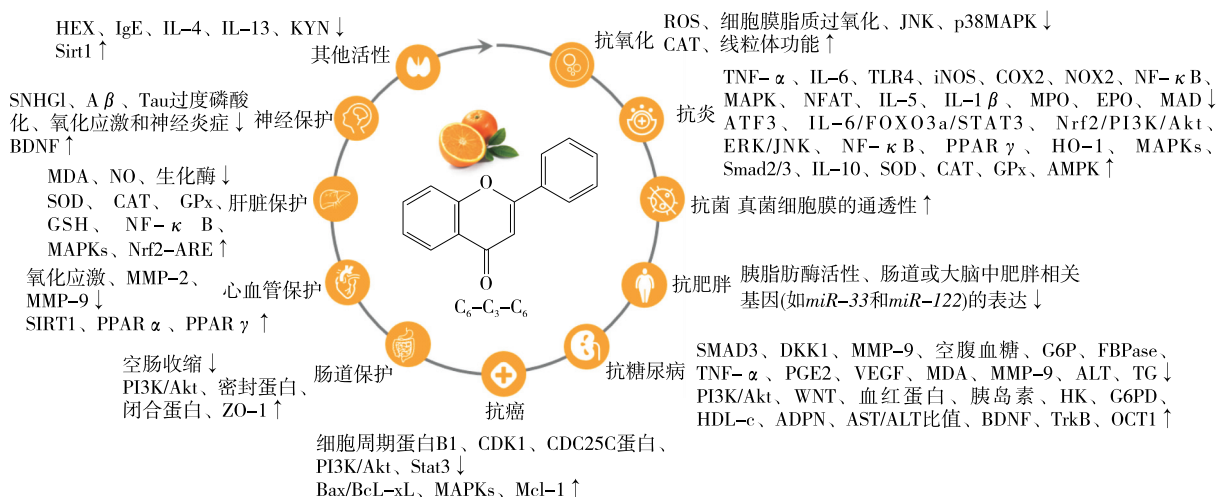


图 1 柑橘黄酮生物活性及其作用机制

Figure 1 Bioactivities of flavonoids from citrus and related mechanism of action

化活性起作用的主要黄酮类化合物为甜橙黄酮、4',5,6,7-四甲氧基黄烷酮、川陈皮素、3,3',4',5,6,7-六甲氧基黄酮和柚皮芸香苷。且柑橘果皮中黄酮类化合物的种类和总含量均高于柑橘果肉。因此,柑橘果皮提取物的抗氧化能力更高^[15]。

在 Fe^{3+} 诱导氧化应激的 A549 细胞模型中,富含类黄酮的柑橘汁提取物能够降低活性氧(ROS)的产生、减少膜脂质过氧化、改善线粒体功能和防止 DNA 氧化损伤,其作用机制可能与铁的整合性质及黄酮提取物增加抗氧化过氧化氢酶(CAT)活性有关^[16]。香叶木苷是一种天然黄酮类化合物,存在于各种柑橘类果实的果皮中。柑橘黄酮——香叶木苷通过减弱 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,并降低细胞色素 c、Bax 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的表达式,增加 Bcl-2 的表达式,阻止高糖诱导的糖尿病视网膜病变模型 ARPE-19 人视网膜色素上皮细胞的氧化损伤^[17]。简而言之,柑橘黄酮通过抑制 ROS 的产生、减少细胞膜脂质过氧化、增加 CAT 活性、改善线粒体功能以及抑制 JNK 和 p38MAPK 信号通路从而发挥其抗氧化活性,但其在体内的作用机制还需进一步的研究探讨。

2.2 抗炎

柑橘类黄酮化合物的抗炎作用在脂多糖(LPS)诱导的炎症小鼠巨噬细胞(RAW264.7)模型、小鼠模型和大鼠模型中得到证实。柚皮素可以抑制 LPS 诱导的炎症小鼠巨噬细胞中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、toll 样受体 4(TLR4)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶 2(COX2)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2(NOX2)的表达式,也可以抑制活化 B 细胞核因子 κ -轻链增强子(NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的激活并直接增加活化转录因子 3(ATF3)的表达式,从而改善炎症反应^[18]。柑橘皮类黄酮——川陈皮素通过激活巨噬细胞中 IL-6/信号转导及转录活化因子 3(STAT3)/叉头框蛋白 O3a(FOXO3a)信号通路增强自噬来抑制 LPS 诱导的炎症反应^[19]。He 等^[20]研究发现柚皮素、川陈皮素和橙皮素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞具有抗炎作用,其机制可能与 TNF- α 诱导的 NF- κ B 通路抑制 COX-2 和 iNOS 表达有关。此外,Yang 等^[21]研究了柑橘类黄酮在佛波酯(PMA)/离子霉素诱导的 EL-4 小鼠 T 淋巴瘤细胞中降低活性氧(ROS)和白介素-5(IL-5)的作用机制,发现柑橘类黄酮通过不同途径抑制 PMA/离子霉素诱导的 EL-4 细胞中的 IL-5 和 ROS 的产生。即橙皮苷通过转录因子红系衍生的核因子 2 相关因子(Nrf2)与磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)或细胞外信号调节激酶(ERK)/Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路结合诱导血红素氧合酶-1(HO-1)的表达式,从而下调活化 T 细胞核因子(NFAT)活性和 IL-5 的分泌。同样,梔子宁通过降低 EL-

4 细胞中 NFAT 活性和上调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)诱导 HO-1 表达式,进而抑制 IL-5 的产生,表明诱导 HO-1 表达式可能抑制哮喘炎症^[21]。

在卵清蛋白诱导的过敏性哮喘小鼠模型中,柑橘总黄酮通过调节 MAPK 和 Smad2/3 信号通路能有效地改善过敏性哮喘炎症并抑制气道重塑^[22]。补充柑橘黄酮(圣草次苷或圣草酚)能减少 LPS 诱导的牙周炎症小鼠模型的牙龈上皮平坦度、慢性和急性炎症细胞浸润及牙龈乳头结缔组织的损失,显著地抑制牙周炎症。且圣草次苷和圣草酚均可抑制牙龈的白介素-1 β (IL-1 β)和 TNF- α 的表达式,并增加白介素-10(IL-10)的表达式,降低髓过氧化物酶(MPO)和嗜酸粒细胞过氧化物酶(EPO)活性,增加超氧化物歧化酶(SOD)、CAT 和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性,降低丙二醛(MDA)含量^[23]。在内毒素血症小鼠模型中,柚皮素通过激活 5'-单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)来增加 ATF3 的表达式,从而改善炎症反应,提高生存率^[18]。即柚皮素通过 AMPK-ATF3 依赖的 LPS/TLR4 信号通路负调控来保护小鼠免受内毒素血症。

2.3 抗菌

柑橘黄酮对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌等具有抑制作用。柑橘中芦丁对铜绿假单胞菌的最低抑菌质量浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$,同时用 200 $\mu\text{g/mL}$ 芦丁和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 抗生素庆大霉素处理时,对铜绿假单胞菌的生物膜的形成具有协同抑制作用^[24]。低浓度的柚皮素通过改变苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸残基的微环境引起膜脂肪酸组成和膜蛋白构象的扰动,而高浓度柚皮素通过增加细胞膜的通透性引起金黄色葡萄球菌细胞形态发生改变^[25]。DNA 分子对接研究^[25]表明,柚皮素通过沟槽结合再与基因组 DNA 的 A-T 碱基对区域结合,从而诱导了该生物大分子二级结构和形态的变化,即柚皮素的抗菌作用可能与金黄色葡萄球菌细胞质膜的破坏和 DNA 靶向作用有关。此外,通过喂食柑橘类黄酮能显著降低虹鳟鱼感染鲁氏耶尔森菌 O1 生物型 2 的死亡风险^[26]。

2.4 抗肥胖

胰脂肪酶是在胃肠道水解甘油三酯的一种关键酶。因此,抑制其活性可以减少脂质吸收从而有效改善肥胖症状^[27]。柑橘皮中橙皮苷是主要的胰脂肪酶活性抑制剂^[28]⁴⁰。橙皮苷可以通过氢键和范德华力与胰脂肪酶相互作用,并且不改变胰脂肪酶的二级结构而降低胰脂肪酶的活性,改善肥胖^[28]³⁶⁻⁴⁶。而圣草次苷、圣草酚和甜橙黄酮 3 种柑橘黄酮主要通过疏水作用力分别与胰脂肪酶周围的氨基酸残基相互作用,使胰脂肪酶周围的芳香族氨基酸残基所处微环境发生改变同时导致酶分子的二级结构发生变化,从而抑制酶活性改善肥胖^[29]。作用机制的差异可能与黄酮化合物的结构有关,但还需进一步的研究确定黄酮化合物的结构与活性之间的关系。

此外,在细胞模型、肥胖斑马鱼和肥胖小鼠模型中,柑橘类黄酮化合物表现出显著的抗肥胖作用。在油酸诱导的脂质积累的人肝癌细胞 HepG2 中,柑橘皮黄酮提取物和柑橘纯黄酮混合物可能是通过抑制 miR-33 和 miR-122 的表达来增加肉碱棕榈酰转移酶 1 α (CPT1 α)基因和减少脂肪酸合酶(FAS)基因的 mRNA 的表达,从而改善脂质代谢^[30]。在饮食诱导的肥胖斑马鱼模型中,富含黄酮的橘汁通过调节肠道和大脑中一些肥胖相关的基因表达来改善肥胖,如瘦蛋白 A、胃饥饿素、促食素、阿黑皮素原(POMC)和神经肽 Y(NPY)^[31]。在高脂肪饮食喂养的肥胖小鼠模型中,柑橘黄酮川陈皮素能有效地预防肥胖、脂肪肝变性、血脂异常和胰岛素抵抗^[32]。但其在体内的作用机制不依赖于肝脏或脂肪细胞的腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)^[32]。在高脂肪胆固醇饮食诱导肥胖的低密度脂蛋白受体基因敲除(*Ldlr*^{-/-})小鼠模型中,补充柑橘类黄酮可以通过增强能量消耗和增加肝脏脂肪酸氧化,逆转现有的肥胖和脂肪细胞的大小和数量^[33]。在高脂饮食喂养的去卵巢肥胖小鼠模型中,补充柑橘类黄酮柚皮素可以抑制体重增加,降低高血糖,减少腹内脂肪增加,增加小鼠的自主活动,减少小鼠骨骼肌中甘油二酯的积累^[34]。

2.5 抗糖尿病

在体外和动物研究中,柑橘黄酮表现出显著的抗糖尿病作用。在人肝癌细胞 HepG2 细胞模型中,柑橘黄酮香风草甙通过激活胰岛素抵抗性 HepG2 细胞中的 PI3K/Akt 信号通路促进葡萄糖摄取^[35]。柑橘果皮中的多甲氧基黄酮则通过增加 WNT 信号通路的关键因子 *TCF7L2* 的表达,抑制 *SMAD3* 和 *DKK1* 的表达来调节血糖^{[36]20-26}。

在链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠模型中,柑橘类黄酮香叶木苷可能作用于肾上腺增强内啡肽的分泌,从而刺激阿片受体,减弱肝糖异生,增加比目鱼肌葡萄糖摄取,从而降低高血糖^[37]。橙皮素通过改善 STZ 诱导的糖尿病大鼠的抗氧化能力来降低高血糖和高血脂^[38]。柑橘类黄酮橙皮苷能够降低空腹血糖水平,增加血红蛋白和胰岛素水平,降低糖基化血红蛋白,增加大鼠肝组织中碳水化合物关键代谢酶己糖激酶(HK)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)的活性,降低葡萄糖-6-磷酸酶(G6P)和果糖-1,6-二磷酸酯酶(FBPase)的活性,来防止糖尿病大鼠的体重减轻,并提高肝组织中糖原含量^[39]。且橙皮苷能降低 TNF- α 、前列腺素 E2(PGE2)、血管内皮生长因子(VEGF)和 MDA 的水平,减弱空腹血糖、炎症、晶状体液体内流、晶状体渗透不平衡及纤维过度水合作用来减轻糖尿病及糖尿病性白内障^[40]。橙皮苷还可通过增加脑源性神经营养因子(BDNF)及酪氨酸蛋白激酶受体 B(TrkB)的表达来抑制视网膜神经节细胞的凋亡,即橙皮苷的抗

凋亡和降糖作用与 BDNF/TrkB 信号通路有关^[41]。柚皮素通过调节糖尿病大鼠的氧化—硝化应激、炎症因子(TNF- α 、TGF-1 β)的释放和抑制基质金属蛋白酶-9(MMP-9)活性来改善糖尿病神经性疼痛^[42]。此外,在自发型糖尿病 KK-Ay 小鼠模型中,柑橘多甲氧基黄酮组分能显著降低糖尿病小鼠的血清谷丙转氨酶(ALT)的水平和甘油三酯(TG)的含量,提高高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)和脂联素(ADPN)的浓度以及谷草转氨酶/谷丙转氨酶(AST/ALT)的比值,有效改善糖尿病小鼠糖脂代谢^{[36]27-38}。在高糖诱导的糖尿病大鼠中,柚皮素能够缓解高血糖诱导的肝脏中有机阳离子转运蛋白 1(OCT1)表达的减少,并导致二甲双胍积累和乳酸生成增加^[43]。因此,糖尿病患者在使用二甲双胍治疗时应避免摄入含橙皮素的果汁。

柑橘中黄酮类化合物具有显著抗糖尿病活性,其作用机制与激活 PI3K/Akt、WNT 等信号通路,抑制 MMP-9 活性,降低空腹血糖、ALT、TG,提高 HDL-c、ADPN、AST/ALT 的比值,改善 BDNF、TrkB 的表达等有关。不同柑橘黄酮类化合物的作用机制不同,但仍需进一步研究活性与化合物结构的关系。

2.6 抗癌

柑橘黄酮类化合物具有抗癌抗肿瘤活性。在细胞试验中,柑橘黄酮类化合物通过下调细胞周期蛋白 B1、CDK1 和 CDC25C 蛋白的表达水平,在 G2/M 期诱导人肺癌细胞 A549 细胞阻滞,从而抑制细胞增殖;并通过上调 Bax/Bcl-xL 比例诱导半胱天冬酶依赖性细胞凋亡^[44]。柑橘黄酮通过激活 MAPKs 和抑制 PI3K/Akt 通路诱导细胞周期阻滞和凋亡,并抑制 Hep3B 肝癌细胞的迁移^[45]。源于葡萄柚的纯化黄酮类化合物能通过调控白血病细胞凋亡相关因子 Mcl-1 的表达,抑制白血病细胞增殖,诱导白血病细胞凋亡^[46]。橙皮素通过提高线粒体途径凋亡相关蛋白的水平来诱导肺腺癌细胞 PC9 细胞凋亡并呈时间—剂量依赖性,且可能与内质网应激有关^[47]。桔皮素可以抑制信号转导及转录活化因子 3(Stat3)信号通路诱导肿瘤干细胞死亡^[48]。在动物试验中,柑橘类黄酮柚皮素可抑制去卵巢肥胖小鼠的肿瘤生长^[49]。在氧化偶氮甲烷/葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎致结肠癌小鼠模型中,摄入 5-去甲基化川陈皮素能显著抑制小鼠结肠炎驱动的结肠癌变,该作用与其在结肠中的代谢物有关^[50]。即柑橘黄酮类化合物可能通过激活 MAPKs 和抑制 PI3K/Akt、Stat3 信号通路,增加 Mcl-1 的表达等来诱导癌细胞的凋亡。

2.7 肠道保护

一些研究报道了柑橘黄酮对肠道的保护作用。在非甾体抗炎药(双氯芬酸)诱导的体内外肠道损伤模型中,纯柑橘总黄酮通过 PI3K/Akt 信号通路促进细胞自噬来

保护肠道屏障的完整性^[51]。在三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的炎症性肠病大鼠中,口服 125~500 mg/kg 干柑橘能显著地缓解大鼠体重减轻和腹泻,减少结肠炎炎症细胞浸润,并抑制促炎因子的产生^[20]。且柚皮素和川陈皮素对离体空肠收缩有抑制作用。柚皮素的作用机制部分与 COX、NOS、肌醇三磷酸(IP₃)有关,并最终降低空肠运动^[20]。此外,柑橘类黄酮柚皮素、川陈皮素和橙皮素能缓解 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠模型体重减轻和结肠缩短,降低疾病活动指数评分,显著上调密封蛋白-2、闭合蛋白和紧密连接蛋白-1(ZO-1)的表达^[52]。同时,黄酮类化合物可增强经上皮电阻,降低 LPS 损伤的单层上皮系统的通透性,上调闭合蛋白和 ZO-1 的表达。此外,在体外肠道—血管屏障模型中,柚皮苷通过调节内皮细胞的连接、减少细胞凋亡水平、促进细胞迁移和修复内皮细胞屏障,来保护肠道微血管内皮细胞单层屏障的完整性,防止 TNF- α 诱导的破坏,有效地改善肠—血管屏障^[53]。柑橘黄酮处理可以显著地改变肠道中多种与人体健康密切相关菌群的丰度,使其向有益人体健康方向调节。并且高剂量的橙皮苷和柚皮苷可以显著地增加能量代谢和短链脂肪酸合成相关基因的相对丰度,橙皮苷的作用效果强于柚皮苷^[54]。因此,柚皮素、川陈皮素和橙皮素等柑橘类黄酮可能通过调节 PI3K/Akt 信号通路、保护肠道黏膜屏障完整性、调节肠道菌群及短链脂肪酸的合成等途径来改善炎症性肠病。

2.8 心血管保护

黄酮类化合物可以用于保护心脑血管。在 RAW 264.7 细胞模型中,柑橘花中的高圣草酚和橙皮苷-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷通过调节 PPAR γ 、磷脂 ATP 结合盒转运体 A1(ABCA1)、磷脂 ATP 结合盒转运体 G1(ABCG1)、清道夫受体 B 类 1 型(SRB1)、清道夫受体 A 类 1 型(SRA1)和分化簇 36(CD36)的基因和蛋白表达水平来抑制 LPS 诱导的炎症反应和氧化低密度脂蛋白诱导的泡沫细胞形成,高圣草酚预防动脉粥样硬化的效果比橙皮苷-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷更强^[55]。柑橘类黄酮柚皮素可以显著地激活去乙酰化酶(SIRT1)并具有抗衰老作用,能保护心肌免受衰老依赖性功能障碍^[56]。

在动物模型中,川陈皮素可通过抑制氧化应激和基质金属蛋白酶(MMP-2 和 MMP-9)的水平来改善糖尿病大鼠心血管功能紊乱。在代谢综合征大鼠模型中,橙皮苷通过改变代谢综合征大鼠心脏和肾脏组织中不同的心血管风险生物标记物蛋白组学特征发挥其保护作用^[57]。橘皮中的总黄酮可通过抗氧化和抗炎作用改善高脂喂养诱导的高血脂仓鼠的肝功能,发挥降血脂作用,其作用机制可能是通过增加 PPAR α 和 PPAR γ 的表达^[58]。柑橘黄酮类化合物可能是通过激活 SIRT1、PPAR α 和 PPAR γ ,抑制氧化应激和 MMP-2、MMP-9 活性,从而发

挥心血管保护作用。

2.9 肝脏保护

柑橘黄酮类化合物具有肝脏保护作用。在胆管结扎诱导小鼠肝纤维化模型中,富含多甲氧基黄酮类化合物的柑橘皮提取物具有抗氧化、抗炎、抗凋亡活性,能有效调节胆管结扎诱导的肝脏损伤。在镉诱导的肝脏损伤大鼠模型中,柑橘类黄酮香叶木苷能有效地降低 MDA 和一氧化氮(NO)含量,改善 SOD、CAT、GPx 活性,增加谷胱甘肽(GSH)含量^[59]。因此,在可能接触镉的情况下,可将香叶木苷作为辅助剂与食物一起服用,以预防肝脏疾病的发生。此外,在酒精诱导的肝脏损伤小鼠模型中,来源于柑橘提取物的多甲氧基黄酮类化合物对酒精诱导的肝损伤具有保护作用,其机制与调节细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)介导的肝脏氧化应激有关^[60]。而在非酒精性脂肪肝病大鼠模型中,柑橘总黄酮通过调节 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路发挥保肝抗炎作用^[61]。在游离脂肪酸培养的人 LX-2 细胞和高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝病的雄性 C57BL/6 小鼠模型中,柑橘总黄酮上调 Nrf2 和下游靶基因的蛋白质表达,激活 Nrf2-ARE 信号通路,从而起到保肝作用^[62]。在高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝病 C57BL/6 J 小鼠模型中,纯柑橘总黄酮通过调节小鼠肠道菌群和胆汁酸代谢改善非酒精性脂肪性肝炎。

2.10 神经保护作用

柑橘黄酮具有保护神经的作用。柑橘黄酮可能通过下调 SNHG1 表达,促进 1-甲基-4-苯基-吡啶离子诱导的帕金森病细胞模型 SH-SY5Y 细胞增殖,抑制其凋亡^[63]。此外,柑橘类黄酮 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮能够改善皮质脂酮诱导的类似抑郁的行为,恢复短暂性全脑缺血小鼠模型的海马体 BDNF 的表达、神经形成和神经重塑^[64]。柚皮素通过减少小鼠脑中淀粉样蛋白(A β)的产生、Tau 过度磷酸化、氧化应激和神经炎症,改善衰老小鼠模型的认知缺陷^[65]。柑橘黄酮具有神经保护作用,作用机制可能是下调 SNHG1 的表达、降低氧化应激和改善神经炎症以及 BDNF 的表达。柑橘黄酮是治疗帕金森病、阿尔茨海默症等神经性疾病的潜在成分,但仍需进一步的研究验证。

2.11 其他活性

柑橘黄酮类化合物除抗炎等作用外,还有一些其他生物活性,如抗过敏、抗抑郁和抗衰老等。在 RBL-2H3 细胞系中,柑橘黄酮减少了抗原诱导的 β -己糖苷酶(HEX)的释放,且在卵蛋白诱导的过敏性哮喘小鼠模型中,经不同浓度的黄酮处理后,免疫球蛋白 E(IgE)、白介素-4(IL-4)、白介素-13(IL-13)显著减少,即黄酮在体外和体内均具有抗过敏活性。在亚慢性轻度社会失败应激模型小鼠中,膳食摄入柑橘类黄酮橙皮苷能通过抑制犬尿氨酸(KYN)信号通路的增强来提高应激恢复能力^[66]。

柑橘黄酮能够上调促甲状腺因子 Sirt1 并不同程度地影响甲状腺 Nrf2 的表达,有助于恢复老年大鼠甲状腺功能受损^[67]。

3 总结与展望

柑橘中含有多种黄酮类化合物,而用于从柑橘中提取黄酮类化合物的新技术,如低共熔溶剂提取、亚临界提取及磁性分子印迹选择性提取等高效、环境友好型提取技术,为柑橘黄酮类化合物的开发利用提供了便利。大量体外和体内试验研究表明柑橘黄酮具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗肥胖、抗糖尿病、抗癌、肠道保护、心血管保护和神经保护作用等生物活性,其作用机制涉及多种信号通路,但缺乏对柑橘类黄酮化合物的结构与生物活性之间的研究。因此,可利用网络药理学、分子对接和分子动力学等方法,研究柑橘黄酮类化合物相关活性的作用机制及作用靶点。同时对柑橘类黄酮在人体内的生物利用度需要进一步探讨。

参考文献

- [1] 祁建宏,董芳旭. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 北京联合大学学报, 2020, 34(3): 89-92.
- [2] 成洪业,漆志文. 低共熔溶剂用于萃取分离的研究进展[J]. 化工进展, 2020, 39(12): 4 896-4 907.
- [3] XU M, RAN L, CHEN N, et al. Polarity-dependent extraction of flavonoids from Citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent[J]. Food Chemistry, 2019, 297: 124970.
- [4] JOKIC S, ŠAFRANKO S, JAKOVLJEVIC M, et al. Sustainable green procedure for extraction of hesperidin from selected Croatian mandarin peels[J]. Processes, 2019, 7(7): 469.
- [5] 谢豪,黄龙,王萍,等. 亚临界萃取结合分子蒸馏提取甜橙油的研究[J]. 食品工业, 2019, 40(3): 78-82.
- [6] KIM D S, LIM S B. Semi-continuous subcritical water extraction of flavonoids from Citrus unshiu peel: Their antioxidant and enzyme inhibitory activities[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(5): 360.
- [7] LACHOS-PEREZ D, BASEGGIO A M, MAYANGA-TORRES P C, et al. Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2018, 138: 7-16.
- [8] 杨霄鸿,贾明宏,杨天子,等. 分子印迹技术在农药残留检测中的应用进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 462-467.
- [9] 张曦雯,李兆周,李道敏,等. 磁性分子印迹聚合物的制备与应用研究[J]. 化工进展, 2016, 35(12): 3 964-3 969.
- [10] 贺美艳. 类黄酮分子印迹聚合物的合成及其在柑橘中识别性能的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017: 17-54.
- [11] WANG D D, GAO D, XU W J, et al. Magnetic molecularly imprinted polymer for the selective extraction of hesperetin from the dried pericarp of Citrus reticulata Blanco [J]. Talanta, 2018, 184: 307-315.
- [12] LIU F, HAN S, NI Y. Isolation and purification of four flavanones from peel of Citrus changshanensis[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 41(6): e13278.
- [13] SUBHI SAMMANI M, CLAVIJO S, FIGUEROLA A, et al. 3D printed structure coated with C₁₈ particles in an online flow system coupled to HPLC-DAD for the determination of flavonoids in Citrus external peel [J]. Microchemical Journal, 2021, 168: 106421.
- [14] GUO C, SHAN Y, YANG Z, et al. Chemical composition, antioxidant, antibacterial, and tyrosinase inhibition activity of extracts from Newhall navel orange (Citrus sinensis Osbeck cv. Newhall) peel[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(6): 2 664-2 674.
- [15] 郭春霞. 4类重庆柑橘乙醇提取物类黄酮分析及其体内抗氧化评价[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(22): 149-153.
- [16] FERLAZZO N, VISALLI G, CIRMI S, et al. Natural iron chelators: Protective role in A549 cells of flavonoids-rich extracts of Citrus juices in Fe³⁺-induced oxidative stress[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016, 43: 248-256.
- [17] LIU W Y, LIOU S S, HONG T Y, et al. The benefits of the Citrus flavonoid diosmin on human retinal pigment epithelial cells under high-glucose conditions[J]. Molecules, 2017, 22(12): 2 251.
- [18] LIU X, WANG N, FAN S, et al. The Citrus flavonoid naringenin confers protection in a murine endotoxaemia model through AMPK-ATF3-dependent negative regulation of the TLR4 signalling pathway[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 39735.
- [19] RONG X, XU J, JIANG Y, et al. Citrus peel flavonoid nobiletin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation by activating IL-6/STAT3/FOXO3a-mediated autophagy[J]. Food & Function, 2021, 12(3): 1 305-1 317.
- [20] HE W, LI Y, LIU M, et al. Citrus aurantium L. and its flavonoids printing technique on the determination of pesticides residues[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(2): 462-467.

- regulate tnbs-induced inflammatory bowel disease through anti-inflammation and suppressing isolated jejunum contraction[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 3 057.
- [21] YANG W L, CHEN S Y, HO C Y, et al. Citrus flavonoids suppress IL-5 and ROS through distinct pathways in PMA/ionomycin-induced EL-4 cells[J]. Food & Function, 2020, 11(1): 824-833.
- [22] WANG J, LI T, CAI H, et al. Protective effects of total flavonoids from Qu Zhi Qiao (fruit of *Citrus paradisi* cv. Changshanhuoyou) on OVA-induced allergic airway inflammation and remodeling through MAPKs and Smad2/3 signaling pathway[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 138: 111421.
- [23] CARVALHO J S, RAMADAN D, DE PAIVA GONCALVES V, et al. Impact of Citrus flavonoid supplementation on inflammation in lipopolysaccharide-induced periodontal disease in mice[J]. Food & Function, 2021, 12(11): 5 007-5 017.
- [24] SATHIYA DEEPIKA M, THANGAM R, SAKTHIDHASAN P, et al. Combined effect of a natural flavonoid rutin from *Citrus sinensis* and conventional antibiotic gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation[J]. Food Control, 2018, 90: 282-294.
- [25] WANG L H, WANG M S, ZENG X A, et al. Membrane and genomic DNA dual-targeting of Citrus flavonoid naringenin against *Staphylococcus aureus* [J]. Integrative Biology, 2017, 9 (10): 820-829.
- [26] ROMER VILLUMSEN K, OHTANI M, FORBERG T, et al. Citrus flavonoids, β -glucan and organic acid feed additives decrease relative risk during *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Peer J, 2020, 8: e8706.
- [27] BUSTANJI Y, AL-MASRI I M, MOHAMMAD M, et al. Pancreatic lipase inhibition activity of trilactone terpenes of *Ginkgo biloba* [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2011, 26 (4): 453-459.
- [28] 黄睿. 柑橘类黄酮分光测定法比较及其抗氧化与胰脂肪酶抑制功效评价[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- HUANG R. Comparison of spectrophotometry of Citrus flavonoids and evaluation of their antioxidant and pancreatic lipase inhibitory activities[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [29] 孔宇驰. 三种柑橘黄酮与消化相关酶的相互作用机理研究[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2020: 47-63.
- KONG Y C. Study on the interaction mechanism between three Citrus flavonoids and digestive enzymes[D]. Shenyang: Liaoning University, 2020: 47-63.
- [30] SU D, LIU H, QI X, et al. Citrus peel flavonoids improve lipid metabolism by inhibiting miR-33 and miR-122 expression in HepG2 cells [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2019, 83(9): 1 747-1 755.
- [31] MONTALBANO G, MANIA M, GUERRERA M C, et al. Effects of a flavonoid-rich extract from *Citrus sinensis* juice on a diet-induced obese zebrafish[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(20): 5 116.
- [32] MORROW N M, BURKE A C, SAMSOONDAR J P, et al. The Citrus flavonoid nobiletin confers protection from metabolic dysregulation in high-fat-fed mice independent of AMPK[J]. Journal of Lipid Research, 2020, 61(3): 387-402.
- [33] BURKE A C, SUTHERLAND B G, TELFORD D E, et al. Intervention with Citrus flavonoids reverses obesity and improves metabolic syndrome and atherosclerosis in obese *Ldlr^{-/-}* mice[J]. Journal of Lipid Research, 2018, 59(9): 1 714-1 728.
- [34] KE J Y, COLE R M, HAMAD E M, et al. Citrus flavonoid, naringenin, increases locomotor activity and reduces diacylglycerol accumulation in skeletal muscle of obese ovariectomized mice[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2016, 60(2): 313-324.
- [35] ALI M Y, ZAIB S, RAHMAN M M, et al. Didymin, a dietary Citrus flavonoid exhibits anti-diabetic complications and promotes glucose uptake through the activation of PI3K/Akt signaling pathway in insulin-resistant HepG2 cells[J]. Chemico-Biological Interactions, 2019, 305: 180-194.
- [36] 季诗誉. 柑橘果实黄酮类物质的降糖活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- JI S Y. Hypoglycemic activity of flavonoids from Citrus fruits[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [37] HSU C C, LIN M H, CHENG J T, et al. Antihyperglycaemic action of diosmin, a Citrus flavonoid, is induced through endogenous beta-endorphin in type I-like diabetic rats[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2017, 44(5): 549-555.
- [38] JAYARAMAN R, SUBRAMANI S, SHEIK ABDULLAH S H, et al. Antihyperglycemic effect of hesperetin, a Citrus flavonoid, attenuates hyperglycemia and exploring the potential role in antioxidant and antihyperlipidemic in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 97: 98-106.
- [39] SUNDARAM R, NANDHAKUMAR E, HASEENA BANU H. Hesperidin, a Citrus flavonoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Toxicology Mechanisms and Methods, 2019, 29(9): 644-653.
- [40] UMRAN N S S, MOHAMED S, LAU S F, et al. Citrus hystrix leaf extract attenuated diabetic-cataract in STZ-rats[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(8): e13258.
- [41] 肖博. 橙皮苷对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的影响及其机制[D]. 唐山: 华北理工大学, 2020: 3-25.
- XIAO B. Effects of hesperidin on retinal ganglion cells in diabetic rats and its mechanism[D]. Tangshan: North China University of Science and Technology, 2020: 3-25.
- [42] SINGH P, BANSAL S, KUHAD A, et al. Naringenin ameliorates diabetic neuropathic pain by modulation of oxidative-nitrosative stress, cytokines and MMP-9 levels[J]. Food & Function, 2020, 11 (5): 4 548-4 560.
- [43] MATO MOFO E P, ESSOP M F, OWIRA P M O. Citrus fruit-derived flavonoid naringenin and the expression of hepatic organic cation transporter 1 protein in diabetic rats treated with metformin[J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2020, 127(3): 211-220.
- [44] NAGAPPAN A, LEE H J, SARALAMMA V V, et al. Flavonoids

- isolated from *Citrus platymamma* induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung cancer cells[J]. *Oncology Letters*, 2016, 12(2): 1 394-1 402.
- [45] HONG G E, LEE H J, KIM J A, et al. Korean Byungkyul-Citrus platymamma Hort.et Tanaka flavonoids induces cell cycle arrest and apoptosis, regulating MMP protein expression in Hep3B hepatocellular carcinoma cells[J]. *International Journal of Oncology*, 2017, 50(2): 575-586.
- [46] DAI T Y, WANG B, LIN S Y, et al. Pure total flavonoids from *Citrus paradisi* Macfad induce leukemia cell apoptosis in vitro[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2017, 23(5): 370-375.
- [47] 汪超. 橙皮素通过内质网应激通路诱导人肺癌细胞 PC9 发生凋亡[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019: 7-37.
- WANG C. Hesperidin induces apoptosis of human lung carcinoma cell PC9 through endoplasmic reticulum (ER) stress[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2019: 7-37.
- [48] KO Y C, CHOI H S, LIU R, et al. Inhibitory effects of tangeretin, a *Citrus* Peel-derived flavonoid, on breast cancer stem cell formation through suppression of Stat3 signaling[J]. *Molecules*, 2020, 25(11): e2599.
- [49] KE J Y, BANH T, HSIAO Y H, et al. Citrus flavonoid naringenin reduces mammary tumor cell viability, adipose mass, and adipose inflammation in obese ovariectomized mice[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(9): 1600934.
- [50] SONG M, LAN Y, WU X, et al. The chemopreventive effect of 5-demethylnobiletin, a unique *Citrus* flavonoid, on colitis-driven colorectal carcinogenesis in mice is associated with its colonic metabolites[J]. *Food & Function*, 2020, 11(6): 4 940-4 952.
- [51] CHEN S, JIANG J, CHAO G, et al. Pure total flavonoids from *Citrus* protect against nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small intestine injury by promoting autophagy in vivo and in vitro[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 622744.
- [52] HE W, LIU M, LI Y, et al. Flavonoids from *Citrus aurantium* ameliorate TNBS-induced ulcerative colitis through protecting colonic mucus layer integrity[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 857: 172456.
- [53] LIU P, BIAN Y, FAN Y, et al. Protective effect of naringin on in vitro gut-vascular barrier disruption of intestinal microvascular endothelial cells induced by TNF- α [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(1): 168-175.
- [54] KARN A. 基于体外发酵的柑橘黄酮与人体肠道菌群相互作用研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020: 23-35.
- KARN A. In vitro study of interactions between Citrus flavonoids and gut microbiota[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020: 23-35.
- [55] SHEN C Y, LIN J J, JIANG J G, et al. Potential roles of dietary flavonoids from *Citrus aurantium* L. var. amara Engl. in atherosclerosis development[J]. *Food & Function*, 2020, 11(1): 561-571.
- [56] TESTAI L, PIRAGINE E, PIANO I, et al. The *Citrus* flavonoid naringenin protects the myocardium from ageing-dependent dysfunction: Potential role of SIRT1[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 4650207.
- [57] PLA-PAGA L, GUIRRO M, GUAL-GRAU A, et al. Proteomic analysis of heart and kidney tissues in healthy and metabolic syndrome rats after hesperidin supplementation [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64(10): e1901063.
- [58] LING Y, SHI Z, YANG X, et al. Hypolipidemic effect of pure total flavonoids from peel of *Citrus* (PTFC) on hamsters of hyperlipidemia and its potential mechanism[J]. *Experimental Gerontology*, 2020, 130: 110786.
- [59] AGIR M S, ERASLAN G. The effect of diosmin against liver damage caused by cadmium in rats[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(9): e12966.
- [60] LEE E Y, KIM S H, CHANG S N, et al. Efficacy of polymethoxylated flavonoids from *Citrus depressa* extract on alcohol-induced liver injury in mice[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 24(6): 907-914.
- [61] JIANG J, YAN L, SHI Z, et al. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Qu Zhi Ke (peel of *Citrus changshan-huyou*) on non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of NF- κ B and MAPKs[J]. *Phytomedicine*, 2019, 64: 153082.
- [62] SHI Z, LI T, LIU Y, et al. Hepatoprotective and anti-oxidative effects of total flavonoids from Qu Zhi Qiao (fruit of *Citrus Paradisi* cv. Changshan-huyou) on nonalcoholic steatohepatitis in vivo and in vitro through Nrf2-ARE signaling pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 483.
- [63] HE B, JIANG J, SHI Z, et al. Pure total flavonoids from *Citrus* attenuate non-alcoholic steatohepatitis via regulating the gut microbiota and bile acid metabolism in mice[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 135: 111183.
- [64] 张海萍, 袁梅, 蒋玲, 等. 柑橘黄酮对帕金森病模型细胞增殖和凋亡的影响研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(5): 555-559.
- ZHANG H P, YUAN M, JIANG L, et al. Citrus flavone affects proliferation apoptosis of Parkinson disease model cell by regulating SNHG1 expression[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2020, 36(5): 555-559.
- [65] ZHOU T, LIU L, WANG Q, et al. Naringenin alleviates cognition deficits in high-fat diet-fed SAMP8 mice[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(9): e13375.
- [66] SATO M, OKUNO A, SUZUKI K, et al. Dietary intake of the Citrus flavonoid hesperidin affects stress-resilience and brain kynurenine levels in a subchronic and mild social defeat stress model in mice[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019, 83(9): 1 756-1 765.
- [67] MILER M, ZIVANOVIC J, AJDZANOVIC V, et al. Citrus flavanones upregulate thyrotroph Sirt1 and differently affect thyroid Nrf2 expressions in old-aged Wistar rats[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(31): 8 242-8 254.