



桔楼籽蛋白酶解物对氧化损伤 HepG2 细胞的保护作用

张瑾莉^{1,2}, 杨 希¹, 朱丽娅^{1,2}, 袁翔宇¹

(1. 安徽粮食工程职业学院, 合肥 230011; 2. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥 230601)

摘 要: 为研究桔楼籽蛋白酶解物(Protease hydrolysates of trichosanthes seed, PHTS)对氧化损伤的人肝癌细胞株 HepG2 的抗氧化保护作用, 构建 H_2O_2 诱导的 HepG2 氧化损伤细胞模型, 检测细胞存活率、细胞总谷胱甘肽(Glutathione, GSH)及细胞分泌 NO 情况; 并分析过氧化氢酶(Catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的表达情况。分别设置空白对照组、 H_2O_2 损伤组、PHTS 实验组和 GSH 阳性对照组。结果显示: 与空白对照组相比, H_2O_2 损伤组的细胞存活率、细胞总 GSH 水平、NO 分泌量、抗氧化酶 CAT 和 SOD 基因表达与蛋白表达水平均显著降低; 在 PHTS 实验组, 细胞存活率、总 GSH 水平、NO 分泌量、CAT 和 SOD 的基因表达与蛋白表达水平均明显增加($p < 0.05$), 表明桔楼籽蛋白酶解物可有效增强 HepG2 细胞的抗氧化保护作用。因此, 桔楼籽蛋白酶解物具有细胞水平的抗氧化作用, 有望应用于氧化应激所致肝脏疾病的辅助治疗。

关键词: 桔楼籽蛋白酶解物; H_2O_2 ; 氧化损伤; HepG2; 抗氧化作用

中图分类号: TS195.644

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2022)11-0908-07

Protective effect of protease hydrolysates of trichosanthes seed on oxidatively damaged HepG2 cells

ZHANG Jinli^{1,2}, YANG Xi¹, ZHU Liya^{1,2}, YUAN Xiangyu¹

(1. Department of Food Biology, Anhui Vocational College of Grain Engineering, Hefei 230011, China; 2. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: In order to study the protective effect of protease hydrolysates of trichosanthes seed (PHTS) on HepG2 cell line with H_2O_2 -induced oxidative damage, HepG2 cell model with H_2O_2 -induced oxidative damage was constructed. The cell survival rate, total glutathione (GSH) and NO secretion were detected, and the expressions of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were analyzed. The experiment included blank control group, H_2O_2 injury group, PHTS experimental group, and GSH positive control group. The results showed that the cell survival rate, total GSH level, NO secretion, CAT and SOD gene expression and protein expression levels of H_2O_2 injured group were significantly decreased compared with the blank control group. In the PHTS group, the cell survival rate, total GSH level, NO secretion, CAT and SOD gene expression and protein expression were significantly increased ($p < 0.05$), suggesting that the protease hydrolysates of trichosanthes seed effectively enhanced the antioxidant protection of HepG2 cells. Therefore, the protease hydrolysates of trichosanthes seed have antioxidant

收稿日期: 2022-05-04 网络出版日期: 2022-07-08

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(KJ2019A1267); 安徽省教育厅高校优秀拔尖人才培育资助项目(gxgnfx2020179); 安徽省职业与成人教育学会教育科研规划课题(azcg141)

作者简介: 张瑾莉(1988—), 女, 安徽安庆人, 讲师, 硕士, 主要从事生物化学方面的研究。

effects at the cellular level and are expected to be used in the adjuvant treatment of liver diseases caused by oxidative stress.

Key words: protease hydrolysates of trichosanthes seed; H_2O_2 ; oxidative damage; HepG2; antioxidation

0 引 言

肝脏是人体重要五脏之一,是物质能量代谢和排泄各种有毒物质的主要器官。肝脏功能直接影响人体健康。研究表明,氧化应激是肝损伤、肝纤维化及肝炎等多种肝脏疾病的重要诱因之一,酒精、辐射、药物和环境污染物等,都可诱发肝脏氧化应激^[1]。氧化应激反映机体在活性氧的产生和消除之间平衡失调及抗氧化剂的减少,在大多数情况下,高水平的活性氧和氧化应激将通过坏死或凋亡机制诱导细胞死亡,导致细胞和组织损伤^[1-2]。在肝脏中,过量活性氧导致的氧化应激,可引起脂质、蛋白质和 DNA 损伤,诱导产生促炎细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)和白细胞介素(IL)-6 等,从而导致肝损伤^[3]。抗氧化剂被认为是治疗肝脏疾病的良好辅助药物,寻找开发更多药食同源的天然抗氧化剂,对治疗因氧化损伤引起的肝脏疾病具有重要意义^[4]。

栝楼,又名瓜蒌,是中国的一种传统中药材,被《神农本草经》列为中品。栝楼果实中的种子,即栝楼籽,可食用,富含蛋白质、油脂等营养素^[5]。栝楼籽中的蛋白具有清除 DPPH 自由基及羟基自由基的功效,具有较好的抗氧化活性^[6];但因蛋白分子量较大,限制了栝楼籽在细胞水平的应用。近年来,越来越多学者发现,利用蛋白酶水解天然蛋白释放出的小分子多肽,在细胞水平显示出较好的抗氧化作用^[7-9]。因此,利用蛋白酶水解栝楼籽蛋白,制备栝楼籽蛋白酶解物,有望提高栝楼籽在细胞水平的抗氧化作用。

H_2O_2 可通过产生氧自由基或羟自由基,打破细胞内氧化与抗氧化之间的平衡,导致氧化应激,因此常被用来构建氧化应激细胞模型^[9]。人肝癌细胞株 HepG2 细胞的代谢酶相对稳定,表型和内部性状不易随传代时间的增加而改变,并含有与人类正常肝实质细胞同源的生物转化代谢酶,是体外肝细胞代谢和基因检测的理想细胞系^[10-11]。

本文选用 H_2O_2 处理 HepG2 细胞,构建氧化应激细胞模型;通过研究栝楼籽蛋白酶解物(Protease hydrolysates of trichosanthes seed,PHTS)对细胞存活

率和细胞内抗氧化成分谷胱甘肽(Glutathione, GSH)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)表达水平及 NO 分泌量的影响,探究 PHTS 对氧化损伤的 HepG2 细胞的抗氧化保护作用,以期对氧化应激所致肝脏疾病的治疗提供更多理论依据。

1 实验部分

1.1 实验材料与试剂

栝楼籽购于安徽省安庆市潜山栝楼种植基地, HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库, DMEM 细胞培养基和 FBS 购自以色列 BI 公司, 胰蛋白酶购自美国 Corning 公司, 碱性蛋白酶和 GSH 购自北京索莱宝公司。CCK8 购自日本 Dojindo Laboratories, GSH 检测试剂盒购自武汉 Elabscience 生物公司, NO 检测试剂盒购自南京建成生物公司, CAT、SOD、GAPDH 多克隆抗体和 HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L)二抗均购自武汉三鹰生物公司, ECL 化学发光试剂购自 Biosharp 公司。

1.2 方 法

1.2.1 栝楼籽蛋白酶解物的制备

鲜栝楼籽经干燥、去壳、粉碎、脱脂后,称取 10 g,按料液比 1:10(m/v)加入质量分数为 3%的碱性蛋白酶溶液 1000 mL,于 50 ℃、pH 值 9 条件下水解,每隔 20 min 观察一次反应液的 pH 值,并使用 2 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 9,记录 NaOH 总消耗量,直至 pH 值不再变化,即视为水解反应结束。根据式(1)计算水解度:

$$DH/\% = \frac{c \times v}{m \times \alpha \times h_{hot}} \times 100 \tag{1}$$

其中:DH 为蛋白水解度,%;v 为水解过程中滴定所消耗的 NaOH 溶液的体积,mL;c 为滴定所消耗的 NaOH 溶液的浓度(2 mol/L);m 为水解反应中蛋白质的总质量,g; h_{hot} 为蛋白质中所含肽键的摩尔数(取 8.00 mmol/g); α 为 α -氨基酸的解离度(取 100/101)。

再将水解后的料液于 90 ℃水浴 10 min 灭酶后,调节 pH 值至 7;离心取上清,浓缩并真空冷冻干燥,得栝楼籽蛋白酶解物粉末,标记为 PHTS。

1.2.2 细胞存活率检测

将 HepG2 细胞按浓度 4×10^4 细胞/mL、每孔 100 μL 种到 96 孔板中,置于细胞培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养过夜。第 2 天取出,将细胞分组,分别设置 HepG2 组、HepG2 (H_2O_2) 组、HepG2 (H_2O_2 + GSH)组和 HepG2(H_2O_2 +PHTS)组,其中 HepG2 (H_2O_2 +PHTS)组设置 0.625、1.250、2.500、5.000

mg/mL 和 10.000 mg/mL 浓度。对各组细胞进行两次加样处理:第一次加 2 μL 双蒸水/GSH 溶液/PHTS 溶液后,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h;第二次加 2 μL 双蒸水/ H_2O_2 溶液,再 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。具体加样浓度见表 1。再移除细胞上清液,每孔加入 100 μL 含 10% FBS DMEM 培养液和 10 μL CCK8,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,采用酶标仪测定波长 450 nm 处的 OD 值。

表 1 各组细胞两次加样顺序及浓度

组别	第一次加样	第二次加样
HepG2 组	双蒸水	双蒸水
HepG2 (H_2O_2)组	双蒸水	300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2
HepG2 (H_2O_2 +GSH)组	1.000 mmol/L GSH 溶液	300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2
	0.625 mg/mL PHTS 溶液	300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2
	1.250 mg/mL PHTS 溶液	300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2
	2.500 mg/mL PHTS 溶液	300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2
	5.000 mg/mL PHTS 溶液	300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2
	10.000 mg/mL PHTS 溶液	300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2
HepG2 (H_2O_2 +PHTS)组		

1.2.3 细胞总 GSH 水平及 NO 分泌量的检测

将 HepG2 细胞按 6×10^4 个细胞/孔、2 mL 培养基种于 6 孔板,置于细胞培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。对各组细胞进行两次加样处理,HepG2 (H_2O_2 + PHTS)组选用 10.000 mg/mL 浓度。吸取各组细胞板中的培养液,采用试剂盒检测 NO 含量;将各组细胞裂解、离心,取上清液,用试剂盒测定总 GSH

含量。

1.2.4 细胞 CAT、SOD 基因表达水平分析

将 HepG2 细胞置于 6 孔板并进行两次加样处理。按照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,逆转录后进行实时荧光定量 PCR,以 *GAPDH* 为内参;各组 PCR 引物序列见表 2,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组基因相对表达量。

表 2 荧光定量 PCR 引物

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>GAPDH</i>	GGAGCGAGATCCCTCCAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
<i>CAT</i>	TAAGACTGACCAGGGCATC	CAACCTTGGTGAGATCGAA
<i>SOD</i>	GAGATGTTACACGCCCAGATAGC	AATCCCCAGCAGTGGAATAAGG

1.2.5 细胞 CAT 和 SOD 蛋白表达水平分析

将 HepG2 细胞置于 6 孔板培养并进行 2 次加样处理后,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。每孔等量蛋白加样进行 SDS-PAGE 电泳,再转膜、漂洗、封闭、脱色。将膜置于一抗稀释液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗脱后将膜置于二抗稀释液中室温孵育 1 h,通过 ECL 化学发光法显影。

1.2.6 统计学分析

数据至少采用 3 个平行样本,数据结果用平均值 \pm 标准差表示,采用 Graphpad Prism 进行统计分析。 $*$ 表示 $p<0.05$, $**$ 表示 $p<0.01$, $***$ 表示 $p<0.001$, $****$ 表示 $p<0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 枳椇籽蛋白酶解物水解度分析

脱脂枳椇籽富含大量蛋白,用蛋白酶水解可释

放大量活性多肽。图 1 为枳椇籽蛋白酶解物的水解度变化曲线。图 1 表明:枳椇籽蛋白水解度随水解时间延长而增加,水解过程的前 100 min 水解反应速度较快,水解度达到 12.75%;而从水解 100 min 之后,水解反应明显减缓,水解至 240 min 时,水解度相较之前无明显增加,因此视为水解反应结束,此时水解度达到 15.73%,碱性蛋白酶较好地水解了枳椇籽蛋白,释放出了活性肽。

2.2 枳椇籽蛋白酶解物对氧化损伤 HepG2 细胞活性的影响

CCK8 是一种细胞计数试剂,可反映活细胞的数目。图 2 为各组细胞的 CCK8 检测结果。由图 2 可知:与对照组相比,HepG2(H_2O_2)组细胞存活率显著下降;枳椇籽蛋白酶解物实验组-HepG2(H_2O_2 +PHTS)组,细胞活性随其浓度增加而显著升高,

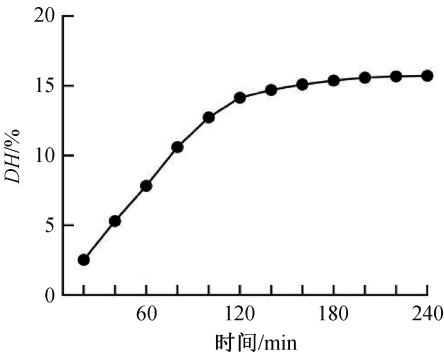


图 1 栝楼籽蛋白酶解物的水解度曲线

呈正相关; HepG2($\text{H}_2\text{O}_2 + 10.000 \text{ mg/mL PHTS}$) 组的细胞活性显著高于阳性对照组- HepG2($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{GSH}$), 栝楼籽蛋白酶解物的加入显著提高了氧化损伤的 HepG2 的细胞活性, 具有抗凋亡作用。后续栝楼籽蛋白酶解物实验组均选用 10.000 mg/mL 浓度。

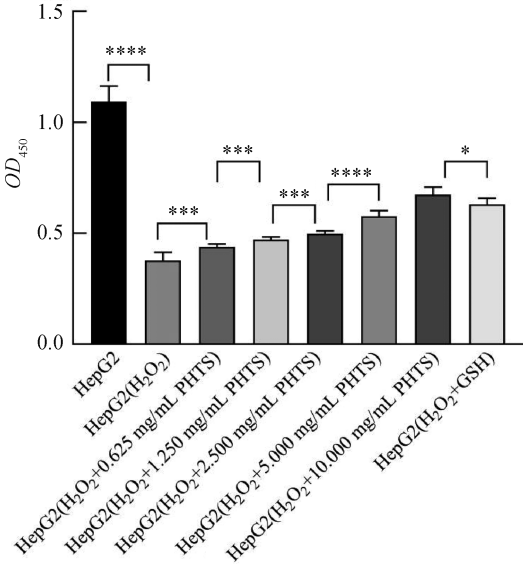


图 2 各组细胞存活率检测结果

2.3 栝楼籽蛋白酶解物对氧化损伤 HepG2 细胞总 GSH 水平的影响

谷胱甘肽(GSH)是生物细胞内广泛存在的一种非酶类自由基清除剂^[1], 图 3 为各组细胞总 GSH 检测结果。由图 3 可知, 与 HepG2 组相比, HepG2(H_2O_2) 组细胞总 GSH 水平显著下降, 而加入 10.000 mg/mL 栝楼籽蛋白酶解物的细胞组总 GSH 水平显著提升, 接近阳性对照组 GSH 水平。因此, 栝楼籽蛋白酶解物可有效提高 H_2O_2 氧化损伤 HepG2 细胞的总 GSH 水平, 促进细胞的抗氧化作用。

2.4 栝楼籽蛋白酶解物对氧化损伤 HepG2 细胞分泌 NO 的影响

适量的 NO 可与羟基自由基、超氧阴离子自由

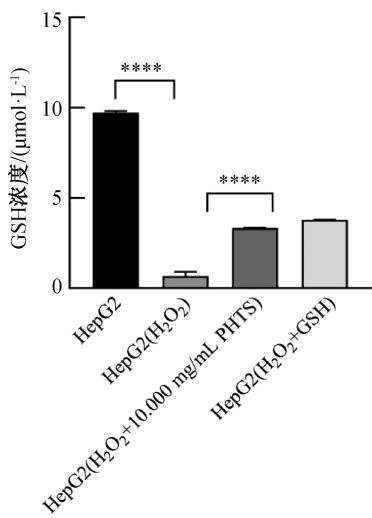


图 3 各组细胞总 GSH 水平分析结果

基等结合而解毒, 起到抗氧化作用^[12]。图 4 为各组细胞的培养基中 NO 检测结果。由图 4 可知, 与 HepG2 组相比, HepG2(H_2O_2) 组细胞的培养基中 NO 含量显著下降, 而加入 10.000 mg/mL 栝楼籽蛋白酶解物的细胞组培养基中 NO 水平显著提升, 接近阳性对照组。因此, 栝楼籽蛋白酶解物可有效促进氧化损伤 HepG2 细胞分泌 NO, 对抗氧化应激。

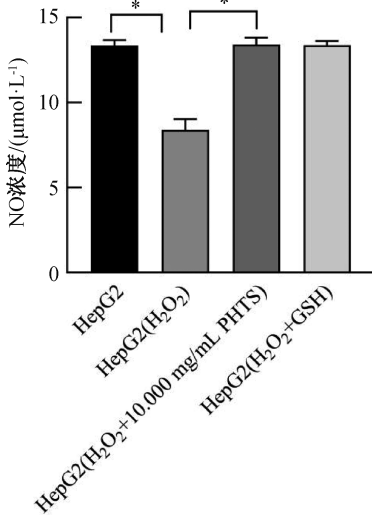
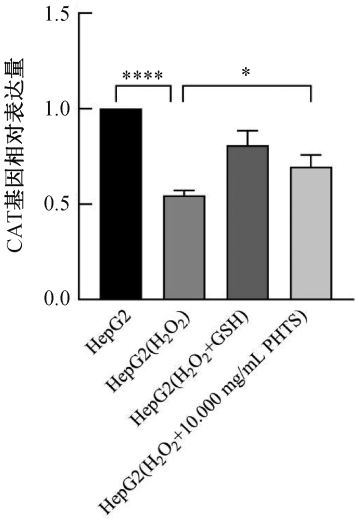


图 4 各组细胞分泌 NO 情况

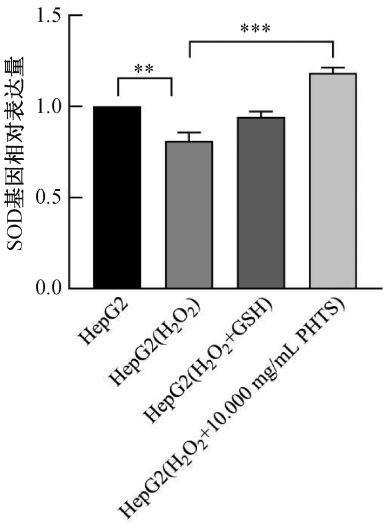
2.5 栝楼籽蛋白酶解物对氧化损伤 HepG2 细胞内 CAT 和 SOD 基因表达的影响

CAT 和 SOD 是生物细胞内广泛存在的酶类自由基清除剂^[13], 图 5 是各组细胞内 CAT 和 SOD 基因的荧光定量 PCR 结果。由图 5 可知, 与 HepG2 组相比, HepG2(H_2O_2) 组细胞的 CAT 和 SOD 基因表达水平显著下降, 而加入 10.000 mg/mL 栝楼籽蛋白酶解物的细胞组 CAT 和 SOD 基因表达水

平显著提升,接近或略高于阳性对照组。因此,桔菱籽蛋白酶解物可有效促进 H_2O_2 氧化损伤 HepG2 细胞的抗氧化酶基因表达,加强细胞的抗氧化保护作用。



(a) 各组细胞CAT基因表达情况



(b) 各组细胞SOD基因表达情况

图 5 各组细胞 CAT 和 SOD 基因表达情况

2.6 桔菱籽蛋白酶解物对氧化损伤 HepG2 细胞内 CAT 和 SOD 蛋白表达的影响

通过 Western Blot 检测各组细胞内 CAT、SOD 蛋白显影情况和灰度分析结果分别见图 6 和图 7。从图中可以看出,与 HepG2 (H_2O_2) 组相比,加入 10.000 mg/mL 桔菱籽蛋白酶解物的细胞组 CAT 和 SOD 蛋白表达水平显著提升。因此,桔菱籽蛋白酶解物可有效促进氧化损伤的 HepG2 细胞抗氧化酶蛋白表达,提升细胞的抗氧化作用。

3 讨 论

细胞存活率是用于判断细胞生长状态的基本指

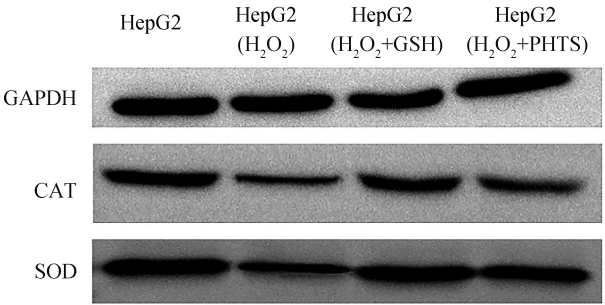
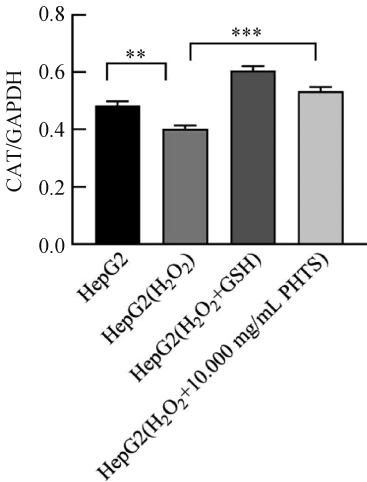
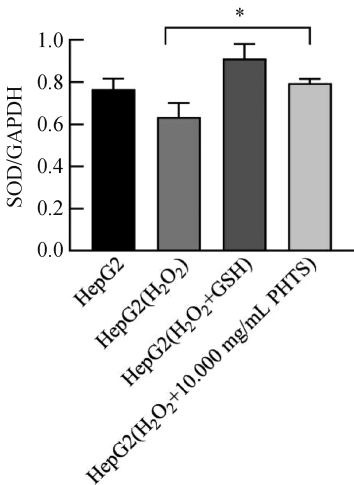


图 6 各组 HepG2 细胞的 CAT 和 SOD 蛋白的 Western blot 检测



(a) 各组细胞CAT蛋白表达情况



(b) 各组细胞SOD蛋白表达情况

图 7 各组 HepG2 细胞的 CAT 和 SOD 蛋白表达情况

标,可反映培养条件或外界刺激对细胞的影响程度^[7]。 H_2O_2 可通过产生氧自由基或羟自由基,导致细胞氧化应激损伤^[9]。在 CCK8 检测细胞存活率的分析中,与空白对照组相比, H_2O_2 损伤组细胞存活率显著下降,说明氧化应激细胞模型已构建成功;加入 0.625 mg/mL 桔菱籽蛋白酶解物之后,细胞存活率明显比 H_2O_2 损伤组高,而且随着桔菱籽蛋白酶解物浓度继续升高,细胞存活率的增加更为显

著。因此,栝楼籽蛋白酶解物显示出较好的抗细胞氧化应激和抗细胞凋亡作用。

在生物细胞内,存在两种抗氧化系统(酶类和非酶抗氧化系统)来维持氧化和抗氧化之间的平衡^[1,13]。酶类抗氧化剂主要包括 SOD、CAT 和谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)等,前两种是生物体中最常见的抗氧化酶。SOD 是对抗氧自由基的第一道防线,能促进超氧化物转化为氧气和过氧化氢,而 CAT 可进一步将过氧化氢分解为氧气和水^[14]。非酶抗氧化剂主要指 GSH、辅酶 Q、尿酸、金属硫蛋白等。抗氧化剂可以中和自由基和活性氧,减少氧化作用引起的细胞和组织损伤^[15]。因此,通过检测抗氧化酶 CAT、SOD 的表达及 GSH 水平可判断细胞内氧化应激情况及抗氧化作用。在本文中,与空白对照组相比, H₂O₂ 损伤组的细胞总 GSH 水平、CAT 和 SOD 基因表达与蛋白表达均显著降低;加入栝楼籽蛋白酶解物的 HepG2 细胞,总 GSH 水平、CAT 和 SOD 基因表达与蛋白表达均显著升高。因此,栝楼籽蛋白酶解物,可通过增强细胞抗氧化成分 GSH、CAT、SOD 等的表达来有效抑制 H₂O₂ 引起的氧化应激。

NO 通常由一氧化氮合酶催化 L-精氨酸产生,在肝、肺、血管等多种器官中存在。NO 在细胞稳态、神经传递、中枢神经系统神经调节、免疫反应、信号转导、细胞增殖和凋亡中起到重要作用,还能有效对抗氧化应激^[16]。低浓度的 NO 可以通过改变线粒体通透性,间接阻断 Caspase 家族的激活,阻止凋亡信号传导,从而阻断细胞凋亡通路;还可下调促凋亡基因 Casp7、Casp9、Bax 和 Bak1,上调抗凋亡基因 Bcl-2 和 Birc6,抑制细胞凋亡^[17-18]。NO 还可介导热休克蛋白 HSP70 的表达,保护细胞免受氧化损伤^[19]。细胞 NO 水平一定程度上可反映细胞的抗氧化损伤效应。本文中,与空白对照组相比,在 H₂O₂ 损伤组细胞存活率降低的同时,NO 分泌量显著下降;而加入栝楼籽蛋白酶解物的细胞存活率及 NO 分泌水平均显著提升。因此栝楼籽蛋白酶解物,可通过提高 HepG2 细胞的 NO 分泌水平,从而抵抗 H₂O₂ 引起的细胞凋亡。因此,本文所选用的栝楼籽蛋白酶解物显示出较好的抗氧化作用,具有辅助治疗氧化应激所致肝脏疾病的应用潜力。

4 结 论

本文利用碱性蛋白酶水解制备栝楼籽蛋白酶解物,并分析其对 H₂O₂ 氧化损伤的 HepG2 细胞存活

率及抗氧化成分的影响,主要结果如下:

a)栝楼籽蛋白酶解物可有效抑制 H₂O₂ 导致的 HepG2 细胞凋亡,且抑制效果与酶解物浓度呈正相关;

b)栝楼籽蛋白酶解物可显著减轻 H₂O₂ 所致 HepG2 细胞抗氧化剂表达减少的情况,减轻氧化应激损伤;

c)栝楼籽蛋白酶解物可促进 HepG2 细胞分泌 NO,抵抗 H₂O₂ 导致的细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Li S, Tan H Y, Wang N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(11): 26087-26124.
- [2] Yang S, Liao W B. Hydroxysafflor yellow A attenuates oxidative stress injury-induced apoptosis in the nucleus pulposus cell line and regulates extracellular matrix balance via CA M II[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2022, 23(2): 182.
- [3] Milena V, Dušan M, Marina M, et al. The effects of Betaine on oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in methionine-choline deficient diet-induced fatty liver disease in mice[J]. Pathophysiology, 2018, 25(3): 233-234.
- [4] Karim N, Shishir M R I, Rashwan A K, et al. Suppression of palmitic acid-induced hepatic oxidative injury by neohesperidin-loaded pectin-chitosan decorated nanoliposomes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 908-917.
- [5] Zhao H, Song L. TKP, a serine protease from Trichosanthes kirilowii, inhibits cell proliferation by blocking aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma cells[J]. Nutrition and Cancer, 2021, 74(1): 11-13.
- [6] 熊利芝, 吴玉先, 曹卫君, 等. 栝楼籽蛋白分离纯化及抗氧化性的研究[J]. 应用化工, 2016, 45(1): 7-10.
- [7] 马萍, 程天赋, 郭增旺, 等. 紫花芸豆肽修复 H₂O₂ 对 HepG2 细胞的氧化应激损伤[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 175-182.
- [8] Sun J, Zhou C Y, Cao J X, et al. Purification and characterization of novel antioxidative peptides from duck liver protein hydrolysate as well as their cytoprotection against oxidative stress in HepG2 Cells[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 848289.
- [9] Hu Y M, Lu S Z, Li Y S, et al. Protective effect of antioxidant peptides from grass carp scale gelatin on the H₂O₂-mediated oxidative injured HepG2 cells[J]. Food Chemistry, 2021, 373: 131539.

- [10] Mattia A, Desirée B, Maria R C, et al. Imbalance in the antioxidant defence system and pro-genotoxic status induced by high glucose concentrations: in vitro testing in human liver cells[J]. *Toxicology in Vitro*, 2020, 69: 105001.
- [11] Wang H L, Liu J, Liu X Y, et al. Protective effects of blueberry against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HEPG2 cells: Involvement of mitochondrial BCL-2-dependent[J]. *British Food Journal*, 2019, 121 (11): 2809-2820.
- [12] Yoko Y, Wang L Q, Asuka N, et al. Black soybean improves the vascular function through an increase in nitric oxide and a decrease in oxidative stress in healthy women[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2020, 688: 108408.
- [13] Niki E, Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 49(4): 503-515.
- [14] Ratnam D V, Anakola D D, Bhardwaj V, et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A phannaceutical perspective [J]. *J Control Release*, 2006, 113(3): 189-207.
- [15] Ilona S, Arunas L, Inga S, et al. Effects of long-term supplementation with aluminum or selenium on the activities of antioxidant enzymes in mouse brain and liver[J]. *Catalysts*, 2020, 10(5): 585.
- [16] Gdara N. Protective effects of nitric oxide and phycocyanin against oxidative stress induced by hepatic ischemia/reperfusion injuries[J]. *Journal of Cardiology and Cardiovascular Sciences*, 2018, 2(4): 15-19.
- [17] Wu W, Gao X, Xu X, et al. Saponin-rich fraction from Clematis chinensis Osbeck roots protects rabbit chondrocytes against nitric oxide-induced apoptosis via preventing mitochondria impairment and caspase-3 activation [J]. *Cytotechnology*, 2013, 65(2) : 287-295.
- [18] Tejedo J R, Tapia-Limonchi R, Mora-Castilla S, et al. Low concentrations of nitric oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival[J]. *Cell Death & Disease*, 2010, 1(10): e80.
- [19] Folorunsho A A, Micheal L O, Iyanuoluwa A O, et al. Hsps70 and 90 protect the heart of hyperthyroid rats via nitric oxide production and VEGF inhibition of apoptosis[J]. *Endocrine and Metabolic Science*, 2021: 100097.

(责任编辑:廖乾生)