刺参多糖清除活性氧保护线粒体的研究

张红玲，韦豪华，李兴太

（大连民族大学生命科学学院，辽宁大连 116600）

摘要：本文采用酶解法（胃蛋白酶与胰蛋白酶）提取刺参多糖（Stichopus japonicus polysaccharides，SJP），以硫酸苯酚法测定多糖含量并研究其清除活性氧保护线粒体的作用机制。以 Fe^{2+}-Vit C 系统诱发肝线粒体脂质过氧化，以丙二醛（MDA）为指标测定 SJP 对脂质过氧化的影响；测定 SJP 的还原力及其对 Fe^{2+}的螯合作用；以 H_2O_2-Fe^{2+}体系为羟自由基（·OH）生成系统，测定 SJP 清除·OH 的能力；用滴定法测定 SJP 清除过氧化氢（H_2O_2）的能力；用氮蓝四唑（NBT）法测定 SJP 清除超氧阴离子（$O_2^{\cdot -}$）的能力。研究表明：SJP 可抑制 MDA 生成；SJP 具有一定的还原力和较弱的 Fe^{2+}螯合作用；另外，SJP 能在一定浓度范围内明显清除·OH、H_2O_2和 $O_2^{\cdot -}$。SJP 能通过抗氧化、清除活性氧（ROS）来保护线粒体，具有保护机体的功效，这是 SJP 保护线粒体的可能机制。

关键词：刺参多糖；线粒体；脂质过氧化；活性氧

文章篇号：1673-9078(2018)05-81-86 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.05.012

Study on the Mitochondrial Protection of *Stichopus japonicus* Polysaccharides by Scavenging Reactive Oxygen Species

ZHANG Hong-ling, WEI Hao-hua, LI Xing-tai

(College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China)

Abstract: *Stichopus japonicus* polysaccharides (SJP) were extracted by enzymatic hydrolysis (pepsin and trypsin), polysaccharide content was determined by phenol/sulfate method and the possible mechanism of scavenging reactive oxygen species (ROS) for SJP to protect mitochondria were investigated in this study. The hepatic mitochondrial lipid peroxidation was induced by Fe^{2+}-Vit C system, malondialdehyde (MDA) was used as an index to determine the effect of SJP on lipid peroxidation; effects of SJP on the reducing power and Fe^{2+} chelating were measured; the scavenging activity of SJP on the hydroxyl radical (·OH) which was produced by H_2O_2-Fe^{2+} system was measured; the method of titration and the method of nitrogen blue tetrazolium (NBT) were used to measure the scavenging activity of SJP on the hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$), respectively. The results showed that SJP could inhibit the production of MDA; SJP had a certain reducing power and weaker Fe^{2+} chelating activity. In addition, SJP could scavenge ·OH, H_2O_2 and $O_2^{\cdot -}$ within a certain concentration range. SJP could protect mitochondria through anti-oxidation and scavenging reactive oxygen species (ROS), which had the effect of protecting the body. This was the possible mechanism of SJP to protect mitochondria.

Key words: Stichopus japonicus polysaccharide; mitochondria; lipid peroxidation; reactive oxygen specie

线粒体存在于大多数细胞中，是细胞乃至生命体进行各类代谢活动的中枢，它不仅为细胞提供能量，参与细胞分化与信息传递等过程，也是产生活性氧（reactive oxygen species，ROS）的最主要场所，还是 ROS 损伤的主要靶点，体内外研究均表明，过多的 ROS 能够攻击膜脂质、蛋白质和 DNA，并使细胞的功能恶化[1]。近年来，关于 ROS 对健康重要性的研究越来越多。低水平的 ROS 对健康无害，被看做为信号分子；高水平的 ROS 与 ROS 缓冲系统功能障碍有关，直接或间接地参与细胞信号传导，诱导细胞凋亡与疾病的发生[2]。研究显示[3,4]，电子传递链的结构变化可使 ROS 生成量增加、脂质过氧化加剧，ROS 生成过量诱导生物分子的氧化损伤，从而导致线粒体衰老、癌症与许多其他疾病。因此，体内 ROS 保持平衡对健康具有重要意义[5]。海参不仅是珍贵的食品也是名贵的药材，自古以来就被奉为营养佳品，具有较高的经济价值与药用价值。海参的营养与保健作用主要源于其体内的多糖，是由氨基半乳糖、己糖醛酸、岩藻糖、硫酸基组成[6]，具有保护神经细胞[7]、免疫调节[8]、抗肿瘤[9]和抗凝血[10]等多种生物活性，刺参被誉为“海参

收稿日期：2017-12-29

基金项目：辽宁省自然科学基金项目（201602192）

作者简介：张红玲（1993-），女，硕士研究生，研究方向：中药生化药理学研究

通讯作者：李兴太（1966-），男，博士，副教授，研究方向：中药线粒体生物能学与生化药理学研究

之冠”。李学鹏等[11]分别选用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、和菠萝蛋白酶水解海参体壁，随水解时间增加，5 种酶解液的抗氧化能力大体上都呈现出先增后降的趋势。胰蛋白酶酶解液 Fe^{2+}螯合能力最强；木瓜蛋白酶酶解液的还原力最大；碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶酶解液对 $O_2\cdot^-$自由基的清除能力较强。许静等[12]研究表明，从海参脏器中分离出的多糖 HPS1、HPS2 可清除·OH、$O_2\cdot^-$自由基，且抗氧化活性随着多糖质量浓度的增加而增强。本文采用胃蛋白酶与胰蛋白酶酶解法提取刺参粗多糖，研究了其 Fe^{2+}螯合能力、还原力及清除·OH、H_2O_2、$O_2\cdot^-$等 ROS 保护线粒体的作用及其机制，为其在功能性食品及新药开发利用方面提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂

干刺参，大连晓芹食品有限公司；SD 大鼠，大连医科大学实验动物中心；牛血清白蛋白、还原型辅酶Ⅰ(NADH)、氮蓝四唑(nitrogen blue tetrazolium，NBT)，荷兰 Boehringer Mannheim 公司；考马斯亮蓝 G-250 染色液、吩嗪硫酸甲酯(phenazine methosulfate，PMS)，美国 Fluka 公司；N-(2-羟乙基)哌嗪-N-2-乙烷磺酸(Hepes)，德国 Merck 公司；硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid，TBA)、1,1,3,3-四乙氧基丙烷(1,1,3,3-tetrathoxypropane，TEP)，美国 Sigma 公司；菲洛嗪(Ferrozine)，英国 Alfa Aesar 公司；三羟甲基氨基甲烷(Tris)，美国 Gibco 公司；其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.2 仪器与设备

UV-2450 紫外-可见分光光度计，日本岛津公司；TGL-18M 台式高速冷冻离心机，上海卢湘仪离心机仪器有限公司；Polystat 34 恒温水浴锅，美国 Techne 公司；DY89-I 型电动玻璃匀浆机，宁波新芝科器研究所；XW-80A 旋涡混合器，上海精密实业有限公司；SX-610 型笔式 pH 计，上海三信仪表厂。

1.2 实验方法

1.2.1 海参粗多糖的提取

称取刺参干粉 10 g，加双蒸水 300 mL 浸泡 5 h；用 98%浓盐酸调刺参浸泡液 pH 为 2.0~2.5，加胃蛋白酶 1 g 水浴酶解 5 h；再用 1 moL/L 氢氧化钠调 pH 为 8.0~8.5，加胰蛋白酶 1 g 水浴酶解 5 h；于 90 ℃水浴 5 min，冷却后用 98%浓盐酸调 pH 至 7；将酶解液 8000 r/min 离心 15 min，上清用 95%乙醇溶液调至含 75%的乙醇，8000 r/min 离心 15 min，收集沉淀烘干后称重，即得刺参粗多糖（Stichopus japonicus polysaccharides，SJP）。采用硫酸苯酚法[13]测定 SJP 多糖含量。

1.2.2 线粒体脂质过氧化的测定

1.2.2.1 丙二醛(MDA)含量标准曲线的测定

用 TBA 显色法测定[14]，利用 TEP 在酸性条件下产生丙二醛（malondialdehyde，MDA），绘制 MDA 含量标准曲线。以吸光值为横坐标，MDA 含量(nmoL)为纵坐标。MDA 含量标准曲线方程为 Y=9.3905X-0.0024，R^2=0.998。

1.2.2.2 肝线粒体的制备

采用差速离心法[15]制备肝线粒体，取新鲜鼠肝，用预冷的生理盐水洗去血迹，放入线粒体分离介质中，用电动匀浆机将其冰浴匀浆。将匀浆液 4 ℃ 3000 r/min 离心 10 min，取其上清液，10000 r/min 离心 10 min，沉淀即为线粒体，加入一定量分离介质，制成悬液放入 4 ℃冰箱备用。采用考马斯亮蓝法[16]测定线粒体蛋白含量。

1.2.2.3 肝线粒体脂质过氧化的测定

实验分为空白、对照与 SJP 组，SJP 组体系中加入 6 mmoL/L Vit C、5 mmoL/L $FeSO_4$、SJP、线粒体与 0.1 moL/L PBS（对照不加 SJP，空白不加 Vit C、$FeSO_4$、SJP），37 ℃水浴 1 h，加入 20%三氯乙酸（Trichloroacetic acid，TCA），5000 r/min 离心 10 min，取 2 mL 上清，加入 0.67% TBA 1 mL，沸水浴 10 min，用 PBS 溶液调零，测定 532 nm 处吸光值。SJP 的作用以 MDA 含量及抑制率（Inhibition Rate，IR）表示：

IR/%=(MDA 含量$_{对照}$-MDA 含量$_{SJP}$)/(MDA 含量$_{对照}$-MDA 含量$_{空白}$)

1.2.3 还原力的测定

以 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚（2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol，BHT）为阳性对照。SJP 组体系中加入 PBS 缓冲液(0.2 moL/L pH 6.6)、1%铁氰化钾、SJP 与水（调零组不加 BHT、SJP），50 ℃水浴 20 min，加入 100 g/L TCA 1.0 mL，5000 r/min 离心 2 min，取上清 1.5 mL，加入 $FeCl_3$ 溶液（1 g/L）0.1 mL，用去离子水补至 3 mL，混匀，测定 700 nm 处吸光值，吸光值越大即还原力越强[17]。

1.2.4 Fe^{2+}螯合的测定

采用 Xu 等[18]方法测定，稍有改动，以乙二胺四乙酸（ethylene diamine tetraacetic acid，EDTA）为阳性对照，SJP 组体系中加入 SJP、$FeSO_4$ (0.375 mmoL/L)、Ferrozine (2.25 mmoL/L)与 Hepes（对照不

加 SJP），漩涡混匀，室温静置 20 min，测定 562 nm 处吸光值。SJP 的作用以螯合率表示[19]，按下式计算：

螯合率/%=[($A_{对照}$-$A_{SJP 或 EDTA}$)/$A_{对照}$]×100%

1.2.5 ·OH清除能力的测定

以 BHT 为阳性对照，SJP 组体系中加入 5 mmoL/L 邻二氮菲、0.2 moL/L PBS (pH 7.8)、7.5 mmoL/L $FeSO_4$、SJP、1% H_2O_2（对照不加 SJP，空白对照不加 SJP、1% H_2O_2），37 ℃水浴 1 h，测定 536 nm 处 Fe^{2+}-邻二氮菲复合物吸光值[20]。SJP 的作用以清除率（Scavenging Rate，SR）表示，按下式计算：

SR/%=[($A_{SJP 或 BHT}$-$A_{对照}$)/($A_{空白对照}$-$A_{对照}$)]×100%

1.2.6 H_2O_2 清除能力的测定

以 BHT 为阳性对照，SJP 组体系中加入 SJP、0.1 mmoL/L H_2O_2、H_2O、3%钼酸铵、2 moL/L H_2SO_4、1.8 moL/L KI（对照不加 SJP），参见参考文献[21]，静置，采用滴定法在 3 min 时，用 5 mmoL/L 的硫代硫酸钠溶液滴定至黄色消失为止，记录硫代硫酸钠溶液的消耗体积 V。SJP 的作用以 SR 表示，按下式计算：

SR/%=[($V_{对照}$-$V_{SJP 或 BHT}$)/$V_{对照}$]×100%

1.2.7 $O_2\cdot^-$清除能力的测定

采用 NBT 法测定[22]，SJP 组体系中加入 H_2O、NBT（12.5 μL/mL）、SJP、NADH(60 μg/mL)、PMS(0.138 mg/mL)（对照不加 SJP，空白不加 PMS），漩涡混匀。使用空白调零，2 min 时准确测定其于 560 nm 处吸光值。SJP 的作用以 SR 表示，按下式计算：

SR/%=[($A_{对照}$-A_{SJP})/$A_{对照}$]×100%

1.2.8 数据处理

数据用均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，运用 SPSS 16.0 进行统计分析，组间比较采用单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 SJP的多糖与蛋白质含量

实验提取的刺参多糖为粗多糖，为了解其含量，测定粗多糖中的多糖与蛋白质含量。经计算得刺参粗多糖的多糖含量为 33.21%，蛋白质含量为 5.30%。刺参多糖所含硫酸基高于其他海参，其糖链上有部分羟基发生硫酸酯化，且硫酸基含量占多糖的 30%左右[23]。硫酸苯酚法是根据多糖在硫酸的作用下水解成单糖，并迅速脱水生成糖醛衍生物，然后与苯酚生成橙黄色化合物[24]。由于多糖中的糖残基以结合形式存在，和单糖有所不同，在浓硫酸的作用下不能百分之百形成糠醛[25]。因而实验只能测定出硫酸脂基类多糖中的多糖含量，考虑到硫酸基的影响，故实际 SJP 多糖含量大约为 63%左右。

2.2 SJP对线粒体脂质过氧化的影响

脂质过氧化是一种氧化变质反应，脂质过氧化过程所产生的自由基与一些小分子产物，可引起多种细胞功能的损伤，如改变细胞膜渗透性与流动性，对蛋白质和 DNA 也有伤害（引起各种碱基损伤、DNA 链断裂和各种荧光产物生成，并对 DNA 分子鸟嘌呤碱基具有选择性损伤[26]），并与多种疾病的发生、发展具有密切关系[27]。故抑制脂质氧化作用变得十分重要。

表 1 SJP 对线粒体脂质过氧化的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Table 1 Effects of SJP on the lipid peroxidation of mitochondria ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

组别	质量浓度/(mg/mL)	MDA/nmoL	IR/%
空白		0.30±0.082**	
对照		2.59±0.486	
SJP	0.003	1.92±0.073**	27.80±2.65
	0.007	1.75±0.063**	34.97±2.34
	0.013	1.65±0.073**	40.98±3.12
	0.027	1.56±0.082**	46.24±3.15

注：与对照组比较，“*”表示有显著差异（p<0.05），“**”表示有较显著差异（p<0.01），下表同。

由结果可知，随 SJP 质量浓度升高，MDA 值呈现下降趋势，抑制率呈现上升趋势，说明 SJP 在此浓度范围内可减少 MDA 的生成，可抑制脂质过氧化反应。脂质过氧化与某些疾病的病理过程，如肿瘤、化学中毒、感染、炎症、自身免疫疾病和心脑血管疾病等，以及衰老等生理过程均有密切联系[28]。所以，SJP 可能通过抑制脂质过氧化而具有一定的抗衰老作用。

2.3 SJP对还原力的影响

表 2 SJP 对还原力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Table 2 Effects of SJP on the reducing power ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

组别	质量浓度/(mg/mL)	A_{700}
BHT	0.002	0.13±0.013 [a]
	0.003	0.22±0.011 [b]
	0.017	0.81±0.049 [c]
	0.033	1.22±0.086 [d]
SJP	0.033	0.01±0.003 [e]
	0.067	0.03±0.006 [e]
	0.333	0.17±0.002 [f]
	0.667	0.28±0.013 [g]

注：组间不同字母表示有显著差异（p<0.05）。

氧化还原反应中给出电子而自身发生氧化的能力称为还原力，它是物质抗氧化的重要表现。采用普鲁

士蓝法测定物质的还原能力，反映其抗氧化能力。吸光值越大表示样品还原力越强，抗氧化能力亦越强[29]。实验结果表明，随 SJP 质量浓度增加，吸光值呈现上升趋势，还原力随吸光值增加而增强，且其还原力与剂量之间呈正相关。

2.4 SJP对Fe^{2+}螯合力的影响

表 3 SJP 对 Fe^{2+}螯合力的影响

Table 3 Effects of SJP on the Fe^{2+} chelation

组别	质量浓度/(mg/mL)	A_{562}	Fe^{2+}螯合率/%
对照		0.34±0.023	
EDTA	0.002	0.21±0.028 **	36.95±3.92
	0.003	0.15±0.012 **	55.85±3.44
	0.004	0.09±0.010 **	72.57±3.06
	0.005	0.04±0.007 **	85.71±2.06
SJP	0.033	0.32±0.015	5.60±3.28
	0.067	0.28±0.022 **	17.41±3.74
	0.167	0.24±0.012 **	28.97±2.78
	0.333	0.23±0.019 **	34.18±2.07

Fe^{2+}螯合力测定是在 Fenton 反应（H_2O_2 与 Fe^{2+}的反应生成·OH）之前，具有螯合 Fe^{2+}活性的药物降低过渡金属酶（可导致脂质过氧化）浓度，减少 ROS 的产生并减弱由此引起的氧化损伤[30]，故在抗氧化性测定中显得很重要。实验结果表明，随 SJP 质量浓度增加，对 Fe^{2+}的螯合能力随之增强。当其质量浓度达到 0.333 mg/mL 时，螯合率可达到 31.55%。但螯合作用远不如 EDTA 强。

2.5 SJP对·OH清除能力的影响

表 4 SJP 对·OH 清除能力的影响

Table 4 Effects of SJP on the scavenging ability of ·OH

组别	质量浓度/(mg/mL)	A_{536}	SR/%
空白组		0.12±0.011 **	
对照组		0.02±0.009	
BHT	0.002	0.03±0.007	4.84±2.33
	0.003	0.04±0.008	12.54±3.24
	0.008	0.05±0.008 **	32.08±3.69
	0.017	0.10±0.009 **	74.91±3.64
SJP	0.167	0.06±0.010 **	37.99±3.83
	0.333	0.08±0.011 **	64.16±2.86
	0.667	0.09±0.007 **	75.27±3.85
	1.000	0.11±0.018 **	89.07±3.81

体内·OH 主要由过氧化物负离子与过氧化氢反应生成。·OH 是一种体内破坏生物分子最强的活性氧。实验采用铁-邻二氮菲法测定 SJP 对·OH 的清除能力。通过 Fenton 反应（H_2O_2/Fe^{2+}体系）产生·OH，将邻二氮菲-Fe^{2+}溶液氧化成邻二氮菲-Fe^{3+}溶液。用邻二氮菲-Fe^{2+}（橙红色）的褪色程度来表示·OH 的清除程度。

实验结果显示，BHT 组与 SJP 组的吸光值在空白与对照组的范围内且呈上升趋势，表明二者均有作用。随 SJP 质量浓度增加，清除率也随之增强。与 BHT 组相比，可看出高浓度的 SJP 对·OH 具有明显的清除作用。·OH 与衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬等有关，·OH 清除率是反映药物抗氧化作用的重要指标。

2.6 SJP对H_2O_2清除能力的影响

H_2O_2 是由两个电子还原 O_2 生成的，在 O_2 和过渡金属离子存在的情况下，H_2O_2 可通过 Fenton 反应生成·OH。由下表可知，随着 SJP 质量浓度逐渐增大，清除率越大，对 H_2O_2 的清除能力越强。与阳性对照组相比，可看出 SJP 具有清除 H_2O_2 的能力。在人体内，许多生物膜（如细胞线粒体膜）以及胞浆中均会产生 H_2O_2，因细胞中许多细胞器均含生物膜结构，故生物膜的过氧化病变对健康的影响可想而知[31]。

表 5 SJP 对 H_2O_2 清除能力的影响

Table 5 Effects of SJP on the scavenging ability of H_2O_2

组别	质量浓度/(mg/mL)	V/mL	SR/%
对照组		0.35±0.036	
BHT	0.008	0.27±0.024 **	19.32±3.39
	0.017	0.22±0.027 **	36.71±3.39
	0.033	0.18±0.023 **	51.69±3.51
SJP	0.167	0.25±0.020 **	27.05±3.39
	0.333	0.19±0.026 **	45.89±3.96
	0.667	0.16±0.017 **	55.07±3.04

2.7 SJP对$O_2^{\cdot-}$清除能力的影响

表 6 SJP 对 $O_2^{\cdot-}$清除能力的影响

Table 6 Effects of SJP on the scavenging ability of $O_2^{\cdot-}$

组别	质量浓度/(mg/mL)	A_{560}	SR/%
对照组		0.47±0.028	
SJP	0.033	0.26±0.016 **	44.81±3.45
	0.067	0.15±0.009 **	64.48±2.02
	0.133	0.07±0.013 **	82.62±0.98
	0.267	0.05±0.009 **	87.81±1.85

体内 $O_2^{\cdot-}$不发生化学变化时对人体无害，但与·OH 结合后的产物可损坏细胞 DNA，破坏人类机体功能。生物体内 $O_2^{\cdot-}$能长时间地攻击靶向目标，且对细胞具有毒性作用，它与人体的衰老息息相关。实验结果表明，随 SJP 质量浓度增加，清除率随之增加，

说明 SJP 具有清除 $O_2\cdot^-$的作用。

3 结论

3.1 海参广泛分布于世界各海洋中。我国南海沿岸种类较多，约有 20 余种海参可供食用，其中以刺参的质量为最佳[32]。海参粗多糖是从海参中提取的海洋生物制剂，含多糖和多肽，在医药领域有巨大应用潜力，具降血脂、抗肿瘤、降血糖、抗病毒、体内外抗氧化及清除 ROS 等作用。ROS 是机体内最常见也是最重要的自由基，在细胞信号传导和保持机体功能上起很大作用。由于带有不成对电子，极易发生得电子或失电子的反应，一旦生成又会引发其他物质生成自由基，由此引发连锁反应。过高的 ROS 水平会对细胞和基因结构造成损伤，ROS 和许多疾病都有着密切的关系，近年来对 ROS 的研究已成为现代生命科学的热点[33]。

3.2 实验结果表明，SJP 对脂质过氧化有抑制作用，具有还原力和 Fe^{2+}螯合能力，对·OH、H_2O_2、$O_2\cdot^-$也具有一定的清除作用。大部分 ROS 作为呼吸链正常能量生成的副产物，在线粒体产生。线粒体主要通过调整 ROS 的生成以及能量代谢来实现其生理功能[34]；恶性细胞中的线粒体结构和功能与正常细胞中的不同，癌细胞中的线粒体过量产生 ROS，通过其诱导基因组不稳定、修饰基因表达与参与信号通路来诱使癌症的发展[35]，因此保护线粒体具有重要意义。

3.3 线粒体功能障碍（ATP 合成减少、活性氧增多、Ca^{2+}紊乱和细胞凋亡等特征[36]）导致细胞功能被破坏，引起心血管与神经系统等多种疾病，而这些疾病正是当今损害人类健康的重大疾病，线粒体已成为研究与治疗疾病的新方向。而 SJP 可通过抑制线粒体脂质过氧化与清除 ROS 来保护线粒体，为相关疾病的治疗、新药研发以及功能性食品开发提供了新思路。

参考文献

[1] 王平远,高丽,许豪文.运动及衰老过程中线粒体 ROS 机制的探讨[J].山东体育学院学报,2003,19(2):36-39
WANG Ping-yuan, GAO Li, XU Hao-wen. Approachment of ROS in the mitochondria during exercise and aging [J]. Journal of Shandong Physical Education Institute, 2003, 19 (2): 36-39

[2] 李兴太,张春英,仲伟利,等.活性氧的生成与健康和疾病关系研究进展[J].食品科学,2016,37(13):257-270
LI Xing-tai, ZHANG Chun-ying, ZHONG Wei-li, et al. Advances in generation of reactive oxygen species associated with health and diseases [J]. Food Science, 2016, 37(13): 257-270

[3] SOHAL R S, SOHAL B H. Hydroge peroxide release by mitochondria increases during aging [J]. Mechanisms of Ageing and Development, 1991, 57(2): 187-202

[4] Shigenaga M K, Hagen T M, Ames B N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(23): 10771-10778

[5] 李兴太,纪莹.线粒体氧化应激与天然抗氧化剂研究进展[J].食品科学,2015,36(7):268-277
LI Xing-tai, JI Ying. Recent advances in mitochondrial oxidative stress and natural antioxidants [J]. Food Science, 2015, 36(7): 268-277

[6] 韩秋菊,马宏飞.海参多糖的提取与纯化研究[J].安徽农业科学,2012,40(14):8071-8072,8074
HAN Qiu-ju, MA Hong-fei. Extraction and purification of polysaccharides in sea cucumber [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(14): 8071-8072, 8074

[7] 盛卸晃.刺参多糖对神经细胞作用的研究[D].济南:山东大学,2012
SHENG Xie-huang. Study of the effect of sulfated polysaccharide purified feom the sea cucmber *stichopus iaponicus* on neural cells [D]. Jinan: Shandong University, 2012

[8] 张祺,李学敏,李兆杰,等.海参岩藻聚糖硫酸酯对巨噬细胞的调节作用及信号通路研究[J].中国药理学通报,2015,31(1):87-92
ZHANG Qi, LI Xue-min, LI Zhao-jie, et al. Immunomodulatory effects of sea cucumber fucoidan on macrophage and the signaling pathways [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2015, 31(1): 87-92

[9] BERTEAU O, MULLOY B. Sulfated fucans fresh perspectives structures functions and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active towards this class of polysaccharide [J]. Glycobiology, 2003, 13(6): 29-40

[10] LUO L, WU M, XU L, et al. Comparison of physicochemical characteristics and anticoagulant activities of polysaccharides from three sea cucumbers [J]. Marine Drugs, 2013, 11(2): 399-417

[11] 李学鹏,王祺,励建荣,等.海参酶解液的体外抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2014,35(24):100-103
LI Xue-peng, WANG Qi, LI Jian-rong, et al. Study on the antioxidant activity of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) enzymatic hydrolysate *in vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(24): 100-103

[12] 许静,解秋菊.海参脏器多糖体外抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2011,32(12):29-31
XU Jing, XIE Qiu-ju. Study on antioxidant activity of polysaccharide from *Holothurian Harslet in Vitro* [J]. Food Research and Development, 2011, 32(12): 29-31

[13] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356

[14] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. Analytical Biochemistry, 1979, 95(2): 351-358

[15] Michele A S, Jhon Z, Alain Y F, et al. Ischemic injury to rat forebrain mitochondria and cellular calcium homestasis [J]. Biochimica Et Biophysica(BBA)-Molecular Cell Research, 1992, 1134(3): 223-232

[16] 杨静,白冰,王宁,等.考马斯亮蓝法对烟草薄片涂布液中蛋白质含量的测定[J].湖北农业科学,2017,56(5):946-947,950
YANG Jing, BAI Bing, WANG Ning, et al. Determination of protein content in reconstituted tobacco coating liquid by coomassie brilliant blue method [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2017, 56(5): 946-947, 950

[17] ZHAO J, LIU T, MA L, et al. Antioxidant and preventive effects from *Nymphaea candida* flower on *in vitro* immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 497673: 1-8

[18] XU X M, CAO R Y, HE L, et al. Antioxidant activity of hydrolysates derived from porcine plasma [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(11): 1897-1903

[19] Mandal S, Hazra B, Srakar R, et al. Assessment of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging activity of methanolic extract of Caesalpinia crista leaf [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 173768: 1-11

[20] LIN Z, ZHU D, YAN Y, et al. An antioxidant phyto-therapy to rescue neuronal oxidative stress [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 519517: 1-7

[21] Zhao G R, Xiang Z J, Ye T X, et al. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng* [J]. Food Chemistry, 2006, 99(4): 767-774

[22] Fontana M, Mosca L, Rosei M A. Interaction of enkephalines with oxyradicals [J]. Biochemical Pharmacology, 2001, 61(10): 1253-1257

[23] 李春艳,常亚青.海参的营养成分介绍[J].科学养鱼,2006,2:71-72
LI Chun-yan, CHANG Ya-qing. Introduction of nutritional components of sea cucumber [J]. Scientific Fish Farming, 2006, 2: 71-72

[24] 罗毅,潘细贵,刘刚,等.苯酚-硫酸法测定多糖含量显色方式的优选[J].中国中医药信息杂志,2005,12(1):45-46
LUO Yi, PAN Xi-gui, LIU Gang, et al. Optimization of the way of coloration in the processof determining polysaccharide content by phenol-sulfuric acid method [J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2005, 12(1): 45-46

[25] 杨勇杰,姜瑞芝,陈英红,等.苯酚硫酸法测定杂多糖含量的研究[J].中成药,2005,27(6):706-708
YANG Yong-jie, JIANG Rui-zhi, CHEN Ying-hong, et al. Determination of sugers in heteropolysaccharide by phenol-sulfuric acid method [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2005, 27(6): 706-708

[26] 刘晓麒,曹恩华.脂质过氧化引起的 DNA 损伤研究进展[J].生物化学与生物物理进展,1994,21(3):218-222,281-282
LIU Xiao-qi, CAO En-hua. DNA damage induced by lipid peroxidation [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1994, 21(3): 218-222, 281-282

[27] HALLIWELL B. Vitamin C and genomic stability [J]. Mutation Research/fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001, 475(1): 29-35

[28] HORTON A A. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity [J]. Critical Reviews in Toxicology, 1987, 18(1): 27-29

[29] 张德华,邓辉,乔德亮.植物多糖抗氧化体外实验方法研究进展[J].天然产物研究与开发,2015,27(4):747-751
ZHANG De-hua, DENG Hui, QIAO De-liang. Research progress on experimental methods on testing *in vitro* antioxidant activity of plant polysaccharides [J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(4): 747-751

[30] 韦豪华,张红玲,李兴太.芪参补气药茶保护线粒体及其机制[J].大连民族大学学报,2017,19(3):216-221
WEI Hao-hua, ZHANG Hong-ling, LI Xing-tai. Mitochondrial protection of Astragalus membranaceus/ Codonopsis pilosula Qi-invigorating herbal tea and its underlying mechanism [J]. Journal of Dalian Minzu University, 2017, 19(3): 216-221

（下转第 166 页）

[31] 赵保路.自由基、营养、天然抗氧化剂与衰老[J].生物物理学报,2010,26(1):26-36
ZHAO Bao-lu. Free radicals, nutrition, natural antioxidant and aging [J]. Acta Biophysicas Sinica, 2010, 26(1): 26-36

[32] 展学孔,周海妹,马小花,等.海参多糖提取新工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(15):40-42
ZHAN Xue-kong, ZHOU Hai-mei, MA Xiao-hua, et al. New extraction technology of polysaccharide from sea cucumber [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(15): 40-42

[33] 敖纯.虫茶醇提取物对超氧阴离子和羟基自由基的清除作用[J].肉类研究,2010,4:60-64
AO Chun. Scavenging effects of sandy-tea ethanol extract on super oxide anion and hydroxyl radical [J]. Meat Research, 2010, 4: 60-64

[34] Fernandes M A, Marques R J, Vicente J A, et al. Sildenafil citrate concentrations not affecting oxidative phosphorylation depress H_2O_2 generation by rat heart mitochondria [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2008, 309(1): 77-85

[35] Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, et al. Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: novel targets for anticancer therapy [J]. Journal of Cellular Physiology, 2016, 231(12): 2570-2581

[36] 熊燕,张梅,陈菲,等.线粒体功能障碍与心血管疾病[J].中国病理生理杂志,2013,29(2):364-370
XIONG Yan, ZHANG Mei, CHEN Fei, et al. Roles of mitochondrial dysfunction in cardiovascular diseases [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2013, 29(2): 364-370

现代食品科技