

甜菜碱保护细胞免受 AAPH 损伤的研究

张虹, 张猛猛, 赖富饶, 闵甜, 武文佳, 王光, 李晓凤, 吴晖

(华南理工大学食品工程与科学学院, 广东广州 510640)

摘要: 为了评价甜菜碱的抗氧化活性, 本文研究了甜菜碱对受 AAPH 诱导产生的自由基损伤的红细胞和肝细胞的影响。结果显示当甜菜碱的浓度达到 200 mmol/L 时, AAPH 诱导的红细胞氧化溶血率降低了 54.19%, MDA 降低了 4.32 nmol/mg; 电镜下阳性损伤组红细胞膜皱缩明显、棘突较多、呈星状改变, 而保护组膜只是略有皱缩, 恢复至阴性组正常细胞形态; 同时经甜菜碱处理, 阳性损伤组红细胞内 ROS 含量降低了 57.16 IU/mg, SOD、CAT、GPx 酶活分别降低了 9.84 mU/mg、13.91 mU/mg 和 43.59 mU/mg, 并与阴性对照组无显著性差异; 在正常肝细胞中, 50 mmol/L 甜菜碱使 AAPH 损伤的细胞内 MDA 下降了 0.21 nmol/mg, SOD、CAT 酶活则分别下降了 173.21 U/mg 和 53.9 U/mg, 与阴性组正常组肝细胞无显著性差异。综合分析, 甜菜碱能很好的保护细胞免受 AAPH 产生的自由基的损伤, 说明甜菜碱具有良好的抗氧化作用。

关键词: 甜菜碱; 抗氧化活性; 红细胞; 肝细胞

文章编号: 1673-9078(2016)6-18-23

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.004

Protective Effects of Betaine on 2,2-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidative Stress in Cells

ZHANG Hong, ZHANG Meng-meng, LAI Fu-rao, MIN Tian, WU Wen-jia, WANG Guang, LI Xiao-feng, WU Hui
(School of Food Sciences and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To evaluate the antioxidant activities of betaine, its effect on erythrocytes and liver cells damaged by AAPH-generated free radicals were studied. The results revealed that betaine (200 mmol/L) treatment effectively reduced AAPH-induced erythrocyte hemolysis and MDA content by 54.19% and 4.32 nmol/mg, respectively. Under scanning electron microscope, the cell membranes of erythrocytes with AAPH-induced damage showed apparent shrinkage, a large number of thorny projections, and changes into a star shape; however, the cell membrane of the erythrocytes treated with betaine only exhibited slight shrinkage, and retained the normal cellular shape as seen in undamaged control cells. Moreover, after betaine treatment, the level of reactive oxygen species (ROS) in the erythrocytes with AAPH-induced damage declined by 57.16 IU/mg, and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) decreased by 9.84 mU/mg, 13.91 mU/mg, and 43.59 mU/mg, respectively, which were not significantly different from those of the control. After liver cells with AAPH-induced damage were treated with 50 mmol/L betaine, the MDA level dropped by 0.21 nmol/mg and the SOD and CAT activities decreased by 173.21 U/mg and 53.9 U/mg, respectively, which were not significantly different from the control. In conclusion, betaine can effectively protect cells from the damage caused by AAPH-generated free radicals, showing that betaine has notable antioxidant activity.

Key words: betaine; antioxidant activity; erythrocyte; liver cell

甜菜碱是一种广泛分布于动植物及微生物中的天然产物, 是枸杞、黄芪和甜菜等的活性成分^[1]。它具有多种生理活性, 如作为渗透调节剂, 保护细胞在高渗条件下免受损伤; 作为甲基供体, 为细胞内的信号通路提供甲基。此外, 甜菜碱还具有多种药理活性,

收稿日期: 2016-02-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201330); 广州市科技攻关项目(201300000202)

作者简介: 张虹(1982-), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物开发

通讯作者: 吴晖(1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与天然产物化学

如治疗血管类, 脂肪肝类疾病, 改善胆汁类肝病症状等^[2]。在低温、高盐等条件下, 甜菜碱可通过稳定细胞内抗氧化酶活力来提高植物对逆境的抵抗能力^[3,4]。在给受酒精、CCL₄ 等有害因子损伤的大鼠喂食甜菜碱后, 大鼠所受损伤得到极大缓解, 其机制可能与甜菜碱使机体抗氧化酶活力恢复至正常水平有关^[5-7]。抗氧化酶是细胞抗氧化防御系统中的重要组成部分, 因此从这些报道中可知, 甜菜碱对机体的抗氧化能力有着重要影响。但是目前对于甜菜碱的抗氧化能力并未有研究报道。

在以往的有关抗氧化的研究报道中, 大多数都是

从清除自由基的能力、还原能力来评价抗氧化剂的抗氧化能力。但该类方法有着极大的局限性,如不能判断待测样品对机体的毒性及在机体内的抗氧化效果,不同的自由基反应体系会导致检测结果出现较大差异。以细胞为载体的体外生物学方法因具有完整的活性作用网络,其评价结果的认可度相对较高^[8]。偶氮引发剂 2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷)二盐酸盐(AAPH)在水溶液中经热分解会生成相对稳定的过氧自由基,并且会引发自由基链式反应,产生更多种类的自由基,更接近于机体内的情况。因此,本文以红细胞和肝细胞为模型,研究在AAPH诱导产生的自由基的损伤下,甜菜碱的抗氧化作用,为进一步拓展甜菜碱的应用奠定科学基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 原料与试剂

甜菜碱、MTT试剂、AAPH购自阿拉丁试剂上海有限公司,抗凝羊血,广州鸿泉生物科技有限公司,羊血活性(ROS)酶联免疫分析试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司,LO2细胞系,本实验室保存,DMEM培养基、胰蛋白酶购自GIBCO;胎牛血清(FBS),购自hyclone;抗氧化指标检测试剂盒(MDA、T-SOD、GSH-PX、CAT)以及BCA蛋白检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.1.2 主要仪器

SpectrumLab 752S紫外可见分光光度计,上海棱光技术公司;Infinite M1000 Pro酶标仪,瑞士Tecan公司;电镜EM 3700。

1.2 方法

1.2.1 AAPH诱导红细胞溶血率的测定

以红细胞氧化溶血为模型^[9],通过甜菜碱对AAPH引发细胞氧化溶血的抑制情况评估其抗氧化活性。

4℃下,抗凝羊血2000 r/min离心10 min去血浆,pH 7.4的PBS缓冲液洗涤三次,每次1200 r/min离心10 min,确保红细胞密度一致,配成20%悬液。0.2 mL红细胞悬液加入0.2 mL不同浓度样品溶液中,混合物于37℃下培养20 min,再加入0.4 mL 120 mM AAPH,同样条件下培养2.5 h,最终反应体系用8 mL PBS缓冲液稀释,800 r/min离心10 min,上清在540 nm处测吸光度A₁;阳性对照组以0.2 mL PBS缓冲液代替样品,测得吸光度为A₂;阴性对照组以0.2 mL

PBS缓冲液代替样品,0.4 mL PBS缓冲液代替AAPH,测得吸光度为A₃;样品自身对红细胞损伤以0.4 mL PBS缓冲液代替AAPH,测得吸光度为A₄;为获得完全溶血产物,反应终体系加入8 mL纯净水,测得吸光度为A₀。

甜菜碱保护组溶血损伤率% = $A_1/A_0 \times 100$

阳性对照组AAPH氧化溶血损伤率% = $A_2/A_0 \times 100$

阴性对照组红细胞自身溶血损伤率% = $A_3/A_0 \times 100$

甜菜碱毒性组对红细胞的损伤率% = $A_4/A_0 \times 100$

1.2.2 红细胞内MDA的测定及电镜扫描

对1.2.1剩余未溶血红细胞进行收集,PBS缓冲液清洗后悬浮于600 μL超纯水中存于-80℃冰箱,按试剂盒标明方法测量MDA。

1.2.1处理后红细胞以1:100的浓度加入2.5%戊二醛(PBS缓冲液配制),4℃固定2 h,PBS缓冲液清洗3次,50%、70%、80%、90%、95%、100%酒精逐级脱水各一次,每次10 min,取出标本低温干燥,喷金,电镜(EM-3700)下对阴性对照组、阳性对照组和甜菜碱保护组进行扫描,观察细胞形态结构变化^[9]。

1.2.3 红细胞胞内ROS含量及抗氧化酶活性的测定:

1.2.2处理后样品按试剂盒标明方法测量细胞内ROS含量和CAT、SOD、GPx等酶酶活。

1.2.4 甜菜碱对LO2细胞的毒性作用

将LO2细胞放于含胎牛血清FBS(10%)、双抗(终浓度为各100 U/mL)的DMEM培养基中培养,细胞培养箱设置为饱和湿度、5% CO₂、37℃。取对数生长期的LO2细胞,按10⁵个/mL接种到96孔板中,每孔约100 μL。24 h后更换含有不同浓度药物的新鲜培养基,每个浓度三个重复,以不含药物的培养基为阴性对照,37℃孵育24 h后,每孔加入10 μL CCK8,继续孵育1 h后,于450 nm测定吸光值。

细胞存活率 = $\frac{\text{加药组 OD 值}}{\text{阴性对照组 OD 值}} \times 100\%$

1.2.5 LO2细胞内抗氧化指标的测定

将处于对数生长期的LO2细胞按10⁵个/mL加入6 cm培养皿中,24 h后分别加入2 mM AAPH,50 mM BET,2 mM AAPH+50 mM BET。加药处理24 h后,收集细胞,反复冻融裂解,12000离心10 min,取上清,按照试剂盒说明书测定总蛋白,MDA,CAT和SOD酶活。

样品抗氧化酶活力 = $\frac{\text{检测体系酶活力}}{\text{样品中蛋白浓度}}$

1.2.6 体外抗氧化能力测定

甜菜碱清除二苯代苦味酰基(DPPH·)^[10]能力的

测定。2 mL 样品溶液，加入 2 mL DPPH 乙醇溶液 (0.005%, *m/V*)，混匀，避光静置 30 min，517 nm 波长下测定其吸光度，记样品吸光度 A_1 ，空白对照吸光度 A_0 ，样品本底吸光度为 A_2 ，每组 3 个平行。

$$\text{DPPH 清除率}\% = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

甜菜碱清除 ABTS^[11]能力的测定。配制 ABTS⁺ 储备液：用 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶解 ABTS，配成 7 mmol/L ABTS 储备液，室温下避光静置 12~16 h。配制 ABTS⁺ 测定液：将 ABTS⁺ 储备液以磷酸盐缓冲液 (10 mmol/L, pH 7.4) 稀释，使其吸光度在 734 nm 波长处达到 0.700 ± 0.020 。测定时取 2.5 mL ABTS⁺ 测定液，加入 50 μL 样品溶液，准确反应 10 min，测定 734 nm 波长处的吸光度，记样品吸光度 A_1 ，空白对照吸光度 A_0 ，样品本底吸光度为 A_2 ，每组 3 个平行。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 清除率}\% = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

1.2.7 数据处理分析

每组数据平行测定 3 次取均值，Origin8.6、SPSS 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 甜菜碱对 AAPH 诱导的红细胞溶血的保护作用

红细胞氧化模型是通过添加抗氧化剂来抑制自由基诱发的红细胞损伤，测定反应终体系中溶血抑制率来评价保护剂细胞内抗氧化活性的一种方法，由于其氧化响应灵敏，代谢机制简单，是建立抗氧化评价方法的理想模型^[8]。

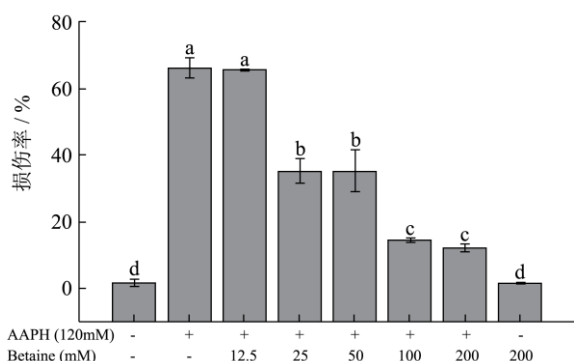


图 1 不同浓度甜菜碱对于 AAPH 引发的红细胞溶血的抑制作用
Fig.1 Inhibitory effects of various concentrations of betaine on AAPH-induced erythrocyte hemolysis

注：a-f 不同字母表示各组间差异显著 ($p < 0.05$)，相同字母表示各组间差异不显著 ($p > 0.05$)，同图 2，图 4~7，图 9~11。

图 1 中，阴性对照组红细胞损伤率为 1.8%，甜菜碱毒性测定组细胞损伤率为 1.5%，接近阴性对照组，

说明甜菜碱自身对实验结果不造成影响；阳性对照组 AAPH 氧化损伤率为 66.32%；不同浓度甜菜碱保护下 AAPH 引发的氧化溶血得到不同程度的抑制，样品浓度与抑制程度基本呈现正相关，当样品终浓度达到 200 mmol/L 时，保护组损伤率降至 12.13%，接近阴性正常细胞。在廖^[9]的文章中，香叶木素具有较好的细胞内抗氧化活性，在 AAPH 诱导自由基产生的氧化损伤中，可以显著提高红细胞的耐受力，将溶血率降到正常水平。这与本实验得到的结果非常相近，说明甜菜碱同样具有较高的细胞内抗氧化活性，能够很好的抑制由 AAPH 诱导的红细胞溶血。

2.2 甜菜碱对红细胞细胞膜的影响

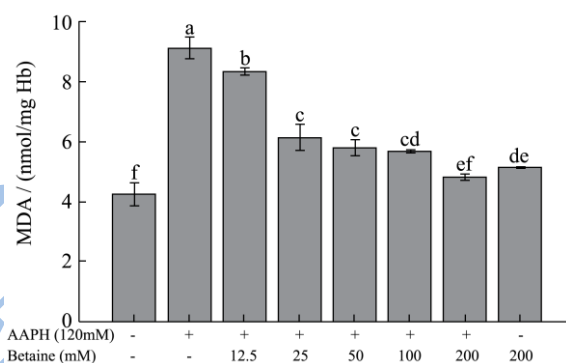


图 2 不同浓度甜菜碱保护下 AAPH 氧化损伤红细胞 MDA 变化

Fig.2 Effect of betaine on changes in MDA content of erythrocytes with AAPH-induced oxidative damage

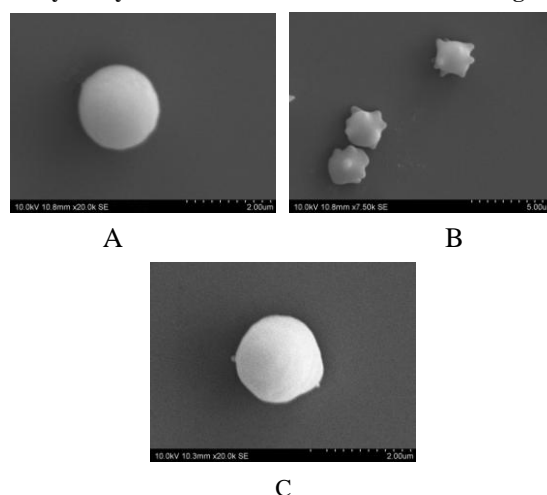


图 3 几种不同处理的羊红细胞电镜图

Fig.3 Scanning electron micrographs of sheep erythrocytes with different treatments

注：A-正常羊红细胞；B-AAPH 损伤红细胞；C-甜菜碱保护后红细胞。

AAPH 引发的自由基链式反应开始后，迅速进攻细胞膜中的不饱和脂肪酸 (LH)，诱导磷脂层发生脂质过氧化反应，细胞内 MDA 含量随之增加，并且与膜

蛋白游离氨基交联, 逐步氧化改变细胞膜的结构^[12]。

图 2 显示, 相较阴性组 4.23 nmol/mg, AAPH 诱导损伤的阳性组 MDA 含量显著增高至 9.12 nmol/mg; 而甜菜碱保护下 MDA 的含量则不断下降至 4.8 nmol/mg, 接近阴性正常细胞, 说明甜菜碱可以阻止细胞膜的脂质过氧化反应, 减少 MDA 堆积。图 3-A 为阴性组正常羊红细胞, 呈圆形, 表面光滑, 边缘整齐。图 3-B 为阳性损伤组, 细胞膜皱缩明显、棘突较多、呈星状改变。图 3-C 为保护组, 细胞膜表面略有皱缩、基本结构得以保持。

MDA 和电镜扫描的结果表明, 甜菜碱的预处理保护了细胞膜免受自由基的氧化攻击, 其机制可能是甜菜碱清除了 AAPH 所产生的自由基, 同时, 甜菜碱促进 S 腺苷甲硫氨酸的生成, S 腺苷甲硫氨酸一方面促进细胞内谷胱甘肽的生成, 而谷胱甘肽是细胞非酶促抗氧化体系的重要组成部分, 因此增加了细胞的抗氧化能力, 另一方面 S 腺苷甲硫氨酸能够调节细胞内磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸的比例, 由此稳定细胞膜的磷脂双分子层结构, 保护细胞膜, 增强细胞对自由基的耐受能力, 也有研究指出甜菜碱可通过大量累积在细胞膜表层形成大面积亲水胶体, 产生一个可与蛋白质相互作用的疏水骨架, 从而保护细胞膜^[13]。

2.3 甜菜碱对红细胞内 ROS 和抗氧化酶的影响

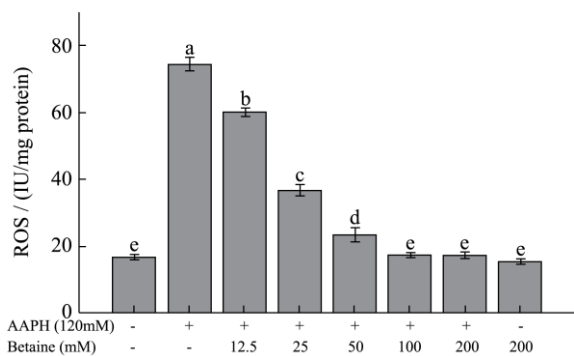


图 4 不同浓度甜菜碱保护下 AAPH 氧化损伤红细胞 ROS 变化

Fig.4 Effect of betaine on changes in ROS content of erythrocytes with AAPH-induced oxidative damage

超氧阴离子自由基、羟基自由基、单线态氧以及由这些自由基与细胞内分子反应所产生的、过氧化亚硝基等非自由基分子离子都被称为活性氧, 严重的损害了人们的健康。人体内由 SOD、CAT 和 GPx 构成胞内酶防御系统, 消除自由基活性氧, 进行体内抗氧化物质的循环代谢, 因此这些抗氧化酶活力变化与细胞内活性氧的含量、细胞内抗氧化反应均密切相关

[14]。

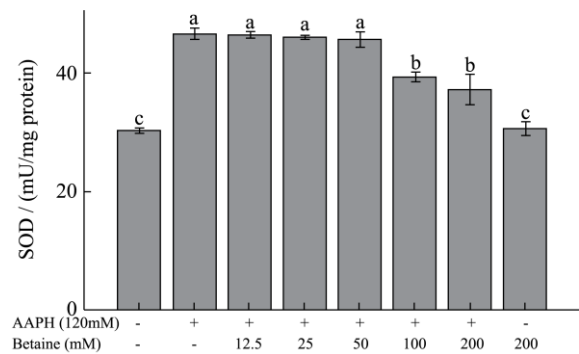


图 5 不同浓度甜菜碱保护下 AAPH 氧化损伤红细胞内 SOD 酶的酶活变化

Fig.5 Effect of betaine on changes in SOD activity of erythrocytes with AAPH-induced oxidative damage

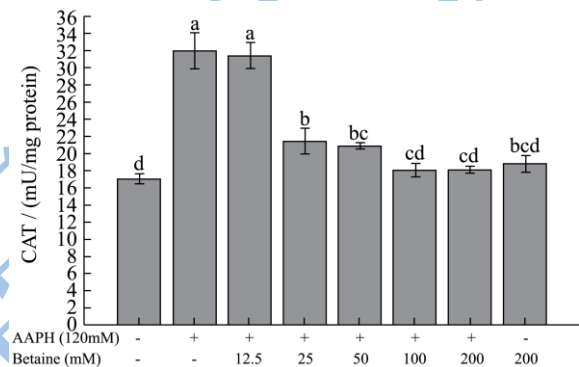


图 6 不同浓度甜菜碱保护下 AAPH 氧化损伤红细胞内 CAT 酶的酶活变化

Fig.6 Effect of betaine on changes in CAT activity of erythrocytes with AAPH-induced oxidative damage

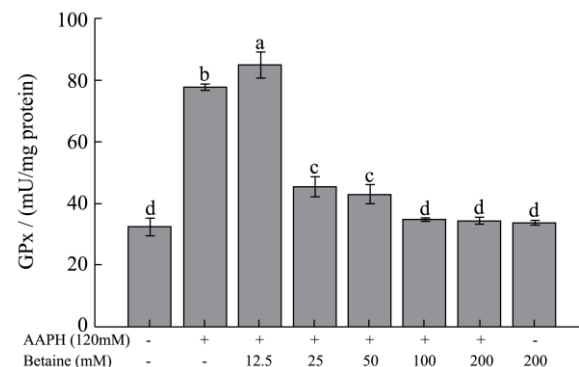


图 7 不同浓度甜菜碱保护下 AAPH 氧化损伤红细胞内 GPx 酶的酶活变化

Fig.7 Effect of betaine on changes in GPx activity of erythrocytes with AAPH-induced oxidative damage

图 4 显示, 相较阴性组 16.82 IU/mg, AAPH 诱导损伤阳性组 ROS 的含量显著增高至 74.61 IU/mg; 甜菜碱保护下 ROS 的含量不断下降, 最终降至 17.45 IU/mg, 接近阴性正常细胞, 说明甜菜碱可以抑制 ROS 的生成。同时, 甜菜碱保护下胞内抗氧化酶酶活变化

如图 5~7 所示, AAPH 诱导损伤阳性组中, 红细胞暴露在自由基攻击下, 细胞膜发生脂质过氧化, 结构改变, 胞内各种抗氧化酶 SOD、CAT、GPx 分别呈 46.63 mU/mg、31.98 mU/mg、77.84 mU/mg 的较高表达; 甜菜碱预处理增强了红细胞抗氧化能力, 减少了细胞膜损伤, 细胞内酶活随甜菜碱浓度的增高而越低, 当终浓度达到 200 mmol/L 时, 胞内抗氧化酶酶活降至 36.79 mU/mg、18.07 mU/mg、34.25 mU/mg, 均接近阴性组 30.34 mU/mg、17.02 mU/mg、32.52 mU/mg 的正常水平。

在之前的研究报道中, 植物在逆境下或者小鼠在受到有毒物质的损伤下, 其体内抗氧化酶酶活降低, 补充甜菜碱可将其抗氧化酶酶活提高至正常水平 [3-7,14]。而我们的结果与之不同, 在受到 AAPH 产生的自由基攻击下, 红细胞内的抗氧化酶酶活升高, 经甜菜碱处理后使其抗氧化酶酶活减低至正常水平。这或许是因为植物或动物在受到有害因子的损伤时, 有害因子同时抑制了其抗氧化酶酶活。而在本研究中, 当细胞的细胞膜发生过氧化作用后, 会引起细胞内的一系列生理反应, 如细胞内 ROS 含量增高, ROS 在一定的浓度范围内会激活相关的抗氧化酶, 而甜菜碱可使细胞内的 ROS 含量降低, 故而相关抗氧化酶的被激活程度有所减轻。

2.4 甜菜碱对 LO2 细胞的毒性作用

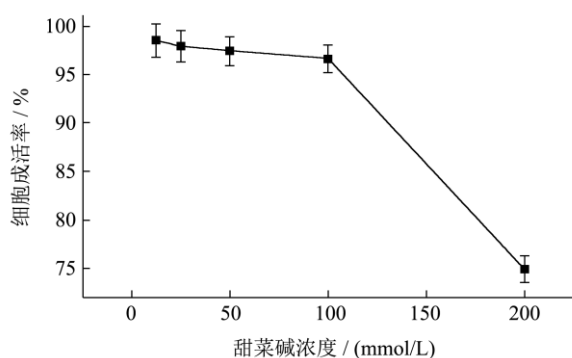


图 8 不同浓度甜菜碱作用下 LO2 细胞的存活率

Fig.8 LO2 cell survival upon betaine treatment

图 8 显示, LO2 细胞中加入甜菜碱的浓度在 100 mmol/L 内时, 细胞存活率保持在 98.45%~96.58% 之间, 对于 LO2 细胞几乎没有影响; 当浓度升至 200 mmol/L 时, 细胞存活率骤降至 74.89%。而本实验加入甜菜碱的浓度为 50 mmol/L, 为安全剂量, 不对实验造成影响。

2.5 甜菜碱对 LO2 细胞各项抗氧化指标的影

响

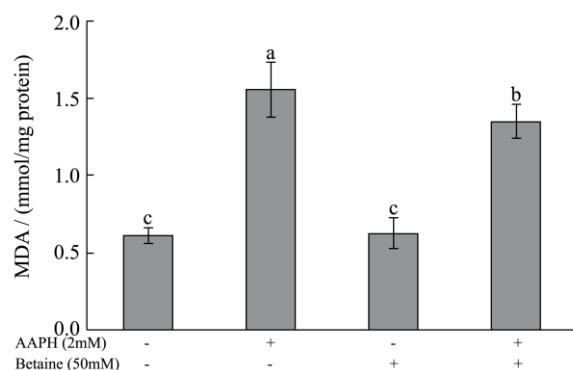


图 9 甜菜碱保护下 AAPH 氧化损伤的 LO2 细胞 MDA 的变化

Fig.9 Effect of betaine on changes in MDA content of LO2 cells with AAPH-induced oxidative damage

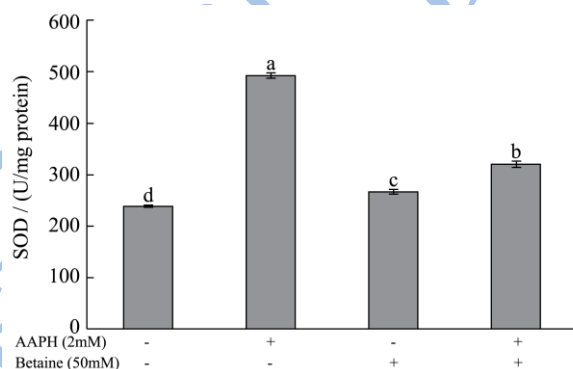


图 10 甜菜碱保护下 AAPH 氧化损伤的 LO2 细胞 SOD 的变化

Fig.10 Effect of betaine on changes in SOD activity of LO2 cells with AAPH-induced oxidative damage

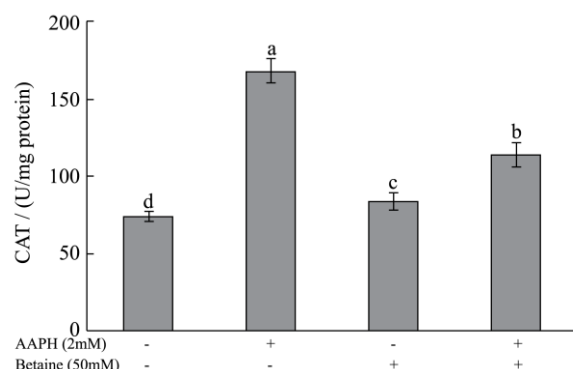


图 11 甜菜碱保护下 AAPH 氧化损伤的 LO2 细胞 CAT 的变化

Fig.11 Effect of betaine on changes in CAT activity of LO2 cells with AAPH-induced oxidative damage

红细胞是高度分化的细胞, 不含细胞核和细胞器, 其细胞内含有细胞核和线粒体等细胞器, 结构和代谢通路较红细胞更加完整, 更加接近生物体真实情况, 该模型结果能够进一步证实甜菜碱对于细胞膜的保护, 进而维系胞内抗氧化酶活性的稳定。

图 9~11 可见甜菜碱毒性试验中细胞各项抗氧化

指标的数值变化不大,说明其自身对实验不存在较大干扰。AAPH 诱导损伤阳性组细胞的 MDA 含量,胞内 SOD、CAT 酶活均较阴性组显著增高,由 0.60 nmol/mg、238.68 U/mg、73.72 U/mg 升至 1.55 nmol/mg、493.14 U/mg、167.09 U/mg,说明氧化损伤中,肝细胞胞膜结构遭到破坏,胞内抗氧化酶酶活应激性增高;而保护组较之损伤组各项指标分别回落至 1.34 nmol/mg、319.93 U/mg、113.24 U/mg,接近阴性正常细胞,进一步说明甜菜碱保护了细胞结构,进而维持胞内抗氧化酶酶活降至正常水平。

2.6 甜菜碱的自由基清除能力

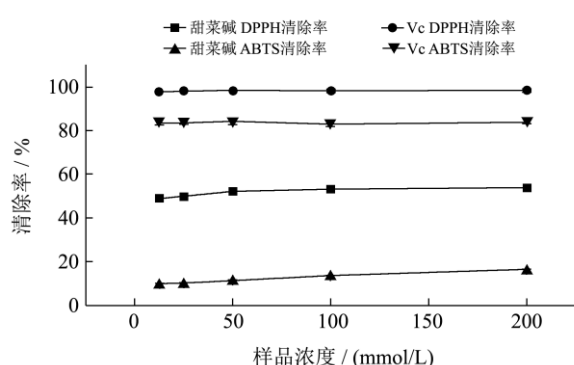


图 12 不同浓度甜菜碱、Vc 对 DPPH、ABTS 的清除能力

Fig.12 DPPH and ABTS radical scavenging activity upon treatment with different concentrations of betaine and Vc

DPPH, ABTS 是两种测定样品抗氧化活性的方法,测量简单,结果稳定、准确,因此被广泛应用。

图 12 可知,甜菜碱对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除率较低,随着浓度的升高,其清除率未有明显上升,终浓度 200mmol/L 甜菜碱对 DPPH、ABTS 清除率最高,分别是 53.56%和 15.96%。甜菜碱对这两种自由基的清除能力差别较大,也进一步说明了自由基清除实验结果的差异性。同时,这也说明了甜菜碱直接清除自由基的能力较弱,而甜菜碱对受 AAPH 诱导产生的自由基损伤的细胞有极强的保护作用,由此可推测,甜菜碱在机体内的抗氧化效果可能不仅仅依赖于其对自由基的直接清除能力,或许还存在其他间接清除自由基的方式。

3 结论

本文以 AAPH 诱导损伤的红细胞和肝细胞为模型评价了甜菜碱的抗氧化能力。结果显示:甜菜碱能够显著抑制 AAPH 诱导的红细胞溶血,并减轻了未溶血的细胞内对 AAPH 所产生的应激反应,使细胞恢复至正常状态,该结果进一步在肝细胞中得到验证。因此,甜菜碱具有良好的抗氧化能力。但是,我们同时还研

究了甜菜碱对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除作用,结果发现甜菜碱对这些自由基的清除能力较弱,这提示我们甜菜碱在以细胞为载体发挥其抗氧化功能时,其机制可能不仅是甜菜碱直接清除了自由基,还可能存在其他的间接方式,如促进 S 腺苷甲硫氨酸的生成, S 腺苷甲硫氨酸一方面能够促进细胞内谷胱甘肽的生成,而谷胱甘肽是细胞非酶促抗氧化体系的重要组成部分,因此增加了细胞的抗氧化能力,另一方面 S 腺苷甲硫氨酸能够调节细胞内磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸的比例,由此稳定细胞膜的磷脂双分子层结构,增强细胞对自由基的耐受能力,以及对抗氧化酶的酶活的调节也有一定作用。但这些还需要进一步的研究验证。本研究一方面拓展了甜菜碱的功能活性,为甜菜碱在功能型食品等领域的应用奠定了科学基础,另一方面为抗氧化功能的评价提供了一个新的角度,即抗氧化剂在机体发挥抗氧化能力的方式,可能不只有直接清除自由基一种方式。因此,在未来的抗氧化研究中,使用以细胞或是其他有机生命体为载体的研究方式,才是较为全面的抗氧化效果评价方法。

参考文献

- [1] 张猛猛,黄敏,吴晓英,等.甜菜碱对 db/db 小鼠糖尿病肾病损伤的作用[J].现代食品科技,2014,30(5):23-27
ZHANG Meng-meng, HUANG Min, WU Xiao-ying, et al. Effects of betaine on diabetic nephropathy in db/db mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 23-27
- [2] 刘燕燕,曾新安,朱思明,等.甜菜碱的生理功能与药物活性[J].现代食品科技,2014,30(5):96-100
LIU Yan-yan, ZENG Xin-an, ZHU Si-ming, et al. Physiological functions and pharmacological activities of betaine [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(1): 96-100
- [3] 郭启芳,马千全,孙灿,等.外源甜菜碱提高小麦幼苗抗盐性的研究[J].西北植物学报,2004,24(9):1680-1686
GUO Qi-fang, MA Qian-quan, SUN Can, et al. Effects of exogenous glycine betaine on the salt-tolerance of wheat [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2004, 24(9): 1680-1686
- [4] M L Ahire, P R Walunj, P B K Kishor, et al. Effect of sodium chloride-induced stress on growth, proline, glycine betaine accumulation, antioxidative defence and bacoside A content in in vitro regenerated shoots of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell [J]. Acta Physiol Plant 2013, 35: 1943-1953
- [5] Masoud Alirezai, Gholamali Jelodar, Zeynab Ghayemi, et al. Antioxidant and methyl donor effects of betaine versus

- ethanol-induced oxidative stress in the rat liver [J]. *Comp. Clin. Pathol.*, 2014, 23: 161-168
- [6] F Erman, J Balkan, U Cevikbas, et al. Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication [J]. *Amino Acids*, 2004, 27: 199-205
- [7] Feral oztyrk, Muharrem ucar, I Cetin ozturk, et al. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in sprague-dawley rats [J]. *Basic Science*, 2003, 62(2): 353-356
- [8] 何佳易.红细胞氧化模型评价抗氧化活性的方法学研究[D].扬州大学,2013
- [9] Wenzhen Liao, Zhengxiang Ning, Luying Chen, et al. Intracellular antioxidant detoxifying effects of diosmetin on 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress through inhibition of reactive oxygen species generation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62: 8648-8654
- [10] 张猛猛,田冰洁,洪秀云,等.纯化的绞股蓝皂苷的抗氧化活性研究[J].*生物技术*,2013,23(1):76-78
ZHANG Meng-meng, TIAN Bing-jie, HONG Xiu-yun, et al. Antioxidative activity of gypenosides purified [J]. *Biotechnology*, 2013, 23(1): 76-78
- [11] Zhuo Zou, Wanpeng Xi, Yan Hu, et al. Antioxidant activity of Citrus fruits [J]. *Food Chemistry*, 2016, 196, 885-896
- [12] Clemens MR, Waller HD. Lipid Peroxidation in Erythrocytes [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1987, 45: 251-268
- [13] Chadalavada S V, Rajendrakumar Reddy BVB, Reddy AR. Proline-protein interactions :pretection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 201(2): 957
- [14] 刘俊英.脯氨酸和甜菜碱对盐胁迫下加工番茄幼苗生长和生理特性的研究[D].石河子大学,2009