

干酪乳杆菌对HepG2细胞抗氧化功能的影响

陈 佩^{1,2}, 党 辉^{3,4}

(1.陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2.陕西广播电视大学, 益生菌功能及应用协同创新中心, 陕西 西安 710119; 3.陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062; 4.江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要:目的: 研究干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 对氧化应激状态下HepG2细胞抗氧化功能的影响。方法: 将培养的HepG2细胞分为3组: 对照组 (不加H₂O₂)、模型组 (加入H₂O₂)、乳杆菌组 (加入干酪乳杆菌和H₂O₂)。细胞培养至12 h和24 h时分别测定其上清液和细胞裂解液的抗氧化活性。利用4',6-二脒基-2-苯基吲哚对HepG2细胞进行染色, 在荧光显微镜下观察不同处理对细胞形态的影响。结果: 添加干酪乳杆菌12 h后, 与模型组相比, 细胞上清液中的总抗氧化力 (total antioxidant capacity, T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活力分别提高了80%、30%和124% ($P < 0.05$), 细胞裂解液中的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活力显著增加了22% ($P < 0.05$); 24 h后, 细胞上清液中的T-AOC、SOD活力、GSH-Px活力、CAT活力和过氧化物酶的活力都显著增加 ($P < 0.05$), 还原型谷胱甘肽和丙二醛的含量分别显著降低了29%和63% ($P < 0.05$)。细胞裂解液中SOD活力比模型组显著降低了20% ($P < 0.05$)。加入干酪乳杆菌后, 细胞受损数量明显减少, 降低了56%, 大部分细胞形态正常。结论: 在体外条件下, 干酪乳杆菌可以提高氧化应激状态下HepG2细胞的抗氧化能力。

关键词: 干酪乳杆菌; HepG2细胞; 抗氧化; 氧化应激; 细胞裂解液

Effect of *Lactobacillus casei* on Antioxidant Function of HepG2 Cells

CHEN Pei^{1,2}, DANG Hui^{3,4}

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China; 2. Collaborative Innovation Center for Function and Application in Probiotics, Shaanxi Radio & TV University, Xi'an 710119, China; 3. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 4. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Objective: This experiment was conducted to study the effect of *Lactobacillus casei* on antioxidant function of HepG2 cells under oxidative stress. Methods: HepG2 cells were randomly divided into 3 groups: control, model (H₂O₂ induced oxidative stress) and treatment (H₂O₂ plus *Lactobacillus casei*) groups. Antioxidant activity in culture supernatants and lysates of HepG2 cells at 12 and 48 h were measured. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining was applied to observe cell morphology in different groups by fluorescence microscopy. Results: Total antioxidant capacity (T-AOC), and glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) activities in the culture supernatant, as well as superoxide dismutase (SOD) activity in the cell lysate at 12 h in the treatment group significantly increased by 80%, 30%, 124% and 22%, respectively when compared with their counterparts in the model group ($P < 0.05$). At 24 h, the activities of T-AOC, SOD, GSH-Px, CAT and peroxidase (POD) were significantly increased ($P < 0.05$), and the content of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in the culture supernatant in the treatment group significantly decreased by 29% and 63% ($P < 0.05$); a significant decrease of 20% in SOD activity in the cell lysate was observed for the treatment group compared with the model group ($P < 0.05$). Moreover, the number of damaged cells was reduced in the treatment group than that in the model group, and most cells in the former group had normal morphology. Conclusion: The addition of *Lactobacillus casei* could increase antioxidant function of HepG2 cells under oxidative stress.

Key words: *Lactobacillus casei*; HepG2 cells; antioxidant; oxidative stress; cell lysates

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201711035

收稿日期: 2016-05-12

基金项目: 陕西省农业科技创新与攻关项目 (2015NY025); 陕西广播电视大学重点课题 (15D-08-A02)

作者简介: 陈佩 (1983—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: angelchen186@163.com

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 11-0220-05

引文格式:

陈佩, 党辉. 干酪乳杆菌对HepG2细胞抗氧化功能的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(11): 220-224. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201711035. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Pei, DANG Hui. Effect of *Lactobacillus casei* on antioxidant function of HepG2 cells[J]. Food Science, 2017, 38(11): 220-224. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201711035. <http://www.spkx.net.cn>

机体在新陈代谢过程中会产生许多活性氧^[1], 当体内自由基含量过高时, 其与生物大分子结合可造成机体损伤, 可引发癌症、关节炎、心血管等疾病^[2-3]。氧化应激会导致机体的各种组织和器官的功能逐渐下降, 加速机体衰老和死亡, 因此老化的速度可通过氧化损伤的衰减被延迟^[4]。依据自由基老化理论, 可以利用抗氧化剂中断产生活性氧的反应^[5], 但是长期使用抗氧化剂会给机体带来一系列的副作用, 如高血糖、高血压和癌症等。因此寻找开发更安全有效的天然抗氧化剂是非常必要的^[6]。

乳酸菌是指发酵糖类且主要产物为乳酸的一类无芽孢、革兰氏染色阳性细菌的总称。乳酸菌具有一系列特殊的生理功能, 如调节机体肠道菌群平衡^[7]、增强免疫力^[8]、改善血脂血糖^[9-10]、延缓衰老^[11]等。尤其近年来, 乳酸菌的抗氧化功能得到了广泛的研究。大量研究表明, 乳酸菌在体内外实验中均表现出很好的抗氧化活性, 例如Lin等^[12]研究了19株乳酸菌都具有还原能力, 能够抑制抗坏血酸的自动氧化。任大勇等^[13]从15株乳酸菌中筛选出了两株抗氧化能力强的菌株, 表明这两株乳酸菌在减轻机体氧化损伤方面具有一定的应用价值。Zhang Shuwen等^[14]从传统酸奶中分离得到的两株乳杆菌均具有良好的抗氧化能力。体外筛选出的具有抗氧化作用的干酪乳杆菌和嗜酸乳杆菌, 在大鼠体内也表现出很好的抗氧化活性^[15-16]。

本实验的干酪乳杆菌, 是在前期研究中使用化学方法筛选出的具有较好抗氧化能力的菌株^[17]。本研究拟通过HepG2细胞模型, 研究干酪乳杆菌对氧化应激状态下细胞抗氧化活性的影响, 为以后体内研究及抗氧化机理方面的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝癌细胞系HepG2细胞株 中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心; 干酪乳杆菌 江南大学食品生物技术中心菌种保藏库。

4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、二甲基亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO) 美国Sigma公司; DMEM低糖培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium)、0.25%胰酶 (含0.02%乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic

acid, EDTA))、胎牛血清、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸 美国Gibico公司; 总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒 武汉博士得生物工程有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

CO₂细胞培养箱 美国Thermo Electron Corporation公司; SW-CJ-1CV超净台 苏州安泰空气技术有限公司; 5415R冷冻离心机 德国Eppendorf公司; 恒温培养箱 上海一恒科技有限公司; VCX500超声波破碎仪 美国Sonics&Materials公司; UV-2450紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; CX41-12C02倒置显微镜 日本Olympus公司; DM2000显微镜 德国莱卡公司。

1.3 方法

1.3.1 乳杆菌菌种活化

将冻存于-80℃的乳杆菌接入MRS液体培养基中, 37℃培养18 h, 连续活化3代后用于后续实验。

1.3.2 乳杆菌的菌液制备

乳杆菌活菌液制备: 将培养好的乳杆菌在4℃条件下以6 000 r/min离心10 min, 弃上清液, 菌体用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 离心洗涤3次, 浓度调节为 1×10^9 CFU/mL。

1.3.3 细胞培养

将HepG2细胞按常规方法复苏后, 置于含有10%胎牛血清、1%非必需氨基酸、1% L-谷氨酰胺和1%双抗的低糖DMEM培养液中, 37℃、5% CO₂的培养箱中进行培养, 隔天更换一次培养液, 待细胞贴壁融合率达80%左右时, 用含0.02% EDTA的0.25%胰酶消化细胞, 按1:3传代。取对数生长期细胞进行实验。

1.3.4 H₂O₂对HepG2细胞氧化损伤模型的建立

参照文献[18]的方法有所改动, 将对数生长期中的HepG2细胞按照 2×10^5 个/mL接种到96孔板中, 每孔100 μL, 37℃、5% CO₂的培养箱中培养24 h后, 加入含H₂O₂终浓度分别为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、

0.30 mmol/L的DMEM培养液,作用2 h,弃上清液,以3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT)法检测细胞活力并以此建立氧化损伤模型。

1.3.5 MTT法检测细胞存活率

参照文献[19]的方法有所改动,96孔板中每孔加入5 g/L MTT 40 μ L,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂,孵育4 h,吸出培养液,每孔加入150 μ L的DMSO溶解结晶,37 $^{\circ}$ C培养箱中放置10 min,确保紫色结晶充分溶解,酶标仪测定各孔在570 nm波长处的吸光度。按下式计算细胞存活率(R)。

$$R/\% = \frac{A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_1 为实验组的吸光度; A_0 为对照组的吸光度。

1.3.6 实验分组

参照文献[20]的方法有所改动,用0.25%的胰蛋白酶消化收集生长处于对数生长期的HepG2细胞以 2×10^5 个/mL的细胞密度接种于6孔培养板,每孔2 mL培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养24 h。分组处理:对照组,加入2 mL DMEM培养液;模型组,加入含0.10 mmol/L H₂O₂的DMEM培养液;乳杆菌组,同时加入含0.10 mmol/L H₂O₂的DMEM培养液和干酪乳杆菌菌液(1×10^9 CFU/mL),继续培养12 h和24 h。

1.3.7 样品收集

细胞继续培养12 h和24 h后吸取培养上清装入离心管,-80 $^{\circ}$ C冻存备用。每孔用PBS洗涤3次,然后每孔加1 mL 1%的Triton X-100用吸管充分吹匀,2 000 r/min离心15 min,收集上清液即为细胞裂解液,-80 $^{\circ}$ C冻存备用。

1.3.8 指标测定

T-AOC、SOD活力、GSH含量、GSH-Px活力、CAT活力、POD活力、MDA含量测定操作方法均按照试剂盒说明书进行。

1.3.9 细胞形态观察

参照文献[21]的方法有所改动,将HepG2细胞以 2×10^5 个/mL的密度接种于6孔培养板,培养24 h使细胞爬片,后进行实验(造模及乳杆菌处理),实验结束后,PBS洗涤3次,避光加入DAPI工作液(1 μ g/mL)淹没平皿底部,染色20 min后,PBS漂洗3次后封片,最后用荧光显微镜观察。

1.4 数据分析

实验平行3组,重复3次。数据统计采用SPSS 16.0软件进行one-way ANOVA, Tukey's多重检验($P < 0.05$ 均为有统计学意义),数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 H₂O₂对HepG2细胞存活率的影响

表1 不同浓度H₂O₂对HepG2细胞存活率的影响
Table 1 Effect of different doses of H₂O₂ on HepG2 cell survival

组别	H ₂ O ₂ 浓度/(mmol/L)	存活率/%
对照组	0.00	100 ^a
	0.05	95.61 \pm 1.32 ^a
H ₂ O ₂ 组	0.10	80.74 \pm 1.11 ^b
	0.15	68.42 \pm 2.00 ^c
	0.20	50.30 \pm 3.06 ^d
	0.25	46.01 \pm 2.89 ^d
	0.30	38.46 \pm 2.54 ^e

注:同列肩标小写字母不同代表差异显著($P < 0.05$)。

H₂O₂作为一种外源性活性氧,特别容易穿透细胞膜导致DNA损伤,这种损伤在适宜的保护剂作用下,还可以被修复^[22]。由表1可以看出,与对照组相比,0.05 mmol/L浓度的H₂O₂对细胞存活率的损伤不显著,当H₂O₂浓度为0.10 mmol/L时,细胞存活率显著下降到80.74% ($P < 0.05$)。浓度为0.20、0.25、0.30 mmol/L时,细胞存活率与对照组相比都呈显著下降趋势($P < 0.05$),并且细胞存活率与H₂O₂的剂量呈现负相关性。因此,本实验选用H₂O₂浓度为0.10 mmol/L建立细胞损伤模型。丁道等^[23]选用浓度为0.30 mmol/L的H₂O₂建立了大鼠睾丸间质细胞氧化损伤模型,施红敏等^[24]选用浓度为0.60 mmol/L的H₂O₂建立了PC12细胞损伤模型。由此可见针对不同的细胞建立氧化损伤模型时,选用的H₂O₂浓度也有所不同。

2.2 干酪乳杆菌对HepG2细胞培养上清液抗氧化功能的影响

T-AOC是一个全面反映机体抗氧化能力的指标,它包括酶促与非酶促两个体系,这两个体系之间相互协同发挥抗氧化的作用^[25]。机体中清除自由基的系统主要包括SOD、GSH、GSH-Px和CAT等抗氧化物质,它们能够阻断自由基的链式扩大反应,有效保护细胞免受伤害。研究发现在人体肠道中,有一部分乳酸菌会被裂解并释放出胞内物质,如GSH-Px和SOD,当乳酸菌被裂解后,这些抗氧化酶向周围环境释放并发挥抗氧化作用^[26]。POD主要存在于细胞的过氧化物酶体中,对细胞具有保护作用。MDA是脂质过氧化的产物,它的含量直接反映体内脂质过氧化程度。有研究表明乳酸菌可以提高体内GSH的含量,降低MDA的含量,具有很强的抗氧化能力^[27]。

表2 HepG2细胞上清液在12 h和24 h时的抗氧化活性
Table 2 Antioxidant activity of culture supernatants at 12 and 24 h

时间/h	指标	对照组	模型组	乳杆菌组
12	T-AOC/ (U/mL)	4.19±0.15 ^a	3.77±0.53 ^a	6.78±0.14 ^b
	SOD活力/ (U/mL)	118.39±9.47 ^a	109.27±6.55 ^a	129.61±5.66 ^a
	GSH含量/ (mg/L)	14.67±0.33 ^b	13.21±0.45 ^a	13.96±0.43 ^b
	GSH-Px活力/ (U/mL)	64.74±7.80 ^a	118.83±10.73 ^b	154.93±9.40 ^c
	CAT活力/ (U/mL)	9.72±1.68 ^a	9.60±0.56 ^a	21.54±0.47 ^b
	POD活力/ (U/mL)	94.21±2.31 ^c	68.38±1.99 ^b	40.87±11.74 ^a
	MDA含量/ (nmol/mL)	1.97±0.33 ^a	1.90±0.14 ^a	2.35±0.22 ^a
24	T-AOC/ (U/mL)	6.21±0.04 ^b	3.08±0.02 ^a	9.01±0.10 ^c
	SOD活力/ (U/mL)	147.11±2.54 ^a	120.87±6.71 ^a	288.79±10.41 ^b
	GSH含量/ (mg/L)	17.37±0.89 ^c	14.17±0.14 ^b	10.08±1.20 ^a
	GSH-Px活力/ (U/mL)	102.19±9.12 ^b	50.37±3.49 ^a	186.95±7.32 ^c
	CAT活力/ (U/mL)	12.67±1.63 ^a	7.99±2.09 ^a	20.38±3.57 ^b
	POD活力/ (U/mL)	43.50±3.21 ^a	59.33±4.56 ^b	87.95±3.34 ^c
	MDA含量/ (nmol/mL)	2.48±0.08 ^b	5.71±0.12 ^c	2.09±0.10 ^a

注: 同行肩标字母不同代表同一处理时间下差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

从表2可以看出, 与对照组相比, 12 h时, 模型组细胞上清液中的T-AOC有所下降但差异不显著, POD活力显著降低 ($P < 0.05$), GSH-Px活力增加了54.09 U/mL, SOD、CAT活力和MDA含量无显著性差异, 表明此时模型组细胞还未进入氧化应激状态, 说明此时细胞自身尚能够通过提高GSH-Px活性来促进GSH清除 H_2O_2 , 以防护机体不受氧化损伤。24 h后, 细胞上清液中模型组的T-AOC比对照组显著降低了50% ($P < 0.05$), GSH-Px活力显著降低51% ($P < 0.05$), 同时MDA含量显著增加130% ($P < 0.05$), 表明此时细胞已表现为氧化应激状态, 引起脂质过氧化损伤, 导致细胞活性降低。杨瑞华等^[28]研究表明添加0.10 mmol/L H_2O_2 可使细胞中的MDA含量显著升高 ($P < 0.05$), 此与本实验结果一致。与模型组相比, 添加干酪乳杆菌12 h后, 细胞上清液中的T-AOC、GSH-Px活力和CAT活力都有显著提高, 分别提高了80%、30%和124% ($P < 0.05$), SOD活力有所提高, 但并不显著 ($P > 0.05$), POD活力显著降低了40% ($P < 0.05$), MDA含量增加了24%, 表明干酪乳杆菌可以提高细胞抗氧化能力, 但是对细胞也有一定的刺激作用。24 h后, 细胞上清液中的T-AOC和SOD活力显著增加了193%和139% ($P < 0.05$), GSH-Px、CAT和POD活力显著增加 ($P < 0.05$), GSH和MDA含量分别显著降低了29%和63% ($P < 0.05$)。有研究显示乳酸菌具有高效清除羟自由基和超氧化阴离子自由基的能力^[29], 并可提高人体SOD和GSH-Px活力, 降低肠道氧化应激, 增强抗氧化能力^[30]。本实验结果表明干酪乳杆菌提高了抗氧化酶的合成和分泌, 增强了细胞的抗氧化能力。

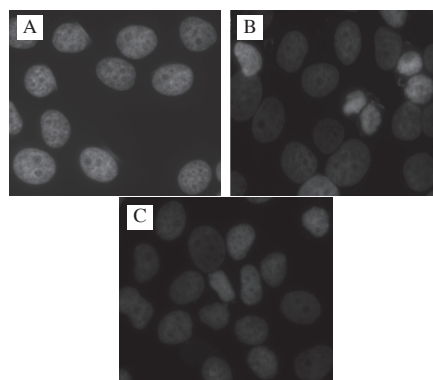
2.3 干酪乳杆菌对HepG2细胞裂解液抗氧化活性的影响

表3 细胞裂解液在12 h和24 h时的抗氧化活性
Table 3 Antioxidant activity of cell lysate at 12 and 24 h

时间/h	指标	对照组	模型组	乳杆菌组
12	SOD活力/ (U/mL)	180.65±10.23 ^{ab}	162.90±6.34 ^a	198.55±21.77 ^b
	POD活力/ (U/mL)	13.31±2.05 ^a	27.84±6.09 ^{bc}	29.07±2.97 ^c
	GSH含量/ (mg/L)	9.07±0.56 ^a	8.04±0.30 ^a	8.51±0.35 ^a
24	SOD活力/ (U/mL)	287.71±10.03 ^a	411.73±17.23 ^b	328.11±12.55 ^a
	POD活力/ (U/mL)	15.21±1.07 ^a	16.78±2.04 ^a	34.88±6.72 ^b
	GSH含量/ (mg/L)	7.45±2.30 ^a	12.75±1.00 ^{bc}	13.66±0.31 ^c

如表3所示, 添加干酪乳杆菌12 h后, 与对照组相比, 模型组细胞裂解液中SOD活力、GSH含量有所降低, 但差异不显著 ($P > 0.05$); POD活力显著提高了109% ($P < 0.05$)。结果表明此时细胞刚开始受到刺激, 胞内POD活力增加以保护细胞免受损伤。12 h后, 乳杆菌组的细胞裂解液中SOD活力与对照组相比有所升高但无显著性差异 ($P > 0.05$), 与模型组相比显著增加了22% ($P < 0.05$); POD活力与对照组相比显著增加了118% ($P < 0.05$), 和模型组相比也有所增加; GSH含量与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。表明此时细胞受到乳杆菌的氧化刺激作用, 胞内的氧化酶含量随之升高。24 h后, 与对照组相比, 模型组细胞裂解液中的SOD活力和GSH含量分别显著增加了43%和71% ($P < 0.05$); POD活力也有所增加; 乳杆菌组的SOD活力比对照组有所增加, 但比模型组显著降低了20% ($P < 0.05$); POD活力比对照组和模型组分别显著增加了129%和108% ($P < 0.05$); GSH含量比对照组显著增加了83% ($P < 0.05$), 与模型组相比也有所增加。结果表明, 此时模型组的细胞已受到强烈的氧化应激, 细胞内的抗氧化物开始大量合成, 以保护细胞免受损伤。另外, 干酪乳杆菌通过刺激提高细胞内抗氧化酶的活力, 增强了细胞的抗氧化作用, 对细胞有一定的保护作用。李盛钰等^[31]研究发现植物乳杆菌C88可提高Caco-2细胞的抗氧化酶活性, 具有较强的抗氧化活性, 此结果与本研究一致。

2.4 干酪乳杆菌对HepG2细胞形态学的影响



A.对照组; B.模型组; C.乳杆菌组。

图1 荧光显微镜下HepG2细胞核形态 (10×40)

Fig. 1 Morphology of nuclei in HepG2 cells examined by fluorescence microscope (10×40)

DAPI是一种能够与DNA强力结合的荧光染料,它可以通过完整的细胞膜,用于活细胞的染色。从图1可看出,通过DAPI染色后在显微镜下可以明显看出HepG2细胞经过不同处理后,细胞的形态变化。图1A显示正常细胞的核DNA与DAPI特异性结合,呈现均匀弥漫的荧光,细胞核轮廓清晰可见,呈圆形或椭圆形,细胞质无荧光。从图1B可看出经过H₂O₂损伤后,细胞形态明显改变,显微镜下呈现致密浓染的块状凝聚强荧光,细胞皱缩,体积变小呈不规则形状。如图1C所示,加入干酪乳杆菌后,细胞受损明显降低了56%,少数细胞发生凋亡,其细胞核发出强荧光,但大部分细胞形态正常,呈现均匀弥漫的荧光。此结果与前文结果相符,即反映出干酪乳杆菌具有抗氧化的能力,能够减少H₂O₂对HepG2细胞的损伤。

3 结 论

本研究结果表明,干酪乳杆菌对H₂O₂诱导的HepG2细胞氧化应激模型具有一定的抗氧化效果,可通过提高抗氧化酶活力以提高细胞的总抗氧化能力,从而减轻细胞的损伤。说明干酪乳杆菌是具有较好抗氧化功能的益生菌,下一步可进行动物体内的抗氧化研究。

参考文献:

- [1] 刘洋,郭宇星,潘道东. 4种乳酸菌体外抗氧化能力的比较研究[J]. 食品科学, 2012, 33(11): 25-29.
- [2] 张江巍,曹郁生. 乳酸菌抗氧化活性的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(1): 34-37.
- [3] ITO M, OHISHI K, YOSHIDA Y, et al. Antioxidative effects of lactic acid bacteria on the colonic mucosa of iron-overloaded mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(15): 4456-4460.
- [4] LIN M T, BEAL M F. The oxidative damage theory of aging[J]. Clinical Neuroscience Research, 2003, 2(5/6): 305-315. DOI:10.1016/S1566-2772(03)00007-0.
- [5] MULLER F L, LUSTGARTEN M S, JANG Y, et al. Trends in oxidative aging theories[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2007, 43(4): 477-503. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034.
- [6] GETOFF N. Anti-aging and aging factors in life the role of free radicals[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2007, 76(10): 1577-1586. DOI:10.1016/j.radphyschem.2007.01.002.
- [7] EBEL B, LEMETAIS G, BENEY L, et al. Impact of probiotics on risk factors for cardiovascular diseases[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2014, 54(2): 175-189. DOI:10.1080/10408398.2011.579361.
- [8] CHEN P, ZHANG Q X, DANG H, et al. Antidiabetic effect of *Lactobacillus casei* CCFM0412 in high-fat-fed, streptozotocin-induced type 2 diabetic mice[J]. Nutrition, 2014, 30(9): 1061-1068.
- [9] CHEN P, ZHANG Q X, DANG H, et al. Oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* CCFM0528 improves glucose tolerance and cytokine secretion in high-fat-fed, streptozotocin-induced type 2 diabetic mice[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 318-326.
- [10] FEIGHERY L M, SMITH P, O'MAHONEY L, et al. Effects of *Lactobacillus salivarius* 433118 on intestinal inflammation, immunity status and *in vitro* colon function in two mouse models of inflammatory bowel disease[J]. Materials Today Proceedings, 2008, 53(9): 2495-2506. DOI:10.1007/s10620-007-0157-y.
- [11] WOLLOWSKI I, RECHKEMMER G, POOLZOBEL B L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73(Suppl 2): 451-455. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.09.055.
- [12] LIN M Y, YEN C L. Antioxidative ability of lactic acid bacteria[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 1460-1466. DOI:10.1021/jf981149l.
- [13] 任大勇,孟思宇,翁璐超,等. 高抗氧化活性乳酸菌的筛选[J]. 食品工程, 2013(4): 43-45. DOI:10.3969/j.issn.1673-6044.2013.04.013.
- [14] ZHANG Shuwen, LIU Lu, SU Yanling, et al. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(29): 5194-5201. DOI:10.5897/AJMR11.997.
- [15] AMDEKAR S, KUMAR A, SHARMA P, et al. *Lactobacillus* protected bone damage and maintained the antioxidant status of liver and kidney homogenates in female wistar rats[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2012, 368(1/2): 155-165. DOI:10.1007/s11010-012-1354-3.
- [16] KAPILA S, VIBHA, SINHA P R. Antioxidative and hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus casei* ssp *casei* (biodefensive properties of lactobacilli)[J]. Indian Journal of Medical Sciences, 2006, 60(9): 361-370. DOI:10.4103/0019-5359.27220.
- [17] CHEN P, ZHANG Q X, DANG H, et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity[J]. Food Control, 2014, 35(1): 65-72. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.06.027.
- [18] 杨静秋. 抗氧化乳酸菌的筛选及其对氧化损伤的CT-26细胞的保护作用[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 11-12.
- [19] PLUMB J A. Cell sensitivity assays: the MTT assay[J]. Methods in Molecular Medicine, 1999, 28(88): 237-245. DOI:10.1385/1-59259-406-9:165.
- [20] BERGQVIST S W, ANDLID T, SANDBERG A S. Lactic acid fermentation stimulated iron absorption by Caco-2 cells is associated with increased soluble iron content in carrot juice[J]. British Journal of Nutrition, 2006, 96(4): 705-711. DOI:10.1079/BJN20061905.
- [21] TANG W X, WANG L K, WANG Y Q, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation protects against endoplasmic reticulum stress-induced HepG2 cell apoptosis[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2014, 385(1): 179-190. DOI:10.1007/s11010-013-1826-0.
- [22] 金明,王玉娇,金梅花,等. 两种细胞建立肝细胞氧化损伤模型比较[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 324-326. DOI:10.11847/zgggws2015-31-03-21.
- [23] 丁道,刘琳,陈迪,等. 过氧化氢诱导原代大鼠睾丸间质细胞氧化损伤模型的建立[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(2): 99-104. DOI:10.7685/j.issn.1000-2030.2014.02.016.
- [24] 施红敏,韦晟. α -硫辛酸注射液对过氧化氢致PC12细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(6): 450-453. DOI:10.3969/j.issn.1001-6821.2011.06.014.
- [25] ASHOK I, WANKHAR D, SHEELADEVI R, et al. Long-term effect of aspartame on the liver antioxidant status and histopathology in Wistar albino rats[J]. Biomedicine and Preventive Nutrition, 2014, 4(2): 299-305. DOI:10.1016/j.bionut.2013.10.002.
- [26] REHEMA A, KULLISAAR T, SEER K, et al. Proteomic proof that a probiotic elevates glutathione level in human serum[J]. Open Life Sciences, 2015, 10(1): 217-224. DOI:10.1515/biol-2015-0021.
- [27] OU C C, LU T M, JAWJI T, et al. Antioxidative effect of lactic acid bacteria: intact cells vs. intracellular extracts[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2009, 17(3): 209-216.
- [28] 杨瑞华,海春旭. 过氧化氢与细胞生长状态的剂量反应关系研究[J]. 癌变·畸变·突变, 1997(2): 92-99.
- [29] 王玉华,王立梅,冯印,等. 鼠李糖乳杆菌菌株LR12和LR76的抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 177-180. DOI:10.3321/j.issn.1002-6630.2009.19.039.
- [30] KULLISAAR T, SONGISEPP E, MIKELSAAR M, et al. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects[J]. British Journal of Nutrition, 2003, 90(2): 449-456. DOI:10.1079/BJN2003896.
- [31] 李盛钰,李达,赵玉娟,等. 植物乳杆菌C88对H₂O₂诱导氧化损伤的Caco-2细胞的保护作用[J]. 中国农业科学, 2013, 46(3): 606-613.