

“红勋 1 号”红肉苹果多酚抗氧化与抗癌活性

齐娜, 雷佳蕾, 邓红*, 穆韦彤, 刘旻昊, 孟永宏, 郭玉蓉 (陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西西安 710062)

摘要 在前期提取纯化红肉苹果多酚及分析组成的基础上, 通过 3 项抗氧化试验探讨多酚抗氧化能力, 并用 MTT 法和荧光染色法研究多酚的抗癌活性。体外抗氧化试验结果表明, 浓度为 0.80 mg/mL 红肉苹果多酚的总还原力与 V_c 持平, 0.60 mg/mL 的多酚对 ABTS⁺ 具有良好的清除作用(清除率 94.11%), 且对 Cu^{2+}/H_2O_2 诱导的 BSA 蛋白氧化损伤具有明显的保护作用。MTT 试验显示红肉苹果多酚对 3 种癌细胞(HepG2、Hela、A549)的增殖均有明显抑制作用(IC_{50} 值分别为 0.687、0.405、0.635 mg/mL), 且对 Hela 癌细胞的抑制率最高达 65.19%; 台盼蓝染色、AO/EB 及 DAPI 荧光染色试验发现, 多酚浓度增大 Hela 细胞凋亡明显, 且细胞内线粒体膜电位降低, 活性氧水平升高, 呈剂量依赖性。红肉苹果多酚具有良好的抗氧化活性, 可显著诱导 Hela 细胞的凋亡, 可作为天然抗氧化、抗癌食品基料进行开发利用。

关键词 “红勋 1 号”红肉苹果; 多酚; 抗氧化活性; 抗癌活性

中图分类号 TS201 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)18-0167-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.18.045



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Antioxidation and Anticancer Activity of Polyphenols from Red-flesh Apple of Hongxun No.1

QI Na, LEI Jia-lei, DENG Hong et al (College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062)

Abstract Based on the extraction, purification and composition analysis of polyphenols from red-flesh apple, the antioxidant capacity of polyphenols from red-flesh apple was examined through three antioxidant test *in vitro*. The anticancer activity of polyphenols from red-flesh apple was determined by MTT assay and fluorescent staining methods. The antioxidant test results *in vitro* showed that the total reducing power of polyphenols from red-flesh apple of 0.80 mg/mL, which was equal to V_c , 0.60 mg/mL polyphenols had significant free radical-scavenging effect on the ABTS⁺ with clearances ratio of 94.11%. The polyphenols of red-flesh apple also had obvious protective effect for the oxidation damage of BSA protein induced by Cu^{2+}/H_2O_2 . The MTT assay experiments showed that the polyphenols had notable inhibitory capabilities on the cancer cells proliferation of Hela, HepG2 and A549 (IC_{50} of 0.405, 0.687 and 0.635 mg/mL, respectively), and had highest inhibition rate of 65.19% on Hela cancer cells. Then the apoptosis phenomenon of Hela cells was distincted with the polyphenol concentration increased after Trypan blue, AO-EB and DAPI fluorescence staining and Hela cells apoptosis occurred in a dose-dependent manner, while intracellular mitochondrial membrane potential decreased and reactive oxygen species levels increased. The polyphenols from red-flesh apple displayed good antioxidant activity and could significantly induce the apoptosis of Hela cells, it will be used as an anti-cancer or/and natural anti-oxidation material in food industry for further development and utilization.

Key words Red-flesh apple of Hongxun No.1; Polyphenols; Antioxidation activity; Anticancer activity

我国是世界上最大的苹果栽培生产国, 有丰富的苹果资源^[1-2], 其中的新疆野苹果作为现代栽培苹果(*Malus domestica* Borkh.)的祖先种遗传多样性丰富、种质利用潜力大。红肉苹果(*Malus sieversii* f. *neidzwetzkiana* (Dieck) Langenf)是新疆野苹果^[3]中的一种珍贵资源, 果实外观独特, 生物活性物质丰富, 鲜果中多酚、果酸、类黄酮、Ca 含量高, 具有很好的营养保健特性^[4]。

目前对红肉苹果的研究主要有遗传多样性^[5-6]、类黄酮^[7]、花青素的组分含量^[8-9]以及红色发育机理^[10]等方面, 其中王燕等^[9]发现“紫红 1 号”红肉苹果抗氧化能力是白肉苹果的 7 倍。刘羽等^[4]研究了新疆 3 种品系红肉苹果果皮和果肉中的糖、酸、挥发性成分的组成与含量, 评价其抗氧化能力。齐娜等^[11]采用响应面法优化了超声辅助提取新疆“红勋 1 号”红肉苹果多酚(得率 2.135 mg/g)的条件。Wang 等^[12]发现新疆红肉苹果的酚类物质具有很好的抗氧化能力, 具有非常重要的食用与药用开发价值。

人类很多疾病的发生都与氧化应激密切相关, 研究发现

多酚可中断氧化反应链、清除自由基、淬灭单线态氧等防止氧化反应的发生, 还能调控致癌过程中的关键酶等^[13-14]。苹果是最重要的膳食多酚来源^[15], 但不同品种苹果多酚由于结构含量的差异其活性不同。红肉苹果多酚具有极强的抗氧化活性, 进而推断其有良好的抗癌活性, 但是目前鲜见同时评价红肉苹果多酚抗氧化与抗癌活性的报道。

该研究在前期对多酚进行提取、纯化、组成分析的基础上, 采用 3 项体外抗氧化试验明确新疆红肉苹果多酚的抗氧化能力; 并用 MTT 法研究该多酚对 3 种癌细胞增殖的抑制效果, 用荧光染色法探讨多酚对 Hela 细胞内线粒体膜电位和活性氧的影响, 为红肉苹果多酚在功能食品等领域的应用提供数据。

1 材料与方法

试验于 2017 年 5—12 月在陕西师范大学食品工程与营养科学学院进行。

1.1 材料 “红勋 1 号”红肉苹果于 2016 年 9 月下旬苹果成熟季采自新疆塔城, 大小均一、成熟度相同、无机械损伤和病虫害, 摘后包装低温冷链运输, 贮藏于 1303 实验室-18℃冰箱, 待用。

试验所用的细胞株(HepG2、Hela、A549)、生化试剂(MTT、DMSO、DAPI)、试剂盒(活性氧检测、吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)、JC-1 法线粒体膜电位检测)均与文献[16]相同。

基金项目 陕西省自然科学基金项目(2013JM4036); 农业部产业体系项目(CARS-28)。

作者简介 齐娜(1993—), 女, 天津人, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学。* 通信作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事食品工程与植物资源利用研究。

收稿日期 2019-04-08

1.2 设备与仪器 SB25-12DTD 超声波机、YHLGJ-10 真空冷冻干燥机、Thermo 高效液相色谱仪、Multiskan Go 全波长酶标仪、ESCO 生物安全柜、BG-verMINI 迷你垂直电泳仪、CO₂ 恒温培养箱、DMI3000B/DFC450C Leica 倒置荧光显微镜^[16-17]。

1.3 方法

1.3.1 红肉苹果多酚的制备。提取红肉苹果多酚^[11],再纯化多酚^[16],分析其组成成分,并冷冻干燥纯化后的“红勋1号”红肉苹果多酚,置于4℃冰箱保存备用。

1.3.2 红肉苹果多酚的抗氧化活性。

1.3.2.1 红肉苹果多酚对 ABTS⁺ 自由基的清除作用。分别以 V_c 作为阳性对照,蒸馏水为阴性对照,制备多酚与 ABTS⁺ 混合溶液^[16],测定吸光值,根据下式进行计算:

$$\text{清除率} = [A_c - (A - A_0)] / A_c \times 100\% \quad (1)$$

式中, A 为红肉苹果多酚溶液在 734 nm 的吸光值; A_c 为阴性对照组的吸光值; A₀ 为本底的吸光值。

1.3.2.2 红肉苹果多酚总还原力的测定。制备混匀液和测定吸光值^[20]。以 V_c 为阳性对照,70%的乙醇溶液作为本底对照,再根据下式进行计算:

$$\text{吸光值} = A - A_0 \quad (2)$$

式中, A 为红肉苹果多酚溶液在 734 nm 的吸光值; A₀ 为本底的吸光值。

1.3.2.3 红肉苹果多酚对 Cu²⁺/H₂O₂ 诱导 BSA 蛋白氧化损伤的保护作用。①变性^[17];②依次进行制胶、上样、电泳、染色、脱色、图像分析^[18]。

1.3.3 红肉苹果多酚的抗癌活性。

1.3.3.1 细胞的培养方法。进行细胞的复苏、传代、冻存^[18-19]。

1.3.3.2 MTT 法测定红肉苹果多酚对癌细胞增殖的抑制作用。分别培养人宫颈癌 HeLa 细胞、肝癌 HepG2 细胞和肺癌 A549 细胞至对数生长期,进行 MTT 试验^[18-19],根据以下公式计算出癌细胞的存活率,存活率 = 1 - (空白对照组吸光值 - 样品试验组吸光值) / 空白对照组吸光值 × 100%。

1.3.3.3 台盼蓝染色。进行台盼蓝染色试验^[19],在倒置显微镜下观察各孔内细胞形态以及染色状态,并拍照记录。

1.3.3.4 AO/EB 和 DAPI 荧光染色。进行 AO 和 EB 染色、DAPI 染色^[19],放于倒置荧光显微镜下观察各孔内细胞的特征,并进行拍照保存。

1.3.3.5 HeLa 细胞线粒体膜电势的测定。用新疆红肉苹果多酚处理 HeLa 细胞后^[20],吸掉培养液,用 PBS 清洗 2 遍后,按照试剂盒说明书进行操作,将处理好的样品立即放置于倒置荧光显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.3.3.6 HeLa 细胞内活性氧 (ROS) 的测定。用新疆红肉苹果多酚处理 HeLa 细胞后^[20],按照试剂盒说明书进行操作,同样将处理好的样品立即放置于倒置荧光显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.4 数据统计分析方法 采用 Design-Expert10.0 及 DPS 软件处理数据。

2 结果与分析

2.1 红肉苹果多酚的抗氧化活性 新疆红肉苹果多酚对 ABTS⁺ 自由基的清除作用如图 1a 所示,新疆红肉苹果多酚总还原力如图 1b 所示,新疆红肉苹果多酚对 Cu²⁺/H₂O₂ 诱导 BSA 蛋白氧化损伤的保护作用如图 1c 所示。

从图 1a 可以看出, V_c 和新疆红肉苹果多酚均对 ABTS⁺ 自由基具有很强的清除作用,并且表现出明显的剂量依赖性;当浓度达 0.60 mg/mL 时,多酚的清除率达 94.11% (V_c 的清除率为 93.30%),二者的清除能力基本相同。从图 1b 可以发现, V_c 和新疆红肉苹果多酚的还原能力都比较强,且有显著的剂量依赖性;当溶液浓度达 0.80 mg/mL 时,还原力逐渐趋于稳定, V_c 与红肉苹果多酚二者的还原力基本相同。

在生物体中 ·OH 的量高于正常水平时,便会对生物大分子产生攻击,最终导致蛋白质的氧化损伤。而新疆红肉苹果多酚可对氧化损伤起到保护作用;作用越强,电泳条带颜色越深,则灰度值越大。从图 1c 可以看出,加入新疆红肉苹果多酚的电泳条带的灰度值均高于阴性对照 (0 mg/mL),并且呈剂量依赖性,逐渐增大。当多酚浓度达 3.2 mg/mL 时,电泳条带灰度值高于空白组。该结果表明,新疆红肉苹果多酚对 Cu²⁺/H₂O₂ 诱导 BSA 蛋白氧化损伤具有很强的保护作用,且表现出剂量依赖性。

2.2 红肉苹果多酚的抗癌活性

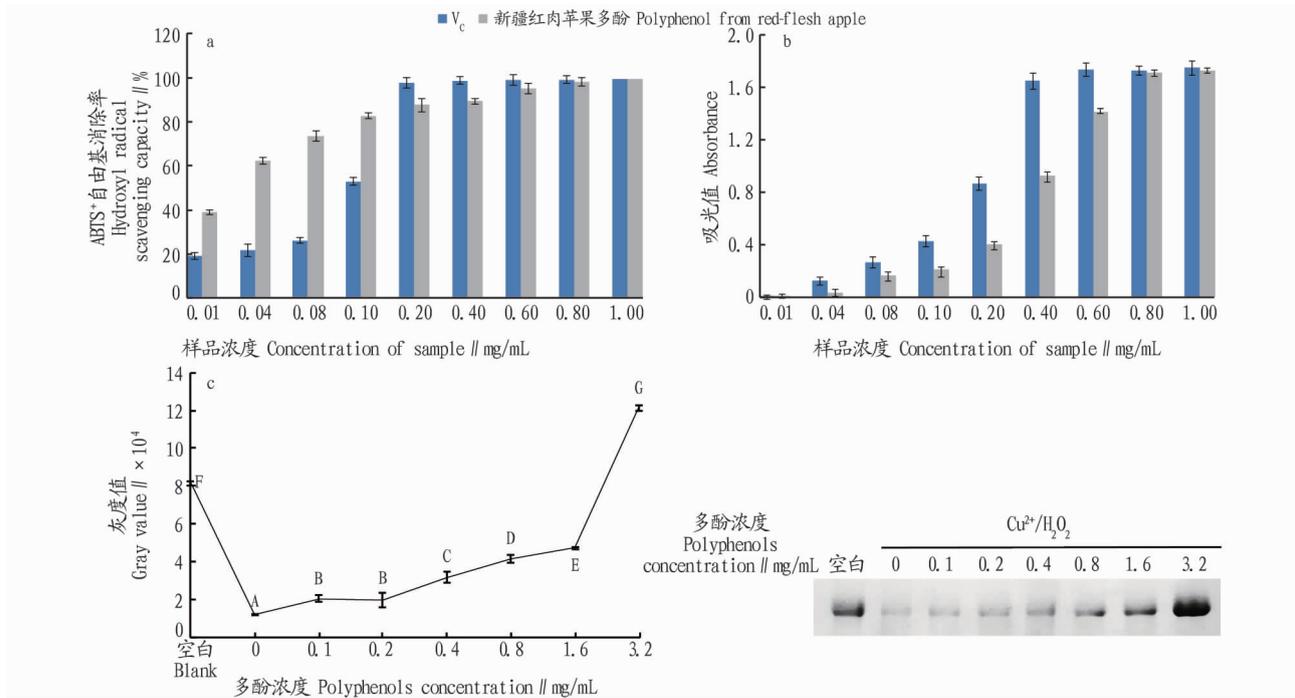
2.2.1 红肉苹果多酚的抗癌效果。

2.2.1.1 MTT 试验结果。从图 2a 可以看出,新疆红肉苹果多酚对 3 种癌细胞的增殖均具有明显的抑制作用,并呈时间和浓度的依赖性,但是作用效果不同。多酚作用于 3 种癌细胞的 IC₅₀ 值分别为 0.405、0.687 和 0.635 mg/mL,对 HeLa 细胞的抑制效果最为明显 (细胞活力仅 34.81%,抑制率 65.19%)。由图 2b 可知,新疆红肉苹果多酚对 HeLa 细胞作用 6、12 和 24 h 时,均具有明显的抑制作用,且不同时间下 IC₅₀ 值分别为 0.635、0.405 和 0.360 mg/mL。根据抑制效果和时间经济,选择 12 h 为处理时间。

2.2.1.2 细胞染色试验结果。①台盼蓝染色。台盼蓝染色可快速区分活细胞和死细胞^[21]。红肉苹果多酚对 HeLa 细胞形态的影响如图 3a 所示,与无处理对照组 (0 mg/mL) 相比,红肉苹果多酚作用浓度为 0.1 mg/mL 时,可以观察到已经有部分 HeLa 细胞开始发生明显的变化 (皱缩、变小变圆、间隙逐渐增大),有少量细胞被染成蓝色;随着多酚浓度增加达 0.5 mg/mL 时,细胞大部分发生皱缩凋亡现象,被染成蓝色,基本失去原来的形态,且呈剂量依赖性。②荧光染色。吖啶橙 (AO) 在激发光下发出绿色荧光;溴化乙锭 (EB) 仅能与受损的细胞结合,在激发光下发出橘红色荧光^[22]。如图 3b 所示,将不同浓度的新疆红肉苹果多酚作用于 HeLa 细胞 12 h 后,对照组 (0 mg/mL) HeLa 正常活细胞呈现均匀绿色荧光,多酚作用浓度为 0.1 mg/mL 时,HeLa 细胞核染色质发生明显固缩,细胞有逐渐变红的趋势 (早期凋亡细胞),个别细胞完全呈橘红色 (晚期凋亡细胞);随着多酚浓度的增大,被染成橘红色细胞的数量也增多。DAPI (4',6-二脒基-2-苯基喹

喹) 荧光染色结果如图 3c 所示, 对照组 (0 mg/mL) 中的 HeLa 细胞内部荧光染色均匀, 当新疆红肉苹果多酚作用浓度为 0.1 mg/mL 时, 细胞形态发生变化, 有个别细胞出现明显的亮斑 (细胞开始发生凋亡), 当多酚浓度增加时, 细胞亮斑的数

量越来越多, 凋亡现象也越来越明显。这些显著特征可以证明新疆红肉苹果多酚可有效诱导 HeLa 细胞发生凋亡, 并与其剂量呈正相关。

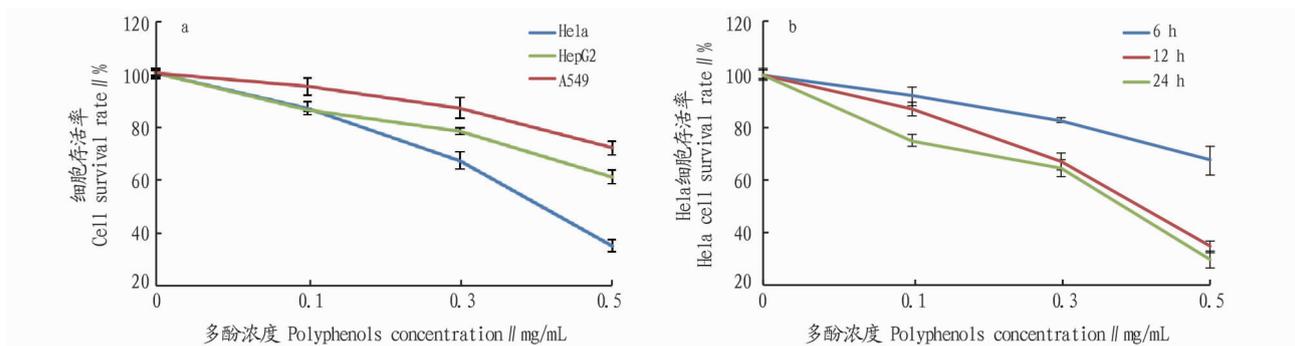


注: a. 新疆红肉苹果多酚对 ABTS⁺ 自由基的清除率; b. 新疆红肉苹果多酚总还原力; c. 新疆红肉苹果多酚对 Cu²⁺/H₂O₂ 诱导 BSA 蛋白氧化损伤的保护作用; 图中大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: a. Scavenging rate of red-flesh apple polyphenol on ABTS⁺ radical; b. Reducing capacity of red-flesh apple polyphenol; c. The proteins defense of red-flesh apple polyphenol on the oxidation damage induced by Cu²⁺/H₂O₂; Capital letters in the figure indicate that the difference is extremely significant ($P < 0.01$)

图 1 红肉苹果多酚的抗氧化活性

Fig.1 The antioxidant activity of polyphenol from red-flesh apple



注: a. 红肉苹果多酚对 3 种不同癌细胞活力的影响 ($P < 0.05$); b. 不同处理时间下红肉苹果多酚对 HeLa 细胞活力的影响 ($P < 0.05$)

Note: a. The effects of red-flesh apple polyphenol on three cells viability ($P < 0.05$); b. The effects of red-flesh apple polyphenol on HeLa cell viability on different time ($P < 0.05$)

图 2 红肉苹果多酚的 MTT 试验结果

Fig.2 MTT test results of polyphenol from red-flesh apple

2.2.2 红肉苹果多酚的抗癌机制。

2.2.2.1 红肉苹果多酚对细胞线粒体膜电位的影响。线粒体膜电位是一种反映细胞受损效应较灵敏的指标, 当细胞发生凋亡时, 线粒体功能发生紊乱, 膜电位便发生变化^[23]。采用 JC-1 荧光探针^[24] 测定细胞内线粒体膜电位的变化 (图

4), 与对照组 (橘红色荧光, 膜电位高) 相比, 红肉苹果多酚可以明显增强 HeLa 细胞内绿色的荧光, 当浓度达 0.5 mg/mL 时, 细胞内几乎完全呈现绿色荧光, 说明膜电位低, 而线粒体膜电位的下降是细胞早期凋亡的重要现象; 细胞凋亡时由于线粒体膜巨型通道 PT 孔开启, 使得线粒体膜的通透性增大,

膜两侧的离子重新分布,造成线粒体膜电位的迅速下降,所以线粒体膜电位的降低与细胞凋亡水平有密切关系。图4

显示红肉苹果多酚可导致Hela细胞线粒体损伤和功能障碍,可显著降低线粒体膜电位,且呈剂量依赖性。

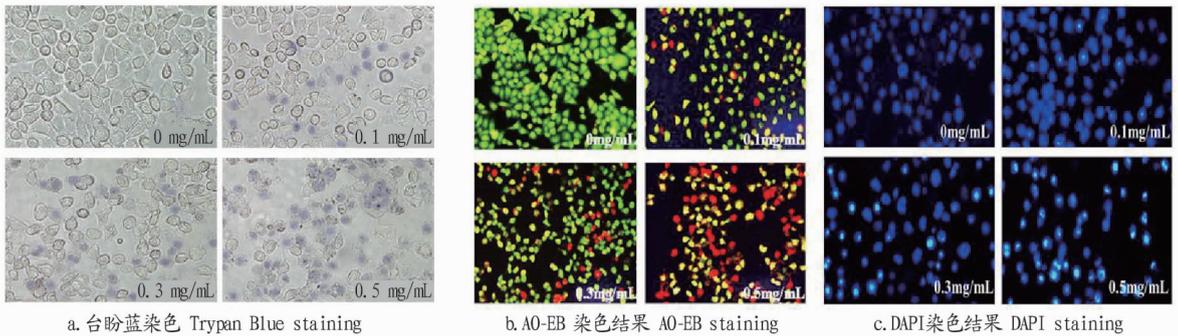


图3 新疆红肉苹果多酚诱导Hela细胞凋亡的台盼蓝与荧光染色结果

Fig.3 The Trypan blue and fluorescent staining results of Hela cell apoptosis induced by red-flesh apple polyphenol

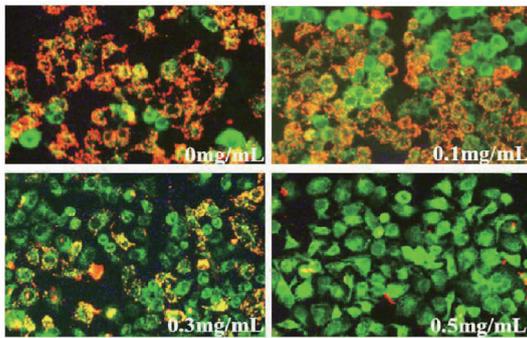


图4 疆红肉苹果多酚对Hela细胞线粒体膜电势的影响

Fig.4 The effects of red-flesh apple polyphenol on the mitochondrial membrane potential of Hela cell

2.2.2.2 红肉苹果多酚对活性氧生成的影响。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是一种活泼的含氧化合物,过量的ROS可以激活细胞发生凋亡,可选择药物诱导细胞中ROS发生变化以抑制肿瘤细胞^[25]。采用DCFH-DA荧光探针法测定了不同浓度的新疆红肉苹果多酚对细胞内ROS水平的影响(图5)。DCFH-DA(无荧光)能够穿过细胞膜被水解成DCFH,在细胞氧化剂作用下DCFH生成具有荧光的DCF,可根据荧光强度来反映细胞内ROS水平的高低。如图5所示,和对照组(0 mg/mL)相比,红肉苹果多酚(0.5 mg/mL)处理过的Hela细胞的荧光显著增强,且呈剂量相关性,说明红肉苹果多酚能刺激Hela细胞产生ROS,可能会减弱Hela细胞线粒体抗氧化防御机制,使线粒体活性氧产生增多,这与线粒体膜电位降低一致。

3 结论

“红勋1号”红肉苹果多酚对ABTS⁺自由基的清除作用与V_c相当,同时该多酚具有较高的总还原力,对Cu²⁺/H₂O₂诱导BSA蛋白氧化损伤具有良好的保护作用。此外,红肉苹果多酚能够有效抑制3种癌细胞(Hela、A549、HepG2)的增殖,且呈剂量依赖性;对Hela细胞抑制最为明显(IC₅₀值为0.405 mg/mL)。台盼蓝染色、AO/EB及DAPI荧光染色发现红肉苹果多酚处理后的Hela细胞发生明显的凋亡,因为该多酚能够降低Hela细胞线粒体膜电位,改变线粒体通透性,进而使细胞功能受损,发生凋亡,同时刺激Hela细胞中ROS

的生成,发生氧化应激,诱导Hela细胞凋亡。

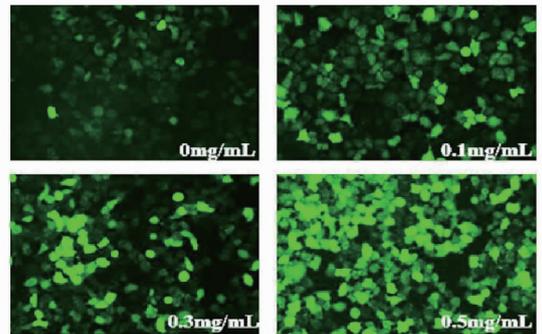


图5 新疆红肉苹果多酚对Hela细胞内活性氧的影响

Fig.5 The effects of red-flesh apple polyphenol on the ROS of Hela cell

参考文献

- [1] 苟小菊,田由,郭玉蓉,等.16个苹果品种非浓缩还原汁的理化特征分析[J].中国农业科学,2018,51(4):800-810.
- [2] 吕菲菲,陶吉寒,王晓芳.中美苹果产业经济比较分析[J].陕西农业科学,2016,62(1):99-101.
- [3] 张新忠,王忆,韩振海.我国苹果属(*Malus* Mill.)野生资源研究利用的现状分析[J].中国农业科技导报,2010,12(3):8-15.
- [4] 刘羽,刘盛雨,卢娟芳,等.新疆红肉苹果3个品系的风味品质与抗氧化能力评价[J].中国农业科学,2017,50(8):1495-1504.
- [5] 陈学森,张晶,刘大亮,等.新疆红肉苹果杂种一代的遗传变异及功能型苹果优良评价[J].中国农业科学,2014,47(11):2193-2204.
- [6] 张小燕,陈学森,彭勇,等.新疆野苹果多酚物质的遗传多样性[J].园艺学报,2008,35(9):1351-1356.
- [7] 项亚,赵瑞雪,赖方敏,等.红肉苹果果皮类黄酮组分及抗氧化活性分析[J].植物生理学报,2016,52(9):1353-1360.
- [8] 孙晓红,刘源霞,孙欣,等.红肉苹果果实发育过程中花青苷含量变化及其合成相关基因表达分析[J].植物生理学报,2017,53(8):1507-1514.
- [9] 王燕,陈学森,刘大亮,等.‘紫红1号’红肉苹果果肉抗氧化性及花色苷分析[J].园艺学报,2012,39(10):1991-1998.
- [10] 王延玲,张艳敏,冯守干,等.新疆红肉苹果果皮果肉呈色差异机理[J].中国农业科学,2012,45(13):2771-2778.
- [11] 齐娜,李涵,张志宇,等.新疆红肉苹果多酚的超声波辅助提取工艺优化[J].食品与机械,2016,32(9):177-182.
- [12] WANG X Q, LI C Y, LIANG D, et al. Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples [J]. Journal of functional foods, 2015, 18: 1086-1094.
- [13] MENG J F, FANGY L, QIN M Y, et al. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China) [J]. Food chemistry, 2012, 134:2049-2056.

中同样会产生许多小分子量的活性成分,这些小片段可能在机体内会具有特殊生理调节功能^[15]。该研究通过分析西兰花茎叶蛋白酶解产物分子量分布,发现西兰花茎叶蛋白经碱酶酶解后,其主要成分为相对分子量 3 000 Da 以下的小分子肽,其中分子量 1 000 Da 以下组分占 65.63%。已有研究表明,米糠蛋白^[16]、羽扇豆蛋白^[17]、大豆蛋白水解物^[18]等植物蛋白源类物质有良好的降血脂活性。该试验为西兰花茎叶蛋白酶解物生理活性的研究奠定了基础,也为西兰花茎叶蛋白的高值化开发提供了参考。

参考文献

- [1] ARES A M, NOZAL M J, BERNAL J. Extraction chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds[J]. *Journal of chromatography A*, 2013, 1313(20): 78-95.
- [2] LATTÉ K P, APPEL K E, LAMPEN A. Health benefits and possible risks of broccoli—An overview[J]. *Food and chemical toxicology*, 2011, 49(12): 3287-3309.
- [3] 刘海萍. 西兰花茎叶粉营养价值评定及其在绿牧草鸡日粮中的应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009: 1-49.
- [4] CAMPAS-BAYPOLI O N, SÁNCHEZ-MACHADO D I, BUENO-SOLANO C, et al. Biochemical composition and physicochemical properties of broccoli flours[J]. *International journal of food sciences and nutrition*, 2009, 60(4): 163-173.
- [5] XU Y, BAO T, HAN W, et al. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from cauliflower by-products protein hydrolysate[J]. *Process biochemistry*, 2016, 51(9): 1299-1305.
- [6] 党亚丽, 么春艳, 周亭屹, 等. 西兰花茎叶多肽的酶法提取及其增强免疫力功能研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(11): 352-355.
- [7] RUTHERFURD S M. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A review[J]. *J. AOAC Int*, 2010, 93(5): 1515-1522.
- [8] 宋茹, 冯婷立, 谢超. 海产小杂鱼抗氧化肽制备工艺[J]. *食品科学*, 2011, 32(12): 29-33.
- [9] 周雪松. 鸡肉蛋白酶解及其产物抗氧化活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [10] KONG X Z, ZHOU H M, QIAN H F. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysate[J]. *Food chemistry*, 2007, 102: 759-763.
- [11] 张一帆, 张唐伟, 央珍. 响应面法优化西藏核桃蛋白酯解工艺[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(12): 4747-4754.
- [12] ABDEL-FATTAH Y R, SAEED H M, GOHAR M, et al. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs[J]. *Process biochemistry*, 2005, 40(5): 1707-1714.
- [13] 朱玉英, 王存芳, 王建民. 粗粮型羊奶奶油加工工艺的响应面优化[J]. *乳业科学与技术*, 2016, 39(3): 18-24.
- [14] KATO M, NAKANISHI T, TANI T, et al. Low-molecular fraction of wheat protein hydrolysate stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in an enteroendocrine L cell line and improves glucose tolerance in rats[J]. *Nutrition research*, 2017, 37: 37-45.
- [15] 殷雪婷. 生物活性肽的制备方法及其功能[J]. *河南科技*, 2011(4): 57.
- [16] 屠锡萍. 血脂异常的药物治疗[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(34): 95-99.
- [17] WANG J, SHIMADA M, NAGAOKA S. Identification of the active protein in rice bran protein having an inhibitory activity of cholesterol micellar solubility[J]. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2017, 81(6): 1216-1219.
- [18] LAMMI C, ZANONI C, CALABRESI L, et al. Lupin protein exerts cholesterol-lowering effects targeting PCSK9: From clinical evidences to elucidation of the *in vitro* molecular mechanism using HepG2 cells[J]. *Journal of functional foods*, 2016, 23: 230-240.

(上接第 170 页)

- [14] CHATTERJEE K, ALSHARIF D, MAZZA C, et al. Resveratrol and pterostilbene exhibit anticancer properties involving the downregulation of HPV oncoprotein E6 in cervical cancer cells[J]. *Nutrients*, 2018, 10(2): 243-253.
- [15] TSAO R, YANG R, XIE S, et al. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? [J]. *Journal of agriculture and food chemistry*, 2005, 53: 4989-4995.
- [16] 齐娜. 新疆红肉苹果多酚的提取纯化及其抗氧化与抗癌活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2018.
- [17] 石明明. 陕西地区绿茶中主要活性成分的比较研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [18] 张志宇, 王珂, 李涵, 等. 文冠果种仁总皂苷的抗氧化及抗肝癌活性初探[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(7): 1012-1019.
- [19] YUAN L, LIU J Y, DENG H, et al. Benzo[a]pyrene induces autophagic and pyroptotic death simultaneously in HL-7702 human normal liver cells [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2017, 65(44): 9763-9773.
- [20] 刘超. 液体深层发酵羊肚菌胞内多糖提取、结构分析及抗结肠癌作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [21] 彭彬, 吴晶晶, 李焱, 等. 贴壁培养细胞台盼蓝拒染实验的方法学探讨[J]. *激光生物学报*, 2011, 20(2): 269-273.
- [22] 乔燕. 草质素体外抗氧化活性及对人肝癌细胞 HepG2 凋亡的分子机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [23] 许惠玉, 陈志伟, 牛建昭, 等. 赤芍总苷诱导 K562 细胞凋亡及对线粒体膜电位和 Ca²⁺ 的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(16): 3123-3126.
- [24] 官福新, 周露露, 张宸豪, 等. JC-1 单染法检测 CCCP 对内皮细胞线粒体膜电位的影响[J]. *吉林医药学院学报*, 2014, 35(5): 324-326.
- [25] HONG Y H, LIU T T, LIU Y J, et al. Vanadium compounds induce stronger growth suppression in PTEN-deficient prostate cancer cells by ROS-mediated mechanism [J]. *Journal of Chinese pharmaceutical sciences*, 2017, 26(6): 432-439.