

间充质干细胞旁分泌物质诱导肝星状细胞凋亡的体外研究

徐 晓,施启鹏,周 晗,蔡 洁,李 军,章莉莉*

(南京医科大学第一附属医院感染病科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)旁分泌物质对活化的肝星状细胞 Lx-2 的影响及作用机制。方法:应用 6 孔塑料细胞培养板,每孔使用半透膜,构建 Transwell 共培养体系;将骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BM-MS)和人肝星状细胞系 Lx-2 分别接种在体系的上下层,并把此组作为实验组,单独培养的 Lx-2 作为对照组,观察培养液中 MSC 旁分泌物质对 Lx-2 的影响。采用流式细胞术及 Hoechst33342 染色法分别检测 Lx-2 细胞凋亡的情况,qRT-PCR 和 Western blot 检测 Lx-2 中解耦联蛋白 2(uncoupling protein 2, UCP2)的 mRNA 和蛋白水平的表达量,荧光探针法检测 Lx-2 细胞内及线粒体中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的荧光强度,采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法检测细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量。结果:与对照组相比,Hoechst 33342 染色后可见部分 Lx-2 染色质固缩、颗粒状荧光等凋亡细胞典型表现,实验组 Lx-2 凋亡率是对照组的 2.6 倍($P < 0.05$)。实验组 Lx-2 中 UCP2 mRNA 及蛋白表达量显著低于对照组($P < 0.05$);实验组 Lx-2 细胞内和线粒体中 ROS 水平明显升高。细胞培养上清中 MDA 为(0.43 ± 0.47) mmol/L,显著高于对照组(0.16 ± 0.43) mmol/L($P < 0.05$)。结论:MSC 旁分泌物质有诱导 Lx-2 细胞凋亡的作用;可能与 MSC 旁分泌物质抑制 UCP2 的表达,促进细胞内及线粒体 ROS 过量生成有关。

[关键词] 间充质干细胞;旁分泌;肝星状细胞;凋亡;活性氧;解耦联蛋白 2

[中图分类号] Q255

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)08-1040-06

doi:10.7655/NYDXBNS20140808

Human mesenchymal stem cells secreted factors inducing apoptosis of hepatic stellate cells *in vitro*

Xu Liang, Shi Qipeng, Zhou Han, Cai Jie, Li Jun, Zhang Lili*

(Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the paracrine effects of mesenchymal stem cells (MSC) on the activated hepatic stellate cells Lx-2, and explore the possible mechanisms. **Methods:** A co-culture system was established by culturing bone marrow mesenchymal stem cell (BM-MS) in the Transwell insert and Lx-2 on the plastic plates (6 well), which were placed on the upper and lower layer respectively, and set it as the experiment group. Normal Lx-2 was cultured alone as control. Cell apoptosis was determined by Hoechst 33342 staining and flow cytometry, respectively. The expressions of uncoupling protein 2 (UCP2) mRNA and protein in Lx-2 were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot, respectively. Intracellular and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) levels of Lx-2 were measured by fluorescent probe method. The content of MDA in co-culture supernatant was determined by thiobarbituric acid (TBA) reaction. **Results:** Compared with the control group, Hoechst 33342 staining showed nuclear condensation, granular fluorescence and other typical features of apoptosis in parts of Lx-2 cells. The apoptotic rate of Lx-2 in the experiment group was 2.6 times of that in the control group ($P < 0.05$). The expressions of UCP2 mRNA and protein in Lx-2 were significantly inhibited compared with those in the control group ($P < 0.05$). The intracellular and mitochondrial ROS levels of Lx-2 in the experiment group were highly enhanced. The concentration of MDA in the co-culture supernatant in the experimental group was (0.43 ± 0.47) mmol/L, which was significantly higher than the control group with (0.16 ± 0.43) mmol/L ($P < 0.05$). **Conclusion:** The paracrine effects of MSC were capable of inducing Lx-2 apoptosis, which is supposed to be the result of the suppression of UCP2 and over-expression of intracellular and mitochondrial ROS in Lx-2.

[基金项目] 江苏省医学创新团队与领军人才资助项目(LJ201121)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lilyzh@njmu.edu.cn

[Key words] MSC; paracrine; Lx-2; apoptosis; ROS; UCP2

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(08): 1040-1045]

肝硬化是严重危害人类健康的常见病之一,临床上尚无特效的治疗手段^[1]。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)治疗被认为是较有希望的新疗法,多个国家探索性地应用 MSC 移植治疗肝硬化, I、II 期临床研究结果也非常令人鼓舞^[2-3]。然而,有关 MSC 治疗机制尚不清楚,有研究认为 MSC 的肝内定植率低,仅极少数能分化为功能细胞^[4-5],推测其治疗作用可能是通过 MSC 旁分泌功能实现的^[6-7]。

肝纤维化是肝硬化发展的必经阶段,而肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活又是肝纤维化的中枢事件。激活的 HSC 过度分泌胶原蛋白,造成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)大量增生沉积,最终导致肝纤维化和肝硬化。因此,诱导和促进活化的 HSC 凋亡是治疗肝纤维化的策略之一。为进一步了解 MSC 的旁分泌功能对肝纤维化的作用,本实验以活化的肝星状细胞系 Lx-2 为研究对象,通过 MSC 与 Lx-2 Transwell 共培养,了解培养上清中 MSC 旁分泌物质对 Lx-2 的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

骨髓来源于南京医科大学第一附属医院健康无偿志愿者。本研究通过南京医科大学第一附属医院伦理委员会审批,志愿者均签署知情同意书。人肝脏星状细胞系 Lx-2 购于上海复祥生物科技有限公司。主要试剂及仪器包括细胞凋亡 Annexin V FITC/PI 双染试剂盒、蛋白提取试剂盒(南京凯基), SYBR Green I 荧光染料(大连 TaKaRa 公司), MDA 测定试剂盒(南京建成), L-DMEM 培养液、澳洲胎牛血清(WISENT 公司,加拿大), CM-H2DCFDA、MitoSOX™(Invitrogen 公司,美国), Hoechst33342(Sigma 公司,美国), 鼠抗人 UCP2 抗体、鼠抗人 β -actin 抗体(Santa Cruz 公司,美国), 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 抗体(北京金杉), Transwell 6 孔培养板(Corning 公司,美国)。引物由上海英俊公司合成。实时荧光定量 PCR 仪(StepOnePlus™, ABI 公司,美国), 流式细胞仪(FACS Calibur, BD 公司,美国), 荧光显微镜(TE, NIKON 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 人骨髓间充质干细胞(bone marrow mes-

enchymal stem cells, BM-MS-C)的分离与培养

取健康人骨髓 5 ml, Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离单个核细胞, 1×10^6 个/ml 单个核细胞接种到 10 cm 培养皿中进行培养。24 h 后, 用含有 10%FBS+1%青链霉素的 L-DMEM 完全培养液进行首次全量换液;此后适时换液,待 BM-MS-C 融合度达 80%,用 0.25%EDTA 胰酶消化后传代,传代密度为 1×10^5 个/ml。第 3 代细胞用于实验。

1.2.2 人肝脏星状细胞系的培养

用含有 10%FBS+1%青链霉素的 L-DMEM 完全培养液进行培养,待细胞长至 80%融合,用 0.05% EDTA 胰酶消化,1:3 传代后扩增培养。

1.2.3 Lx-2 与 MSC 共培养

Transwell 共培养体系分为上下两层,中间隔以直径 0.4 μ m 的半透膜,两层细胞不接触,适于观察研究一种细胞旁分泌的分子对另一种细胞的作用。

在 Transwell 6 孔培养板的 Insert 小室中接种 BM-MS-C,密度为 $(1\sim 2) \times 10^5$ 个/孔;在细胞培养板下层接种相同数量的 Lx-2。每孔 1.5 ml 完全培养液。待细胞完全贴壁、状态稳定后全量换液,并建立 Transwell 上下双层细胞共培养体系^[8],常规培养。实验分组:①实验组:BM-MS-C 与 Lx-2 共培养;②对照组:Lx-2 单独培养。

1.2.4 细胞凋亡检测

采用 Annexin V-FITC/PI 法检测。将收集好的细胞依次固定、染色、避光孵育,在 1 h 内用流式细胞仪检测。Annexin V⁺/PI⁻标记为早期凋亡细胞, Annexin V⁺/PI⁺标记为晚期凋亡细胞,两者凋亡率之和为总凋亡率。每组细胞设置 3 个复孔,实验重复 3 次。

采用荧光倒置显微镜观察细胞 Hoechst33342 染色后的细胞核形态。于 6 孔板中制作细胞爬片,相应时间点,每孔细胞加入 0.5 ml Hoechst 33342 染色液,染色 15 min。荧光倒置显微镜下于 350 nm 检测细胞内荧光强度。

1.2.5 细胞中 UCP2 mRNA 检测

采用 SYBR Green 荧光探针实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测。按试剂说明书提取细胞总 RNA,并反转录合成 cDNA。以 2 μ l cDNA 为模板行解耦联蛋白 2(uncoupling pro-

tein 2, UCP2) 基因的 qRT-PCR 检测。总体系 20 μ l, PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。反应结束后以 β -actin 作为内参基因, 使用 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析基因相对表达量, 每对引物均做 3 个复孔取平均值, 每组细胞设置 3 个复孔, 实验重复 3 次, 多对引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers sequences of quantitative RT-PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
β -actin	FOR: ACTGGAACGGTGAAGGTGAC REV: AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT
UCP2	FOR: CCCCGAAGCCTCTACAATGG REV: CTGAGCTTGAATCGGACCTT

1.2.6 Lx-2 中 UCP2 蛋白的检测

采用 Western blot 检测。取等量已变性处理的实验组、对照组 Lx-2 细胞总蛋白经凝胶电泳后电转至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入适当比例稀释的一抗(UCP2 1:200, β -actin 1:500), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000)室温孵育 1 h, ECL 化学发光法显示结果。

1.2.7 细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测

细胞内和线粒体中 ROS 水平采用 CM-H2DCF-DA 和 MitoSOXTM 探针进行检测。按照试剂说明书配制 CM-H2DCFDA 和 MitoSOXTM 混合工作液, 终浓度均为 5 μ mol/L, 每孔细胞加入 1 ml 工作液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 荧光倒置显微镜下分别于 488 nm、540 nm 检测细胞内荧光强度。

1.2.8 细胞培养上清液丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测

采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法检测细胞 MDA。分别留取实验组、对照组下室的细胞培养上清, 按检测试剂盒说明书于波长 530 nm 测定相应吸光度值, 根据公式: MDA 含量(nmol/ml) = (测定管-对照管)/(标准管-空白管) × 标准品浓度 × 样本测定前稀释倍数, 计算细胞培养上清液中 MDA 含量, 并绘制图表进行比较。

1.3 统计学方法

结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组比较采用 SPSS19.0 统计学软件进行独立样本 *t* 检验分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 BM-MSc 的分离、培养与鉴定

利用 BM-MSc 与其他贴壁细胞的贴壁差异性,

严格控制胰酶用量及消化时间: 10 cm 培养皿中加入 2 ml 胰酶, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 min, 且细胞总消化时间不得超过 5 min, 传代纯化 BM-MSc。第 3 天开始出现长条形细胞, 分布稀疏; 第 7 天形成 MSC 簇, 并向周边增殖扩大。BM-MSc 呈纺锤形、梭状细胞, 涡旋状生长, 细胞排列紧密, 形态均一(图 1A)。

2.2 人肝脏星状细胞系的培养

由于 Lx-2 在塑料皿的培养过程中, 细胞从休眠的脂肪储存状态自发转化为高度活化、增殖的肌成纤维样细胞。这种变化可模拟星状细胞活化状态^[9](图 1B)。

2.3 细胞凋亡检测结果

流式细胞术检测发现: 实验组凋亡率为(6.95 \pm 0.61)%, 对照组凋亡率为(2.64 \pm 0.66)%, 实验组是对照组的 2.6 倍, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 2)。

Hoechst 33342 染色显示, 实验组部分 Lx-2 细胞核固缩, 着色较亮, 大小不等, 见凋亡小体(图 3A), 对照组细胞核呈淡蓝色、形态清晰、大小基本一致(图 3B)。

2.4 Lx-2 细胞中 UCP2 表达量的变化

qRT-PCR 检测数据显示, 实验组 Lx-2 细胞中 UCP2 mRNA 表达量为 0.75 \pm 0.15, 对照组中 UCP2 mRNA 表达量为 1.62 \pm 0.10, 实验组 UCP2 mRNA 的表达量明显低于对照组, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 4A)。提示 Transwell 共培养上清中 MSC 分泌物质可以抑制 Lx-2 UCP2 mRNA 的表达。

Western blot 结果提示, 实验组 Lx-2 细胞中 UCP2 的蛋白表达量明显低于对照组(图 4B)。

2.5 Lx-2 细胞 ROS 检测结果

CM-H2DCFDA 和 MitoSOXTM 荧光染色法分别检测 Lx-2 细胞整体及线粒体中 ROS 水平, 实验组 Lx-2 胞内绿色荧光强于对照组, 提示胞内 ROS 增强, 红色荧光强度高于对照组, 提示 Lx-2 线粒体中 ROS 增强(图 5)。

2.6 细胞培养上清液 MDA 检测结果

TBA 法检测发现, MSC 与 Lx-2 Transwell 共培养后, 实验组细胞培养上清液中 MDA 含量是对照组的 2.5 倍左右, 两组相比差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 6)。

3 讨论

近年来, MSC 旁分泌的治疗作用受到广泛关注。体内外研究发现, MSC 能旁分泌多种细胞因子、

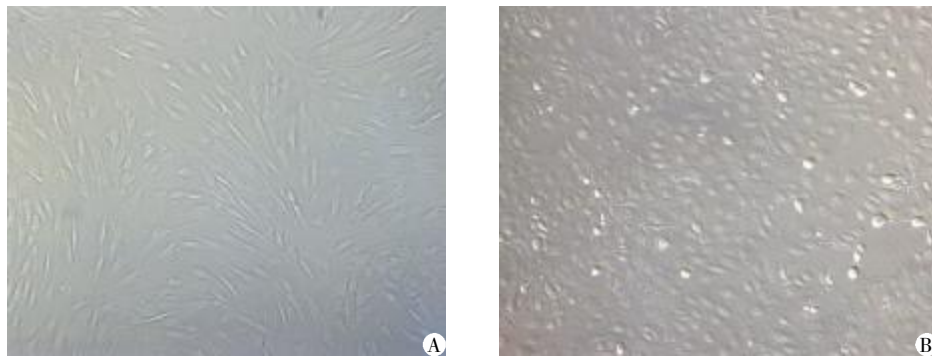


图 1 体外培养的第 3 代 BM-MSC(A)和 Lx-2细胞(B)(×100)
Figure 1 The morphology of the third-generation of BM-MSC and Lx-2 cultured *in vitro*(×100)

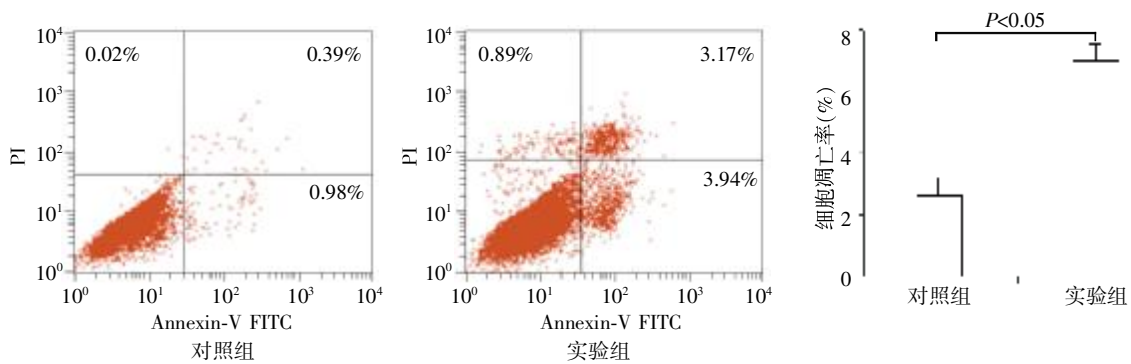
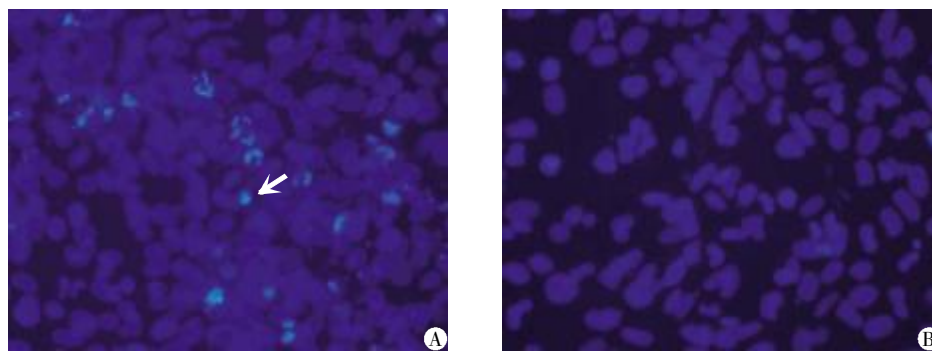


图 2 流式细胞术检测 Lx-2 细胞凋亡变化
Figure 2 Flow cytometry analysis of Lx-2 apoptosis



A: 实验组, Lx-2 细胞可见染色质固缩、颗粒状荧光等凋亡细胞的典型表现(箭头所指); B: 对照组。

图 3 Hoechst 33342 染色检测 Lx-2 细胞凋亡(×400)
Figure 3 Hoechst 33342 fluorescence staining of Lx-2 apoptosis(×400)

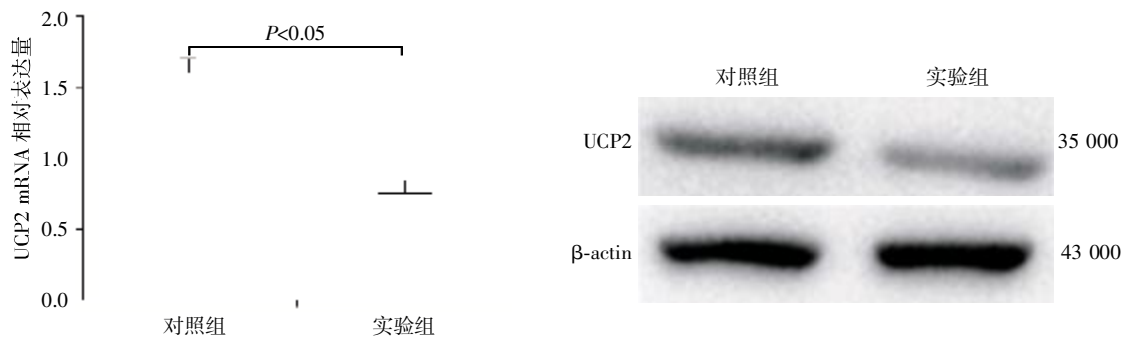


图 4 Lx-2 中 UCP2 表达水平的变化
Figure 4 The UCP2 expression changes of Lx-2

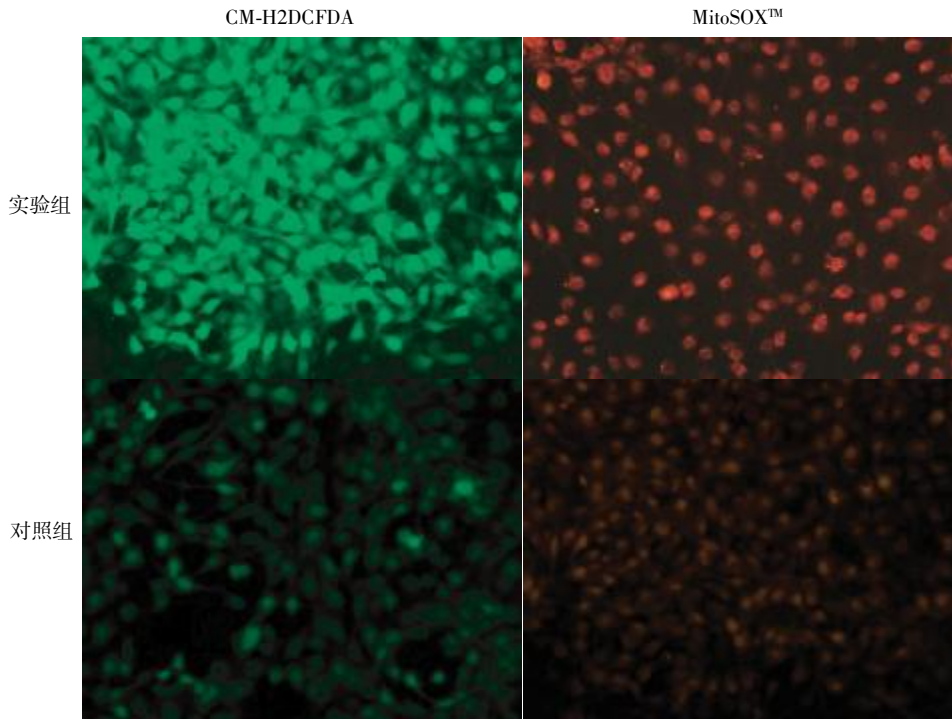


图 5 Lx-2 细胞免疫荧光染色(×200)

Figure 5 Immunofluorescence staining of Lx-2 cells(×200)

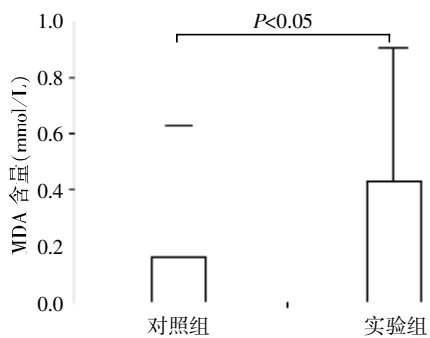


图 6 细胞培养上清液中 MDA 含量

Figure 6 The MDA level of culture supernatant

生长因子和炎症调节分子,可调节细胞的凋亡、增殖、炎症反应等生理过程^[10]。Fouraschen 等^[11]将 MSC 条件培养液输注到肝脏大部切除的动物模型后,可促进肝再生和肝功能的恢复,提示培养液中 MSC 旁分泌物质有重要的治疗作用。也有体外研究发现 MSC 旁分泌物质中肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 可抑制 HSC 增殖,并通过 HGF/c-met、RohA 等信号途径诱导细胞凋亡^[8]。由于 MSC 旁分泌物质中含有多种细胞因子、生长因子,具有复杂的生物学作用,其综合作用对肝纤维化的影响尚不十分清楚。

肝纤维化的形成机制非常复杂,其中 HSC 活化是纤维化进程的关键事件。活化的 HSC 过度分泌

I、Ⅲ、Ⅳ型胶原蛋白,导致 ECM 过度沉积,是发生纤维化的基础^[12]。因此,促进 HSC 细胞凋亡,抑制 HSC 活化,降低 ECM 的产生是治疗肝脏纤维化的主要策略。本研究通过 BM-MSC 与 Lx-2 Transwell 共培养的方法,探讨 MSC 旁分泌物质对 Lx-2 的影响,结果发现 MSC 旁分泌物质可诱导 Lx-2 细胞凋亡。

为探讨其可能机制,我们对 Lx-2 细胞 UCP2 的表达情况及氧化应激水平进行了分析。结果发现,实验组 Lx-2 中 UCP2 mRNA 及蛋白水平的表达量均明显低于对照组,提示 MSC 旁分泌物质能抑制 UCP2 的合成与表达。UCP2 是位于线粒体内膜上的一种质子转运蛋白,介导质子的渗漏,使氧化磷酸化解耦联,降低线粒体内膜两侧质子梯度和呼吸链电子漏,减少线粒体 ROS 的产生,在细胞受到氧化损伤时起保护作用。除此之外,UCP2 也通过线粒体质子漏,将质子驱动中贮存的势能以热能的形式释放,最终减少 ATP 生成,调节能量代谢^[13]。UCP2 表达的变化能直接影响细胞的能量代谢和氧化应激水平。Lu 等^[14]研究发现,敲除小鼠 UCP2 基因后,细胞中 ROS 显著增高,并激发内质网应激与细胞炎症。此外,UCP2 作为线粒体内膜上的蛋白,其表达降低后能促进线粒体内外膜之间通透性转运孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 的开放,增加

Ca²⁺重摄取及 ROS 生成,促进线粒体途径细胞凋亡的发生^[15]。本实验通过荧光探针法检测到实验组 Lx-2 细胞整体及线粒体中 ROS 荧光强度明显高于对照组,脂质过氧化物 MDA 水平也显著升高,表明 Lx-2 中 UCP2 被抑制后,细胞保护作用减弱,细胞内和线粒体中生成大量的 ROS。

过量的 ROS 可经多种途径诱导 HSC 凋亡,其中,线粒体途径是一个重要的诱导途径。有研究发现,过量生成的 ROS 可通过损伤线粒体膜系统以及氧化呼吸链,影响线粒体内外膜之间通透性转运孔、线粒体膜间腔蛋白的功能以及 ATP 能量代谢的过程,共同促进线粒体途径细胞凋亡的发生^[15-17]。此外,过量 ROS 也能通过损伤细胞的胞膜成分、蛋白质和 DNA,造成细胞膜功能崩溃、细胞内酶蛋白活性丧失以及细胞染色质受损,直接诱导细胞的凋亡与坏死^[18-20]。

综上所述,MSC 旁分泌物质可诱导 Lx-2 细胞凋亡,这种效应是通过 MSC 旁分泌物质中多种细胞因子、生长因子共同作用的结果。其机制可能与旁分泌物质抑制 Lx-2 中 UCP2 的表达,促进 Lx-2 胞内及线粒体 ROS 过量生成有关。MSC 旁分泌物质的这种综合效应值得深入研究,充分利用 MSC 旁分泌物质中含有多种细胞因子的鸡尾酒特性有望对肝纤维化有治疗作用。

[参考文献]

[1] Liou IW. Management of end-stage liver disease[J]. Med Clin North Am, 2014, 98(1):119-152

[2] El-Ansary M, Abdel-Aziz I, Mogawer S, et al. Phase II trial: undifferentiated versus differentiated autologous mesenchymal stem cells transplantation in Egyptian patients with HCV induced liver cirrhosis [J]. Stem Cell Rev, 2012, 8(3):972-981

[3] Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection; a phase I-II clinical trial [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009, 21(10):1199-1205

[4] Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. Bone marrow mesenchymal cells; how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? [J]. Arch Immunol Ther Exp(Warsz), 2011, 59(5):369-378

[5] Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. *In vivo* contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions [J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 23):5655-5664

[6] van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, et al. Mesenchymal

stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo* [J]. Hepatology, 2008, 47(5):1634-1643

[7] Nagaishi K, Ataka K, Echizen E, et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic hepatocyte damage in mice by inhibiting infiltration of bone marrow-derived cells[J]. Hepatology, 2014, 59(5):1816-1829

[8] 陈国忠,姜海行,陆正峰,等. 骨髓间充质干细胞共培养对肝星状细胞增殖、凋亡和 RohA 表达的调控[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(16):1643-1649

[9] Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54(1):142-151

[10] Khubutiya MS, Vagabov AV, Temnov AA, et al. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury [J]. Cytotherapy, 2014, 16(5):579-585

[11] Fouraschen SM, Pan Q, de Ruiter PE, et al. Secreted factors of human liver-derived mesenchymal stem cells promote liver regeneration early after partial hepatectomy[J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(13):2410-2419

[12] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Gastroenterology, 2008, 134(6):1655-1669

[13] Sluse FE, Jarmuszkiewicz W, Navet R, et al. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1757(5-6):480-485

[14] Lu M, Sun XL, Qiao C, et al. Uncoupling protein 2 deficiency aggravates astrocytic endoplasmic reticulum stress and nod-like receptor protein 3 inflammasome activation [J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(2):421-430

[15] Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis [J]. Cell Calcium, 2011, 50(3):222-333

[16] Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia NC, Uribe M, et al. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis; a review [J]. Curr Med Chem, 2012, 19(28):4850-4860

[17] Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21(3):83-86

[18] Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems; oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification [J]. Toxicol Pathol, 2002, 30(6):620-650

[19] Stadtman ER. Protein oxidation and aging [J]. Science, 1992, 257(5074):1220-1224

[20] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease[J]. FASEB J, 2003, 17(10):1195-1214