

• 研究论文 •

羟自由基对支撑磷脂双层膜的破坏及水溶性抗氧化剂 保护作用的电化学研究

王建国^{*a} 江黎丽^a 杨薇薇^a 迟红训^b 孙巧花^a 吕 慧^a

(^a 辽宁大学化学学院 沈阳 110036)

(^b 辽东学院 丹东 118003)

摘要 以支撑磷脂双层膜(supported bilayer lipid membrane, s-BLM)作为生物膜模型, 利用 Fenton 体系产生羟自由基(hydroxyl free radical, $\cdot\text{OH}$), 采用循环伏安法研究了 s-BLM 与 $\cdot\text{OH}$ 之间的相互作用. 结果表明: $\cdot\text{OH}$ 通过与磷脂发生化学反应, 诱发 s-BLM 上形成孔洞或缺陷, 这种作用对时间、 FeSO_4 和 H_2O_2 的浓度具有依赖性, 且不可恢复. 具有还原性基团的抗氧化剂维生素 C, 还原型谷胱甘肽和 L-半胱氨酸, 通过与 $\cdot\text{OH}$ 发生氧化还原反应, 可抑制 $\cdot\text{OH}$ 与 s-BLM 的相互作用, 降低 $\cdot\text{OH}$ 对 s-BLM 结构的破坏程度.

关键词 支撑磷脂双层膜; 循环伏安; 羟自由基; 抗氧化剂

Electrochemical Study on the Destructive Effect of Hydroxyl Free Radical on Supported Bilayer Lipid Membrane and Protective Effect of Water-Soluble Antioxidant

WANG, Jian-Guo^{*a} JIANG, Li-Li^a YANG, Wei-Wei^a

CHI, Hong-Xun^b SUN, Qiao-Hua^a LÜ, Hui^a

(^a College of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036)

(^b Eastern Liaoning University, Dandong 118003)

Abstract Supported bilayer lipid membrane (s-BLM) was served as a biomembrane model. The interaction between s-BLM and hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) produced by Fenton system was investigated by means of cyclic voltammetry. The results show that $\cdot\text{OH}$ can induce pore or defect on s-BLM through chemical interaction with lecithin. The interaction between them depends on time, concentration of FeSO_4 and H_2O_2 , moreover, it is not reversible. Through redox reaction with $\cdot\text{OH}$, the antioxidants including vitamin C, glutathione and L-cysteine which contain reductive radicals, can suppress the interaction between $\cdot\text{OH}$ and BLM. Therefore, they can decrease the destructive degree of the structure of s-BLM.

Keywords supported bilayer lipid membrane; cyclic voltammetry; hydroxyl free radical; antioxidant

自由基是独立存在的带有不成对电子的原子、分子、离子或基团, 人体内约 95% 以上的自由基为氧自由基. 在正常生理条件下, 氧自由基在人体内细胞呼吸、甲状腺素合成等代谢过程中, 都起着重要作用, 是对人

体有益的. 然而一旦机体出现应激或疾病时, 氧自由基就会过量产生, 从而对人体造成危害. 而羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 则是目前所知活性氧中对生物体毒性最强的、危害最大的一种自由基^[1]. 它可以破坏蛋白质的构象^[2~4]、

* E-mail: jgwang@lnu.edu.cn; Fax: 024-62202380.

Received December 8, 2006; revised January 23, 2007; accepted March 26, 2007.

国家自然科学基金(No. 20271024)和辽宁省教育厅青年基金(No. 2004F026)资助项目.

促使线粒体 DNA 单链断裂^[5]、引发细胞的体外分化^[6]等。

生物膜对细胞生命活动是至关重要的。磷脂是构成生物膜的主要成分, 其中的脂肪酸有很大一部分是不饱和的, 极易和自由基作用而发生脂质过氧化反应, 从而造成生物膜结构的破坏, 影响其活性和功能的正常发挥, 进而导致生物系统的严重损害。因此如何抑制自由基以防治各种疾病的发生, 已引起人们的广泛关注。

维生素 C(又名抗坏血酸), 是体内一种重要的水溶性抗氧化剂。它在体内直接与自由基作用生成不活跃的自由基产物, 然后被代谢为草酸排出体外, 从而达到抗氧化的效果^[7]。由于维生素 C 的抗氧化作用, 它能够有效地抑制 LDL(低密度脂蛋白)发生脂质过氧化反应^[8-10]。还原型谷胱甘肽广泛分布于机体各器官内, 它含有活性巯基(SH), 它自身易受某些物质氧化, 所以还原型谷胱甘肽在体内能保护许多蛋白质和酶等分子中的巯基不被自由基等有害物质氧化^[11]。还原型谷胱甘肽能够抑制羟自由基引发的脂质过氧化反应^[12], 还可遏制因氧化应激而产生的活性氧基团^[13], 其作为抗氧化剂得到了较为广泛的应用。具有活性巯基(SH)结构的 L-半胱氨酸也是一种水溶性的抗氧化剂^[14,15], 它能抑制因氧化应激产生的自由基对 DNA 的破坏^[16], 还能有效地遏制自由基引发的脂质过氧化反应^[17], Griffith 和 Schulpis 等^[18,19]研究表明 L-半胱氨酸能够适当地调制谷胱甘肽的合成, 而合成出来的谷胱甘肽能够抑制磷脂的过氧化反应, 因此它在保护细胞免受氧化应激破坏方面又具有重要的间接作用。L-半胱氨酸的上述生理功能和化学特性, 使其近年来得到越来越广泛的应用。

有关维生素 C、还原型谷胱甘肽和 L-半胱氨酸抗氧化作用的研究是国内外热门研究课题之一, 但利用电化学方法和模拟生物膜来研究羟自由基对生物膜的破坏及维生素 C、还原型谷胱甘肽和 L-半胱氨酸的抗氧化作用尚未见报道。支撑磷脂双层膜(s-BLM)制备简单, 有良好的稳定性, 采用电化学方法研究支撑磷脂双层膜与物质的相互作用重现性较为理想。我们在铂电极表面构筑支撑磷脂双层膜, 采用循环伏安法对于羟自由基与生物膜的相互作用以及维生素 C、还原型谷胱甘肽和 L-半胱氨酸的抗氧化作用进行研究, 发现羟自由基对支撑磷脂双层膜有明显的破坏作用, 上述三种抗氧化剂对羟自由基有显著的抑制作用。

1 实验部分

1.1 试剂

磷脂酰胆碱 phosphatidylcholine(简称 PC)、胆固醇

cholesterol(简称 CH)、维生素 C、还原型谷胱甘肽, L-半胱氨酸均购于美国 Sigma 公司。双氧水、硫酸亚铁、铁氰化钾、亚铁氰化钾、氯化钾、环己烷购于中国医药(集团)上海化学试剂有限公司。其它试剂均为分析纯。

实验用水是经过全石英蒸馏器蒸馏所得的二次蒸馏水(18.2 MΩ·cm)。

1.2 实验仪器和装置

采用美国 Princeton Applied Research 公司的 273A 恒电流/电位仪进行循环伏安测量, 循环伏安实验在铁氰化钾、亚铁氰化钾测试溶液(testing solution)中进行。该溶液是由 0.1 mol/L KCl(作为支持电解质), 1.0 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ 和 1.0 mmol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ (即两者的物质的量之比为 1:1)所组成的。

所有实验均采用三电极体系, 工作电极为铂电极, 参比电极为 Ag/AgCl(饱和 KCl)电极, 对电极为铂片电极。

所有实验都在 25 °C 室温及溶液通氩气除氧条件下进行。

1.3 支撑磷脂双层膜的制备

支撑磷脂双层膜制备及验证方法参见文献[20, 21]。

1.4 羟自由基的产生

Fenton 反应^[22,23]: 在 50 mL 容量瓶中依次加入 5 mL 0.75 mol/L, pH=7.40 的磷酸盐缓冲溶液, 5 mL 7.5 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液, 5 mL 0.033 mol/L 的 H_2O_2 溶液(实验前 H_2O_2 溶液浓度采用碘量法标定), 用水稀释至刻度, 反应 2 min 后即与磷脂双层膜作用。

2 结果与讨论

2.1 羟自由基对磷脂双层膜的作用

将修饰有磷脂双层膜的铂电极浸入羟自由基制备体系中, 每间隔 5 min 将其放入铁氰化钾、亚铁氰化钾测试溶液中进行电化学测试, 其循环伏安响应如图 1 所示。

可以看到随着磷脂双层膜与羟自由基作用时间的增加, 循环伏安图中的氧化还原峰电流也在不断增加, 这说明 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 越来越容易到达铂电极表面, 并发生了电子的传递, 也就是说羟自由基使磷脂双层膜的结构发生了明显改变, 使其表面形成了孔洞或缺陷, 并且随着作用时间的增加, 孔洞或缺陷的面积越来越大。当作用 20 min 时, 氧化还原峰电流不再发生变化, 磷脂双层膜基本达到稳定。将作用 20 min 后的磷脂双层膜放入 0.1 mol/L KCl 的溶液中, 静置 1 h 后, 进行循环伏安扫描, 发现其循环伏安曲线基本保持不变, 这说明磷脂双

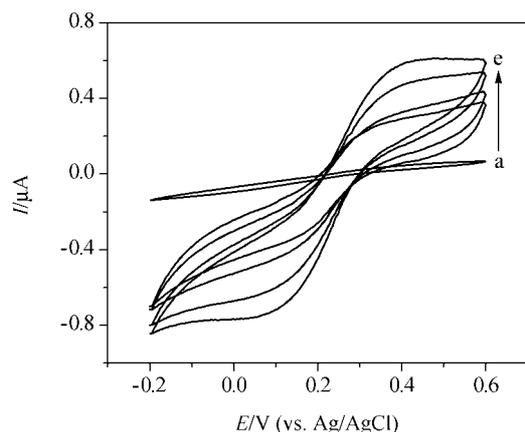


图 1 修饰磷脂双层膜的铂电极在测试溶液中的循环伏安图 a~e 分别为与 Fenton 体系作用 0, 5, 10, 15, 20 min 后的磷脂双层膜(扫速: 50 mV/s)

Figure 1 Cyclic voltammograms of the platinum electrode modified with BLM in testing solution

a~e representing BLM after interacting with Fenton system for 0, 5, 10, 15 and 20 min, respectively (scan rate: 50 mV/s)

层膜形成的孔洞或缺陷没有恢复, 羟自由基对磷脂双层膜造成了不可逆的损伤. 生物实验已发现, 羟自由基能使神经细胞膜上的磷脂发生脂质过氧化反应, 最终导致神经细胞膜被破坏, 神经细胞坏死^[24]. 我们的实验结果与之相一致.

2.2 Fenton 试剂的影响

2.2.1 H₂O₂ 浓度的影响

在羟自由基制备体系中, 保持磷酸盐和 FeSO₄ 的浓度不变, 制成 H₂O₂ 浓度分别为 3.3, 1.7, 1.1, 0 mmol/L 溶液, 然后将它们分别与修饰有磷脂双层膜的铂电极作用 5 min 后, 在铁氰化钾、亚铁氰化钾测试溶液中进行循环伏安扫描, 其电化学响应如图 2 所示.

从图 2 可以看到, 随着 H₂O₂ 浓度的降低, 循环伏安中的氧化还原峰电流也随之降低, 这说明到达电极表面、产生响应的探针分子数目在减少, 也就是磷脂双层膜上形成的孔洞或缺陷的面积在减少, 即与膜作用的羟自由基数目在减少. 这是因为 H₂O₂ 量的减少, 导致羟自由基制备体系产生的羟自由基数目也随之减少. 当 H₂O₂ 浓度为 0 mmol/L、只有 Fe²⁺ 单独存在时, 其循环伏安曲线与磷脂双层膜的基本重合, 这说明 Fe²⁺ 不与磷脂双层膜发生作用, 磷脂双层膜的结构未发生改变, 因此它们的电化学响应是一致的.

2.2.2 Fe²⁺ 浓度的影响

同样, 保持羟自由基制备体系中磷酸盐和 H₂O₂ 的浓度不变, 改变 FeSO₄ 溶液浓度, 使其分别为 0.75, 0.38, 0 mmol/L. 然后将修饰有磷脂双层膜的铂电极分别与它们作用 5 min 后, 再放入铁氰化钾、亚铁氰化钾测试溶

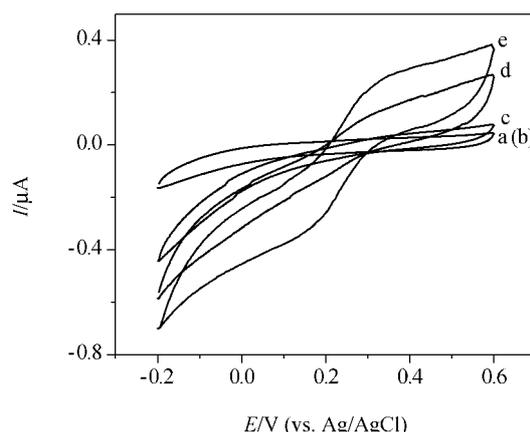


图 2 修饰 BLM 的铂电极与含有不同 H₂O₂ 浓度的 Fenton 体系作用后, 在测试溶液中的循环伏安图

a—作用前的磷脂双层膜; b~e 分别为与含有 0, 1.1, 1.7, 3.3 mmol/L H₂O₂ 的 Fenton 体系作用 5 min 后的磷脂双层膜(扫速: 50 mV/s)

Figure 2 Cyclic voltammograms of the platinum electrode modified with BLM after interaction with Fenton system containing different concentration of hydrogen peroxide in testing solution

a—BLM before interaction; b~e representing BLM after interacting with Fenton system of 0, 1.1, 1.7, 3.3 mmol/L H₂O₂ for 5 min, respectively (scan rate: 50 mV/s)

液中进行循环伏安扫描, 其电化学响应如图 3 所示.

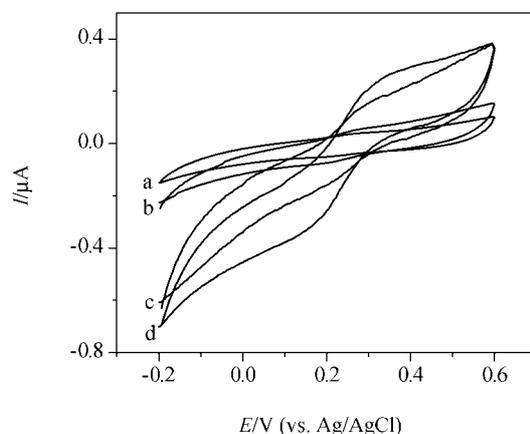


图 3 修饰 BLM 的铂电极与含有不同 Fe²⁺ 浓度的 Fenton 体系作用后, 在测试溶液中的循环伏安图

a—作用前的磷脂双层膜; b~d 分别为与含有 0, 0.38, 0.75 mmol/L FeSO₄ 的羟自由基制备体系作用 5 min 后的磷脂双层膜(扫速: 50 mV/s)

Figure 3 Cyclic voltammograms of the platinum electrode modified with BLM after interaction with Fenton system containing different concentration of ferrous ion in testing solution

a—BLM before interaction; b~d representing BLM after interacting with Fenton system of 0, 0.38, 0.75 mmol/L FeSO₄ for 5 min, respectively (scan rate: 50 mV/s)

从图 3 可以看到, 循环伏安图中的氧化还原峰电流随着 Fe²⁺ 浓度的降低而迅速减小, 这是由于 Fe²⁺ 的减

少, 导致了制备体系产生羟自由基的数量也随之减少, 对磷脂双层膜结构破坏作用也就减弱. 当 Fe^{2+} 浓度为 0 mmol/L 时, 虽然体系很难产生羟自由基, 但仍有少许氧化还原峰电流产生. 这是因为体系中的 H_2O_2 本身具有一定氧化能力, 它能够氧化磷脂^[25], 对支撑磷脂双层膜的结构造成一定破坏, 使膜上形成微小孔洞或缺陷, 但 H_2O_2 对膜破坏速度明显低于羟自由基, 也就是证明 H_2O_2 对生物膜的破坏小于羟自由基.

2.3 维生素 C、还原型谷胱甘肽及 L-半胱氨酸对羟自由基的抑制作用

根据 Sabatini 和 Rubinstein^[26] 的理论, 自组装双层膜的表面针孔的分数, 即覆盖率, 可由其氧化还原峰的峰面积与裸铂电极氧化还原峰的峰面积之比来粗略估计^[27]. 我们采用积分的方法求出各循环伏安曲线氧化还原峰的峰面积, 然后计算覆盖率, 从而对 $\bullet\text{OH}$ 与磷脂双层膜的相互作用以及抗氧化剂的抑制效应进行了定量研究.

分别配制含 2.0 mmol/L 维生素 C、还原型谷胱甘肽、L-半胱氨酸的羟自由基制备体系和分别配制含 9.9 mmol/L 维生素 C、还原型谷胱甘肽、L-半胱氨酸的羟自由基制备体系. 把修饰有磷脂双层膜的铂电极与含有抗氧化剂和不含抗氧化剂的羟自由基制备体系作用 5 min 后, 将电极取出, 放入测试溶液中进行循环伏安扫描, 得到循环伏安曲线进行积分、计算覆盖率, 结果列于表 1.

我们分别研究了 Fenton 体系中抗氧化剂的浓度大于和小于 H_2O_2 浓度(抗氧化剂为 9.9 和 2.0 mmol/L)时, $\bullet\text{OH}$ 与磷脂膜的作用情况, 从表 1 可以看到, 作用后磷脂双层膜的覆盖率有所减小(e 小于 a), 这说明磷脂双层膜上形成了孔洞或缺陷, 证明了 $\bullet\text{OH}$ 对膜有明显的破坏作用. 同时从表 1 还可以看到, 与含有抗氧化剂 b~d 的 Fenton 体系作用后, 磷脂双层膜的覆盖率均大于 e, 这证明了抗氧化剂对 $\bullet\text{OH}$ 与磷脂双层膜的作用存在抑制效应, 能够保护磷脂膜. 然而, 即使在 Fenton 体系中添加高浓度的抗氧化剂, 磷脂双层膜的覆盖率始终小于 a, 这表明抗氧化剂并不能完全阻断 $\bullet\text{OH}$ 与磷脂双层膜的相互作用, 这是因为抗氧化剂对羟自由基的清除率不可

能达到 100%, 不会使羟自由基全部泯灭. 徐向荣等^[28] 研究了抗坏血酸和硫脲对 Fenton 体系产生的羟自由基的清除效应, 发现它们对 $\bullet\text{OH}$ 的最高清除率为 80% 左右, 这与我们上述实验结果是一致的. 根据表 1 中覆盖率, 我们还可以比较出三种抗氧化剂泯灭自由基能力的大小: 维生素 C > 还原型谷胱甘肽 > L-半胱氨酸, 从其覆盖率变化范围(90.1%~93.4%)可以看出, 这三种抗氧化剂清除自由基的能力相差并不是很明显.

3 讨论

以上实验结果表明羟自由基具有很强的活性, 它能够与支撑磷脂双层膜发生强烈相互作用, 使磷脂双层膜上迅速形成孔洞或缺陷, 然后探针分子通过这些孔洞或缺陷到达电极表面、产生电化学响应. 由于与 $\bullet\text{OH}$ 作用后的磷脂双层膜不能在 KCl 溶液中恢复, 可以推断 $\bullet\text{OH}$ 并不是通过单纯的嵌入磷脂双层膜中, 降低磷脂双层膜排列的有序性, 进而使其结构发生改变的, 而是与磷脂双层膜上的磷脂发生了过氧化反应. 因而随着作用时间的增加, 越来越多的磷脂与 $\bullet\text{OH}$ 发生作用, 使得磷脂双层膜上形成孔洞或缺陷的面积越来越大, 这也就导致越来越多的探针分子到达铂电极表面, 在铂电极表面发生电子传递. Obata 等^[24] 通过实验发现, 羟自由基能使神经细胞膜上的磷脂发生脂质过氧化反应, 破坏神经细胞膜结构, 最终导致神经细胞坏死; Akintonwa 等^[29] 的研究证明, 羟自由基能够破坏 HIV 的外部磷脂膜; 羟自由基还能使甘油磷酸酯和神经鞘脂类发生脂质过氧化反应, 造成中枢神经系统破坏^[30]. 这与我们工作中得到的结果相一致.

我们分别将水溶性抗氧化剂维生素 C、还原型谷胱甘肽及 L-半胱氨酸添加到体系中, 由于维生素 C 的羟基(OH)结构, 以及还原型谷胱甘肽和 L-半胱氨酸的巯基(SH)结构, 使得它们自身都具有还原性. 当它们与具有氧化性的羟自由基在体系中相遇时, 会与之发生氧化还原反应, 这样就会泯灭掉一部分 $\bullet\text{OH}$. Rose 等^[7] 发现维生素 C 具有清除自由基的能力, 它与 $\bullet\text{OH}$ 作用后生成不活泼的维生素 C 自由基; 也有文献报道维生素 C 能在自

表 1 磷脂覆盖率的分析

Table 1 Analysis of cover rate of lecithin

	作用前的磷脂 双层膜	作用后的磷脂双层膜						
		维生素 C/ (mmol·L ⁻¹)		还原型谷胱甘肽/ (mmol·L ⁻¹)		L-半胱氨酸/ (mmol·L ⁻¹)		不含抗 氧化剂
编号	a	b ₁ (2.0)	b ₂ (9.9)	c ₁ (2.0)	c ₂ (9.9)	d ₁ (2.0)	d ₂ (9.9)	e
积分面积	0.0404	0.0661	0.0532	0.0736	0.0581	0.0791	0.0640	0.166
覆盖率(1-积分面积÷A)×100%	95.0	91.7	93.4	90.8	92.7	90.1	92.0	79.3

^aA 为裸铂电极在测试溶液中循环伏安曲线的积分面积, A=0.800.

由基引起脂质过氧化反应前, 有效地捕获自由基, 防止脂质过氧化损害^[31]; Escalante 等^[32]的研究也表明维生素 C 可以有效地抑制磷脂被氧化. Zhang 等^[33]和 Pocernich 等^[34]的研究表明还原型谷胱甘肽可以清除包含羟自由基在内的多种自由基; 还原型谷胱甘肽通过自身作为还原剂与自由基反应, 以此来保护酶和血红素的巯基不被氧化, 从而使红细胞免受氧化破坏^[11]. L-半胱氨酸因为具有巯基结构, 使得它能够抑制自由基进攻脂质, 减少脂质过氧化物的产生^[17]; L-半胱氨酸还能抑制因氧化应激产生的自由基对 DNA 的破坏^[16]. 我们的实验结果表明: Fenton 体系中的水溶性抗氧化剂, 明显减少了磷脂双层膜覆盖率下降的幅度, 也就是说水溶性抗氧化剂减少了体系内 $\cdot\text{OH}$ 的数目, 降低了磷脂发生过氧化反应的程度. 因此我们可以推测: 在生物体内水溶性抗氧化剂也会通过其较强的还原能力泯灭溶液中 $\cdot\text{OH}$, 起到对磷脂双层膜的保护作用的. 氧化应激是在系统抗氧化能力不足的情况下发生的, 补充水溶性抗氧化剂能有效地抑制 $\cdot\text{OH}$, 保护生物膜、蛋白质、DNA 等免遭 $\cdot\text{OH}$ 的破坏.

4 小结

利用循环伏安法研究了支撑磷脂双层膜与羟自由基之间相互作用, 以及维生素 C、还原型谷胱甘肽和 L-半胱氨酸对这种作用的影响. 发现 s-BLM 与 $\cdot\text{OH}$ 之间的相互作用对 FeSO_4 , H_2O_2 的浓度及作用时间具有明显的依赖性, 具有抗氧化能力的维生素 C、还原型谷胱甘肽及 L-半胱氨酸, 能够起到抑制 $\cdot\text{OH}$ 、保护 s-BLM 的作用.

References

- 1 Knight, J. A. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1995**, 25, 111.
- 2 Du, J.; Gebicki, J. M. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, 36, 2334.
- 3 Nagy, I. Z.; Floyd, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 790, 238.
- 4 Neuzil, J.; Stocker, R. *FEBS Lett.* **1993**, 331, 281.
- 5 Scotti, C.; Iamele, L.; Alessandrini, A.; Vannini, V.; Cazzalini, O.; Lazze, M. C.; Melli, R.; Savio, M.; Pizzala, R.; Stivala, L. A.; Biglieri, S.; Tomasi, A.; Bianchi, L. *Mitochondrion* **2003**, 2, 361.
- 6 Oravec, K.; Bazso-Dombi, E.; Jeney, F.; Nagy, K.; Gecse, M.; Zs, N. I. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **2001**, 33, 61.
- 7 Rose, R. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 169, 430.
- 8 Martin, A.; Frei, B. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **1997**, 17, 1583.
- 9 Stocker, R.; Bowry, V. W.; Frei, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 1646.
- 10 Frei, B.; England, L.; Ames, B. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, 86, 6377.
- 11 El, R. F. H.; Al, T. W. A.; Stohs, S. J. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1984**, 44, 423.
- 12 Sohal, R. S. *Exp. Gerontol.* **1988**, 23, 211.
- 13 Noctor, G.; Foyer, C. H. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, 49, 249.
- 14 Shpigun, L. K.; Arharova, M. A.; Brainina, K. Z.; Ivanova, A. V. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 573~574, 419.
- 15 Jana, S.; Choudhuri, M. A. *Aquat. Bot.* **1987**, 27, 203.
- 16 Tsakiris, S.; Parthimos, T.; Parthimos, N.; Tsakiris, T.; Schulpis, K. H. *Pharmacol. Res.* **2006**, 53, 386.
- 17 Saravanan, N.; Senthil, D.; Varalakshmi, P. *Pharmacol. Res.* **1995**, 32, 165.
- 18 Griffith, O. W. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 27, 922.
- 19 Schulpis, K. H.; Reclos, G. J.; Parthimos, T.; Parthimos, N.; Gavriilidis, A.; Tsakiris, S. *Clin. Biochem.* **2006**, 39, 1002.
- 20 Diao, P.; Jiang, D.-L.; Cui, X.-L.; Gu, D.-P.; Tong, R.-T.; Zhong, B. *Electrochemistry* **1999**, 5, 288 (in Chinese). (刁鹏, 蒋殿录, 崔晓丽, 顾登平, 童汝亭, 钟炳, 电化学, **1999**, 5, 288.)
- 21 Wang, J.-G.; Jiang, L.-L.; Hui, F.; Yang, W.-W.; Lü, H.; Sun, Q.-H. *Acta Chim. Sinica* **2007**, 65, 239 (in Chinese). (王建国, 江黎丽, 惠飞, 杨薇薇, 吕慧, 孙巧花, 化学学报, **2007**, 65, 239.)
- 22 Zhao, B. L.; Li, X. J.; He, R. G.; Cheng, S. J.; Xin, W. J. *Cell Biophys.* **1989**, 14, 175.
- 23 Stadtman, E. R.; Berlett, B. S. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 17201.
- 24 Obata, T.; Yamanaka, Y.; Kinemuchi, H.; Orelan, L. *Brain Res.* **2001**, 906, 170.
- 25 Chan, W. K. M.; Faustman, C.; Yin, M.; Decker, E. A. *Meat Sci.* **1997**, 46, 181.
- 26 Sabatini, E.; Rubinstein, I. *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 6663.
- 27 Wang, J.-G.; Teng, R.-R.; Wang, E.-K. *Acta Chim. Sinica* **2001**, 59, 2138 (in Chinese). (王建国, 滕人瑞, 汪尔康, 化学学报, **2001**, 59, 2138.)
- 28 Xu, X.-R.; Wang, W.-H.; Li, W.-B. *Prog. Biochem. Biophys.* **1999**, 26, 67 (in Chinese). (徐向荣, 王文华, 李文斌, 生物化学与生物物理进展, **1999**, 26, 67.)
- 29 Akintonwa, D. A. *Med. Hypotheses* **2002**, 59, 622.
- 30 Brett, R.; Rumsby, M. G. *Neurochem. Int.* **1994**, 24, 241.
- 31 Sies, H.; Stahl, W. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, 62, 1315S.
- 32 Escalante, A. S.; Djenane, D.; Torrescano, G.; Beltrán, J. A. Roncalés, P. *Meat Sci.* **2001**, 58, 421.
- 33 Zhang, P.; Omaye, S. T. *Toxicol. in vitro* **2001**, 15, 13.
- 34 Pocernich, C. B.; La, F. M.; Butterfield, D. A. *Neurochem. Int.* **2000**, 36, 185.