

虾青素可能通过 H^+ 传递功能保护 NaN_3 损伤的人胎肝 L-02 细胞

马 建¹, 陈海敏¹, 严小军^{1*}, 王 峰², 徐炜烽²

(1. 宁波大学浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 浙江省宁波市李惠利医院检验科, 浙江 宁波 315041)

摘要: 观察虾青素 (astaxanthin) 对呼吸链复合体 IV 抑制剂叠氮钠 (NaN_3) 损伤的人胎肝 L-02 细胞保护作用, 并初步探讨其作用机制。100 $mmol \cdot L^{-1}$ NaN_3 用于构建肝损伤细胞模型, 通过测定不同浓度虾青素 (0.01、0.10、1.00 及 10.00 $nmol \cdot L^{-1}$) 对损伤细胞存活率 (MTT 检测)、细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平 (DCFH-DA 检测)、细胞凋亡率 (Annexin V-FITC/PI 双染法) 以及线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 水平 (JC-1 法) 的影响, 发现虾青素能抑制损伤细胞晚期凋亡; 对细胞存活率和 MMP 的保护作用呈现先增加后降低的非剂量依赖性关系, 其中 0.10 $nmol \cdot L^{-1}$ 虾青素表现为较强的保护作用; 实验浓度范围内的虾青素并不能显著降低细胞内 ROS 水平 ($P > 0.05$)。为进一步探讨虾青素对损伤细胞的保护作用, 人工制备平面双层磷脂膜 (planar bilayer lipid membrane, BLM) 模拟线粒体膜, 测定不同浓度虾青素 (0.1%、2.0%、10.0%) 对 H^+ 的传递能力。结果显示, 虾青素对 H^+ 传递效率无剂量依赖性, 中等浓度 (2.0%) 的虾青素能够较高效率地传递 H^+ 。结果提示, 虾青素对 NaN_3 损伤的人胎肝细胞的保护作用与其直接淬灭 ROS 的抗氧化功能无关, 而可能是通过适当浓度下的虾青素对 H^+ 的高效传递进而维持线粒体膜电位实现的。

关键词: 虾青素; 线粒体膜电位; 活性氧自由基; 细胞凋亡

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 05-0521-06

Astaxanthin inhibits sodium azide-induced cytotoxicity in hepatocyte L-02 cells probably by H^+ transferring function

MA Jian¹, CHEN Hai-min¹, YAN Xiao-jun^{1*}, WANG Feng², XU Wei-feng²

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Lihuli Hospital of Ningbo Medical Center, Ningbo 315041, China)

Abstract: This study is to investigate the protective effect of astaxanthin against injured hepatocyte L-02 cells induced by sodium azide (NaN_3) and reveal the possible mechanisms. Hepatocyte L-02 cells were exposed to 100 $mmol \cdot L^{-1}$ NaN_3 with various concentrations of astaxanthin pre-incubated, then the cell viability was measured by MTT method; The level of reactive oxygen species (ROS) was determined by DCFH-DA method; The changes of mitochondrial membrane potential (MMP) and apoptosis ratio were detected by JC-1 method and Annexin V-FITC/PI double stain method, respectively. Results showed that after cells were exposed to 100 $mmol \cdot L^{-1}$ NaN_3 for 3 hours, the cell viability significantly decreased; ROS level and the percentage of late phase apoptosis increased obviously; MMP was also declined. When cells were pretreated with astaxanthin, the cell damage and late phase apoptosis ratio reduced and MMP was maintained. However, the level of ROS showed insignificant decrease ($P > 0.05$). The beneficial concentration of astaxanthin in improving cell viability and MMP was not in a dose dependent manner and the most effective of which was 0.10 $nmol \cdot L^{-1}$ ($P < 0.01$). In

收稿日期: 2010-11-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30800860); 宁波市自然科学基金资助项目 (2010A610028); 宁波大学研究生科研创新基金项目 (NG09JLA017).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-574-87600590, E-mail: xiaojunyan@nbu.edu.cn

order to reveal its possible non-antioxidant mechanism, mitochondrial membrane was imitated and H^+ transferring function of astaxanthin was also detected by bilayer lipid membrane (BLM) method. Results showed that 2.0% astaxanthin could transfer H^+ efficiently. These suggested the mechanisms of astaxanthin in protection of hepatocyte L-02 cells not *via* its ROS quenching capability but *via* its H^+ transferring function, which improved the mitochondrial function and had the sequence biology effects.

Key words: astaxanthin; mitochondrial membrane potential; reactive oxygen species; apoptosis

肝脏是人体内重要的消化代谢和解毒器官, 由于当前环境因素和人类生活节奏的加快, 各种损肝因素所致的肝损伤的发病率与日俱增, 对人类的健康危害极大。据世界卫生组织统计, 中国的肝病患者至少有 1.2 亿, 占世界肝病患者总数的三分之一以上。预防和治疗肝脏相关疾病是当前该研究领域的热点, 也是世界性的难题。虾青素 (astaxanthin, ASN, 图 1) 属于胡萝卜素类, 是一种常见于海藻、甲壳动物和鸟类羽毛中的天然色素。近年来, 大量的生物体内和体外研究表明, 虾青素不仅具有化学抗氧化活性^[1, 2], 而且还具有如抗炎、免疫调节^[3]、抗肿瘤^[4]、保护神经系统^[5, 6]等多种药理作用。有关虾青素保护肝损伤的研究鲜有报道, 体外实验研究^[7]表明, 虾青素较维生素 E 能更有效地防止小鼠肝脏细胞脂质的过氧化反应; 动物实验表明, 虾青素对缺血再灌注的小鼠肝脏有保护作用^[8]。本研究利用线粒体复合物 VI 的特异性阻断剂 NaN_3 阻断呼吸链, 构建体外损伤细胞模型, 研究虾青素对 NaN_3 损伤人胎肝 L-02 细胞的保护作用, 揭示其内在的作用机制, 为虾青素应用于人类肝脏疾病的预防和治疗提供科学依据。

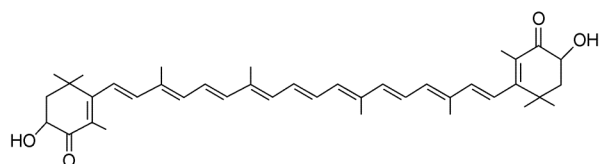


Figure 1 Chemical structure of astaxanthin

材料与方法

实验材料 人胎肝细胞株 L-02 购自中国典型培养物保藏中心 (武汉), 本实验室传代, 供实验用; 虾青素 (纯度 $\geq 92\%$, 批号: 097K1301), 2', 7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠 (DCFH-DA) 和二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPhPC, 纯度 $\geq 99\%$) 均购自 Sigma 公司 (美国); 叠氮钠 (NaN_3 , 分析纯) 购自无锡市默克尔精细化学制品有限公司, 批号: E2003-01-15; 甲基噻唑蓝 (MTT) 购自 Serva 公司 (德国); 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 购自碧云天生物技术研究; Annexin V-FITC

Apoptosis Detection 试剂盒购自 BD 公司 (美国)。

细胞培养 L-02 细胞用 MEM 培养基 (内含 10% 新生小牛血清, $100\text{ u}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素) 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。

损伤细胞模型的建立 取 L-02 细胞, 以细胞数 $5\times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板, 培养 24 h 至指数生长期, 加入最终作用浓度为 31.4、62.4、93.2、124.0、154.0 和 $184.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaN_3 溶液, 继续培养 3 h 后换为无血清 MEM, 加入 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h 后加 DMSO $150\text{ }\mu\text{L}$, 于 492 nm 处测吸收度 (A) 值。细胞存活率 (%) = (实验组平均 A 值/对照组平均 A 值) $\times 100\%$ 。

虾青素对正常和损伤细胞存活率的影响 待细胞长到铺满板底的 70%~80% 时, 加入各种浓度的虾青素溶液, 最终浓度为 0.01、0.10、1.00 和 $10.00\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 培养 12 h 后, 换为无血清 MEM, 再加入 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 溶液, 3 h 后换成无血清 MEM, 以 MTT 法检测细胞存活率。

细胞内 ROS 水平的测定 采用 DCFH-DA 检测细胞内活性氧水平。步骤如下: 收集正常对照组、药物诱导组及虾青素 ($0.01\sim 10.00\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) + 药物诱导组的细胞。将细胞悬浮于含 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFH-DA 的无血清 MEM 中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, PBS 洗 3 次, 用酶标仪测定二氯荧光素 (DCF) 的平均荧光强度, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm。

细胞凋亡率的测定 不同浓度虾青素孵育细胞 12 h, 换成无血清 MEM, 加入 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 , 3 h 后收集细胞, PBS 洗 2 次, binding buffer 重悬并调整细胞数为 $1\times 10^6/\text{mL}$, 加入 Annexin V-FITC $10\text{ }\mu\text{L}$ 和 PI $5\text{ }\mu\text{L}$, 室温染色 15 min, 用流式细胞仪 (Becton Dickinson) 检测。所得数据用 Cell Quest 软件处理, 分析细胞凋亡率。

线粒体膜电位的测定 取 L-02 细胞, 以细胞数 $5\times 10^4/\text{mL}$ 接种于 6 孔板, 待细胞铺满 80% 左右板底时用药物处理。消化后离心, 取培养基 0.5 mL 重悬细胞, 加入 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ JC-1, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光染色 20 h, 用缓冲液洗 2 遍, 用流式细胞仪 488 nm 激发光检测荧

光强度。以荧光强度变化反映线粒体膜电位的变化。

虾青素对 H^+ 传递能力的测定 实验装置和测定方法参照文献^[9, 10], 略有改动。将 DPhPC 0.027 mmol 溶于正-癸烷 1 mL, 将制成的膜涂制液刷于 Teflon 膜上 0.7 mm 的微孔内, 制成的平面双层磷脂膜 (BLM) 用于测定自身的稳定性和系统的密封性。按照上述方法, 配制含虾青素 (与 DPhPC 的摩尔浓度比) 为 0.1%、2.0%、10.0% 的膜涂制液, 用敏感 pH 计测定各浓度的虾青素对 H^+ 的传递能力, 记录 pH 值随时间的变化。每分钟记录一次。

统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件系统进行单因素方差分析。

结果

1 损伤细胞模型的建立

MTT 检测结果 (图 2) 显示, 正常人胎肝 L-02 细胞在不同浓度 NaN_3 作用 3 h 后, 细胞存活率表现为随药物浓度的增加而降低的剂量依赖关系。当 NaN_3 的浓度在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右时, 细胞存活率基本维持在 50%。为使细胞处于损伤状态且又不致使细胞过度死亡, 选择 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为后续实验浓度。

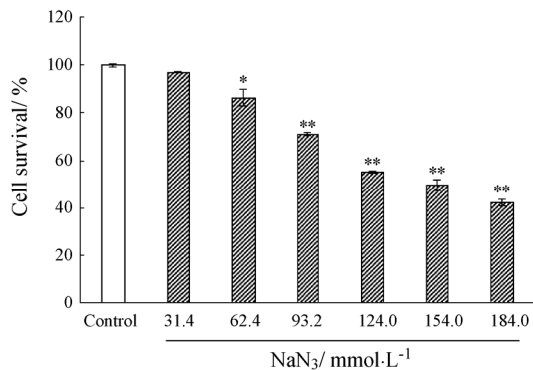


Figure 2 The toxic effect of sodium azide on hepatocyte L-02 cells. Hepatocyte L-02 cells were treated with NaN_3 in gradient concentration for 3 hours and measured for viability by MTT assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2 虾青素对正常和损伤细胞存活率的影响

MTT 结果显示, 实验浓度的虾青素 (0.01、0.10、1.00 和 $10.00 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对正常人胎肝 L-02 细胞的存活率没有影响 (图 3A)。与模型组比较, 各实验浓度的虾青素都能够提高细胞存活率; $0.01 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 虾青素使细胞存活率由 48.9% 上升至 55.0%, 说明低浓度虾青素能较小程度地提高细胞存活率, 当虾青素的浓度达到 $0.10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率从 48.9% 升高至 73.9%, 表现为最高, 说明该浓度下的虾青素能显著

提高细胞存活率; 随着虾青素浓度的进一步增加, 细胞存活率又从 71.1% 降低到 58.6%, 但还是高于 NaN_3 单独处理组 (图 3B)。

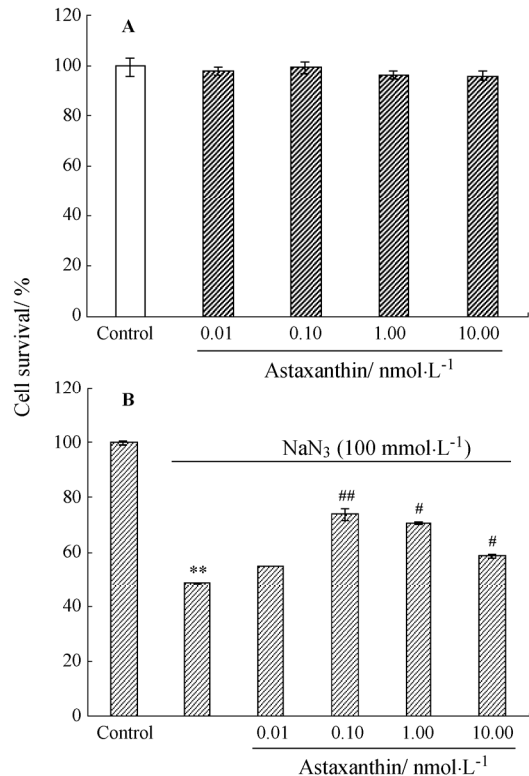


Figure 3 Effect of astaxanthin on survival of hepatocyte L-02 cells. A: Effect of astaxanthin on survival of normal hepatocyte L-02 cells; B: The protective effect of astaxanthin on hepatocyte L-02 cells from sodium azide-induced cell death. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} NaN_3$)

3 虾青素对细胞内 ROS 的影响

NaN_3 与线粒体呼吸链复合物 IV 特异性结合, 电子传递受阻, 而与 O_2 结合生成 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 等活性氧自由基^[11]。与正常对照组比较, NaN_3 单独处理组显著增加了 ROS 水平, 增加量达 $(68.32 \pm 1.58)\%$; 而虾青素预先孵育组, 虽然降低了 ROS 水平, 但降低量非常少, $10.00 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 虾青素使 ROS 水平降低 15.0% 左右, 与模型组相比, 差异不显著 ($P > 0.05$), 且各组 ROS 水平仍然明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 见图 4。结果表明, 虾青素没有显著降低细胞内 ROS 水平, 推测虾青素不是通过清除细胞内 ROS 来保护细胞的。

4 虾青素对细胞凋亡率的影响

研究虾青素对 NaN_3 诱导人胎肝 L-02 细胞凋亡的影响, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率的变化。结果 (图 5) 显示, 正常对照组细胞存在少量的凋亡细胞, 其中正常细胞占 $(95.15 \pm 2.42)\%$ 。

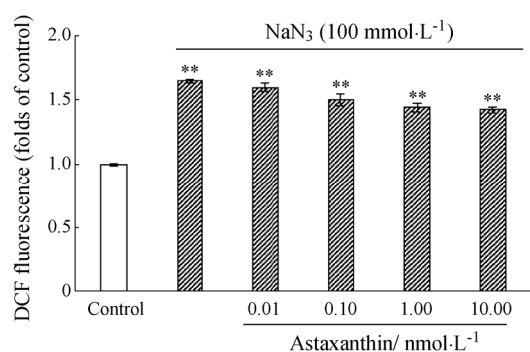


Figure 4 Effects of astaxanthin on intracellular ROS production. Hepatocyte L-02 cells were pre-incubated with 0, 0.01, 0.10, 1.00, and 10.00 nmol·L⁻¹ astaxanthin for 12 hours before treated with 100 mmol·L⁻¹ NaN₃ for 3 hours and then the level of intracellular ROS was determined using the peroxide-sensitive probe DCFH-DA. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group

损伤模型组中, NaN₃ 诱导细胞发生晚期凋亡, 凋亡率为 $(43.37 \pm 2.58)\%$ 。而虾青素预处理后, 各组晚期凋亡率降低, 正常细胞数量增多, 其中 10.00 nmol·L⁻¹ 虾青素使晚期凋亡率减少了 18% 左右, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明, 实验浓度的虾青素能在一定程度上抑制 NaN₃ 诱导细胞发生晚期凋亡, 保护人胎肝 L-02 细胞免受损伤。

5 虾青素对线粒体膜电位的影响

NaN₃ 是线粒体上电子传递链复合物 IV 的特定性阻断剂, 电子传递的阻断伴随着线粒体膜电位的降低, 为初步揭示虾青素抑制凋亡的机制, 检测虾青

素对损伤细胞线粒体膜电位的影响。结果 (图 6) 显示, 对照组中有少部分细胞线粒体膜电位降低, 占细胞总量的 $(4.84 \pm 0.35)\%$; 100 mmol·L⁻¹ NaN₃ 处理组大部分细胞的线粒体膜电位去极化, 仅有 $(34.86 \pm 2.41)\%$ 的细胞的线粒体膜电位维持正常。各浓度虾青素预先孵育组能提高线粒体膜电位, 分别为 $(77.30 \pm 1.49)\%$ 、 $(82.85 \pm 4.25)\%$ 、 $(65.81 \pm 3.47)\%$ 、 $(41.21 \pm 4.81)\%$, 其中 0.10 nmol·L⁻¹ 虾青素能显著提高线粒体膜电位, 表现为最强。这一结果虽无剂量依赖性, 但与 MTT 所测定的细胞存活率与虾青素浓度之间的关系是一致的, 即随着虾青素实验浓度的增加表现为

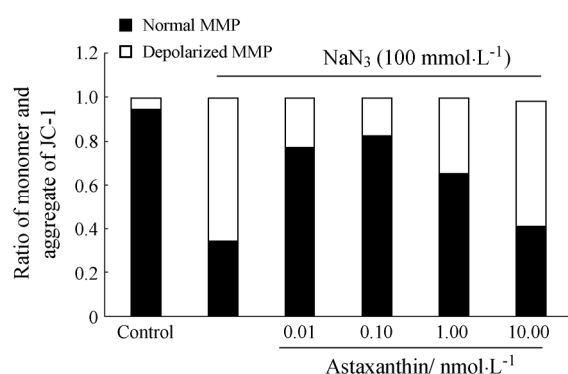


Figure 6 Histogram demonstrated the relative ratio of normal and depolarized MMP in total cells of the group. Hepatocyte L-02 cells were pre-incubated with 0, 0.01, 0.10, 1.00, and 10.00 nmol·L⁻¹ of astaxanthin for 12 hours before treated with 100 mmol·L⁻¹ NaN₃ for 3 hours and subsequently stained with JC-1. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

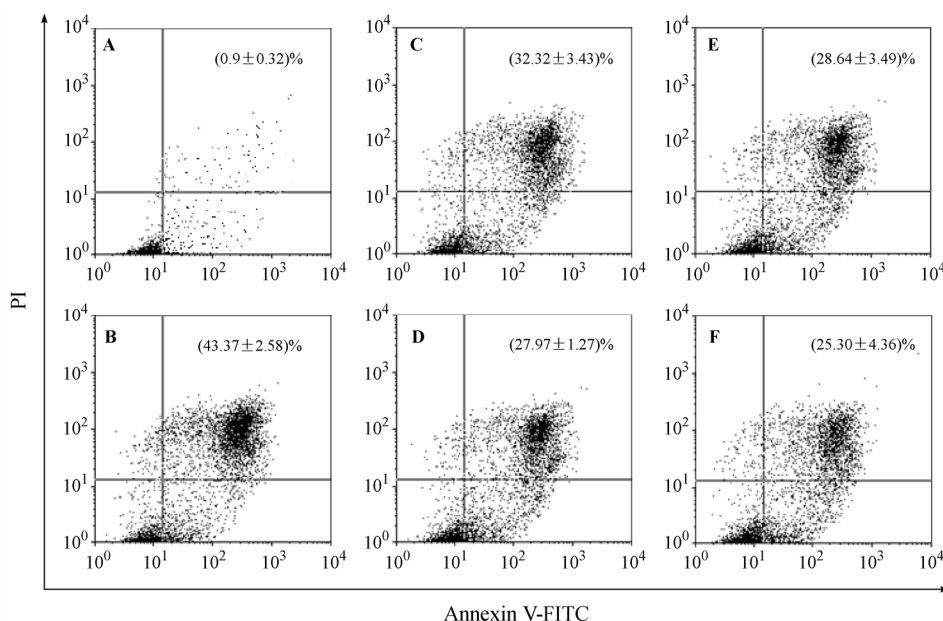


Figure 5 Flow cytometric dot-plots (Annexin V-FITC/PI) of hepatocyte L-02 cells treated with or without astaxanthin for 12 hours. A: Control; B: Model (100 mmol·L⁻¹ NaN₃); C: NaN₃ + astaxanthin (0.01 nmol·L⁻¹); D: NaN₃ + astaxanthin (0.10 nmol·L⁻¹); E: NaN₃ + astaxanthin (1.00 nmol·L⁻¹); F: NaN₃ + astaxanthin (10.00 nmol·L⁻¹). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

先增加再降低的趋势,但各组还是高于模型组,提示虾青素对抑制 NaN_3 诱导人胎肝 L-02 细胞的凋亡作用与保护线粒体功能相关。

6 虾青素对 H^+ 传递能力的影响

以上实验结果发现虾青素并没有显著地降低细胞内 ROS,说明本实验条件下,虾青素可能不是依赖其淬灭自由基的抗氧化活性保护细胞的。为了探讨虾青素可能通过保护线粒体功能发挥生物学效应的潜在机制,通过制备平面双层膜 (BLM) 以模拟线粒体膜,测定虾青素对 H^+ 的传递功能,以揭示虾青素对细胞膜功能的影响。

在测定时间内系统稳定,膜被破坏后,两个槽室达到平衡时的 pH 为 5.80 (图 7A)。测定不同浓度虾青素对 H^+ 的传递效率,结果如图 7B 所示,各浓度的虾青素都能造成 pH 下降,说明由于虾青素分子的掺入使 H^+ 能够在一定程度上透过双层磷脂膜。9 min 内,较高浓度 (10.0%) 的虾青素使 pH 值从中性 7.00 降低到 6.54,对 H^+ 的传递效率最低;较低浓度的虾青素 (0.1%) 使 pH 值从 7.00 降低到 6.36 左右,表现为中等强度的 H^+ 传递效率;而 2.0% 虾青素对 H^+ 的传递效率表现为最高,使 pH 值从 7.00 缓慢降低到 5.86 左右,接近 BLM 被戳破的情况下的 H^+ 自由扩散。说明虾青素分子影响了膜两侧的 H^+ 浓度。

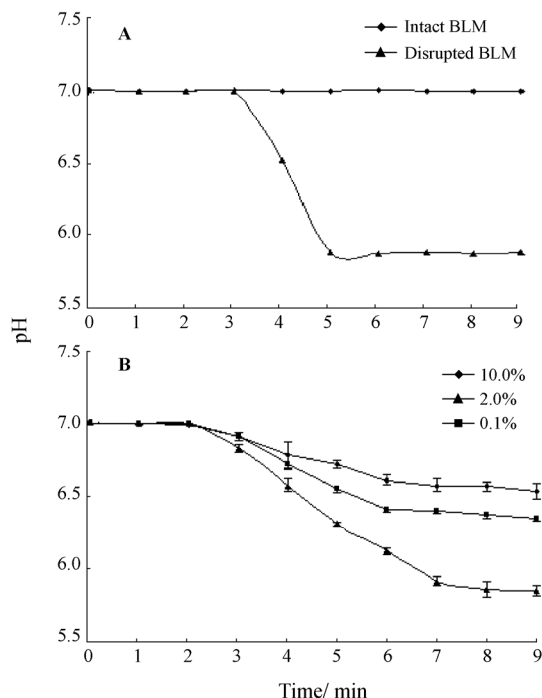


Figure 7 Changes of pH over time in one of two compartments. A: Stability of the BLM and tightness of the system; B: H^+ transferring function of astaxanthin. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

讨论

本研究结果显示,虾青素能够有效地保护肝脏细胞免受 NaN_3 的毒性作用,其机制可能是通过影响线粒体内膜两侧 H^+ 浓度差,进而维持 MMP 实现的,而在该实验条件下可能与清除细胞内 ROS 无关。很多学者认为,虾青素的多种药理活性是由于该化合物具有较强的抗氧化功能,即清除细胞内过多的 ROS^[12-14],缓解细胞非生理条件下的急性氧化胁迫^[15],这是由于虾青素能够像桥梁一样跨膜,将电子从膜的一侧传递到另一侧,高效地清除自由基^[16]。但 Wolf 等^[16]最新报道却持不同观点,该研究发现:虾青素并不能显著地降低抗霉素 A 诱导的人宫颈癌细胞 (HeLa) 和 T 淋巴细胞 (Jurkat) 内 ROS 水平,并认为脂溶性的虾青素定位在膜上,而大部分活性氧自由基都带电,无法与虾青素发生反应。本研究结果与 Wolf 等报道一致,虾青素不能显著地降低 NaN_3 诱导人胎肝 L-02 细胞产生的 ROS。抗氧化剂通过清除 ROS 抑制细胞凋亡的研究屡见不鲜,如辅酶 $CoQ_{10}H_2$ 清除 50% 的 ROS 使细胞凋亡率减少了 20% 左右^[17]; Ikeda 等^[18]研究发现,20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 虾青素使细胞内 ROS 水平降低 50%,细胞凋亡率减少了 20% 左右;但在本研究中,ROS 水平并没有明显降低,作者因此推测虾青素保护细胞的作用机制并非来自其直接淬灭 ROS 的抗氧化活性,而可能是通过其他抗氧化或者非抗氧化 (non-antioxidant) 机制^[19]来实现的。

NaN_3 是呼吸链复合体 IV 的特异性抑制剂,常被用作构建氧化应激情况下的“线粒体损伤”细胞模型的工具药^[20]。 NaN_3 使复合物 IV 蛋白分子构象发生变化,“质子泵”功能丧失,线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 耗散,ATP 合成受阻,导致细胞凋亡或坏死。本实验结果表明,实验浓度范围内的虾青素能够抑制 NaN_3 诱导的人胎肝 L-02 细胞的晚期凋亡,但各组差异不显著 ($P > 0.05$)。据已有报道^[14],虾青素可影响细胞的黏附性,所以作者推测这一原因可能造成 MTT 结果和凋亡数据不一致。有研究发现虾青素能够提高某些细胞的存活率和维持 MMP^[16, 21],本研究证实虾青素对 NaN_3 损伤的人胎肝 L-02 细胞有同样的作用,但实验浓度范围内的虾青素对损伤的 L-02 细胞的保护作用并无剂量依赖性,较高浓度的虾青素对损伤的 L-02 细胞保护性反而降低,提示适当浓度的虾青素才具有较强的保护作用。

目前研究已证实虾青素跨膜定位于线粒体膜发挥生物学功能,本研究中人工制备 BLM 以模拟线粒

体膜, 揭示其保护线粒体功能的内在作用机制。结果表明在本实验条件下虾青素能够传递 H^+ , 并且发现较低浓度 (0.1%) 和较高浓度 (10.0%) 的虾青素对 H^+ 的传递效率较低, 而中等浓度 (2.0%) 传递效率较高, 说明适当浓度的虾青素可以较高效率地传递 H^+ , 这一结果同 MTT 和 MMP 数据一致, 由此推断在损伤的 L-02 细胞内, 定位于线粒体上的虾青素可能通过传递 H^+ 抑制 MMP 的耗散以保护细胞, 而这种保护作用并无剂量依赖性, 适当浓度为最佳。

本研究发现虾青素通过传递 H^+ 进而维持 MMP 可能是其保护肝脏细胞免受氧化应激损伤的的内在机制之一; 只要选择恰当的浓度, 可以达到良好的保护肝细胞的功能。

References

- [1] Lee SH, Min DB. Effects, quenching mechanisms and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil [J]. *J Agric Food Chem*, 1990, 38: 1630–1634.
- [2] O'Connor I, O'Brien N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts [J]. *J Dermatol Sci*, 1998, 16: 226–230.
- [3] Mohammadi M, Nedrud J, Redline R, et al. Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load [J]. *Gastroenterology*, 1997, 113: 1848–1857.
- [4] Chew BP, Wang MW, Park JS, et al. Dietary beta carotene and astaxanthin but not canthaxanthin stimulate splenocyte function in mice [J]. *Anticancer Res*, 1999, 19: 5223–5227.
- [5] de Rijk MC, Breteler MM, den Breeijen JH, et al. Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam study [J]. *Arch Neurol*, 1997, 54: 762–765.
- [6] Tso M, Lam TT. Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage: US, 5527533 [P]. 1996-06-18.
- [7] Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, et al. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin [J]. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 1990, 22: 27–38.
- [8] Curek GD, Cort A, Yucel G, et al. Effect of astaxanthin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion [J]. *Toxicology*, 2010, 267: 147–153.
- [9] Dawson TL, Gores GJ, Nieminen AL, et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes [J]. *Am J Physiol*, 1993, 264 (Cell Physiol): 961–967.
- [10] Pei ZM, Tang ZC. Plain bilayer lipid membranes were used to study ion channels in plants [J]. *Plant Physiol Commun*, 1993, 29: 445–448.
- [11] Mueller P, Rudin DO, Tien HT, et al. Methods for the formation of single biomolecular lipid membranes in aqueous solution [J]. *J Phys Chem*, 1963, 67: 534–535.
- [12] Lee SJ, Bai SK, Lee KS, et al. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing IkappaB kinase-dependent NF-kappaB activation [J]. *Mol Cells*, 2003, 16: 97–105.
- [13] Aoi W, Naito Y, Sakuma K, et al. Astaxanthin limits exercise-induced skeletal and cardiac muscle damage in mice [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5: 139–144.
- [14] Pashkow FJ, Watumull DG, Campbell CL. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease [J]. *Am J Cardiol*, 2008, 101: 58–68.
- [15] McNulty HP, Byun J, Lockwood SF, et al. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768: 167–174.
- [16] Wolf AM, Asoh S, Ohsawa I, et al. Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress [J]. *Nutr Biochem*, 2010, 21: 381–389.
- [17] Alleva R, Tomasetti M, Andera L, et al. Coenzyme Q blocks biochemical but not receptor-mediated apoptosis by increasing mitochondrial antioxidant protection [J]. *FEBS Lett*, 2001, 503: 46–50.
- [18] Ikeda Y, Tsuji S, Satoh A, et al. Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *J Neurochem*, 2008, 107: 1730–1740.
- [19] Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function [J]. *FASEB J*, 1995, 9: 1551–1558.
- [20] Cassarino DS, Bennett Jr JP. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration [J]. *Brain Res Rev*, 1999, 29: 1–25.
- [21] Chan KC, Mong MC, Yin MC, et al. Antioxidative and anti-inflammatory neuroprotective effects of astaxanthin and canthaxanthin in nerve growth factor differentiated PC12 cells [J]. *J Food Sci*, 2009, 74: 25–31.