

·基础研究·

水溶性番茄浓缩物经自噬途径调控血小板的氧化损伤

李孔耀^{1,2,3}, 施译琳^{2,3,4}, 马熙麟¹, 田泽众^{1,2,3}, 邹进超^{1,2,3}, 王锐杰^{1,2,3}, 毛钰蘅^{1,2,3}, 杨燕^{1,2,3}

(1. 中山大学公共卫生学院(深圳), 广东 深圳 518106; 2. 广东省营养膳食与健康重点实验室, 广东 广州 510080;

3. 广东省营养转化工程技术研究中心, 广东 广州 510080; 4. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】过氧化应激可促进血小板氧化损伤,从而加快心血管疾病的发生发展。水溶性番茄浓缩物(Fruitflow)具有抑制血小板聚集、活化的作用,但是否通过自噬减轻血小板氧化损伤仍未见报道。本研究拟通过体外实验探讨Fruitflow对过氧化氢(H₂O₂)导致的小血小板氧化损伤的影响及其潜在机制。【方法】用不同剂量的Fruitflow(0、20、40、80 mg/L)与纯化血小板预孵育30 min,随后加入H₂O₂共孵育60 min。用流式细胞术测定线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)去极化的水平;用酶标仪测定活性氧(ROS)生成水平;用Western blot测定p53、phospho-p53、LC3 II/I、p62的表达水平。【结果】Fruitflow显著减轻H₂O₂导致的小血小板 $\Delta\Psi_m$ 去极化($P<0.05$),ROS生成和p53磷酸化($P<0.05$)。自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA)可以显著逆转Fruitflow对H₂O₂处理血小板ROS生成的抑制作用($P<0.05$)。Fruitflow可以降低静息血小板p62的表达、升高LC3 II/I的比例($P<0.05$),也显著升高H₂O₂处理的血小板LC3 II/I的表达水平($P<0.05$)。此外,3-MA显著逆转Fruitflow降低H₂O₂处理的血小板 $\Delta\Psi_m$ 去极化的作用($P<0.05$)。【结论】Fruitflow可在体外通过促进血小板自噬,显著减轻H₂O₂导致的小血小板氧化损伤。

关键词:水溶性番茄浓缩物;血小板;氧化损伤;自噬;p53

中图分类号:R151.2

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2021)03-0321-07

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2021.0101

Fruitflow, a Water-soluble Tomato Extract, Regulates Platelet Oxidative Damage via Autophagy in Vitro

LI Kong-yao^{1,2,3}, SHI Yi-lin^{2,3,4}, MA Xi-lin¹, TIAN Ze-zhong^{1,2,3}, ZOU Jin-chao^{1,2,3}, WANG Rui-jie^{1,2,3},MAO Yu-heng^{1,2,3}, YANG Yan^{1,2,3}

(1. School of Public Health, Shenzhen, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518106, China; 2. Guangdong Provincial Key

Laboratory of Food, Nutrition and Health, Guangzhou 510080, China; 3. Guangdong Engineering Technology

Research Center of Nutrition Translation, Guangzhou 510080, China; 4. School of Public Health,

Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: YANG Yan; E-mail: yangyan3@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】Excessive oxidative stress can promote platelet oxidative damage and plays an important role in the occurrence and development of cardiovascular diseases. Fruitflow, a water-soluble tomato extract, can inhibit platelet aggregation and activation, but it has not been reported whether Fruitflow can reduce platelet oxidative damage through autophagy. Therefore, we conducted this study to investigate the effect of Fruitflow on oxidative damage in H₂O₂-treated platelets as well as the underlying mechanism *in vitro*.【Methods】Gel-filtered platelets from healthy people were pre-incubated with different concentrations (0, 20, 40, 80 mg/L) of Fruitflow for 30 minutes, and then treated with H₂O₂ (1 mmol/L)

收稿日期:2021-01-22

基金项目:国家自然科学基金(81872617, 82030098),广州市科技计划项目(201804020045),深圳市知识创新计划(JCYJ20180307153228190)

作者简介:李孔耀,硕士生,研究方向:营养与慢性病的防治,E-mail:liky33@mail2.sysu.edu.cn;杨燕,通信作者,E-mail:yangyan3@mail.sysu.edu.cn

for another 60 minutes. The level of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) depolarization was determined by flow cytometry. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect reactive oxygen species (ROS) level. The expression of p53, phospho-p53, LC3 II/I, and p62 was detected by Western blot. **[Results]** Fruitflow significantly inhibited the $\Delta\Psi_m$ depolarization, ROS production and p53 phosphorylation in H_2O_2 -treated platelets ($P<0.05$). The autophagy inhibitor (3-MA) significantly reversed the effect of Fruitflow on reduction of platelet ROS generation ($P<0.05$). In addition, Fruitflow reduced p62 and increased the expression level of LC3 II/I in resting platelets ($P<0.05$), and increased the expression level of LC3 II/I in H_2O_2 -treated platelets ($P<0.05$). Furthermore, the effect of Fruitflow on decreasing $\Delta\Psi_m$ depolarization in H_2O_2 -treated platelet was reversed by 3-MA ($P<0.05$). **[Conclusion]** Fruitflow can significantly reduce the H_2O_2 -induced platelet oxidative damage by promoting autophagy *in vitro*.

Key words: Fruitflow; platelet; oxidative damage; autophagy

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(3): 321-327]

血小板是巨核细胞来源的无核血细胞,具有止血、凝血的基本生理功能^[1]。线粒体在血小板的代谢和活化中发挥主要作用,线粒体损伤是血小板损伤的重要标志^[2]。已有研究发现,部分心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)患者的机体氧化水平升高,血小板内活性氧(reactive oxygen species, ROS)增加,导致血小板线粒体氧化损伤^[3]。因此推测,抑制血小板的氧化损伤可能是防治CVD的有效手段之一。自噬是溶酶体降解双膜泡中受损蛋白和细胞器的过程,可以通过细胞内自噬体形成清除受损线粒体^[4],生理性自噬有助于细胞新陈代谢和某些细胞器更新^[5]。此外,在过氧化条件下,自噬具有促进细胞生存的作用^[4,6],例如,糖尿病患者的血小板在过氧化状态下增强自噬,清除部分ROS和受损线粒体,可保护血小板免受氧化损伤^[7-8]。此外,LC3 I与磷酸二乙醇胺结合产生LC3 II的过程与自噬小体形成有关,因此LC3 II/I的比值大小可以用来评估自噬水平的高低^[4]。膳食营养素干预对于早期防治CVD发挥着重要作用^[9]。流行病学研究表明,膳食摄入番茄可降低心血管疾病的发生率^[10]。水溶性番茄浓缩物(Fruitflow)是使用物理方法除去番茄中的脂溶性成分,并将水溶性成分浓缩而得到的。人群及体外研究表明Fruitflow对血小板具有降低聚集、活化的作用^[11-12]。并且,Fruitflow及其主要的成分具有抗氧化作用^[13-14],然而它对血小板氧化损伤的作用仍不清楚,对血小板自噬的影响也未见报道。因此,本研究拟采用体外实验,探讨Fruitflow对 H_2O_2 导致的小血小板氧化损伤的影响,及血小板自噬在其中可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

招募符合条件的健康志愿者:年龄25~40岁,两周内未曾服用会改变血小板、凝血系统功能的药物或营养补充剂(辅酶Q10、鱼油等);志愿者出现以下任何一种情况将予以排除,包括近半年患有心血管疾病、肿瘤等病史;或者吸烟、酗酒半年以上。研究经中山大学公共卫生学院伦理委员会审批,并依照赫尔辛基宣言进行,参与者对试验方案知情同意。

1.2 主要试剂

Fruitflow粉末获自汤臣倍健公司;过氧化氢(Hydrogen peroxide, H_2O_2)和2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate, DCFH-DA)购自美国Sigma公司;四甲基罗丹明甲酯(Tetramethylrhodamine methyl ester, TM-RM)、一抗LC3 B和二抗goat anti-rabbit、goat anti-mouse购自英国abcam公司;一抗phospho-p53 (serine 15)、p53、p62、 β -actin购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.3 主要仪器与设备

多功能酶标仪 美国Bio Tek公司;流式细胞仪CytoFlex S 美国Beckman Coulter公司;Tanon 5200 发光成像系统 中国Tanon公司。

1.4 方法

1.4.1 制备纯化血小板 清晨,对空腹志愿者用一次性静脉采血针(0.7 mm×25 mm)从肘静脉抽取15 mL的血液,注入含柠檬酸钠(1:9)的真空抗凝管中,离心(300×g, 10 min, 22 °C),取上清为富血

小板血浆。用 Sepharose 2B 柱在 PIPES (1L 溶液含 PIPES 粉末 8.38 g、NaCl 8.01 g、KCl 0.298 g 和葡萄糖 1 g, pH 7.0) 缓冲液中制备纯化血小板, 详见已发表文献^[15]。

1.4.2 测定血小板线粒体膜电位 用不同剂量(0、20、40、80 mg/L)的 Fruitflow 或溶剂对照与纯化血小板在体外共同孵育 30 min 后, 离心弃上清, 并重悬, 加入 H_2O_2 (1 mmol/L) 或溶剂对照继续孵育 40 min, 孵育完成后, 加入终浓度为 400 nmol/L 的 TMRM, 迅速混匀, 避光孵育 20 min, 流式细胞仪测定血小板线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$) 水平, CytExpert 2.3 分析。

1.4.3 测定血小板 ROS 生成水平 纯化后的血小板 (1×10^6 个/mL) 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 共避光孵育 30 min, 离心弃上清, 并重悬。用 80 mg/L 的 Fruitflow 或溶剂对照与纯化血小板共孵育 30 min, 然后加入 H_2O_2 或溶剂对照, 和 3-MA (2 mmol/L) 或溶剂对照, 避光孵育 60 min。收集细胞, 用荧光微孔板检测, 在 488 nm 处激发样品, 在 525 nm 处测定荧光强度。

1.4.4 Western blot 收集 Fruitflow 与 H_2O_2 处理后的血小板, 并离心 (12 000 $\times g$, 4 $^\circ\text{C}$, 15 min), 得到细胞沉淀, 加入混有 (100:1) 蛋白酶抑制剂的裂解液, 冰上裂解 30 min, 再次离心 (12 000 $\times g$, 4 $^\circ\text{C}$, 15 min) 取上清即为血小板蛋白。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 混匀, 制样后 -20 $^\circ\text{C}$ 保存。将样本进行电泳、转膜、封闭, 用对应的一抗 (Phospho-p53、p53、p62、LC3 B、 β -actin) 4 $^\circ\text{C}$ 过夜

孵育, 洗膜, 二抗常温孵育。ECL 化学发光后成像仪成像, 用 Quantity one 计算灰度值。实验至少重复 3 次。

1.5 统计学分析

数据资料用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 5.0 软件分析和绘制统计图。图中的计量资料用均数 \pm 标准误 (standard error of mean, SEM) 表示; 采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 进行多组间比较, 方差分析差异有统计学意义时两两比较采用 Bonferroni 法, 双侧 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

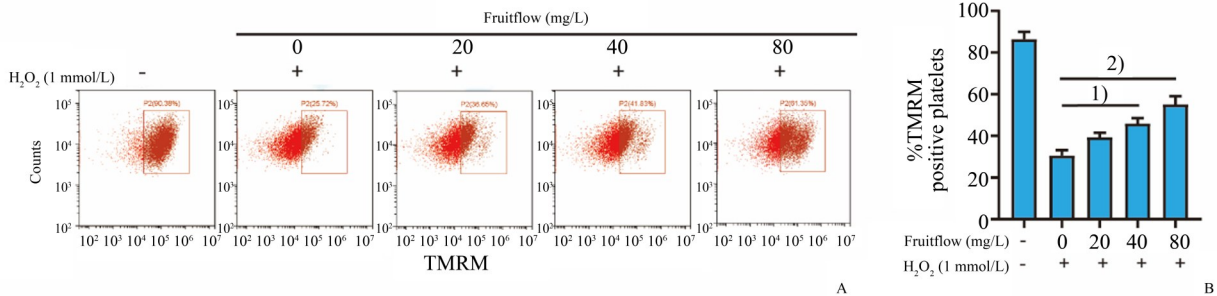
2 结果

2.1 Fruitflow 对 H_2O_2 诱导的血小板损伤的影响

与单纯 H_2O_2 组相比, 40、80 mg/L 的 Fruitflow 能显著升高 TMRM 阳性血小板水平, 这提示 Fruitflow 具有降低血小板线粒体膜电位去极化的作用, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$; 图 1)。

2.2 Fruitflow 对 H_2O_2 诱导的血小板 ROS 生成的影响

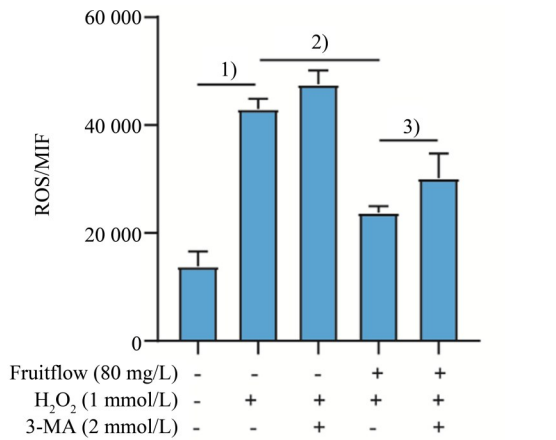
H_2O_2 可显著提升血小板内 ROS 的水平 ($P < 0.0001$, 图 2), 这与其他人的研究结果一致^[8]。80 mg/L 的 Fruitflow 可显著减少 H_2O_2 诱导的血小板 ROS 生成 ($P < 0.01$; 图 2)。并且, 自噬抑制剂 3-MA 可以有效的抑制 Fruitflow 的这一作用 ($P < 0.05$; 图 2)。这提示自噬可能在 Fruitflow 减轻血小板氧化损伤中起重要作用。



Human gel-filtered platelets were pre-incubated with different concentration of Fruitflow (0, 20, 40, 80 mg/L) or solvent control followed by H_2O_2 (1 mmol/L). TMRM was analyzed via flow cytometry. Data are presented as the mean \pm SEM, $n = 3/\text{group}$, $F = 51.28$, $P = 0.0001$. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ compared with the positive control group.

图1 不同浓度 Fruitflow 对 H_2O_2 诱导的血小板线粒体膜电位去极化的影响

Fig. 1 Effect of Fruitflow on $\Delta\Psi_m$ depolarization in H_2O_2 -treated platelets



Human gel-filtered platelets were pre-treated with H₂DCF-DA, wash and suspension, then treated with Fruitflow (80 mg/L) or solvent control, followed by H₂O₂ (1 mmol/L) with/without 3-MA (2 mmol/L) for 60 minutes, endogenous ROS level was detected by microplate reader. Data are presented as the mean \pm SEM, $n = 3$ /group, C: $F = 72.77$, $P = 0.000$ 3. 1) $P < 0.001$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.05$ between two groups.

图2 Fruitflow对H₂O₂诱导的血小板ROS生成的影响

Fig. 2 Effect of Fruitflow on ROS generation in H₂O₂-treated platelets

2.3 Fruitflow降低H₂O₂诱导的血小板p53蛋白磷酸化

20、40、80 mg/L的Fruitflow对p53蛋白的表达并没有显著的影响($P > 0.05$;图3B)。但是,Fruitflow可有效抑制H₂O₂诱导的p53蛋白磷酸化水平,差异有统计学意义($P < 0.05$;图3C)。

2.4 Fruitflow促进血小板自噬

Western blot结果显示,与对照组相比,20、40、80 mg/L的Fruitflow可以显著促进LC3 I I向LC3 II转化($P < 0.05$;图4A),并降低p62的表达($P < 0.05$;图4B)。

2.5 Fruitflow对H₂O₂处理血小板自噬的影响

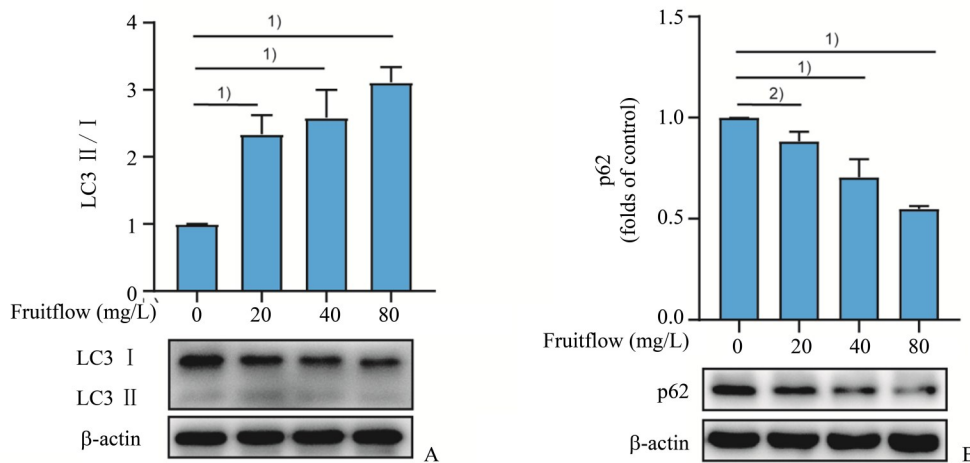
H₂O₂可以促进LC3 I I向LC3 II转化,这与其他人的研究结果一致。与单纯H₂O₂组相比,80 mg/L的Fruitflow也能显著的促进H₂O₂诱导的血小板LC3 I I向LC3 II转化($P < 0.05$;图5)。

2.6 Fruitflow通过促进自噬减轻H₂O₂导致的小血小板损伤

3-MA可以显著逆转80 mg/L Fruitflow升高H₂O₂处理后的血小板线粒体膜电位的效应($P < 0.01$;图6)。并且,与3-MA组相比,加入Fruitflow和3-MA组的线粒体膜电位差异无统计学意义($P > 0.05$;图6)。

3 讨论

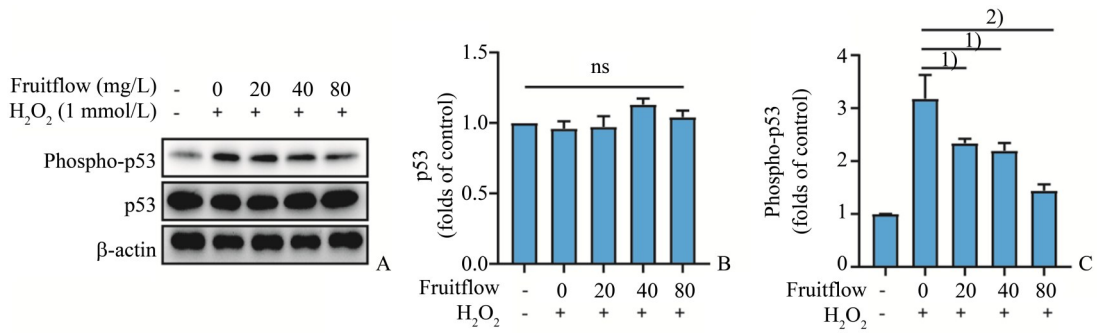
氧化应激反应是CVD的一个重要病理机制。例如,在糖脂代谢紊乱、高血压等疾病中,机体处于过氧化状态,从而导致血小板过氧化损伤^[16-17];在这一过程中,血小板线粒体出现功能障碍、损伤^[2];最终引起血小板反应性升高(轻度线粒体损害)和磷脂酰丝氨酸外翻增多(严重线粒体损害)而加速



Human gel-filtered platelets were pre-incubated with different concentration of Fruitflow (20, 40, 80 mg/L) or solvent control. Platelet lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted to detect the expression levels of LC3 II/I (A) and p62 (B). Data are presented as the mean \pm SEM, $n = 3$ /group, A: $F = 10.69$, $P = 0.0036$; B: $F = 46.33$, $P = 0.000$ 1. 1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.05$ compared with the solvent control group.

图4 Fruitflow对血小板自噬的影响

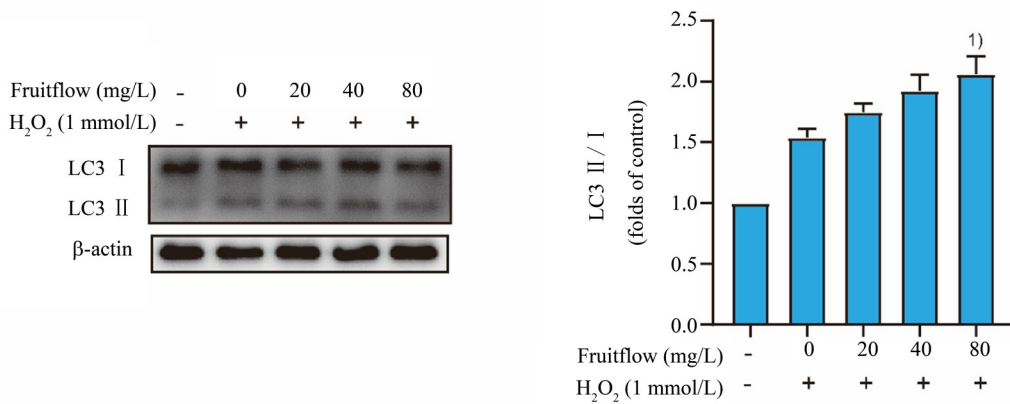
Fig. 4 Effect of Fruitflow on autophagy in resting platelets



Human gel-filtered platelets were pre-incubated with different concentration of Fruitflow (0, 20, 40, 80 mg/L) or solvent control followed by H₂O₂ (1 mmol/L). Platelet lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted (A) to detect the expression levels of p53 (B) and phospho-p53 (C). Data are presented as the mean ± SEM, n = 3/group, C: F = 14.63, P = 0.000 3. 1) P < 0.05, 2) P < 0.01 compared with the positive control group. ns: no significant difference.

图3 Fruitflow 对H₂O₂导致的小血小板 p53 蛋白磷酸化的影响

Fig. 3 Effect of Fruitflow on p53 phosphorylation in H₂O₂-treated platelets



Human gel-filtered platelets were pre-incubated with different concentration of Fruitflow (0, 20, 40, 80 mg/L) or solvent control followed by H₂O₂ (1 mmol/L). Platelet lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted to detect the expression levels of LC3 II / I . Data are presented as the mean ± SEM, n = 3/group, F = 17.52, P = 0.000 2. 1) P < 0.05 compared with the positive control group.

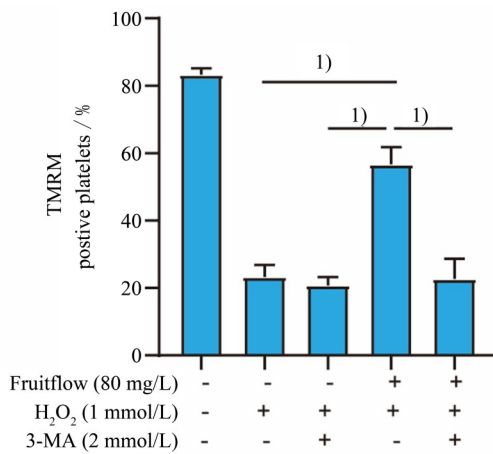
图5 不同浓度的Fruitflow 对H₂O₂促进血小板自噬的影响

Fig. 5 Effect of Fruitflow on autophagy in H₂O₂-treated platelets

血栓形成^[16, 18]。并且,体外实验显示用H₂O₂孵育血小板会直接导致线粒体损伤。已有研究表明 1 mmol/L 的H₂O₂体外诱导血小板ROS的增加量与糖尿病病人的血小板内ROS增量相一致,此种H₂O₂的浓度与其他研究诱导血小板损伤的浓度相一致,因此,本实验采用的H₂O₂剂量浓度为 1 mmol/L^[3, 8]。本研究发现,Fruitflow 可以抑制H₂O₂导致的小血小板线粒体损伤,这可能与Fruitflow 预防CVD 相关。另外,p53在丝氨酸15位点的磷酸化可直接导致线粒体功能障碍,ROS是p53诱导线粒体损伤的早期事件^[3]。本研究首次发现Fruitflow 可以减少H₂O₂导致的ROS生成和p53 (serine 15)磷酸化,从而减轻血小板氧化损伤。有研究表明,膳食营养素在癌细胞中可以促进p53的表达及磷酸化,但是在正常

细胞系中,研究表明绿原酸、芦丁、多酚(白藜芦醇、姜黄素)可以通过抑制氧化应激和p53磷酸化来发挥细胞保护作用。Fruitflow 的主要成分包括绿原酸、芦丁,因此相关的结果与以往研究相一致^[19-20]。然而,Fruitflow 经ROS调控血小板氧化损伤的具体成分尚不清楚,仍需进一步探讨。

细胞内自噬水平的降低,与CVD 的进展相关^[21]。这主要是因为自噬降低,细胞积累错误折叠的蛋白质和功能异常的线粒体,进一步加剧细胞损伤^[5]。血小板自噬最早于2014年被报道,随后研究也证实血小板自噬与其功能存在紧密联系^[4, 7]。当血小板自噬被抑制时,细胞凋亡增加,并且线粒体吞噬作为一种选择性自噬,可以抑制氧化应激或低氧条件下的血小板聚集^[4]。本研究发现,Fruitflow



Human gel-filtered platelet was pre-treated with Fruitflow (80 mg/L) or solvent control, followed by H₂O₂ (1 mmol/L) with/without 3-MA (2 mmol/L) for 60 minutes, TMRM was detected by flow cytometry. Data are presented as the mean \pm SEM, $n = 3/\text{group}$, C: $F = 45.66$, $P = 0.000$ 1.) $P < 0.01$ between two groups.

图6 Fruitflow, 3-MA对H₂O₂诱导的血小板线粒体膜电位去极化的影响

Fig. 6 Effect of Fruitflow, 3-MA on $\Delta\Psi_m$ depolarization in H₂O₂-treated platelets

可以促进血小板 LC3 II/I 比值升高和 p62 表达降低,首次证明了 Fruitflow 可促进血小板自噬^[4]。这提示 Fruitflow 可能通过调控自噬,发挥 CVD 预防作用。据报道,血小板自噬促进细胞存活,特别是自噬通过自噬体形成隔离产生 ROS 的受损线粒体^[8]。本研究发现, Fruitflow 可增强 H₂O₂ 处理血小板的自噬。同时,使用自噬抑制剂 3-MA 时, Fruitflow 升高 H₂O₂ 处理血小板的线粒体膜电位被逆转。这表明, Fruitflow 降低血小板内的 ROS 可能部分通过自噬

小体吞噬受损线粒体。其他研究也表明 Fruitflow 含有的绿原酸、芦丁可以通过促进自噬,清除受损细胞器,减轻细胞损伤^[22-23]。然而, Fruitflow 是否通过自噬调控其他血小板功能仍需进一步研究。此外,血小板自噬表现为吞噬泡、自噬小体、自噬溶酶体的形成,至于 Fruitflow 对血小板自噬过程中形态学的影响需要以后进一步研究。

临床研究表明 Fruitflow 对血小板功能的抑制作用主要是通过降低 GP II b/III a 的活化和 P-selectin 的表达,这与其成分中所含的多酚和核苷具有提高 cAMP 和 cGMP 水平的潜在作用一致^[11]。此外,近期的一项体外研究表明 Fruitflow 抑制血小板聚集和活化与调控 PI3K/Akt、MAPKs 分子机制相关^[24]。然而,这些分子机制是否参与 Fruitflow 调控自噬、氧化应激,仍需进一步探究。

Fruitflow 的欧洲食品安全局 (European Food Safety Authority) 推荐的每日摄入量为 150 mg,并且药代动力学实验表明,志愿者摄入 150 mg Fruitflow 后,产生的最大理论循环浓度约为 43 mg/L^[11]。因此,我们的体外研究采用 20、40、80 mg/L 的剂量,这与之前体外研究用于抑制血小板聚集、活化的浓度相一致^[24]。并且,多项人群研究结果表明 150 mg/d 的 Fruitflow 摄入不会产生肝肾功能损害和影响凝血时间。因此, Fruitflow 具有较好的安全性。

综上所述,本研究表明 Fruitflow 可通过促进血小板的自噬功能从而减轻 H₂O₂ 导致的血小板氧化损伤。因此,本研究为 Fruitflow 在心血管疾病的营养膳食干预防治提供了理论依据,具有重要应用价值。

参考文献

- [1] Van Der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives[J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(3): 166-179.
- [2] Wang L, Wu Q, Fan Z, et al. Platelet mitochondrial dysfunction and the correlation with human diseases [J]. Biochem Soc Trans, 2017, 45(6): 1213-1223.
- [3] Tang WH, Stitham J, Jin Y, et al. Aldose reductase-mediated phosphorylation of p53 leads to mitochondrial dysfunction and damage in diabetic platelets[J]. Circulation, 2014, 129(15): 1598-1609.
- [4] Luo XL, Jiang JY, Huang Z, et al. Autophagic regulation of platelet biology [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(9): 14483-14488.
- [5] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.
- [6] Yun HR, Jo YH, Kim J, et al. Roles of autophagy in oxidative stress[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3289.
- [7] Feng W, Chang C, Luo D, et al. Dissection of autophagy in human platelets [J]. Autophagy, 2014, 10(4): 642-651.
- [8] Lee SH, Du J, Stitham J, et al. Inducing mitophagy in diabetic platelets protects against severe oxidative

- stress[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(7): 779–795.
- [9] Brandhorst S, Longo VD. Dietary restrictions and nutrition in the prevention and treatment of cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2019, 124(6): 952–965.
- [10] Cheng HM, Koutsidis G, Lodge JK, et al. Tomato and lycopene supplementation and cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 257: 100–108.
- [11] O’Kennedy N, Raederstorff D, Duttaroy AK. Fruitflow: the first European Food Safety Authority-approved natural cardio-protective functional ingredient[J]. *Eur J Nutr*, 2017, 56(2): 461–482.
- [12] Uddin M, Biswas D, Ghosh A, et al. Consumption of Fruitflow ((R)) lowers blood pressure in pre-hypertensive males: a randomised, placebo controlled, double blind, cross-over study[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2018, 69(4): 494–502.
- [13] Guo Q, Li F, Duan Y, et al. Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond[J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(6): 866–874.
- [14] 汪玉芳, 贺瑞坤, 张旭光. 水溶性番茄浓缩物抗氧化和辅助降血脂功效研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(13): 4531–4535.
Wang YF, He RK, Zhang XG. Study on the antioxidant and assistant hypolipidemic function of water soluble tomato concentrate[J]. *J Food Safety & Quality*, 2020, 11(13): 4531–4535.
- [15] Yang Y, Shi Z, Rehemani A, et al. Plant food delphinidin-3-glucoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: novel protective roles against cardiovascular diseases[J]. *PloS one*, 2012, 7(5): e37323.
- [16] Khosravi M, Poursaleh A, Ghasempour G, et al. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis[J]. *Bio Chem*, 2019, 400(6): 711–732.
- [17] El Hauari M. Platelet oxidative stress and its relationship with cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus patients[J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(22): 4145–4165.
- [18] Khodadi E. Platelet function in cardiovascular disease: Activation of molecules and activation by molecules[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20(1): 1–10.
- [19] Hada Y, Uchida HA, Otaka N, et al. The protective effect of chlorogenic acid on vascular senescence via the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4527.
- [20] Ma JQ, Liu CM, Yang W. Protective effect of rutin against carbon tetrachloride-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in mouse kidney associated with the ceramide, MAPKs, p53 and calpain activities[J]. *Chem Biol interact*, 2018, 286: 26–33.
- [21] Miyamoto S. Autophagy and cardiac aging[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(4): 653–664.
- [22] Ma Y, Yang L, Ma J, et al. Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(8): 1904–1911.
- [23] Guo W, Liu J, Zhang Y, et al. Dehydroandrographolide inhibits mastitis by activating autophagy without affecting intestinal flora[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(14): 14050–14065.
- [24] 凡蝶, 田泽众, 马熙麟, 等. 水溶性番茄浓缩物 Fruitflow 通过调控血小板 PI3K/Akt 和 MAPKs 信号通路抑制其活化、聚集及血栓形成[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2020, 41(2): 243–250.
Fan D, Tian ZZ, Ma XL, et al. Fruitflow, a water-soluble tomato concentrate, inhibits platelet activation, aggregation and thrombosis by regulating the signaling pathway of PI3K/Akt and MAPKs[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2020, 41(2): 243–250.

(编辑 祁方昉)