

蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽段对H₂O₂诱导 Caco-2细胞氧化损伤的保护作用

彭新颜*, 黄磊, 崔云, 张翠云

(鲁东大学食品工程学院, 山东烟台 264025)

摘要: 为了研究蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽段(Fraction II, 1~4 ku)对氧化损伤Caco-2细胞的保护作用。将实验分为5组: 空白对照组; H₂O₂模型阴性对照组; H₂O₂+Fraction II 低剂量组(10 μg/mL); H₂O₂+Fraction II 中剂量组(50 μg/mL); H₂O₂+Fraction II 高剂量组(100 μg/mL)。实验测定了细胞存活率、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量的变化, 并通过荧光显微镜和流式细胞仪检测了细胞凋亡情况。结果显示, 与模型阴性对照组相比, 中、高剂量组的Fraction II 能显著提高Caco-2细胞的存活率, SOD、CAT和GSH-Px活性; 且明显降低了LDH活性和MDA含量。其中100 μg/mL的高剂量处理组细胞存活率达到了47.10%, SOD、CAT和GSH-Px酶活性分别为45.50、35.10和34.13 U/mg蛋白; LDH酶活性和MDA含量分别降低为20.93 U/mg蛋白和20.77 nmol/mg蛋白。流式细胞仪和荧光显微镜观察也证实, 一定量的Fraction II 对氧化应激导致的Caco-2细胞凋亡有抑制作用。可见, 蓝点马鲛鱼皮Fraction II 对H₂O₂诱导的氧化损伤细胞具有较好的保护作用。

关键词: 蓝点马鲛; 鱼皮抗氧化肽(Fraction II); Caco-2细胞; 氧化应激; 保护作用

中图分类号: TS 251

文献标志码: A

现代医学研究证明, 许多疾病及衰老现象是由于机体活性氧(ROS)自由基增加, 引起氧化应激, 从而产生一系列与氧化损伤相关的病理变化。为了保持健康, 最理想的方法是在饮食中补充外源性抗氧化剂, 使机体免受自由基的侵害^[1]。从食品安全性考虑, 天然抗氧化物质具有合成抗氧化剂无法比拟的优势, 已经成为研究热点^[2]。目前, 有许多利用水解方法制备海产品天然抗氧化多肽的报道, 如牡蛎、蛤蜊、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)、太平洋鲱(*Clupea pallasii*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、大西洋鳕(*Gadus*

morhua)等水解多肽在防止食品氧化变质、预防疾病及延缓衰老方面都取得了良好的效果^[3-8]。

据报道, 美洲大赤鱿(*Dosidicus gigas*)蛋白多肽经纯化后具有较高的抗氧化活性, 将其作用于由叔丁基过氧化氢(tBHP)诱导的氧化损伤细胞后, 可以提高细胞存活率, 对氧化损伤细胞具有明显保护作用^[9]。本课题组前期研究表明, 分子量为1~4 ku的蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)鱼皮多肽(Fraction II)具有抑制猪肉糜脂肪和蛋白氧化的作用^[10]。因此, 本课题组继续以建立H₂O₂诱导Caco-2细胞氧化损伤模型为切入点, 研究纯化的鱼皮抗氧化肽段对损伤细胞的保护作用, 为蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽段在细胞体系的作用模式和海洋生物活性多肽的开发利用提供依据。

收稿日期: 2016-05-19 修回日期: 2016-07-28

资助项目: 国家自然科学基金(31401491)

通信作者: 彭新颜, E-mail: pengxinyan2006@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 实验对象与仪器

蓝点马鲛鱼皮(加工副产物)购于烟台惠安市场; Caco-2细胞购于中国协和医科大学基础医学研究所; 噻唑蓝(MTT)粉末和二甲基亚砷(DMSO)购于Sigma公司; 胎牛血清(FBS)、非必需氨基酸、青—链霉素、DMEM高糖培养基购于GIBCO公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒于购于Invitrogen公司。台盼蓝(Trypan blue)购于碧云天公司; SOD、CAT、GSH-Px、LDH和MDA试剂盒购于南京建成生物工程公司; Alcalase碱性蛋白酶(6×10⁴ U/g)购于Novo公司, 氯化钠、EDTA、碳酸氢钠、碳酸氢钾等为国产分析纯, 购于烟台市化学试剂公司。

Model 680酶标仪, Biorad公司; 细胞培养瓶/96孔板/6孔板, Corning公司; 荧光显微镜(DM4000), Leica有限公司; 倒置显微镜(AE31), Motic中国公司; CO₂培养箱, Sanyo公司; AL-104型精密电子天平, 上海梅特勒—托利多仪器设备有限公司; D-1320超净工作台, 北京东联有限公司; pHs-25型酸度计, 上海精科雷磁仪器厂; 电动搅拌器, 江苏金坛金城国胜实验仪器厂; UV-2401PC紫外分光光度计, 日本岛津公司; XHF-I高速分散器, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽段的制备

参考彭新颜等^[10]的方法, 将经过处理的蓝点马鲛鱼皮依次经过碱、酸和热水进行提取, 得到蓝点马鲛鱼皮胶原蛋白冻干粉, 将其进行溶解、匀浆、加入3%(w/v)Alcalase碱性蛋白酶, 调节pH值8.0、温度50℃后水解6 h, 为维持pH恒定, 此过程中不断加入1 mol/L的NaOH, 沸水浴5 min使酶失活, 得到的蓝点马鲛鱼皮6 h水解多肽, 经1和4 ku超滤膜分离, 收集透过4 ku超滤膜而未通过1 ku膜的组分Fraction II (1~4 ku), 冻干后用于后续实验。

1.3 Caco-2细胞的培养

将含10%的胎牛血清(经过热灭活处理)、1%非必需氨基酸和0.1%双抗的DMEM培养液加入Caco-2细胞的培养瓶中, 置于37℃、湿度饱和、5%的CO₂培养箱中培养, 隔天更换培养液。待细

胞贴壁生长为单层后, 对其进行消化(0.25%胰酶)传代, 连续培养3代后选择对数生长期的细胞用于实验。

1.4 Caco-2细胞存活率的测定

细胞存活率用MTT法测定^[11]。Caco-2细胞以1.2×10⁴个/mL密度接种于96孔板, 每孔加样量200 μL。第1组为空白对照组; 第2组为模型对照组, 加入含1 mmol/L H₂O₂的培养基; 第3~5组在37℃培养16 h后将不同浓度的Fraction II样品(10、50和100 μg/mL)加入孔板中, 于37℃培养48 h后, 加入1 mmol/L的H₂O₂及5 mg/mL的MTT液(20 μL/孔), 继续培养4 h。丢弃孔内培养液, 加入DMSO(150 μL/孔)。室温下, 将平板置于微孔板振荡器上振荡10 min, 使结晶物水解, 用酶标仪于570 nm波长处检测OD值, 结果表示为样品OD值和对照组OD值的百分比。

1.5 细胞裂解液的制备及过氧化氢损伤模型的建立和分组

参考Lee等^[12]的方法制备细胞裂解液: Caco-2细胞以1.2×10⁴个/mL的密度接种于24孔板, 每孔加样量0.5 mL。37℃培养16 h后将不同浓度的Fraction II样品(10、50、100 μg/mL)加入孔板中。37℃培养24 h后, 每孔加入150 μL细胞裂解液(1% Triton X-100), 4℃裂解12 h后测定酶活。裂解液的蛋白质含量由考马斯亮兰法测定^[13]。酶活表示为U/mg蛋白。

细胞连续培养3代后, 随机分为5组, 第1、2组同细胞存活率测定法, 第3~5组将不同浓度的Fraction II样品(10、50和100 μg/mL)加入孔板中。37℃培养16 h, 加入H₂O₂使浓度为1 mmol/L。

1.6 抗氧化指标测定

超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、乳酸脱氢酶(LDH)活性与丙二醛(MDA)含量检测参考Carrillo等^[14]的方法, 按照试剂盒说明书要求操作。

1.7 Hoechst 33258染色观察细胞凋亡

参考Jia等^[15]的方法, 取洁净盖玻片在70%乙醇中浸泡10 min, 用无菌的PBS溶液洗涤3遍, 再用细胞培养液洗涤2遍。将盖玻片置于六孔板内, 以5×10⁵个/孔的密度接种细胞, 培养过夜。弃去旧培养液, 加入含有不同浓度(10、50和

100 $\mu\text{g/mL}$ 多肽的新鲜培养液, 培养24 h, 用PBS洗3遍, 加入含1 mmol/L的 H_2O_2 培养液, 继续于37 $^\circ\text{C}$ 培养4 h。刺激细胞发生凋亡后, 对细胞进行Hoechst33258染色, 具体步骤: 细胞发生凋亡后, 吸弃培养液, 加入0.5 mL固定液, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜; 去固定液, 用PBS洗2遍(用摇床), 每次3~5 min, 吸尽液体; 加入0.5 mL的Hoechst33258染色液, 摇床上染色5 min; 去染色液, 用PBS洗2遍, 每次3~5 min, 吸尽液体; 滴1滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 让细胞接触封片液, 尽量避免气泡; 选择激发波长350 nm, 发射波长460 nm后, 荧光显微镜下观察细胞的凋亡。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡率

采用Annexin V-FITC染色法, 利用流式细胞仪检测细胞凋亡率^[15]。以 4.5×10^5 个/孔的密度将细胞接种于6孔板, 培养24 h, 弃去旧培养液, 加入含有不同浓度(10、50和100 $\mu\text{g/mL}$)多肽的新鲜培养液, 继续培养24 h, 用PBS洗3遍, 加入含1 mmol/L的 H_2O_2 培养液, 继续于37 $^\circ\text{C}$ 培养4 h。收集细胞, 1000 r/min、4 $^\circ\text{C}$ 离心10 min, 弃上清液, 加入1 mL冷的PBS洗涤细胞2次, 轻轻振荡使细胞悬浮, 1000 r/min、4 $^\circ\text{C}$ 离心10 min。将细胞重悬于200 μL Binding Buffer; 加入10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI, 轻轻混匀, 避光室温反应15 min或4 $^\circ\text{C}$ 反应30 min。加入300 μL Binding Buffer, 在1 h内上机检测。

1.9 数据统计分析

每个实验重复3次, 结果表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。采用SigmaPlot 12.0和Excel 6.0作图, 采用Statistix 8.1(分析软件, St Paul, MN)软件包中Linear Models程序进行数据统计, 差异显著性($P < 0.05$), 分析使用Tukey HSD程序。

2 结果

2.1 抗氧化肽对Caco-2细胞存活率的影响

与空白对照相比, H_2O_2 模型阴性对照组的细胞存活率下降了61.85%, 说明造模成功(图1)。 H_2O_2 损伤后的Caco-2细胞在蓝点马鲛鱼皮Fraction II保护下, 细胞存活率有所改善, 低、中、高剂量组比模型对照分别提高了19.84%、72.27%和117.35%。特别是中、高剂量组存活率

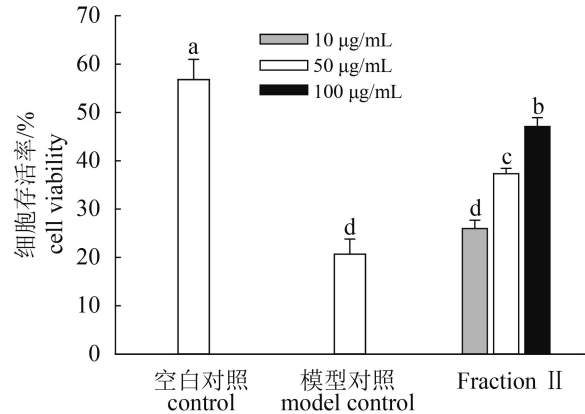


图1 蓝点马鲛鱼皮Fraction II对 H_2O_2 诱导氧化损伤Caco-2细胞存活率的影响

图中柱子上方字母相同表示差异不显著($P > 0.05$), 不同表示差异显著($P < 0.05$), 下同

Fig. 1 The effect of *S. niphonius* skin hydrolysates (Fraction II) on H_2O_2 induced oxidative damage in Caco-2 cells viability

a, b, c and d column values with same superscript indicate no significant difference ($P > 0.05$), column values with different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$), the same below

分别达到37.33%和47.10%, 对细胞的促生长效果显著($P < 0.05$)。由此可见, 一定浓度的Fraction II可以保护Caco-2细胞, 抑制 H_2O_2 诱导的细胞凋亡, 且其作用呈量效递增关系。

2.2 抗氧化肽对Caco-2抗氧化酶系活性的影响

空白对照组的SOD、CAT、和GSH-Px酶活性均高于模型对照组($P < 0.05$)(表1), 进一步说明 H_2O_2 处理会对细胞造成氧化损伤。抗氧化肽段各剂量组中的SOD、GSH-Px和CAT酶活性随着剂量的增加而提高, 但低剂量组(10 $\mu\text{g/mL}$)保护作用不明显, 与模型阴性对照组不存在显著差异($P > 0.05$)。中、高剂量组(50和100 $\mu\text{g/mL}$)其酶活性均明显高于模型对照组($P < 0.05$), 其中高剂量组酶活性已恢复到正常水平。

LDH位于细胞质内, 模型阴性对照组LDH的上升说明脂质体系受到损伤($P < 0.05$), 而加入Fraction II对细胞进行保护后, LDH水平呈现一定程度的下降, 其中100 $\mu\text{g/mL}$ 的Fraction II保护组细胞膜的损伤程度最小。

2.3 Fraction II对Caco-2中MDA含量的影响

脂质氧化的终产物MDA常用来衡量机体细胞膜等膜质结构受到氧化损伤的情况。实验中

表 1 蓝点马鲛鱼皮Fraction II对Caco-2细胞中SOD、CAT、GSH-Px和LDH活性的影响

Tab. 1 The effect of *S. niphonius* skin hydrolysates (Fraction II) on SOD, CAT, GSH-Px and

测定指标 parameters	LDH activities in Caco-2 cells				
	空白对照 control	模型对照 model control	10 μg/mL Fraction II	50 μg/mL Fraction II	100 μg/mL Fraction II
SOD	51.77±2.35 ^a	20.20±2.86 ^b	26.97±2.96 ^b	46.53±3.37 ^a	45.50±3.05 ^a
CAT	40.20±2.17 ^a	25.20±2.19 ^b	23.57±1.65 ^b	34.43±2.36 ^a	35.10±3.20 ^a
GSH-Px	38.40±2.30 ^a	21.80±1.83 ^c	20.33±2.63 ^c	32.23±1.78 ^b	34.13±2.1 ^{ab}
LDH	52.40±0.89 ^b	57.53±1.50 ^a	35.23±1.85 ^c	26.90±1.25 ^d	20.93±1.39 ^c

注: 同一行中的相同字母表示差异不显著, 不同则表示差异显著(P<0.05)

Notes: a, b, c, d in the same line with same superscripts letter indicate no significant difference, with different superscripts letter indicate significant difference (P<0.05)

颜色的深浅变化又间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度。随蓝点马鲛鱼皮Fraction II浓度的不断增加, MDA含量不断减少(图2)。与模型对照相比, 低剂量(10 μg/mL)、中剂量(50 μg/mL)和高剂量组(100 μg/mL)的Fraction II都可以抑制MDA的生成, 使其含量显著降低(P<0.05)。

2.4 Fraction II对Caco-2细胞凋亡的影响

Hoechst33258染色后, 空白对照组的细胞形态正常, 细胞核饱满, 呈弥散均匀的蓝色荧光, 少有凋亡或死亡细胞(图3)。Caco-2细胞经1 mmol/L的H₂O₂处理后, 细胞核可见浓密的颗粒块状荧光, 凋亡小体明显增多(箭头所指), 有些细胞颜色发白, 呈碎块状或致密浓缩, 有大量的凋亡或死亡现象。细胞与Fraction II共孵育后, 凋亡现象得到显著改善, 而且随着Fraction II浓度的增加, 凋亡数目有所减少, 与细胞存活率测定结果一致。

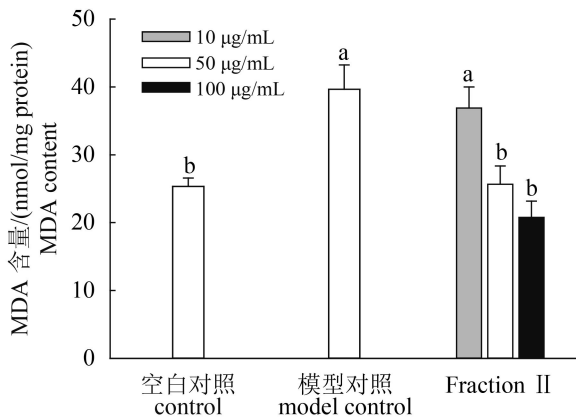


图 2 蓝点马鲛鱼皮Fraction II对Caco-2细胞中MDA含量的影响

Fig. 2 The effects of *S. niphonius* skin hydrolysates (Fraction II) on MDA content in Caco-2 cells

2.5 流式细胞技术检测细胞凋亡

从流式细胞仪结果分析, 与空白对照组相比, H₂O₂模型阴性对照组早期凋亡、晚期凋亡及坏死率分别为31.6%、12.8%和3.6%, 均明显上升, 活细胞率仅有51.9%, 下降了28.7%(图4)。经蓝点马鲛鱼皮Fraction II作用后, 受损程度有所改善。如10 μg/mL的Fraction II使活细胞百分率增加到68.0%, 早期凋亡和晚期凋亡率分别为13.6%和14%; 当Fraction II浓度增加到50 μg/mL时, 细胞存活率增加71.6%, 早期和晚期凋亡率分别为8.6%和14.5%; 抗氧化肽浓度为100 μg/mL时, 活细胞比例为72.0%, 接近正常细胞水平。这与荧光显微镜结果一致, 也证实Fraction II具有抑制H₂O₂引起的Caco-2细胞凋亡作用。

3 讨论

氧化应激是由于活性氧(ROS)和自由基打破机体氧化与抗氧化平衡状态, 一些活跃的自由基就会氧化类脂质中的脂肪酸, 造成细胞内重要物质(蛋白质、DNA、细胞膜脂类等)的损伤。对于H₂O₂诱导模型来说, 外源性的H₂O₂可以穿透细胞膜等生物膜, 生成单态氧、自由基, 有效造成细胞的氧化损伤, 从而导致细胞的衰老、死亡^[6]。

实际上, 机体内有一套天然抗氧化酶系统, 多余的自由基可被这套防御系统消耗掉, 从而使细胞免受损伤, 保持正常的稳定状态^[1]。SOD是生物体内重要的内源性抗氧化酶类, 可以通过歧化作用清除体内各种过氧化物和超氧阴离子自由基(O₂⁻), 从而减少脂质过氧化反应。GSH-Px是存在于动物体内的一种含硒酶, 它能使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 阻断脂

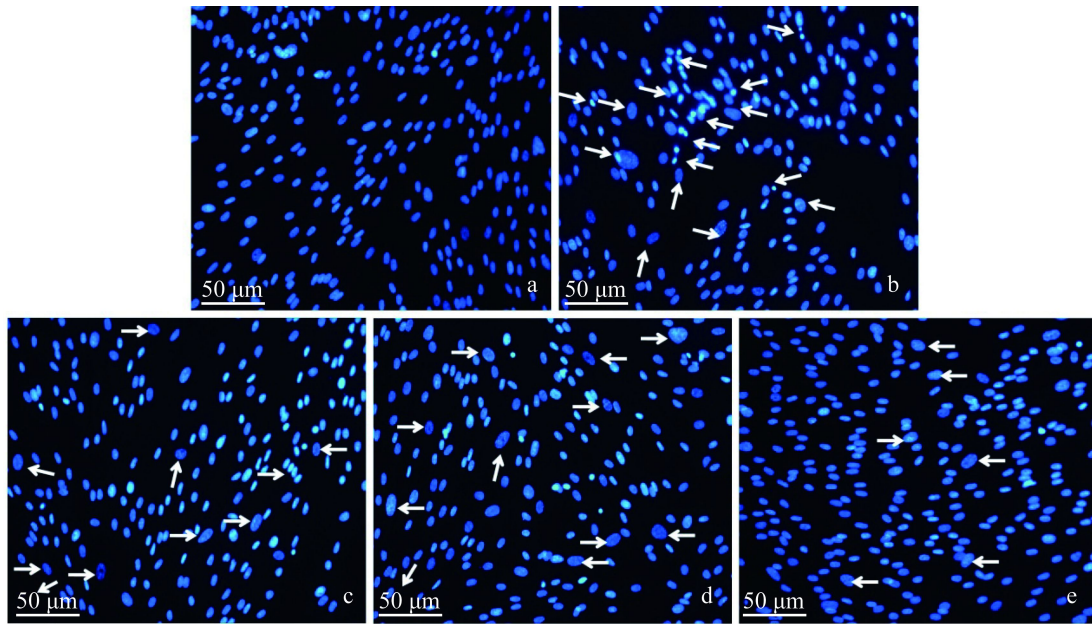


图3 蓝点马鲛Fraction II对H₂O₂诱导Caco-2损伤细胞保护作用的荧光图片

a、b、c、d、e分别为空白对照组、H₂O₂处理组、10、50、100 µg/mL抗氧化肽处理组，400×

Fig. 3 Fluorescence microscope photographs of Caco-2 cells treated by *S. niphonius* skin hydrolysates (Fraction II) and H₂O₂

a, b, c, d and e represent control, H₂O₂ treatment and 10, 50 and 100 µg/mL antioxidant peptides treatment cells, 400×

质过氧化的连锁反应，促进H₂O₂分解，从而保护细胞膜结构及功能的稳定。CAT是一类广泛存在于动植物和微生物体内的末端氧化酶，也是体内抗氧化系统的主要组分，可以催化H₂O₂分解为H₂O与O₂，避免中间代谢产生的H₂O₂对机体造成损害^[17]。H₂O₂氧化损伤造模后，在细胞内生成大量的活性自由基，引发细胞膜上脂质过氧化反应，并生成产物MDA，因此，生物体处于衰老和自由基过量时会导致MDA含量升高^[18]。LDH是一种存在于细胞质内的糖酵解酶，含量增加说明细胞膜的通透性增加，是机体细胞受损的重要标志。可见，SOD、GSH-Px、CAT和LDH活性及MDA含量是衡量生物机体及细胞氧化损伤程度的重要指标^[19]。

研究表明，一定浓度的Fraction II可引起抗氧化酶系统和MDA含量的变化。其中SOD、GSH-Px和CAT的变化趋势相似，随Fraction II浓度的升高酶活力增强，存在一定的剂量依赖关系。Fraction II中、高浓度处理组(50和100 µg/mL)能有效提高3种抗氧化酶活力，与模型阴性对照组差异显著($P<0.05$)。LDH活性也表明，H₂O₂对细胞有强烈的损害作用，H₂O₂诱导氧化损伤后，LDH水平明显升高，与空白对照组差异显著

($P<0.05$)，随着Fraction II浓度的增加，LDH水平呈显著下降趋势($P<0.05$)。同样，中、高浓度的Fraction II对降低细胞MDA含量也具有显著的作用($P<0.05$)。Fraction II可能是通过增强抗氧化系统酶活性和减少脂质过氧化产物MDA含量等功能，减轻自由基的损伤效力，维持细胞内环境的稳定，从而起到保护细胞的作用。

细胞凋亡的分子机理包括诸多因素，其中自由基学说认为引起细胞衰亡的主要原因是机体细胞代谢过程中不断产生自由基，过剩的自由基会破坏细胞的膜结构，使其功能失常，导致细胞死亡。Giovannini等^[19]研究发现，麦麸抗氧化肽对Caco-2细胞凋亡具有抑制作用，细胞凋亡率从氧化损伤组的83%下降到了60%。周颖斌等^[20]也报道栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)多肽对角质细胞凋亡具有抑制作用。本实验中流式细胞仪和荧光显微结果也表明，一定量的Fraction II具有较好的抑制Caco-2细胞凋亡、提高细胞存活率的作用。这说明Fraction II可能也是通过抗氧化作用，大量淬灭多余的自由基，从而保护了细胞核物质，防止细胞受自由基攻击而凋亡。

研究表明，蛋白水解多肽之所以具有提高抗氧化酶活性、降低LDH和MDA含量及抑制细

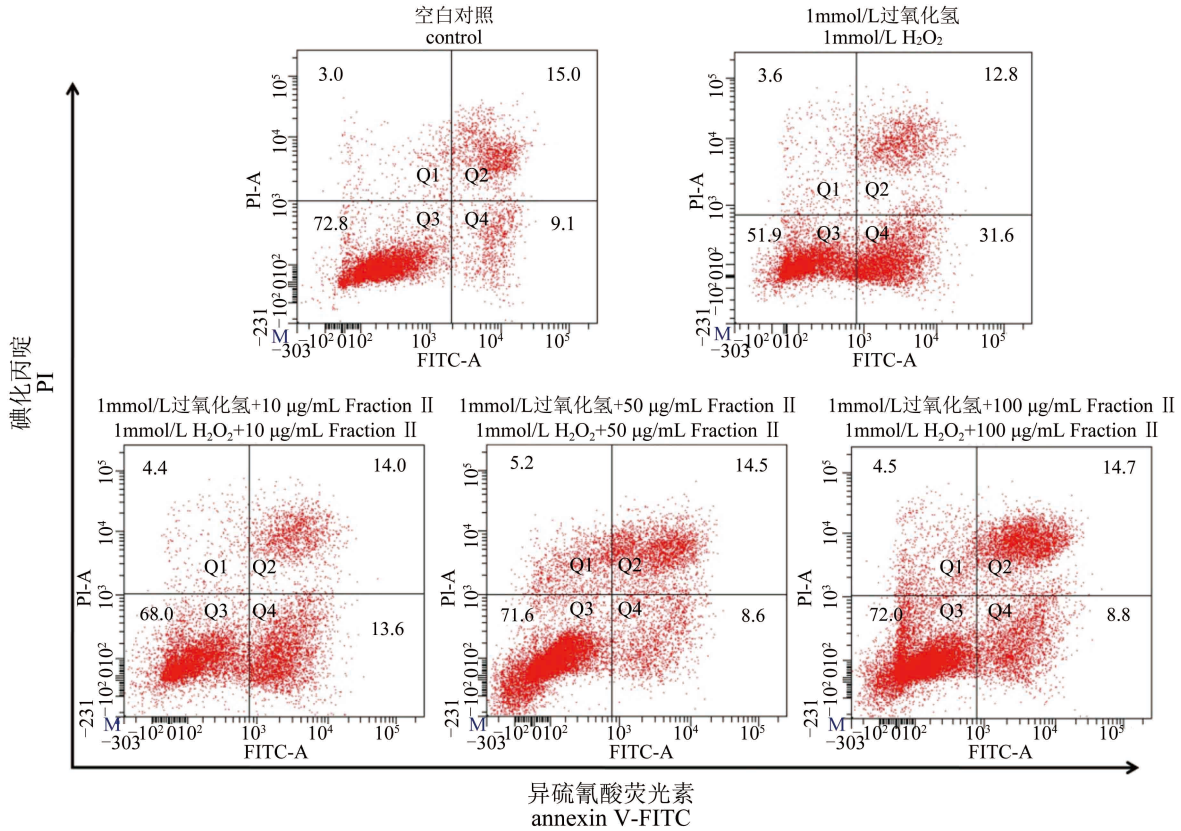


图4 流式细胞仪检测蓝点马鲛鱼皮Fraction II对H₂O₂诱导Caco-2细胞损伤的保护作用

Q1. 死亡细胞; Q2. 凋亡晚期细胞; Q3. 活细胞; Q4. 凋亡早期细胞

Fig. 4 Representative dot plots of flow cytometric analysis of the protective effect of *S. niphonius* skin hydrolysates (Fraction II) on Caco-2 cells damaged by H₂O₂

Q1. necrotic cells; Q2. late apoptotic cells; Q3. viable cells; Q4. early apoptotic cells

胞凋亡的功效,很大程度上是由于肽键断裂,使得一些活性氨基酸打开和暴露,增加了氢供体和充足的质子,从而和氧化剂反应,起到抗氧化的作用。尤其是多肽段的分子量、氨基酸组成、排列顺序、氨基酸性质等因素是影响其效果的主要因素^[10]。其中,特定分子量肽段抗氧化活性较强的规律也已得到广泛证实^[21-25]。如分子量为374.44 u的路氏双髻鲨(*Sphyna lewini*)肽段Leu-Asp-Lys,具有较好的抗氧化效果^[21]。Zhong等^[22]从鲢加工副产品水解物中通过超滤法得到5种多肽组分,其中分子量<1 ku的部分具有最高的清除DPPH、羟基自由基和超氧阴离子自由基的能力。Zhang等^[23]发现,序列为Tyr-Gly-Asp-Glu-Tyr(645.21 u)和Glu-Gly-Leu(317.33 u)的尼罗罗非鱼皮水解多肽,自由基清除能力较高。Kleekayai等^[24]从罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)发酵酱中分离得到分子量小于500 u的多肽具有潜在的抗氧化能力。Girgih等^[25]利用胃蛋白

酶、胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶结合水解大西洋鲑蛋白,酶解物通过1 ku滤膜后,用反相液相色谱法将分子量小于1 ku的部分继续纯化为4部分,其中3部分多肽组分具有较高的氧自由基吸收能力和DPPH自由基清除能力。与上述报道相似,实验中分子量为1~4 ku的Fraction II具有较好的自由基清除能力,对氧化损伤细胞起到了保护作用。但超滤的多肽含有多种氨基酸成分,究竟是哪种物质发挥抗氧化作用尚需进一步探讨。

蓝点马鲛鱼皮Fraction II对氧化损伤Caco-2细胞有保护作用,表现为提高细胞的存活率,提高细胞SOD、CAT和GSH-Px活性,降低LDH活性和MDA含量。荧光显微观察和流式细胞检测结果也证实,一定量的Fraction II能够维持细胞内环境的稳定,防止细胞凋亡。

参考文献:

[1] 彭新颜,孔保华,熊幼翎. 乳清蛋白抗氧化肽对H₂O₂所

- 致人胚肺成纤维细胞MRC-5过氧化损伤的保护作用[J]. 中国农业科学, 2010, 43(14): 2982-2989.
- Peng X Y, Kong B H, Xiong Y L. Protective effects of whey protein isolate (WPI) peptides on lung fibroblasts cell MRC-5 Caused by the damage of H₂O₂[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(14): 2982-2989 (in Chinese).
- [2] Liu R, Zheng W W, Li J, *et al.* Rapid identification of bioactive peptides with antioxidant activity from the enzymatic hydrolysate of *Macraa veneriformis* by UHPLC-Q-TOF mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2015, 167(1): 484-489.
- [3] Chi C F, Hu F Y, Wang B, *et al.* Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolyzate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) muscle[J]. Food Chemistry, 2015, 168(2): 662-667.
- [4] Cai L Y, Wu X S, Zhang Y H, *et al.* Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 16(3): 234-242.
- [5] Huang B B, Lin H C, Chang Y W. Analysis of proteins and potential bioactive peptides from tilapia (*Oreochromis* spp.) processing co-products using proteomic techniques coupled with BIOPEP database[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 19(9): 629-640.
- [6] Najafian L, Babji A S. Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) myofibrillar protein hydrolysates [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 452-461.
- [7] Ahn C B, Je J Y, Cho Y S. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 92-98.
- [8] Borawska J, Darewicz M, Vegarud G E, *et al.* Antioxidant properties of carp (*Cyprinus carpio* L.) protein *ex vivo* and *in vitro* hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2016, 194(8): 770-779.
- [9] Rajapakse N, Mendis E, Byun H G, *et al.* Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, 16(9): 562-569.
- [10] 彭新颜, 孟婉静, 周夕冉, 等. 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽段对熟肉糜脂肪和蛋白氧化抑制作用的研究[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1730-1741.
- Peng X Y, Meng W J, Zhou X R, *et al.* Antioxidant peptides of *Scomberomorus niphonius* skin and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of cooked patties[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(11): 1730-1741 (in Chinese).
- [11] 贺磊, 李曦, 罗和生. 葡萄糖对丁酸钠诱导的结肠癌细胞增殖抑制和凋亡效应的调节作用及其可能机制[J]. 武汉大学学报(医学版), 2008, 29(6): 732-735.
- He L, Li X, Luo H S. Effects of glucose on proliferation inhibition and apoptosis of colon cancer cells induced by sodium butyrate[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2008, 29(6): 732-735 (in Chinese).
- [12] Lee S, Lee S, Song K B. Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of porcine and bovine blood plasma proteins[J]. Food Chemistry, 2003, 82(4): 521-526.
- [13] Lee S E, Hwang H J, Ha J S, *et al.* Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity[J]. Life Sciences, 2003, 73(2): 167-179.
- [14] Carrillo M C, Kanai S, Nokubo M, *et al.* (-) deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats[J]. Life Sciences, 1991, 48(6): 517-521.
- [15] Jia N, Xiong Y L, Kong B H. *et al.* Radical scavenging activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis[J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 382-390.
- [16] Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2000, 29(3-4): 323-333.
- [17] Chen L, Zhu S L, Cao M. The research on organic selenium in the lactic acid fungus to spleen lipid peroxidation and protection effect of NK cell activity in mouseswith liver damage[J]. Acta Biologiae Experimental Sinica, 2005, 38(2): 124.
- [18] 关晨霞, 高希言, 梁杰. 针灸对亚急性衰老小鼠脑组织中一氧化氮、丙二醛、超氧化物歧化酶的影响[J]. 针刺研究, 2001, 26(2): 111-113.

- Guan C X, Gao X Y, Liang J. Effect of acupuncture on NO, MDA and SOD levels in cerebral tissues of sub-acutely aging mice[J]. *Acupuncture Research*, 2001, 26(2): 111-113 (in Chinese).
- [19] Giovannini C, Sanchez M, Straface E, *et al.* Induction of apoptosis in Caco-2 cells by wheat gliadin peptides[J]. *Toxicology*, 2000, 145(1): 63-71.
- [20] 周颖斌, 李丙华, 王春波. 扇贝多肽经由死亡受体和线粒体通路抑制UVB诱导的HaCaT细胞凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(8): 1002-1007.
- Zhou Y B, Li B H, Wang C B. Polypeptide from *Chlamys farreri* prevents UVB-induced apoptosis in the HaCaT cells through death receptor pathway and mitochondrial pathway[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2008, 24(8): 1002-1007 (in Chinese).
- [21] Luo H Y, Wang B, Li Z R, *et al.* Preparation and evaluation of antioxidant peptide from papain hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle protein[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, 51(1): 281-288.
- [22] Zhong S Y, Ma C W, Lin Y C, *et al.* Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing byproduct protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(4): 1636-1642.
- [23] Zhang Y F, Duan X, Zhuang Y L. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin[J]. *Peptides*, 2012, 38(1): 13-21.
- [24] Kleekayai T, Harnedy P A, O'Keeffe M B, *et al.* Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes[J]. *Food Chemistry*, 2015, 176(6): 441-447.
- [25] Girgih A T, He R, Hasan F M, *et al.* Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173(4): 652-659.

Protective effects of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) skin peptides against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells

PENG Xinyan^{*}, HUANG Lei, CUI Yun, ZHANG Cuiyun

(College of Food Engineering, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide and hydrogen peroxide are continually produced during metabolic processes. ROS generation is normally counterbalanced by the action of antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), and other redox molecules. However, excessive ROS will attack membrane lipids, proteins and DNA, which were believed to be involved in many health disorders such as diabetes mellitus, cancer, neurodegenerative and inflammatory diseases. On the other hand, food oxidation processes, especially lipid oxidation, lead to the formation of secondary lipid peroxidation products and degradation of food quality. Antioxidants may directly react with and quench reactive oxygen species (ROS). The utilization of synthetic antioxidants is limited because consumers are increasingly demanding additive-free or natural products. Therefore, the application of natural antioxidants as sources of many effective antioxidants is a promising alternative to the use of synthetic antioxidants. More recently, there is growing interest in natural hydrolysed protein antioxidants from many animal and plant sources, including those derived from soybean, zein, Pacific hake, algae, and smooth hound muscle. In our previous study, antioxidative peptides (1–4 ku) obtained from *Scomberomorus niphonius* skin (Fraction) had a high antioxidant in cooked pork patties because it inhibited both lipid and protein oxidation and stabilized the quality during refrigerated storage. The purpose of the present study is to evaluate protective effects of the *S. niphonius* skin peptides(1–4 ku)against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. There were five treatments in this experiment, including normal control (samples were not treated with H₂O₂ and antioxidant peptide), negative control, H₂O₂+Low-dose of Fraction (10 µg/mL), H₂O₂+Middle-dose of Fraction (50 µg/mL), H₂O₂+High-dose of Fraction (100 µg/mL). The viability of cells, antioxidant enzymes activity including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), lactic dehydrogenase (LDH), and MDA content were determined. Further, the flow cytometry and fluorescence microscopy were also applied to detect the cell apoptosis. The result showed that the contents of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase (CAT) levels were significantly increased compared with negative control group, while the lactic dehydrogenase (LDH) and MDA contents was sharply decreased treated by middle and high dose of Fraction. Treatment with high dose Fraction(100 µg/mL) could increase the cell viability rate to 47.10%, increase SOD, GSH-Px and CAT activity to 45.50 U/mg protein, 35.10 U/mg protein and 34.13 U/mg protein respectively, and decrease the levels of LDH activity and MDA content to 20.93 U/mg protein and 20.77 nmol/mg protein. Moreover, the flow cytometric analysis and fluorescence microscopy observation confirmed that a certain amount of Fraction have a more effective role in decreasing cells apoptosis caused by oxidative stress. These results demonstrated that preincubated Caco-2 cells with antioxidant peptide (*S. niphonius* skin hydrolysates) resulted in a significant protection against the toxicity caused by H₂O₂.

Key words: *Scomberomorus niphonius*; antioxidant peptides of skin (Fraction II); Caco-2; oxidative stress; protection

Corresponding author: PENG Xinyan. E-mail: pengxinyan2006@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31401491)