

蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II对D-Gal诱导氧化损伤大鼠肝脏的保护作用

张 昱, 彭新颜*, 黄萍萍, 张翠云, 张乐仪

(鲁东大学食品工程学院, 山东烟台 264025)

摘要: 研究蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II (1~4 ku)对氧化损伤Wistar大鼠肝脏的保护作用。采用D-半乳糖(D-gal)建立衰老模型, 实验大鼠随机分为6组: 空白对照组; D-Gal模型阴性对照组; D-Gal+维生素E(V_E)阳性对照组; 抗氧化肽低、中、高剂量组。通过检测血清中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)和单胺氧化酶(MAO)活性及肝组织匀浆液中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性, 丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)含量和总抗氧化能力(T-AOC), 并结合组织形态学来评价Fraction II对氧化损伤肝脏的作用效果。结果显示, 与阴性对照相比, 各剂量组的Fraction II能够显著降低大鼠血清中的AST和ALT活性, 提高肝脏组织的SOD、GSH-Px、CAT活性和T-AOC能力, 降低MDA和NO含量及MAO水平, 并成一定的量效依赖关系。其中效果较好的高剂量(200 mg/kg)多肽处理组SOD、GSH-Px活性分别为236.27、182.23 U/mg蛋白, 达到了正常对照及阳性对照组水平; AST、ALT分别降低至302.47和220.43 U/L, MDA含量降低至138.83 nmol/mg蛋白, 也达到正常对照组水平。H.E.染色结果也证实, Fraction II在保护肝细胞完整性、维持结构清晰、抑制坏死等方面都有一定的效果。研究表明, 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II对D-Gal诱导的氧化损伤大鼠肝脏具有较好的保护作用。

关键词: 蓝点马鲛; 鱼皮抗氧化肽; D-半乳糖; 氧化损伤; 肝脏保护作用

中图分类号: S 986.2

文献标志码: A

以天然蛋白质为原料, 利用水解反应获得具有抗氧化功能的多肽成为近年来国内外研究的热点, 如从草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、罗非鱼(*Oreochromis* sp.)、黄鲫(*Setipinna taty*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、斑马鲂(*Salarias basilisca*)中获得的水解多肽表现出良好的抗氧化效果和疾病预防功效^[1-7]。与化学合成抗氧化剂相比, 这些天然多肽具有安全性高、来源广泛、功效显著等特点^[8]。蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)是黄、渤海地区重要经济鱼类, 鱼皮中富含胶原蛋白、不饱和脂肪酸及少量球蛋白、弹性蛋

白、白蛋白, 具有较高的再利用价值。本课题前期研究表明, 对蓝点马鲛鱼皮进行水解, 获得的分子量为1~4 ku的多肽段Fraction II不仅能有效抑制冷藏肉糜的氧化劣变^[9], 还对H₂O₂诱导的氧化损伤细胞具有一定的保护作用^[10]。在此基础上, 本课题通过建立D-半乳糖(D-galactose, D-Gal)动物衰老模型, 用多肽段Fraction II对大鼠进行灌胃处理, 观察其生化指标和组织生理学的变化规律, 继续研究多肽段Fraction II对氧化应激大鼠肝脏的保护作用, 为蓝点马鲛鱼皮多肽段的体内抗氧化作用模式及机理研究提供理论依据。

收稿日期: 2017-02-25 修回日期: 2017-04-18

资助项目: 国家自然科学基金(31401491); 山东省自然科学基金(ZR2016CP12); 鲁东大学博士科研启动金(LY2011015)

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

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

健康Wistar[大鼠(*Rattus norvegicus*)的一个品系,由美国Wistar研究所育成]雄性大鼠,购自北京维通利华试验动物公司;蓝点马鲛鱼皮(鱼肉馅加工副产物)由烟台惠安市场提供;Alcalase碱性蛋白酶(6×10^4 U/g)购于Novo公司;D-半乳糖(D-Gal),含量大于99.0%,由南京生兴生物技术有限公司提供;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)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)和单胺氧化酶(MAO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒由长春汇力生物科技有限公司提供;碳酸氢钠、碳酸氢钾等为国产分析纯,购于南京华嘉化学试剂公司。

Model 680酶标仪, Biorad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;电热恒温水浴箱,上海医疗器械五厂;pHS-25型酸度计,上海精科雷磁仪器厂;台式高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技公司;电动搅拌器,江苏省金坛市金城国胜实验仪器厂;微型混合器,上海康达电子仪器厂;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^[9]的方法,依次经过碱、酸和热水提取蓝点马鲛鱼皮,冻干得到胶原蛋白粉:蓝点马鲛鱼皮→洗净后剪成 $1\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 的鱼皮碎片→加6倍体积的NaOH(0.2%)溶液浸泡50 min→水洗至中性→加6倍体积的 H_2SO_4 (0.2%)溶液浸泡50 min→水洗至中性→匀浆(加10倍体积的蒸馏水)→热水提取12 h($50\text{ }^\circ\text{C}$)→ 6000 r/min 离心20 min后取上清液→冷冻干燥→鱼皮胶原蛋白。在pH为8.0,温度为 $50\text{ }^\circ\text{C}$,加酶量3%的条件下,用Alcalase酶水解6 h,利用1和4 ku超滤膜将水解多肽分离,收集分子量在1~4 ku的Fraction II,冻干后用于动物灌胃实验。

1.3 D-Gal致衰老模型大鼠的建立

清洁级Wistar大鼠,雄性,86只,3月龄,体质量260~300 g。将大鼠适应性饲养1周后建立模型,期间有淘汰,最终每组10只。随机分为

6组:①正常对照组;②D-Gal模型阴性对照组;③Gal+ V_E 阳性对照组;④D-Gal+Fraction II低剂量组;⑤D-Gal+Fraction II中剂量组;⑥D-Gal+Fraction II高剂量组。①组大鼠颈背部皮下注射生理盐水作为正常对照组;②、③、④、⑤、⑥组皮下注射D-半乳糖(120 mg/kg),连续注射7周建立衰老模型;其中②、③、④、⑤、⑥、⑦组大鼠于第2周开始正式实验,每日分别灌喂50 mg/kg双蒸水、50 mg/kg V_E 及50、100、200 mg/kg Fraction II。

1.4 血清和组织匀浆的制备与蛋白测定

实验持续7周后,大鼠的行为、食量和体质量增长均正常。摘除眼球取血,血样于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱放置12 h,以 $1800 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$,离心10 min,取上清液,即为血清。

将大鼠摘除眼球后断颈处死,迅速取出肝脏,除去周围脂肪及结缔组织,用生理盐水洗净血污后滤纸吸干,取0.5 g,置于5 mL小烧杯中,量取生理盐水,以眼科剪迅速剪碎组织块,冰浴匀浆,将匀浆液以 $2000 \times g$ 离心10 min,取上清液,制成10%组织液。

将已制得的10%组织液离心取上清液,用紫外吸收法测定上清液在280 nm处的吸光值,以牛血清蛋白为标准,计算蛋白含量。

1.5 生化指标测定

AST、ALT、MAO水平及肝组织匀浆中SOD、GSH-Px、CAT活性,NO和MDA含量的检测方法按照试剂盒说明书操作。

1.6 肝组织形态学观察

采用石蜡切片观察病理变化,取大鼠肝左叶,体积大约为 $2.0\text{ cm} \times 2.0\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$ 。经甲醛固定,80%、90%、95%、100%各浓度乙醇脱水、石蜡包埋、切片机切片、苏木素—伊红法染色、封片等步骤制成切片,在显微镜下观察病理变化。

1.7 数据统计分析

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

2 结果与分析

2.1 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 对大鼠血清AST、ALT活性的影响

ALT、AST属于非特异性细胞内功能酶,能在一定程度上反映肝细胞受损程度^[11]。与正常对照组相比,D-Gal阴性对照组AST、ALT活性分别升高了650.24和778.03 U/L,说明大鼠肝脏损

伤严重,D-Gal诱导氧化应激造模成功(图1)。蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 各剂量组及阳性对照组的AST水平显著低于阴性对照组($P<0.05$),其中Fraction II 高剂量组的AST水平与低、中剂量组相比分别降低了69.66%和73.65%,且ALT水平与低、中剂量组相比分别降低了56.51%和70.52%,可见,200 mg/kg的Fraction II 效果最佳。

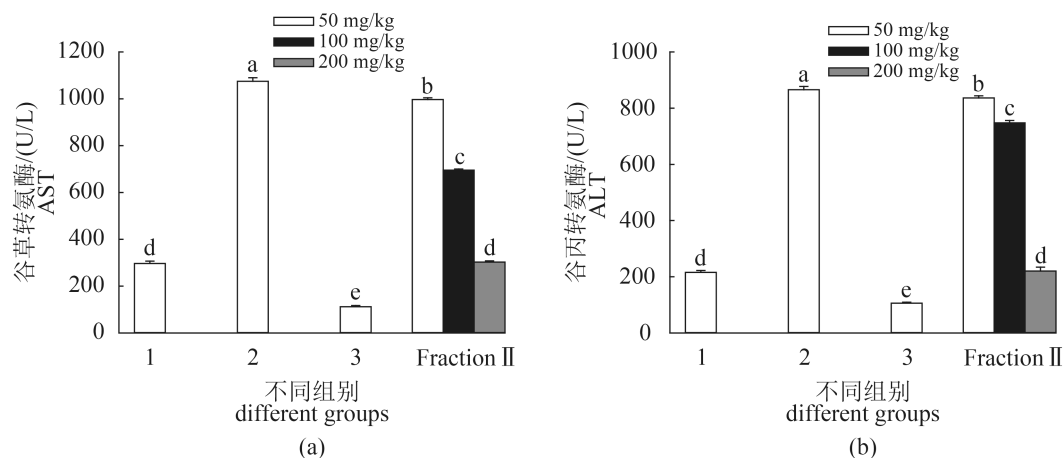


图1 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 对D-Gal诱导肝损伤大鼠血清AST (a)、ALT (b)水平的影响

1. 正常对照, 2. 阴性对照, 3. 阳性对照, 图中柱子上方不同字母表示差异显著($P<0.05$), 下同

Fig. 1 The effect of *S. niphonius* skin hydrolysates (Fraction II) on AST (a), ALT (b) level in *R. norregicus* plasma in a model of D-Gal induced hepatotoxicity

1. normal control, 2. negative control, 3. positive control, column values with different superscripts indicate significant difference ($P<0.05$), the same below

2.2 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 对大鼠血清MAO的影响

MAO作为黄素腺嘌呤二核苷酸酶,主要催化单胺类物质生成醛和过氧化氢。随着人类年龄的增长,机体MAO活性会上升,因此它是一种组织或细胞老化的标志酶^[12]。高、中剂量多肽组MAO含量分别为75.93和80.06 U/mg prot,显著低于阴性对照和低剂量组($P<0.05$)(图2),这表明Fraction II 的中、高剂量组有抑制MAO升高的作用,但效果不及正常对照及阳性对照组($P>0.05$)。

2.3 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 对大鼠肝脏抗氧化酶活性和MDA含量的影响

SOD、GSH-Px变化趋势相似,Fraction II 高剂量组效果最好,与低、中剂量组差异显著($P<0.05$)。Fraction II 高剂量组CAT活性显著高于低、中剂量组($P<0.05$),但不如阳性对照组效果

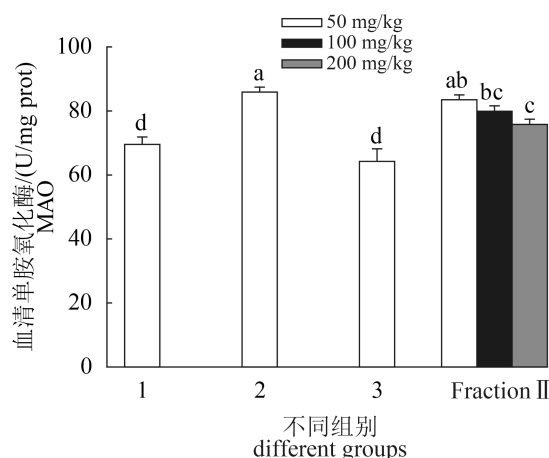


图2 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 对D-Gal诱导肝损伤大鼠血清MAO活性的影响

Fig. 2 The effect of *S. niphonius* skin hydrolysates (Fraction II) on MAO activity in *R. norregicus* plasma in a model of D-Gal induced hepatotoxicity

好($P<0.05$)。Fraction II 高剂量组MDA水平与正常对照组无显著差异($P>0.05$), 并且比低、中剂量组分别降低了141.00和118.81 nmol/mg ($P<0.05$)

(表1)。说明抗氧化肽Fraction II 对提高肝细胞抗氧化酶活性和减轻脂质过氧化有较好效果, 并呈量效依赖关系。

表 1 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 对大鼠肝脏抗氧化酶活性和MDA含量的影响

Tab. 1 Effects of *S. niphonius* skin hydrolysates (Fraction II) on SOD, GSH-Px, CAT activity and MDA level in *R. norregicus* liver in a model of D-Gal induced hepatotoxicity

组别 group	超氧化物歧化酶/(U/mg) SOD	谷胱甘肽过氧化物酶/(U/mg) GSH-Px	过氧化氢酶/(U/mg) CAT	丙二醛/(nmol/mg) MDA
正常对照组 normal control	225.97±4.76 ^b	175.63±3.69 ^b	391.63±8.87 ^c	137.23±2.55 ^d
阴性对照组 negative control	152.00±3.72 ^c	117.00±2.91 ^c	230.27±4.56 ^f	350.93±5.40 ^a
50 mg/kg Fraction II	195.43±3.05 ^d	127.40±1.85 ^d	260.00±7.84 ^e	279.83±3.09 ^b
100 mg/kg Fraction II	207.17±3.05 ^c	142.00±4.70 ^e	349.17±6.36 ^d	257.64±6.12 ^c
200 mg/kg Fraction II	236.27±3.09 ^{ab}	182.23±3.78 ^{ab}	477.90±9.81 ^b	138.83±5.78 ^d
阳性对照组 positive control	244.97±6.08 ^a	190.73±5.23 ^a	564.77±5.61 ^a	117.30±4.23 ^e

注: 同一行中的不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Notes: different superscripts letters in the same line means significant difference ($P<0.05$)

2.4 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 对大鼠肝脏T-AOC的影响

总抗氧化能力(T-AOC)代表机体抗氧化酶系统和非酶系统对外界刺激的整体调节状态, 可维持内环境活性氧的动态平衡, 是反映机体组织总体抗氧化功能的指标^[1]。阳性对照与正常对照组总抗氧化能力最强, 显著优于其他处理组($P<0.05$)。蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 低、中、高剂量组的T-AOC水平分别为2.05、2.16、2.45 U/mL, 都优于阴性对照组($P<0.05$)(图3)。

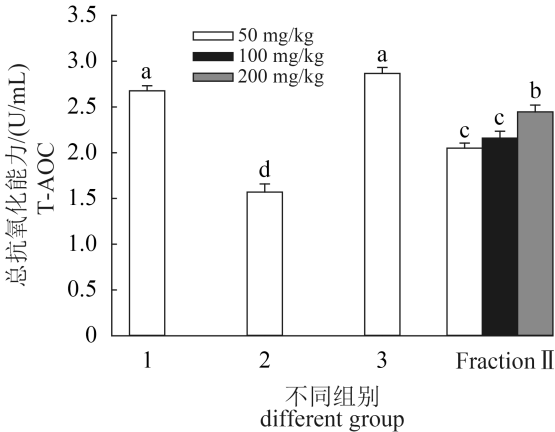


图 3 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 对D-Gal诱导肝损伤大鼠T-AOC的影响
Fig. 3 The effect of *S. niphonius* skin hydrolysates (Fraction II) on T-AOC (U/mg) in *R. norregicus* liver in a model of D-Gal induced hepatotoxicity

2.5 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 对大鼠肝脏NO的影响

NO是生物体内一种反应性极强的自由基, 在机体中扮演着生理和病理的双重角色^[13]。阴性对照组的NO含量显著高于其他各处理组($P<0.05$), 正常对照与阳性对照组NO在肝脏中的含量最低, 且无显著性差异($P>0.05$), 而与其他各处理组差异显著($P<0.05$)。阳性对照组、正常对照组和抗氧化肽段Fraction II 高剂量组比阴性对照组分别降低24%、21%和14%(图4)。以上结果说明, 阴性对照组肝脏受到氧化损伤导致NO含量

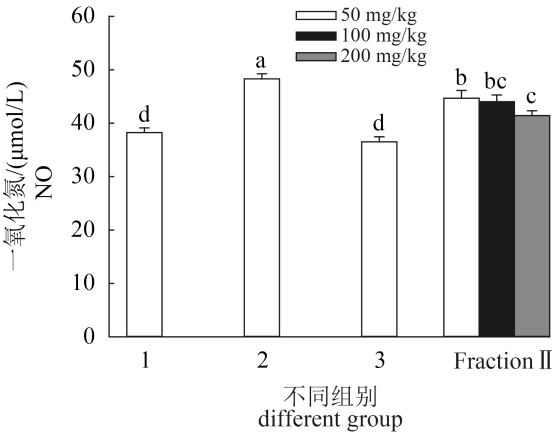


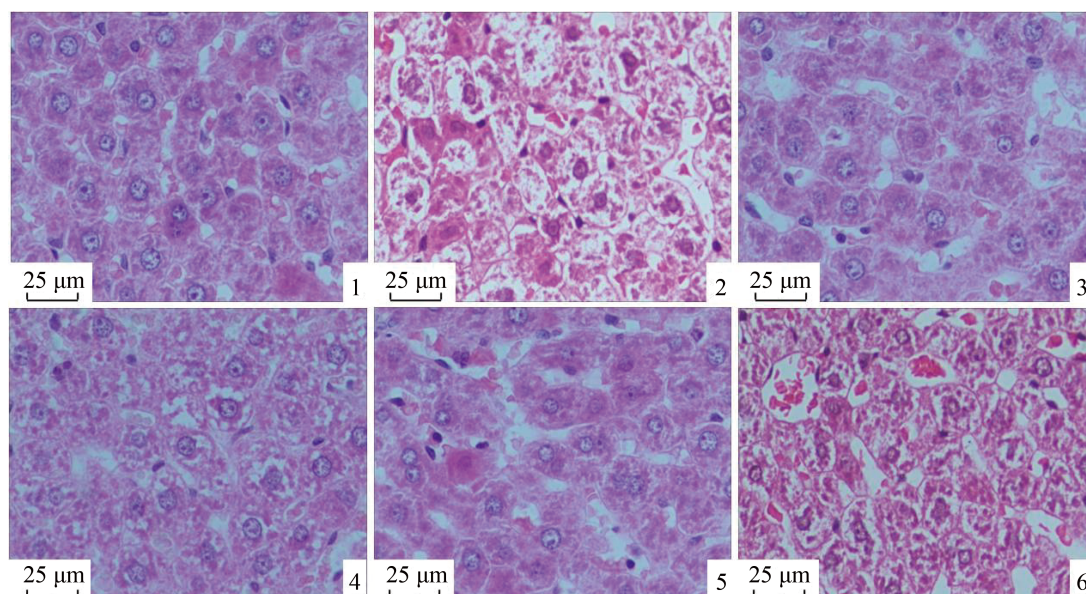
图 4 蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 对D-Gal诱导肝损伤大鼠肝组织NO水平的影响
Fig. 4 The effect of *S. niphonius* skin hydrolysates (Fraction II) on NO level in *R. norregicus* plasma in a model of D-Gal induced hepatotoxicity

升高, Fraction II 各剂量组都有抑制NO升高的作用, 其中以高剂量组的效果最好。

2.6 肝脏组织病理学切片

H.E.染色法是形态学中最常用的染色方法^[14]。本实验正常对照组与阳性药物组之间无明显差异, 大鼠肝组织小叶结构清晰、分界清楚、胞质饱满; 肝细胞索以中央静脉为中心, 呈放射

状排列, 未出现疏松、水肿及炎细胞浸润。阴性对照组肝脏部分区域界限不清, 肝细胞水肿、胞浆疏松淡染、体积增大, 部分肝细胞变性或坏死(图版)。蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 中、高剂量组形态学有所改善, 病变显著减轻, 偶见细小炎灶, 极少许肝细胞水肿、胞浆疏松淡染, 无明显的淤血、出血。



图版 各处理组大鼠肝脏病理学切片

1. 正常对照组, 2. D-Gal阴性对照组, 3. 维生素E组, 4~6. Fraction II 低、中、高剂量组

Plate Histopathology of liver tissues

1. the control group, 2. the group treated with D-Gal only, 3. vitamin E, 4-6. low, middle and high dose of Fraction II respectively

3 讨论

肝脏是机体最主要的解毒器官, 具有较高的代谢率, 一般通过分解活性氧自由基来降低氧化应激造成的肝损伤^[11]。氧化应激使得肝细胞膜通透性增加, 其内部的ALT释放入血, 当肝细胞损伤较重时, AST也释放入血, 因此, 血清ALT、AST活性的改变是肝功能受损的“金标准”^[7], 具有肝保护功能的物质可以显著降低血液中ALT、AST值。本研究发现, 与D-Gal阴性对照相比, 3种剂量的蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II 能显著降低血清ALT、AST水平, 表明Fraction II 能有效干预D-Gal所致肝细胞损伤, 并具有改善大鼠肝功能的作用, 而且呈一定的量效关系。MAO是体内自行产生生物胺的氧化酶, 可以催化氧化单胺类物质发生脱氨反应, 生成过氧化氢类物质, 其活性与衰老密切相关^[12]。本实验中, 抗

氧化肽虽有降低MAO含量的作用, 但效果不及正常对照组, 这可能是因为MAO催化产生了过氧化氢, 抗氧化肽与过氧化氢发生反应被消耗, 从而导致MAO活性降低不明显。

抗氧化酶系统是机体抗自由基损伤的重要防御体系, 其中SOD、GSH-Px、CAT这3类抗氧化酶分别通过催化超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)发生歧化反应^[15-16]、阻断脂质过氧化连锁反应^[5]、催化 $O_2^{\cdot-}$ 歧化与SOD协同作用^[17-18], 在体内发挥清除自由基的作用^[19-20]。T-AOC水平的下降是病理状态的重要体现, 是机体活性氧水平增加的重要表征^[8]。另外, 肝组织中MDA含量不仅能反映肝细胞膜脂质过氧化程度的高低, 而且可间接反映自由基对肝细胞的损伤程度^[3]。研究表明, 与正常对照组相比, 阴性对照组大鼠肝脏SOD、CAT、GSH-Px活性和T-AOC能力显著下降, 脂

质过氧化产物MDA含量明显增加,表明D-Gal能引起机体产生大量自由基,使得氧化与抗氧化失衡,表现出与自然衰老大鼠一致的特征,说明造模成功。蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II处理组能提高SOD、CAT、GSH-Px活性和T-AOC能力,降低MDA含量,其中高剂量组效果最好,提示Fraction II在增强抗氧化酶类的活性和清除自由基方面可发挥较好的作用。

NO由精氨酸在结构型一氧化氮合酶(cNOS)或诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的催化下生成。正常生理状态下,少量NO对肝脏有一定的保护作用;而病理状态时,iNOS被激活合成大量的NO^[11],过量NO是造成氧化应激损伤的主要物质^[21]。研究表明,D-Gal致衰老模型大鼠肝组织中NO含量均显著高于正常对照、阳性对照和Fraction II各剂量组,这可能是因为D-Gal引起的肝损伤会导致iNOS基因的大量表达,促进了NO的合成。Fraction II各剂量组大鼠NO均有不同程度的下降,但尚未达到正常对照及阳性对照水平,其中以高剂量组作用效果最好,说明Fraction II可通过减少NO的合成从而减轻高浓度NO引起的毒性。病理切片实验也证实,Fraction II能够改善D-Gal引起的肝组织学恶化,抑制了大鼠肝脏组织病变。

目前,蛋白水解多肽的体内、体外抗氧化功效与其氨基酸组成、序列、极性,尤其是分子量密切相关的规律已得到证实^[22-23]。如Chang等^[22]发现,油棕(*Elaeis guineensis*)中小于3 ku的肽段有较强的ABTS自由基清除能力。Chi等^[23]将绿鳍马面鲈(*Navodon septentrionalis*)头部水解后得到了分子量为269.33 u的肽段Gly-Pro-Pro,该肽段表现出了较强的DPPH自由基、羟自由基和ABTS自由基清除能力。Ktari等^[7]也发现,分子量为1300 ku的斑马鲷蛋白水解多肽段具有较好的自由基清除能力,而且能够有效地降低糖尿病小鼠体内硫代巴比妥酸反应物(TBARs)水平,提高SOD和CAT活性。本课题组前期研究表明,分子量为1~4 ku的蓝点马鲛鱼皮抗氧化多肽Fraction II具有较好的自由基清除能力^[9],而且可以通过提高H₂O₂诱导的氧化损伤Caco-2细胞中LDH、SOD、GSH-Px、CAT的活性并降低MDA含量,以起到保护氧化损伤细胞的作用^[10]。本实验中Fraction II对氧化损伤大鼠的衰老抑制效果明显,说明蓝点马鲛鱼皮水解物由分子量为1~4 ku多肽的氨基

酸组成、肽链长度大小、排列顺序适宜,恰具有较好的体内抗氧化效果。

综上所述,蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽Fraction II(1~4 ku)对D-Gal所致氧化损伤大鼠有保护作用,这可能与通过多途径清除体内过量自由基有关。具体表现为提高细胞SOD、CAT、T-AOC和GSH-Px活性,降低MAO、NO活性和MDA含量。而且大鼠肝脏病理学切片也证实,Fraction II可以在一定程度上保护肝组织结构。因此,抗氧化多肽Fraction II在延缓D-Gal引起的肝损伤及改善衰老方面起到良好的作用。

参考文献:

- [1] Liu Q, Kong B H, Li G X, *et al.* Hepatoprotective and antioxidant effects of porcine plasma protein hydrolysates on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(6): 1316-1321.
- [2] 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.
- [3] Lee S J, Kim Y S, Hwang J W, *et al.* Purification and characterization of a novel antioxidative peptide from duck skin by-products that protects liver against oxidative damage[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 285-295.
- [4] 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.
- [5] Song R, Wei R B, Ruan G Q, *et al.* Isolation and identification of antioxidative peptides from peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 221-229.
- [6] 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(1): 770-779.
- [7] Ktari N, Nasri R, Mnafigui K, *et al.* Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in alloxan-induced

- diabetic rats[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(5): 890-897.
- [8] Peng X Y, Kong B H, Yu H Y, *et al.* Protective effect of whey protein hydrolysates against oxidative stress in D-galactose-induced ageing rats[J]. *International Dairy Journal*, 2014, 34(1): 80-85.
- [9] 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).
- [10] 彭新颜, 黄磊, 崔云, 等. 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[J]. *水产学报*, 2017, 41(3): 456-464.
- Peng X Y, Huang L, Cui Y, *et al.* Protective effects of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) skin Peptides against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 456-464(in Chinese).
- [11] Plumel M I, Benhaim-Delarbre M, Rompais M, *et al.* Differential proteomics reveals age-dependent liver oxidative costs of innate immune activation in mice[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 135(1): 181-190.
- [12] Maurel A, Hernandez C, Kunduzova O, *et al.* Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats[J]. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 2003, 284(4): H1460-H1467.
- [13] Zhou Y, Dong Y, Xu Q G, *et al.* Mussel oligopeptides ameliorate cognition deficit and attenuate brain senescence in D-galactose-induced aging mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 59(8): 412-420.
- [14] Zhou B H, Zhao J, Liu J, *et al.* Fluoride-induced oxidative stress is involved in the morphological damage and dysfunction of liver in female mice[J]. *Chemosphere*, 2015, 139(2): 504-511.
- [15] Agrawal H, Joshi R, Gupta M. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2016, 204: 365-372.
- [16] Turan A, Celik I. Antioxidant and hepatoprotective properties of dried fig against oxidative stress and hepatotoxicity in rats[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 91: 554-559.
- [17] Jobara K, Kaido T, Hori T, *et al.* Whey-hydrolyzed peptide enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats[J]. *Nutrition*, 2014, 30(10): 1195-1207.
- [18] Liu Z G, Liu Y, Xiong Z Y, *et al.* Total soy saponins improve the antioxidant capacity of the myocardium and exercise ability in exhausted rats[J]. *Journal of Sport and Health Science*, 2016, 5(4): 424-429.
- [19] Aldahmash B A, El-Nagar D M. Antioxidant effects of captopril against lead acetate-induced hepatic and splenic tissue toxicity in Swiss albino mice[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016, 23(6): 667-673.
- [20] Miler M, Živanović J, Ajdžanović V, *et al.* Citrus flavanones naringenin and hesperetin improve antioxidant status and membrane lipid compositions in the liver of old-aged Wistar rats[J]. *Experimental Gerontology*, 2016, 84: 49-60.
- [21] Chen K I, Erh M H, Su N W, *et al.* Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(1): 9-22.
- [22] Chang S K, Ismail A, Yanagita T, *et al.* Antioxidant peptides purified and identified from the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) kernel protein hydrolysate[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 14: 63-75.
- [23] Chi C F, Wang B, Wang Y M, *et al.* Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 12: 1-10.

Protective effects of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) skin peptides against D-Gal-induced liver damage in rats

ZHANG Yu, PENG Xinyan*, HUANG Pingping, ZHANG Cuiyun, ZHANG Leyi

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

Abstract: Epidemiological studies consistently show that excessive amounts of reactive oxygen species (ROS) is an important underlying cause of the initiation of oxidative stress in various tissue injuries as well as cell death and several chronic diseases. Several compounds, such as D-Galactose (D-Gal), bromobenzene, carbon tetrachloride (CCl₄), acetaminophen, and ethanol have been implicated in the etiology of liver diseases. D-Gal is commonly used as a toxin to induce reactive oxygen species and hepatic disorders, which has been extensively used in oxidative damage animal models to evaluate the therapeutic potential of drugs and dietary antioxidants. Due to the risks of synthetic antioxidants, there is a growing interest in the use of natural antioxidants to prevent ROS related liver pathologies. Therefore, during the past several decades, human nutrition and biochemistry research focused on antioxidants derived from foods that could prevent or diminish ROS-induced damage. More recently, there is growing interest in natural hydrolysed protein antioxidants from many plant and animal sources. So, we hypothesized that the administration of antioxidant peptides might be useful for preventing various types of oxidative stress *in vivo*. In our previous experimental studies, Fraction I (MW <1 ku), Fraction II (MW 1–4 ku) and Fraction III (MW >4 ku) were isolated from the hydrolysates of *Scomberomorus niphonius* skin through ultrafiltration membrane with the cutoff of 1 and 4 ku, respectively. Among them, the Fraction (1–4 ku) exhibited the highest radical scavenging activity, inhibiting both lipid and protein oxidation of cooked patties during refrigerated storage, and protecting Caco-2 cells against the toxicity caused by H₂O₂. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antioxidant effects of Fraction II on D-Gal-induced liver damage in rats. Wistar rats were randomly divided into 6 groups, which were normal control, negative control, D-Gal+Low-dose of Fraction II, D-Gal+Middle-dose of Fraction II, D-Gal+High-dose of Fraction II, and D-Gal +V_E as positive control for seven weeks. The activities of serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), monoamine oxidase (MAO) and antioxidant enzyme activities including superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), total antioxidant capacity (T-AOC), nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) contents in liver were determined. The result showed that all doses of Fraction II could significantly reduce the ALT and AST level in serum of the rat, while M-dose and H-dose of Fraction could sharply decrease the MAO level. Compared with negative control group, SOD, GSH-Px, CAT activity and T-AOC of liver of the rats were increased significantly. the MDA and NO contents in liver of the rats were reduced when treated with all doses of Fraction. Treatment with high dose Fraction (200 mg/kg) could increase the SOD, GSH-Px activity to 236.27 and 182.23 U/mg protein, which could reach the level of normal and positive control, decrease the contents of AST, ALT and MDA to 302.47 U/L, 220.43 U/L and 138.83 nmol/mg protein, which was close to the level of normal control. Moreover, Fraction II could significantly reduce the injury score of prominent nucleus, visible central veins and necrosis in rats. These data indicate that Fraction II can protect the liver against D-Gal induced oxidative damage.

Key words: *Scomberomorus niphonius*; antioxidant peptides of skin (Fraction); D-Gal; oxidative stress; hepatoprotective effect

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31401491); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CP12); Doctoral Scientific Research Project in Ludong University (LY2011015)