



可溶性南极磷虾蛋白-芦丁复合物的制备及抗氧化性能分析

李玉锋^{1,2}, 王敬敬^{3*}, 檀利军², 彭知云²,
赵晟², 刘海泉², 赵勇^{2*}

(1. 安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000;

2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

3. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东 佛山 528000)

摘要: 为了提升可溶性南极磷虾蛋白的抗氧化性能, 将芦丁复合到可溶性南极磷虾蛋白(SAKP)上, 成功制备了SAKP-芦丁复合物, 一种新型的多酚-蛋白复合物。通过测定SAKP-芦丁复合物清除二苯基苦基苯肼自由基(DPPH)和羟基自由基(OH[·])的能力来评估其抗氧化能力。同时采用H₂O₂诱导HepG-2细胞氧化损伤模型评价了SAKP-芦丁复合物对细胞受到氧化损伤时的保护能力。结果发现, 与芦丁复合后, SAKP的抗氧化和清除自由基的能力明显增强; 与天然SAKP相比, SAKP-芦丁复合物显著提升了HepG-2细胞超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性, 减少了细胞因氧化应激产生的脂质过氧化产物(MDA)含量, 最终降低了氧化应激损伤对细胞的伤害。以上结果表明, SAKP-芦丁复合物是一种新型的、有希望应用于开发功能性食品的蛋白资源。

关键词: 可溶性南极磷虾蛋白; 芦丁; 复合物; 抗氧化; HepG-2 细胞

中图分类号: S 983; TS 254

文献标志码: A

南极磷虾(*Euphausia superba*)属于磷虾科(Euphausiidae)磷虾属(*Euphausia*), 主要生活在南极洲水域中^[1]。其生物量巨大, 目前估计有5亿t, 年可捕量约达1亿t^[2], 是世界上最大的动物蛋白来源, 其可利用的生物量与人类收获的其他水生生物的总生物量相同^[3]。南极磷虾的营养还极其丰富, 其体内蛋白的含量为11.9%~15.4%, 灰分的含量约3%, 碳水化合物约含2%, 脂质占0.5%~3.6%。南极磷虾蛋白中包含了人体所需的全部氨基酸, 生物学价值高于其他肉类和奶类蛋白^[3-4]。但是, 目前绝大多数磷虾被用于生产低附加值的磷虾粉和动物饲料, 每年用于人类食用的磷虾量不足20%。

南极磷虾蛋白作为一种尚未商业化生产的蛋白, 承载了人们对更高生活品质的期望, 不仅要求其具有优异的营养特性, 还需要其具备特定的功能特性, 以适应蛋白质在贮藏、加工和消费过程中的环境变化。南极磷虾蛋白的结构复杂特殊, 在加工过程中也存在着很多问题, 这极大的阻碍了其在食品工业中的应用^[5]。此外, 蛋白质在储存过程中极易氧化, 严重影响蛋白质的品质。因此, 改善南极磷虾蛋白的功能特性是当前科学研究的重点^[6]。多酚类化合物及其糖苷是植物次生代谢的主要产物之一, 由于其具有强大的清除自由基和螯合金属离子的能力, 因此它们具有较好的抗氧化性能, 同时它们还可以预防多种疾病,

收稿日期: 2021-11-09 修回日期: 2021-12-27

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFC1602205); 安徽工程大学引进人才科研启动基金(2021YQ0046)

第一作者: 李玉锋(照片), 从事食品质量与安全研究, E-mail: lyfahpu2018@126.com

通信作者: 王敬敬, 从事食品质量与安全研究, E-mail: w_j2010@126.cn;

赵勇, 从事食品质量与安全研究, E-mail: yzhao@shou.edu.cn



比如神经衰弱、癌症、心血管疾病、糖尿病和骨质疏松症等,常被作为天然食品抗氧化剂,广泛用于开发功能性的食品^[7-8]。最近,科研人员广泛采用多酚对蛋白质进行修饰,以形成新的具有抗氧化功能的蛋白质复合颗粒^[6,9-10]。多酚类物质对蛋白质的修饰可以提升蛋白质的多种功能性质(如抗氧化性和乳化性等),这主要归因于大量具有强还原性的酚羟基的引入。芦丁是植物中一种常见的膳食类多酚化合物,通常被称为糖苷,由槲皮素和2个配糖(鼠李糖和葡萄糖)组成,其具有多种药理活性,包括抗炎、抗癌、抗微生物、抗糖尿病和保护神经的作用^[7,11]。

我们之前的研究表明,通过碱溶酸沉法提取的南极磷虾蛋白溶解度仅为19%^[12],为了提升磷虾蛋白的利用度,本研究对南极磷虾进行分级利用,首先从南极磷虾总蛋白中分离出了纯度较高的可溶性南极磷虾蛋白(SAKP),在碱性(pH 9.0)条件下制备了SAKP-芦丁复合物。然后通过测量氨基酸、巯基和疏水性含量的变化来表征蛋白质结构的变化。最后评价了复合颗粒的抗氧化性、清除自由基能力以及对HepG-2细胞氧化应激损伤的保护能力。本研究希望为开发功能性磷虾蛋白食品提供新的理论基础,同时也为海洋蛋白在食品工业中的高附加值应用开辟新的道路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

南极磷虾购自大连海洋渔业集团公司,通过冷链运输到实验室,置于低温冰箱(-20℃)储存备用。

1.2 SAKP的提取

南极磷虾总蛋白的提取按照我们前期建立的提取方法^[13]。具体步骤:将20g南极磷虾肉与180mL碱性电解水(1:10,质量体积比)混合,将混合物在800r/min的转速下均质1min。用NaOH(1mol/L)将所得均质物的pH调至12。将所得均质物置于装有冰水的烧杯中进行冰水浴,用超声波细胞破碎仪SCIENTZ-II D(宁波新芝生物科技股份有限公司)超声处理20min(超声持续6s,关闭3s,功率为350W)。随后将混合溶液在室温条件下搅拌1h,用盐酸(1mol/L)将溶液pH调至4.5,以8000×g的转速离心10min,离心后置于-80℃冰箱中冷冻储存。将南极磷虾

蛋白样品在真空干燥机中冷冻干燥获得总蛋白粉末,在此基础上分离出SAKP。通过凯氏定氮仪(FP-428, Leco Corporation, 美国)测定磷虾蛋白质的纯度。

1.3 SAKP-芦丁复合物的制备

SAKP-芦丁复合物的制备参考Rawel等^[14]的方法。首先将0.2g芦丁分散在4mL乙醇中,使用蒸馏水调节至200mL;然后制备系列浓度的(6、8、10和12mg/mL)SAKP溶液,按照SAKP和芦丁质量比为6:1、8:1、10:1和12:1制备SAKP与芦丁混合溶液。用NaOH(0.1mol/L)将SAKP和芦丁混合物溶液的pH调节至9.0;最后将混合物溶液在室温下搅拌过夜,以确保SAKP和芦丁之间完全反应。通过透析袋(8~14ku)对溶液进行透析(4℃,36h)除去未反应的芦丁,每隔12h换1次水。

1.4 游离氨基酸含量的测定

SAKP-芦丁复合物中游离氨基含量的测定参考Vigo等^[15]的方法。首先,制备邻苯二甲醛(OPA)试剂:将80mgOPA溶于2mL甲醇,依次加入5mL SDS(2%质量体积分数)、50mL硼酸钠缓冲液(0.1mol/L)和200μLβ-巯基乙醇,然后加入蒸馏水定容至100mL。将200μL SAKP-芦丁复合物溶液(2mg/mL)和4mL OPA试剂加入试管中,然后水浴加热5min(37℃)。用紫外-可见分光光度计(U-7100, Hitachi Corporation)测定样品的吸光度(340nm)。采用L-亮氨酸制备的标准曲线计算样品中游离氨基的含量。

1.5 巯基含量的测定

使用Ellman(DTNB)试剂测定蛋白质中巯基的含量。1mL蛋白质(2mg/mL)加入9mL缓冲液(0.086mol/L Trise, 0.09mol/L 甘氨酸, 4mmol/L Na₂EDTA, pH=8)中充分混合。将混合物充分振荡后置于水浴锅中,于25℃孵育1h,然后以12000×g的转速离心15min(4℃)。将30μL Ellman试剂(4mg/mL DTNB)添加到3mL混合物中充分混合,然后将混合溶液于25℃静置15min,最后在412nm处读取样品的吸光度值,并将缓冲液作为空白对照。使用还原性的谷胱甘肽制作标准曲线(图1),将测定样品的吸光度值通过标准曲线转换成蛋白质中游离巯基含量。所有测定均重复3次。

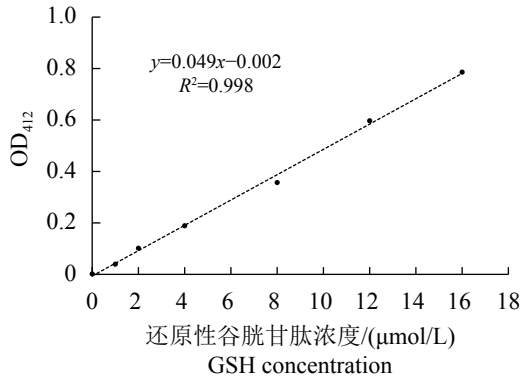


图1 还原性谷胱甘肽标准曲线

Fig. 1 The reduced glutathione standard curve

1.6 表面疏水性 (H_0) 测量

根据已有的研究方法^[13], 使用 8-苯胺基-1-萘磺酸 (ANS) 作为荧光探针测定 SAKP 的表面疏水性。将 20 μL 8.0 mmol/L 的 ANS (0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液, PBS) 添加到连续稀释的蛋白样品溶液中 (25~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。使用分光光度计 F7100 (Hitachi, 日本) 测量样品在 364 nm (激发波长) 和 475 nm (发射波长) 下的荧光强度。以蛋白质的浓度为横坐标, 蛋白质的荧光强度为纵坐标制作曲线, 斜率表示为蛋白质的表面疏水性, 多次重复实验求得平均值。

1.7 SAKP-芦丁复合物清除二苯基苦基苯肼自由基 (DPPH) 能力测定

DPPH 清除能力的测定参考宁方建^[16]的方法。将 DPPH 溶于乙醇中制备 0.5 mmol/mL DPPH 乙醇溶液, 并置于暗室保存。将 SAKP 和 SAKP-芦丁复合物配置成不同浓度 (1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mg/mL) 的蛋白质溶液。分别向不同的样品中加入 1 mL 的 DPPH 溶液至 SAKP 和 SAKP-芦丁复合物达到目标浓度 (0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL), 充分混匀后在暗室中孵育 30 min, 以维生素 C 作为阳性对照。DPPH 的清除率计算公式:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_0 为空白对照组的吸光度值, A_s 为测试样品的吸光度值。

1.8 SAKP-芦丁复合物清除羟基自由基 (OH^\cdot) 能力测定

采用羟自由基清除能力检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 测定 SAKP-芦丁复合物对 OH^\cdot 的清除能力。具体步骤按照试剂盒说明书的操作

方法进行。 OH^\cdot 的清除能力计算公式:

$$\text{OH}^\cdot \text{清除率}(\%) = \frac{(A_s - A_0)}{(A_c - A_0)} \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_0 为空白对照组的吸光度值; A_c 为空白管的吸光度值; A_s 为测定管的吸光度值。

1.9 细胞活性测定

培养液配置 向 DMEM 培养基中加入 10% 胎牛血清 (FBS) 和双抗试剂 (青霉素和链霉素)。

细胞培养 细胞培养瓶内的 HepG-2 细胞培养至密度达 80%~90% 时, 离心除去上清培养液, 然后用灭菌后的 PBS 润洗 1~2 次。加入适量的胰蛋白酶 (0.25%) 消化细胞, 过程中用显微镜观察细胞的消化程度, 待大部分细胞都脱落时, 加入 1~2 mL 完全培养基终止消化。充分混匀后, 在 1200 r/min 的转速下离心 5 min, 除去上清, 用细胞计数板进行计数, 将细胞转移至 96 孔培养板中继续培养 24 h。处理组 1 (对照组) 加入等体积培养基; 处理组 2 加入终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 SAKP; 处理组 3 加入终浓度为 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 SAKP-芦丁复合物和 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 过氧化氢; 处理组 4 加入终浓度为 0.2 mol 的 SAKP-芦丁和 0.5 mmol/L 过氧化氢; 处理组 5 加入终浓度为 0.3 mol 的 SAKP-芦丁和 0.5 mmol/L 过氧化氢; 处理组 6 加入终浓度为 0.4 mol 的 SAKP-芦丁和 0.5 mmol/L 的过氧化氢, 每组设 3 个平行孔, 在 37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱中 (CO_2 , 5%) 培养 24 h。最后加入 100 μL 的 MTT 溶液 (0.5 mg/mL), 在 37 $^\circ\text{C}$ 中水浴 3 h 后, 离心除去上清液, 加入 150 μL 的二甲基亚砷 (DMSO), 充分振荡混匀, 在 490 nm 的波长下测定其吸光度值^[17]。细胞活性计算公式:

$$\text{细胞活性}(\%) = \frac{A_s}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中, A_s 和 A_0 分别代表处理样品和对照组的吸光度值。

1.10 细胞中抗氧化酶活性的测定

按照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书操作, 测定细胞内丙二醛 (MDA) 的含量以及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性。

1.11 统计分析

所有数据至少是 3 个重复测定的平均值, 采用 SPSS19.0 软件按照单因素方差法 (ANOVA) 分

析不同处理组之间的差异, $P < 0.05$ 被认为存在显著性差异。

2 结果

2.1 SAKP-芦丁复合物的制备

通过质谱分析, SAKP 主要是原肌球蛋白, 这一结果与 Chen 等^[18]的研究结果一致。实验从 NCBI 数据库中下载到南极磷虾肌球蛋白的氨基酸序列 (BAF95205.1)。将 5 种天然多酚物质 (芦丁、

儿茶素、异黄酮、木犀草素和橘皮素) 与南极磷虾原肌球蛋白在 Discover Studio 软件中的 LibDock 程序进行分子对接。针对对接后的结果进行打分评价, 发现肌球蛋白与芦丁的对接具有最小的结合能。在 SAKP 与芦丁的 LibDock 对接 2D 模式局部对接图中可以看出芦丁与 SAKP 中氨基酸残基 (如 ASP-A:175、ARG-A:178、GLU-B:180 和 GLU-B:184 等) 发生了氢键相互作用 (图 2), 因此芦丁与氨基酸的结合有氢键参与相互作用。

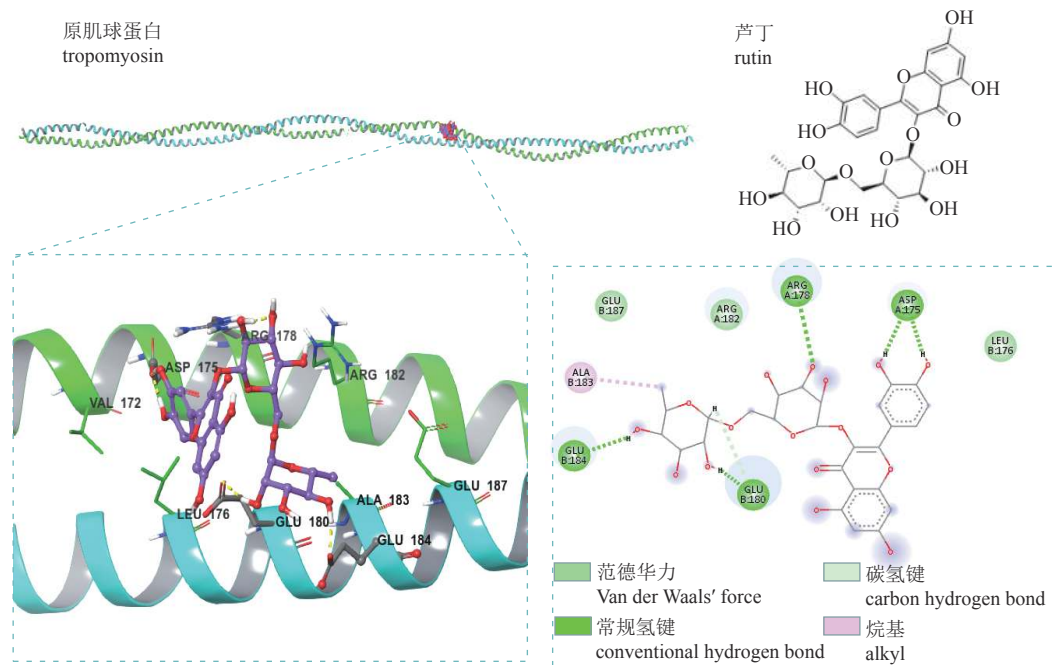


图 2 南极磷虾原肌球蛋白和芦丁的分子局部对接模拟

Fig. 2 Molecular docking simulation of Antarctic krill tropomyosin and rutin

选择合适的质量比例对于制备 SAKP-芦丁复合物非常重要。表 1 显示了 SAKP 和芦丁分别在不同比例 [(6~12 : 1), 质量比] 下复合 3~12 h 的复合度。所有处理组, SAKP 与芦丁的复合度随复合时间的延长明显增加。复合 9 h 后, SAKP 与芦丁质量比为 6 : 1、8 : 1、10 : 1 和 12 : 1 的最大复合度分别是 27.20%、26.86%、25.57% 和 19.85%, 且复合度不会随复合时间延长而提高。通过统计分析, 6 : 1、8 : 1 和 10 : 1 的比例制备的 SAKP-芦丁复合物的复合度无显著差异, 都显著高于 12 : 1 比例下的 SAKP-芦丁复合物的复合度 ($P < 0.05$)。

同时, 本研究测定了不同浓度的 SAKP 与芦丁的比例复合 9 h 后, 对照组 (天然 SAKP) 中游离氨基酸的含量为 316.43 nmol/mg, 而 SAKP 与芦丁质量比为 12 : 1、10 : 1、8 : 1 和 6 : 1 制备的

SAKP-芦丁复合物中游离氨基酸的含量分别为 175.36、143.62、141.67 和 138.49 nmol/mg, 显著

表 1 SAKP 和芦丁不同比例复合不同时间的复合度

Tab. 1 Conjugation degree of SAKP and rutin at different ratios for different time

时间/h time	SAKP与芦丁的质量比 the ratio of SAKP to rutin			
	6 : 1	8 : 1	10 : 1	12 : 1
3	16.76±2.82 ^c	14.48±1.05 ^c	10.48±1.44 ^b	4.32±1.05 ^a
6	21.02±1.22 ^c	20.92±1.42 ^c	15.97±1.31 ^b	11.77±1.88 ^a
9	26.21±2.38 ^b	26.14±1.97 ^b	25.18±1.59 ^b	18.64±1.09 ^a
12	27.15±2.87 ^b	26.86±2.06 ^b	25.57±1.71 ^b	19.85±1.36 ^a

注: 不同字母表示不同SAKP/芦丁比例存在差异性显著 ($P < 0.05$); 下同

Notes: Different letters indicate significant differences between different SAKP/rutin ratios ($P < 0.05$); the same below

低于对照组 ($P < 0.05$) (图 3-a)。对照组 SAKP 中巯基的含量为 15.97 nmol/mg, SAKP 与芦丁比例为 12:1、10:1、8:1 和 6:1 制备的 SAKP-芦丁复合物中游离氨基酸的含量分别为 12.67、11.37、11.31 和 11.24 nmol/mg (图 3-b), 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 对照组的疏水性为 498.63, 与芦丁复合后, 蛋白质疏水性显著增高 ($P < 0.05$), SAKP 与芦丁质量比为 12:1、10:1、8:1 和 6:1 制备的 SAKP-芦丁复合物表面疏水性分别增高至 567.23、619.37、624.78 和 631.65 (图 3-c)。

2.2 SAKP-芦丁复合物抗氧化能力分析

DPPH 是存在于有机溶剂中的一种自由基, 其溶解在醇中呈紫色。抗氧化剂的电子或氢原子可以转移至 DPPH 上, 进而生成非自由基形态的 DPPH, 具体的表现是含有 DPPH 混合液的颜色由紫色变为黄色或者消失^[19-20]。本研究通过测定 DPPH 的清除率来评价 SAKP-芦丁复合物的抗氧化能力。结果显示, SAKP 对 DPPH 没有清除能力, 而 SAKP-芦丁复合物可以清除 DPPH, 并且随着浓度的增加, 其清除自由基的能力也逐渐增加, 当 SAKP-芦丁复合物的浓度达到 0.5 mg/mL 时, 其对 DPPH 的清除率可达到 42.5% (图 4-a)。

自由基是机体活动过程中的一些生理生化反应所产生的中间产物, 而 OH 在众多自由基中是最活泼的, 其对机体的危害也是最大的。OH 可通过细胞膜快速与细胞内的生物大分子 (蛋白质、碳水化合物和脂质等) 反应, 引起机体组织损伤或细胞坏死^[16]。因此清除 OH 可以有效保护生物体免受自由基的侵害。本研究通过测定 SAKP-芦丁复合物对 OH 的清除能力进一步评估其抗氧化活性。结果表明, SAKP 对 OH 没有清除能力, 而 SAKP-芦丁复合物可以有效清除 OH, 并且其对 OH 的清除能力随浓度的增加逐渐提高, 当 SAKP-芦丁复合物的浓度达到 0.5 mg/mL 时, 其对 OH 的清除率可达到 61.4% (图 4-b)。以上结果表明, 将芦丁复合到 SAKP 上可以明显提高可溶性南极磷虾蛋白的抗氧化能力。

2.3 SAKP-芦丁复合物对 H₂O₂ 诱导 HepG-2 细胞氧化损伤的保护能力

本研究首先建立了一个 H₂O₂ 对 HepG-2 细胞氧化损伤的模型。随着 H₂O₂ 浓度的增加, 细胞活力逐渐下降。当用 0.5 mmol/L 的 H₂O₂ 处理细胞后, 细胞的活力降至约 50% (图 5)。参考宁方建^[16]的研究, 当细胞的活力降低至 50%~70% 时, 可

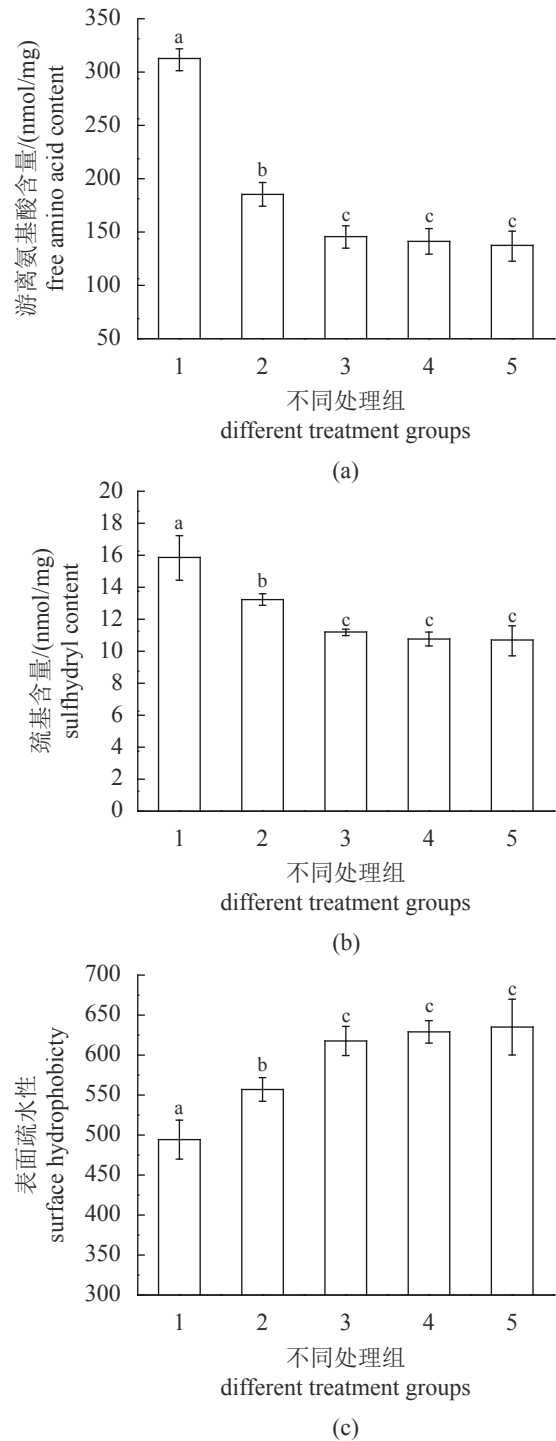


图 3 SAKP 和 SAKP-芦丁复合物中游离氨基酸 (a)、巯基 (b) 的含量和表面疏水性 (c)

1. 对照组, 2. SAKP 与芦丁质量比为 12:1, 3. SAKP 与芦丁质量比为 10:1, 4. SAKP 与芦丁质量比为 8:1, 5. SAKP 与芦丁质量比为 6:1

Fig. 3 Free amino acid content (a), sulfhydryl content (b) and surface hydrophobicity (c) of SAKP and SAKP-rutin complexes

1. control group, 2. the ratio of SAKP to rutin is 12:1, 3. the ratio of SAKP to rutin is 10:1, 4. the ratio of SAKP to rutin is 8:1, 5. the ratio of SAKP to rutin is 6:1

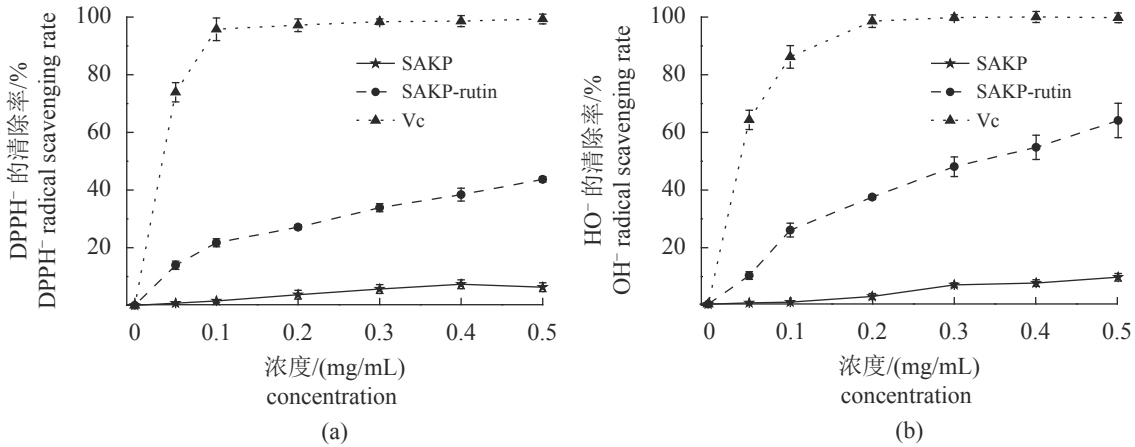


图 4 SAKP-芦丁复合物对 DPPH⁻ (a) 和 OH⁻ (b) 的清除能力

Fig. 4 DPPH⁻ (a) and OH⁻ (b) radical scavenging activities of SAKP-rutin complexes

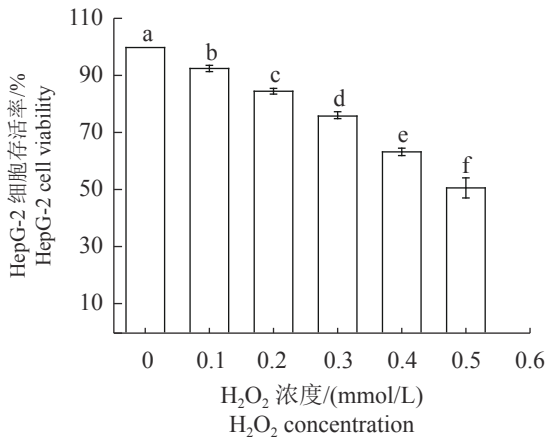


图 5 不同浓度 H₂O₂ 对 HepG-2 细胞存活率的影响

Fig. 5 Cell viability of HepG-2 treated with H₂O₂ at different concentration

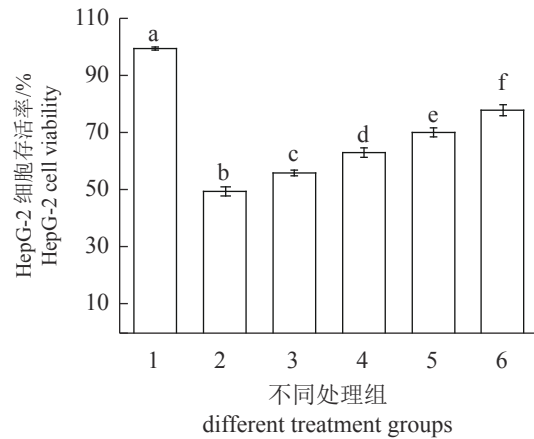


图 6 不同浓度 SAKP-芦丁复合物对 H₂O₂ 氧化损伤 HepG-2 细胞存活率的影响

1. 对照组, 2. 0.5 mmol/L H₂O₂, 3. 0.1 mol SAKP-芦丁+0.5 mmol/L H₂O₂, 4. 0.2 mol SAKP-芦丁+0.5 mmol/L H₂O₂, 5. 0.3 mol SAKP-芦丁+0.5 mmol/L H₂O₂, 6. 0.4 mol SAKP-芦丁+0.5 mmol/L H₂O₂

Fig. 6 Effects of different concentrations of SAKP-rutin complexes on the survival rate of HepG-2 cells induced by H₂O₂ oxidative damage

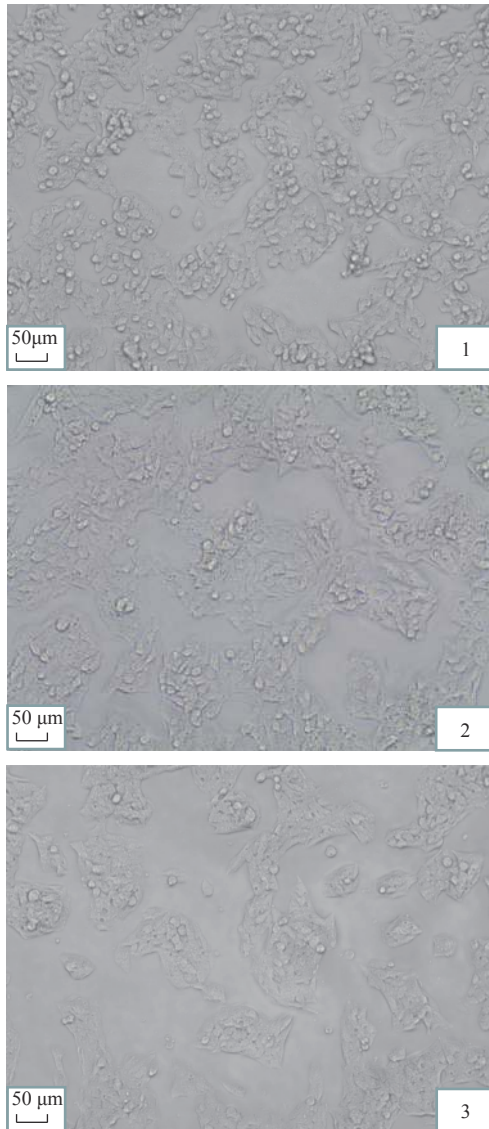
1. control group, 2. 0.5 mmol/L H₂O₂, 3. 0.1 mol SAKP-rutin+0.5 mmol/L H₂O₂, 4. 0.2 mol SAKP-rutin+0.5 mmol/L H₂O₂, 5. 0.3 mol SAKP-rutin+0.5 mmol/L H₂O₂, 6. 0.4 mol SAKP-rutin+0.5 mmol/L H₂O₂

以建立细胞氧化损伤的模型。本研究采用 0.5 mmol/L 的 H₂O₂ 处理 HepG-2 细胞建立 H₂O₂ 诱导 HepG-2 细胞氧化损伤的模型, 进行后续的实验。

本实验同时分析了不同浓度的 SAKP-芦丁复合物对 H₂O₂ 诱导 HepG-2 细胞氧化损伤的保护作用, H₂O₂ (0.5 mmol/L) 处理组 HepG-2 细胞的存活率约为 50%, 而加入 SAKP-芦丁复合物, 再加入 H₂O₂ 后, HepG-2 细胞的存活率显著提高, 并且 SAKP-芦丁复合物的浓度越高, 其对保护细胞免受 H₂O₂ 氧化损伤的效果越明显 (图 6)。通过观察 HepG-2 细胞形态可以发现, H₂O₂ 处理细胞后细胞形态逐渐发生明显的变化, 细胞核固缩、细胞数量减少 (图版 I -3), 而 SAKP-芦丁复合物培养的 HepG-2 细胞经过 H₂O₂ 处理时, 其细胞数量显著高于 H₂O₂ 处理组 (图版 I -2), 与对照组 (图版 I -1) 相比细胞形态无明显变化, 细胞数量稍有减少。

2.4 HepG-2 细胞中 MDA、CAT、SOD 和 GSH 的含量

H₂O₂ 处理细胞后, 细胞中过氧化物 (MDA) 和抗氧化酶 (CAT、SOD 和 GSH-Px) 含量的变化可以反映细胞受氧化损伤程度的抵抗能力。结果显示, 对照组中细胞中 MDA 的含量为 15.97 mmol/mg pro, 经过 H₂O₂ 处理后细胞中 MDA 的含量显著增高至 72.53 mmol/mg pro, SAKP 预培养的细胞中经过 H₂O₂ 处理后 MDA 的生成量与仅



图版 I SAKP-芦丁复合物对 H_2O_2 氧化损伤的 HepG-2 细胞的形态的影响

1. 对照组; 2. SAKP-芦丁复合物培养后经 H_2O_2 处理的 HepG-2 细胞; 3. 经 H_2O_2 处理的 HepG-2 细胞

Plate I Effect of SAKP-rutin complexes on the morphology of HepG-2 cells oxidized by H_2O_2

1. control; 2. H_2O_2 oxidative damage to HepG-2 cells cultured with SAKP-rutin complexes; 3. treated by H_2O_2

H_2O_2 处理后没有差异, 而 SAKP-芦丁复合物预培养的细胞经过 H_2O_2 处理后 MDA 的生成量显著降低至 52.03 mmol/mg pro。对照组细胞中 CAT、SOD 和 GSH-Px 的含量分别为 30.83、124.47 和 40.73 mmol/mg pro。经过 H_2O_2 处理后细胞中 CAT、SOD 和 GSH-Px 的含量分别降低至 10.37、61.60 和 10.81 mmol/mg pro, 而 SAKP-芦丁复合物预培养的细胞经过 H_2O_2 处理后, 细胞中 CAT、SOD 和 GSH-Px 的含量显著高于仅用 H_2O_2 处理组 ($P < 0.05$) (表 2)。

3 讨论

由于多酚含有较多的酚羟基, 其可以与蛋白质通过非共价键和共价键的形式相互结合^[21], 其中非共价键主要包括氢键、范德华力和疏水作用等^[22-23], 通过质谱分析, SAKP 主要是原肌球蛋白, 其含有丰富的非极性、疏水和极性氨基酸^[17]。这些不同的氨基酸可以为相互结合的物质提供良好的氢键供体和受体, 分子对接的结果也表明芦丁与 SAKP 二者之间存在氢键相互作用。除此之外, 多酚和蛋白质之间还可以通过共价键的方式结合。在碱性条件下, 酚羟基去质子化生成醌, 醌与邻近的酚反应生成二聚体或高级聚合物^[21]。由于它们的亲电特性, 所形成的邻醌可以轻松地与蛋白质中的亲核基团(氨基、巯基和 N 端脯氨酸)反应, 从而形成共价键^[24-25]。SAKP 与芦丁复合后, 其游离氨基酸和巯基的含量显著降低。这表明 SAKP 与芦丁的复合消耗了部分游离氨基酸和巯基基团。有研究表明猪骨蛋白^[6]和乳清蛋白^[26]可以与多酚类物质通过共价键复合。因此, 在本研究中 SAKP 与芦丁之间的复合也形成了共价键。此外, SAKP 和芦丁以 6 : 1、8 : 1 和 10 : 1 的比例(质量比)复合后, 游离氨基酸和巯基的含量没有显著差异, 且都显著低于 12 : 1 比例下的 SAKP-芦丁复合物中的含量 ($P < 0.05$), 这也进一步证明 SAKP 与芦丁以 10 : 1 的比例复合可以使蛋白的复合度达到饱和。因此, 本研究选择 10 : 1 (质量比) 的比例进行后续的实验。同时, SAKP-芦丁复合物的表面疏水性显著高于未处理 SAKP 的疏水性(表 1)。这是由于多酚和氨基酸残基之间的共价反应会导致部分蛋白质构象发生变化和疏水性位点的暴露^[6], 薛艾莲等^[27]的研究也表明麦醇溶蛋白与芦丁复合后, 蛋白分子结构发生变化, 暴露出更多的疏水基团, 从而导致其疏水性增高。

多酚一般具有较强的抗氧化活性, 可以防止生物体内的生物分子被氧化, 同时其还具有阻止生物体活性氧生成以及清除体内自由基的能力^[28]。通常, 蛋白质与多酚复合后可以保护多酚类化合物的抗氧化活性, 同时还可以提升蛋白质的抗氧化能力^[29-30]。在本研究中, 抗氧化多酚芦丁与 SAKP 复合后制备的 SAKP-芦丁复合物具有清除 DPPH[·]和 OH[·]的能力, 同时可以保护细胞免受 H_2O_2 的氧化损伤。氧化应激损伤是机体常见的应激损伤, 在活性氧和自由基正常产生的情况下, 机体

表 2 各组 HepG-2 细胞中 MDA 含量以及 CAT、SOD 和 GSH-Px 活性

Tab. 2 MDA content and CAT, SOD and GSH-Px activity in HepG-2 cells of each group

处理 treatment	剂量/ mmol dose	丙二醛/ (mmol/mg pro) MDA	过氧化氢酶/ (mmol/mg pro) CAT	超氧化物歧化酶/ (mmol/mg pro) SOD	谷胱甘肽过氧化物酶/ (mmol/mg pro) GSH-Px
对照组(生理盐水) control group	0.5	15.97±1.68 ^a	30.83±2.58 ^a	124.47±6.64 ^a	40.73±2.80 ^a
过氧化氢 H ₂ O ₂	0.5	72.53±4.48 ^e	10.37±1.50 ^e	61.60±3.73 ^e	10.81±1.32 ^d
磷虾蛋白+过氧化氢 SAKP+H ₂ O ₂	0.5	71.40±6.11 ^e	12.71±1.05 ^e	66.57±6.10 ^e	14.43±0.78 ^e
SAKP-芦丁复合物+H ₂ O ₂ SAKP-rutin+H ₂ O ₂	0.5	52.03±4.88 ^b	22.57±0.91 ^b	92.13±3.11 ^b	30.03±4.14 ^b

本身的防御体系可以清除自由基,起到防御的效果,可以保持机体的稳定状态,但是如果机体受到的损伤程度大于本身的防御效果时,过量的自由基会破坏细胞膜通透性和细胞结构,从而引起细胞内 DNA 的损伤和脂质的氧化,进一步使细胞凋亡^[31-32]。MDA 是细胞脂质氧化的最终产物,机体积累过多 MDA 会损伤细胞膜的结构,进一步引起生命大分子(蛋白质和核酸等)聚合,增加线粒体的负担,对细胞有毒性作用,这也是机体氧化应激的标志^[33]。H₂O₂ 处理后,细胞的 MDA 含量显著增加。在 H₂O₂ 处理组加入 SAKP,其细胞内的 MDA 含量依然很高,与 H₂O₂ 单独处理组没有差异,表明 SAKP 不具备降低细胞中 MDA 的能力。而加入 SAKP-芦丁复合物预培养处理组, H₂O₂ 处理后细胞中的 MDA 生成量显著降低 ($P < 0.05$),表明 MDA 的生成受到抑制。因此,SAKP-芦丁复合物能够降低脂质过氧化物的产生,降低对细胞膜的氧化损伤。CAT 可以清除细胞代谢过程中产生的过氧化氢毒性物质,其还可以保护巯基酶、蛋白质以及过氧化氢解离^[34-35]。SOD 和 GSH-Px 的活性可以反映细胞抵抗氧化应激损伤的能力,其中 SOD 可以清除过量的活性氧,平衡细胞的氧化和还原过程;GSH-Px 是细胞清除自由基的重要酶,SOD 和 GSH-Px 共同组成了细胞抵抗氧化防御系统^[17,36]。细胞在受到 H₂O₂ 诱导损伤后,这 3 种酶的酶活性都显著降低,在 H₂O₂ 处理组加入 SAKP, HepG-2 细胞内的 CAT、SOD 和 GSH-Px 的酶活性依然很低,与 H₂O₂ 单独处理组没有差异。而 SAKP-芦丁复合物预培养的细胞中 3 种酶的酶活性显著高于 H₂O₂ 处理组 ($P < 0.05$)。以上结果表明, H₂O₂ 处理后,细胞受到强烈的氧化损伤导致自身抗氧化体系失衡。然而,经过 SAKP-芦丁复合物预处理的 H₂O₂ 细胞中 CAT、SOD 和 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.05$),MDA 的含量显著降低 ($P < 0.05$)。表明 SAKP-芦丁复合物激活了细胞内部的抗氧化系统,提高了抗氧化酶表达,

<https://www.china-fishery.cn>

提升了细胞的抗氧化酶活性,同时降低了细胞氧化应激产生的脂质过氧化物对细胞的危害,从而保护细胞免受 H₂O₂ 的氧化损伤。这一结果也进一步表明 SAKP-芦丁复合物可以保护细胞免受 H₂O₂ 的氧化诱导损伤。

4 结论

本研究中 SAKP 与芦丁通过氢键和共价键结合,成功制备了一种新型的多酚-蛋白质复合物。与 SAKP 相比,SAKP-芦丁复合物具有更好的抗氧化性和清除自由基等性能。更重要的是 SAKP-芦丁复合物可以抑制机体脂质氧化过程中 MDA 的产生,并能激活细胞内部的抗氧化系统,提高抗氧化酶(CAT、SOD 和 GSH-Px)的表达,从而保护细胞免受过氧化物(H₂O₂)的氧化损伤。这为开发高品质南极磷虾蛋白产品提供了理论依据和实践指导,同时也为高品质海洋蛋白资源的高附加值开发开辟了新的方向。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献(References):

- [1] Nicol S, Endo Y. Krill fisheries: development, management and ecosystem implications[J]. *Aquatic Living Resources*, 1999, 12(2): 105-120.
- [2] 王灵昭. 南极磷虾(*Euphausia superba*)蛋白质深加工新技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Wang L Z. New technologies of deep processing of Antarctic krill (*Euphausia superba*) proteins [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013 (in Chinese).
- [3] Suzuki T, Shibata N. The utilization of Antarctic krill for human food[J]. *Food Reviews International*, 1990, 6(1): 119-147.
- [4] Tou J C, Jaczynski J, Chen Y C. Krill for human consumption: nutritional value and potential health

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- benefits[J]. *Nutrition Reviews*, 2007, 65(2): 63-77.
- [5] 姚梦珂, 张绵松, 赵福江, 等. 南极磷虾蛋白质营养及利用研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(9): 170-175.
- Yao M K, Zhang J S, Zhao F J, *et al.* Progress in protein nutrition and utilization of Antarctic krill (*Euphausia superba*)[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(9): 170-175 (in Chinese).
- [6] Liu H T, Han G, Zhang H, *et al.* Improving the physical and oxidative stability of emulsions based on the interfacial electrostatic effects between porcine bone protein hydrolysates and porcine bone protein hydrolysate-rutin conjugates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 94: 418-427.
- [7] Gullón B, Lú-Chau T A, Moreira M T, *et al.* Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 67: 220-235.
- [8] Scalbert A, Manach C, Morand C, *et al.* Dietary polyphenols and the prevention of diseases[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, 45(4): 287-306.
- [9] Feng J, Cai H, Wang H, *et al.* Improved oxidative stability of fish oil emulsion by grafted ovalbumin-catechin conjugates[J]. *Food Chemistry*, 2018, 241: 60-69.
- [10] Wefers D, Bindereif B, Karbstein H P, *et al.* Whey protein-pectin conjugates: linking the improved emulsifying properties to molecular and physico-chemical characteristics[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 85: 257-266.
- [11] Mazzeo M F, Lippolis R, Sorrentino A, *et al.* *Lactobacillus acidophilus*-rutin interplay investigated by proteomics[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142376.
- [12] Li Y F, Zeng Q H, Liu G, *et al.* Food-grade emulsions stabilized by marine Antarctic krill (*Euphausia superba*) proteins with long-term physico-chemical stability[J]. *LWT*, 2020, 128: 109492.
- [13] Li Y F, Zeng Q H, Liu G, *et al.* Effects of ultrasound-assisted basic electrolyzed water (BEW) extraction on structural and functional properties of Antarctic krill (*Euphausia superba*) proteins[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 71: 105364.
- [14] Rawel H M, Rohn S, Kruse H P, *et al.* Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid[J]. *Food Chemistry*, 2002, 78(4): 443-455.
- [15] Vigo M S, Malec L S, Gomez R G, *et al.* Spectrophotometric assay using *o*-phthalaldehyde for determination of reactive lysine in dairy products[J]. *Food Chemistry*, 1992, 44(5): 363-365.
- [16] 宁方建. 花生蛋白富硒特性及其纳米粒子稳定的皮克林乳液研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- Ning F J. Characteristics of selenium enriched peanut protein and Pickering emulsion stabilized by nanoparticles [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019 (in Chinese).
- [17] Tabassum R, Jeong N Y. Potential for therapeutic use of hydrogen sulfide in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2019, 16(10): 1386-1396.
- [18] Chen J, Guo J, Zhao M, *et al.* Hydrogen bonding in chitosan/Antarctic krill protein composite system: study on construction and enhancement mechanism[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 142: 513-520.
- [19] Wen L R, You L J, Yang X M, *et al.* Identification of phenolics in litchi and evaluation of anticancer cell proliferation activity and intracellular antioxidant activity[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 84: 171-184.
- [20] Ak T, Gülçin İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 174(1): 27-37.
- [21] Chen Y, Li Z S, Yi X Z, *et al.* Influence of carboxymethylcellulose on the interaction between ovalbumin and tannic acid via noncovalent bonds and its effects on emulsifying properties[J]. *LWT*, 2020, 118: 108778.
- [22] Quan T H, Benjakul S, Sae-leaw T, *et al.* Protein-polyphenol conjugates: antioxidant property, functionalities and their applications[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 91: 507-517.
- [23] You J, Luo Y K, Wu J P. Conjugation of ovotransferrin with catechin shows improved antioxidant activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(12): 2581-2587.
- [24] Liu F G, Ma C C, McClements D J, *et al.* Development of polyphenol-protein-polysaccharide ternary complexes as emulsifiers for nutraceutical emulsions: impact on formation, stability, and bioaccessibility of β -carotene emulsions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61: 578-588.
- [25] Kroll J, Rawel H M, Rohn S. Reactions of plant phen-

- olics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds[J]. *Food Science and Technology Research*, 2003, 9(3): 205-218.
- [26] Liu G, Zhong Q X. Dispersible and thermal stable nanofibrils derived from glycated whey protein[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(7): 2146-2153.
- [27] 薛艾莲, 李春翼, 王启明, 等. 超声处理对麦醇溶蛋白/芦丁相互作用及结构特性的影响 [J/OL]. 食品科学, 2021: 1-10.
- Xue A L, Li C Y, Wang Q M, *et al.* Effects of ultrasonic treatment on the interaction of gliadin-rutin complex and their structural properties [J/OL]. *Food Science*, 2021: 1-10. (in Chinese).
- [28] 陈晓玲, 管维良, 施佩影, 等. 谷物醇溶蛋白与植物多酚的互作机理及应用研究进展 [J/OL]. 食品科学, 2021: 1-12.
- Chen X L, Guan W L, Shi P Y, *et al.* Review on the interaction mechanism and application research progress of prolamins and polyphenols [J/OL]. *Food Science*, 2021: 1-12. (in Chinese).
- [29] Chang C, Wang T R, Hu Q B, *et al.* Caseinate-zein-polysaccharide complex nanoparticles as potential oral delivery vehicles for curcumin: effect of polysaccharide type and chemical cross-linking[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 72: 254-262.
- [30] Zhao Z J, Lu M W, Mao Z, *et al.* Modulation of interfacial phenolic antioxidant distribution in Pickering emulsions via interactions between zein nanoparticles and gallic acid[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 152: 223-233.
- [31] Yoon J, Ham H, Sung J, *et al.* Black rice extract protected HepG2 cells from oxidative stress-induced cell death via ERK1/2 and Akt activation[J]. *Nutrition Research and Practice*, 2014, 8(2): 125-131.
- [32] Cai L, Wang L F, Pan J P, *et al.* Neuroprotective effects of methyl 3, 4-dihydroxybenzoate against TBHP-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells[J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 1071.
- [33] Yuan C F, Li Z H, Peng F, *et al.* Combination of selenium-enriched green tea polysaccharides and Huo-ji polysaccharides synergistically enhances antioxidant and immune activity in mice[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(15): 3211-3217.
- [34] 贾芮. 碘乙酸对抗氧化酶的毒性效应与作用机制研究 [D]. 烟台: 烟台大学, 2020.
- Jia R. Studies on the toxicity and mechanism of iodoacetic acid to antioxidant enzymes [D]. Yantai: Yantai University, 2020 (in Chinese).
- [35] Chen X Y, Cheng C, Zuo X Z, *et al.* Astragalosin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by improving anti-oxidant and anti-inflammatory activities and inhibiting apoptosis pathway in rats[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2020, 20(1): 120.
- [36] 王路平, 田荣, 邵珠德, 等. 紫薯黄酮对酒精诱导人正常肝细胞氧化损伤保护作用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 48-50.
- Wang L P, Tian R, Shao Z D, *et al.* Protective effective of purple sweet potato flavones on ethanol-induced damaged HL7702[J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 20(8): 48-50 (in Chinese).

Preparation and antioxidant properties of soluble Antarctic krill protein-rutin complexes

LI Yufeng^{1,2}, WANG Jingjing^{3*}, TAN Lijun², PENG Zhiyun²,
ZHAO Cheng², LIU Haiquan², ZHAO Yong^{2*}

(1. College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China;

2. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Department of Food Science, Foshan University, Foshan 528000, China)

Abstract: In order to improve the antioxidant activity of Antarctic krill protein, a new polyphenol-protein complex (SAKP-rutin complex) was successfully prepared by grafting rutin onto soluble Antarctic krill proteins (SAKP). The antioxidant capacity of SAKP-rutin complexes was evaluated by measuring its ability to scavenge DPPH[·] and hydroxyl radicals. Meanwhile, the protective ability of SAKP-rutin complexes against oxidative damage of HepG-2 cells was determined by using an H₂O₂ induced oxidative damage model. The results showed that the combination of rutin greatly enhanced the ability of SAKP to scavenge free radicals. Compared with natural SAKP, the SAKP-rutin complexes significantly increased the activity of cellular antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px), decreased the production of lipid peroxidation products (MDA) in cells caused by oxidative stress, and finally reduced the damage of oxidative stress to cells. These findings suggest that SAKP-rutin complex is a novel protein resource which will hopefully be applied to developing functional protein food.

Key words: soluble Antarctic krill proteins (SAKP); rutin; complex; antioxidant; HepG-2 cell

Corresponding authors: WANG Jingjing. E-mail: w_j2010@126.com;

ZHAO Yong. E-mail: yzhao@shou.edu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program (2018YFC1602205); Scientific Research Foundation of Anhui Polytechnic University (2021YQQ046)