

酪蛋白水解物分别与维生素 A、维生素 C 和维生素 E 协同保护乙醇氧化损伤的肝细胞

庞佳楠¹, 陈芳芳¹, 马春敏¹, 戚莉佳¹, 李铁晶²

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (2. 辽宁大学轻工学院, 辽宁沈阳 110036)

摘要:酪蛋白水解物可以治疗和修复乙醇氧化损伤的肝细胞。本文的研究目的在于评价维生素 A、维生素 C 和维生素 E 分别与酪蛋白水解物 (Casein Hydrolysate, CH) 协同保护乙醇氧化损伤的肝细胞。已有研究表明, 酪蛋白水解物对肝细胞 HHL-5 没有明显的毒性, 甚至有着良好的促进增殖的结果。结果表明, 300 mmol/L 的乙醇对细胞有着明显的损伤作用; 酪蛋白水解物显著提高了乙醇损伤肝细胞 HHL-5 的细胞存活率。分别在维生素 A (0.0344 mg/mL)、维生素 C (0.0881 mg/mL) 和维生素 E (0.1077 mg/mL) 的浓度下与酪蛋白水解物协同作用显著提高了乙醇损伤细胞的细胞存活率。通过 CCK-8 法和培养基内 LDH 含量的测定, 选取最佳 CH 的协同浓度。通过胞内丙二醛含量的测定和胞内 ROS 含量的测定进行再次验证。2 mg/mL 的酪蛋白水解物单独作用乙醇氧化损伤的细胞有着一定的修复作用, 且该浓度下分别与维生素 A、维生素 C 和维生素 E 协同保护作用显著增强 ($p < 0.05$)。

关键词:酪蛋白水解物; 乙醇; 氧化损伤; 协同保护

文章编号: 1673-9078(2017)6-32-37

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.006

Synergistic Protective Effects of Casein Hydrolysate and Vitamins A, C, or E against Ethanol-induced Damage in Hepatocyte HHL-5 Cells

PANG Jia-nan¹, CHEN Fang-fang¹, MA Chun-min¹, QI Li-jia¹, LI Tie-jing²

(1. Key Laboratory of Dairy Science of Food Science College, Northeast Agricultural University, Heilongjiang University, Harbin 150030, China) (2. College of Light Industry, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: Casein hydrolysate (CH) can be used to treat and repair hepatocytes damaged by ethanol-induced oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the synergistic effects of vitamin A, vitamin C, or vitamin E with CH to protect the liver cells from oxidative damage *in vitro*. Previous studies have shown that CH has no obvious toxicity to liver cells (HHL-5), and can even promote proliferation. The results showed that 300 mmol/L ethanol induced obviously oxidative damage to HHL-5 cells, and CH significantly enhanced the viability of these cells. Combining vitamin A (0.0344 mg/mL), vitamin C (0.0881 mg/mL), or vitamin E (0.1077 mg/mL) with CH significantly enhanced the viability of liver cells damaged by ethanol-induced oxidation. The concentration of CH for the optimum synergistic effect was selected using a cell counting kit-8 (CCK-8) assay and determination of lactate dehydrogenase (LDH) content in the culture medium. This concentration was verified through the determination of intracellular content of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS). CH at 2 mg/mL alone exhibited a certain restorative effect on cells damaged by ethanol-induced oxidation, and the synergistic protective effects of combining CH at this concentration with vitamin A, vitamin C, or vitamin E were significantly higher ($p < 0.05$).

Key words: casein hydrolysate; ethanol; oxidative stress; synergistic protection

在以前, 食源性毒素和感染引起的急性肝衰竭对人类有着巨大威胁, 现代肝脏疾病导致了大部分的慢性病如慢性病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD), 和酒精性肝病 (ALD)。酒精性肝病是酒

收稿日期: 2016-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201337)

作者简介: 庞佳楠 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 李铁晶 (1973-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事食品化学研究

精性肝炎 (AH) 中一种死亡率较高的可预防性疾病^[1]。急性和慢性酒精疾病产生的活性氧 (ROS), 降低了机体的抗氧化水平, 增加了在肝脏内氧化应激反应的问题^[2]。肝脏是酒精的主要代谢器官, 而乙醇对于肝脏有主要损伤作用。在人体的代谢反应中, 少量的高活性的活性氧是自然产生的。然而酒精暴露后, 大量的 ROS 产生甚至损害细胞内复杂分子如脂质、蛋白质和核苷酸^[3]。酒精引起的氧化应激反应在酒精引起肝损伤的机制中具有重要作用。许多信号分子参与酒精诱

导的氧化应激反应,如细胞色素 P4502E1(CYP2E1)^[4]。除了氧化应激反应,酒精对肝细胞的影响还包括线粒体功能障碍,甲基化能力降低,内质网应激,囊泡转运受损,并改变了蛋白酶体功能^[5]。大量研究^[6,7]表明酒精性肝病的发病机制在于,乙醇代谢产生活性氧、活性氮(RNS),导致机体内抗氧化系统地破坏,导致氧化应激反应。酒精性肝病的发病机制复杂,所以通常通过戒酒、营养补充和药物治疗这几个方面来达到预防,治疗和防治其他肝病,促进肝的再生,减少并发症和终期肝病的肝移植的可能。有研究表明^[8-10]动物来源的抗氧化肽、维生素 A 和维生素 E 等物质有着强抗氧化性,并且存在很强的护肝的作用。寻求天然来源、无毒或低毒的活性成分以预防和治疗酒精性肝病一直是研究热点。

抗氧化肽有着清除自由基,延缓衰老、抑制机体内的脂质氧化的作用,但是在其自由基含量较多的情况下,人体的细胞会受到损伤,甚至凋亡^[13]。选取酪蛋白为原料,因为已有的研究表明^[11,12]酪蛋白来源的抗氧化肽有着较好的清除自由基和抗氧化的效果。本文中建立了乙醇诱导肝细胞 HHL-5 损伤模型,采用不同剂量 CH 分别与维生素 A、维生素 C 和维生素 E 对乙醇损伤的 HHL-5 细胞的抗氧化性研究,旨在探究 CH 分别与维生素 A、维生素 C 和维生素 E 对乙醇损伤 HHL-5 细胞的协同保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酪蛋白,北京澳博康试剂有限公司;木瓜蛋白酶,国药集团化学试剂有限责任公司;维生素 A、维生素 C、维生素 E, Biosharp 公司;HHL-5 肝细胞,哈尔滨工业大学实验室;DMEM/F12 培养基, Hyclone 有限公司;胎牛血清, Hyclone 有限公司;胰蛋白酶-EDTA, Amresco 公司;DMSO, Biotopped 公司;乙醇,天津市天力化学试剂有限公司;CCK-8,东仁化学科技(上海)有限公司;LDH 试剂盒、MDA 试剂盒,碧云天生物技术研究所;微量蛋白测定(BCA 法)试剂盒,南京建成生物技术研究所;活性氧检测试剂盒,碧云天生物技术研究所;所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

HVD-1320 超净工作台,北京东联哈尔仪器公司/中国;LG-21M 高速冷冻离心机,上海市离心机械研究所/中国;HF-90 CO₂ 培养箱,力康公司/美国;UV-2401PC 酶标仪, Bio Rad Laboratories/美国;

JEM-1200EX 电子显微镜,日本日立公司;F-4500 荧光分光光度计,日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 酪蛋白水解物抗氧化肽的制备

配制 5% (m/V) 的酪蛋白溶液,调节 pH,加入 1500 U/g 木瓜蛋白酶置于 45 °C 恒温水浴中酶解 4 h,并于取出酶解样品,沸水浴 10 min 灭酶,冷却,5000 r/min 离心 20 min。

1.3.2 HHL-5 肝细胞的培养

肝细胞 HHL-5 于培养液 DMEM/F-12 中培养,其中含 10%胎牛血清、添加青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/L,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱进行培养。每 2 d 换液一次。做实验时提取细胞为对数生长期。

1.3.3 建立乙醇氧化损伤肝细胞模型

取对数生长期的肝细胞的细胞悬液,以细胞密度为 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ L,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,待细胞完全贴壁后,进行分组实验,复种 6 孔。乙醇作用浓度分别为 100 mmol/L、200 mmol/L、300 mmol/L 和 400 mmol/L,加入量为 100 μ L,培养箱内培养 24 h、48 h 和 72 h。然后,进行乙醇对细胞活性的抑制率测定。在向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液,在培养箱内孵育 4 h,振荡 60 s,在酶联免疫检测仪上 450 nm 处测定吸光度 A 值,计算抑制率。公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{[AC-AS]}{[AC-AB]} \times 100\%$$

其中,AS: 实验孔(含有细胞的培养基、CCK-8、乙醇);AC: 对照孔(含有细胞培养基、CCK-8、无乙醇);AB: 空白孔(不含细胞和乙醇的培养基、CCK-8)。

该步骤重复 3 次,得到最佳的乙醇损伤细胞的作用浓度。

1.3.4 CH 分别与 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 协同保护试验

取对数生长期的 HHL-5 肝细胞,细胞密度为 1×10^4 个/mL,接种于 96 孔板内,每孔 100 μ L,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内孵育 24 h 待贴壁。设正常组(Control)、乙醇模型组(Model)和协同修复组。孵育 24 h 后协同修复组分别加入不同浓度的 CH 和一定浓度 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 75 μ L。CH 的作用浓度为 0.5 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL 和 2 mg/mL,维生素 A 的浓度为 0.0344 mg/mL、维生素 C 的浓度为 0.0881 mg/mL、维生素 E 的浓度为 0.1077 mg/mL,作用 24 h 和 48 h。乙醇组和协同修复组分别加入终浓度 300 mmol/L 无水乙醇,轻微混匀后,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养 48 h。按照 1.3.2 节测定细胞存活率。

1.3.5 培养基内 LDH 含量的测定

取对数生长期的 HHL-5 肝细胞，细胞密度为 1×10^4 个/mL，接种于 96 孔板内，每孔 100 μ L，在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱内孵育 24 h 待贴壁。按照 1.3.4 节的实验操作进行。在测定的前一个小时向培养液中加入 10% 的 LDH 释放液，继续培养。然后取上清液 120 μ L 加入新的 96 孔板内，每孔加入 60 μ L 的 LDH 检测液，室温避光孵育 30 min，在 490 nm 处测定吸光值。

1.3.6 细胞内 MDA 含量测定

将肝细胞 HHL-5 接种于 6 孔板中，接种密度为 1×10^5 个每孔，前述条件培养 24 h，加入含酪蛋白水解物、维生素 A、维生素 C 和维生素 E 的细胞培养液。CH 的作用浓度为 0.5 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL 和 2 mg/mL，维生素 A (0.0344 mg/mL)、维生素 C (0.0881 mg/mL) 和维生素 E (0.1077 mg/mL)，作用 48 h。收集细胞，加入 MDA 检测液，在 532 nm 处测定吸光值。

1.3.7 细胞内活性氧含量检测

将肝细胞 HHL-5 接种于 6 孔板中，接种密度为 1×10^5 个每孔，前述条件培养 24 h，加入含酪蛋白水解物、维生素 A、维生素 C 和维生素 E 的细胞培养液。CH 的作用浓度为 0.5 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL 和 2 mg/mL，维生素 A (0.0344 mg/mL)、维生素 C (0.0881 mg/mL) 和维生素 E (0.1077 mg/mL)，作用 48 h。收集细胞，用冰浴预冷的 PBS 重悬细胞，离心除去 PBS，再向细胞沉淀中加入 DCFH-DA 液稀释(浓度为 10 μ mol/L)。37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min，在孵育过程中应保持细胞处于悬浮状态。无血清细胞培养液轻轻洗涤细胞三次后，用荧光分光光度计在 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长的条件下检测。

1.4 统计分析

试验数据均用均值 \pm 标准偏差表示，使用 SPSS 19.0 软件包进行单因素方差分析 (ANOVA)，组间多重比较采用 Duncan's 极差检验，显著性水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 乙醇损伤肝细胞 HHL-5 模型的建立

肝脏是乙醇代谢的主要器官，由于乙醇诱导氧化损伤，造成肝细胞内线粒体的损伤，进而影响细胞的状态，甚至导致细胞的死亡。对于不同浓度的乙醇溶液作用于人正常肝细胞 HHL-5 不同时间后的 CCK-8 的检测结果。如图 1 所示，乙醇诱导细胞的损伤效果

和乙醇的浓度及时间成依赖关系。乙醇浓度越大，时间越长，损伤效果越明显。实验结果表明，当乙醇浓度为 300 mM 的作用 48 h 和乙醇浓度 400 mM 作用 72 h，细胞存活率均达到 80%，到达本实验建立模型的标准。综合其他的实验因素，采取乙醇浓度 300 mM 作用 48 h 为细胞损伤条件。

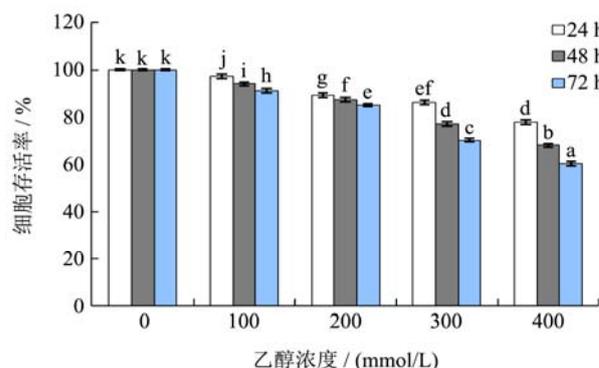
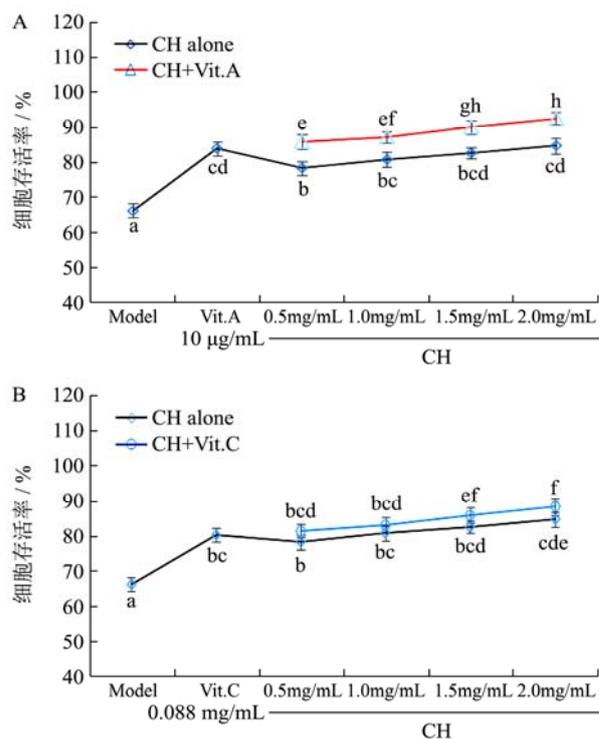


图 1 不同浓度的 EtOH 及孵育时间对 HHL-5 的细胞存活率的影响
Fig.1 Effect of different concentrations of EtOH and incubation times on HHL-5 cell viability

2.2 CH 分别与 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 协同保护的的影响

本实验探究抗氧化剂和维生素 A、维生素 C 和维生素 E 的共同作用。三种维生素分别和酪蛋白水解物 CH 共同作用于乙醇诱导损伤的 HHL-5 肝细胞 24 h 和 48 h。用 CCK-8 法进行测定细胞存活率来评价协同作用。



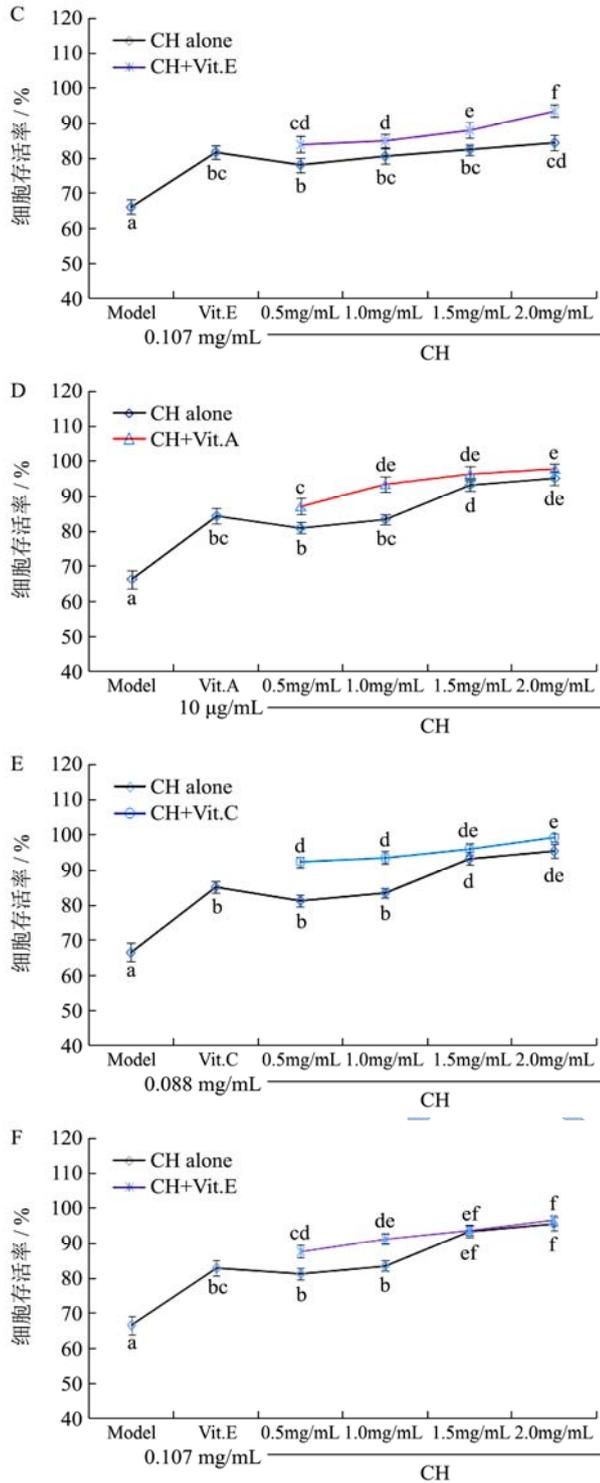


图2 不同浓度的CH 分别与 Vit. A、Vit. C 和 Vit. E 共同处理对 HHL-5 的细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of treatment with CH at different concentrations and Vit. A, Vit. C, or Vit. E on HHL-5 cell viability

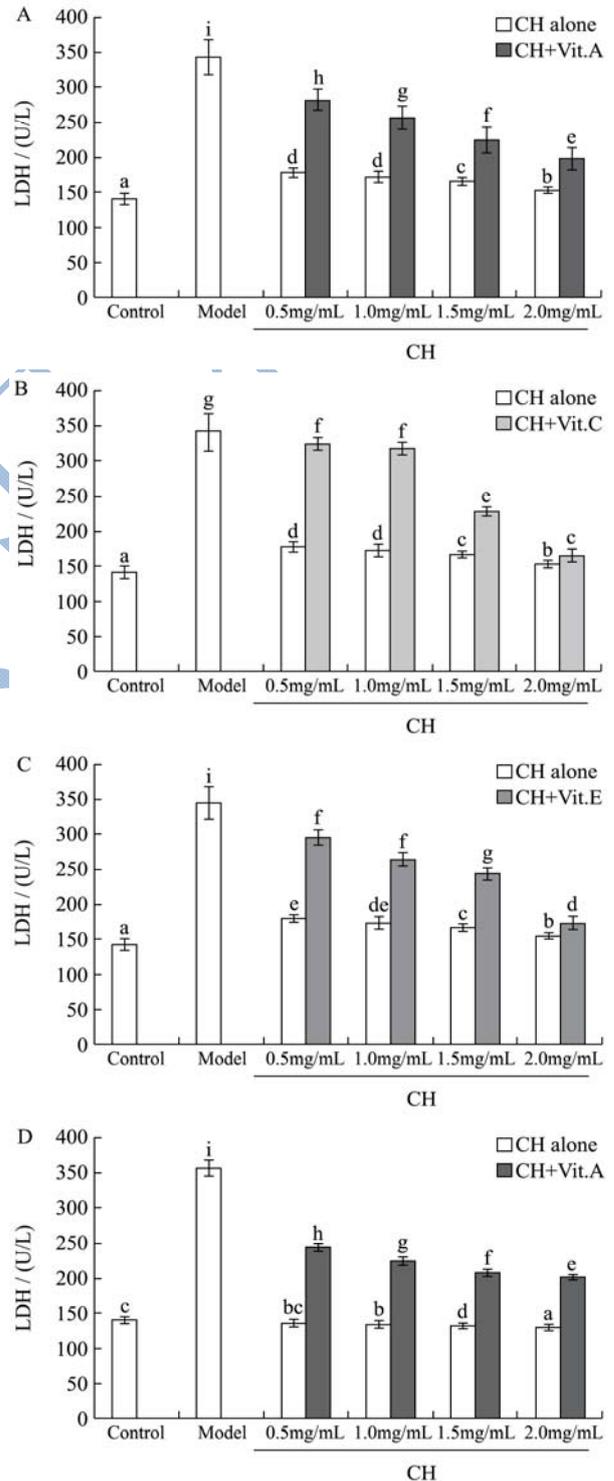
CCK-8 法测定结果如图 2 所示, 其中 A 和 D 代表维生素 A 协同组作用 24 h 和 48 h; B 和 E 代表维生素 C 协同组作用 24 h 和 48 h; C 和 F 代表维生素 E 协同组作用 24 h 和 48 h。

从图 A~F 中可以得出, 无论在 24 h 和 48 h 的保

护作用下, 维生素 A、维生素 C 和维生素 E 不仅单独对损伤的细胞有修复作用还和抗氧化肽 CH 共同作用时保护作用增强, 随着抗氧化肽 CH 的剂量的升高, 保护作用提高。其中, 维生素 C 在 24h 和维生素 E 在 48 h, 保护效果不明显。

2.3 CH 分别与 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 对培养基

内 LDH 含量的影响



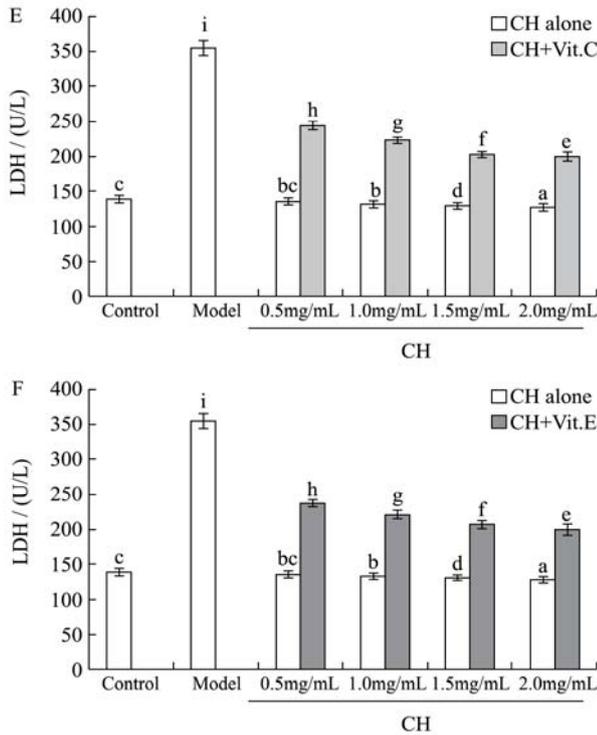


图3 CH 分别与 Vit. A、Vit. C 和 Vit. E 共同处理对培养基内 LDH 含量的影响

Fig.3 Effects of treatment with CH + Vit. A, CH + Vit. C, and CH + Vit. E on LDH content in culture medium

细胞由于受到乙醇的氧化损伤作用，导致细胞膜的完整性破坏，因此，乳酸脱氢酶会释放至培养液中，其渗出率可以间接反应细胞的损伤程度。LDH 法测定结果如图 3 所示，其中 A 和 D 代表维生素 A 协同组作用 24 h 和 48 h；B 和 E 代表维生素 C 协同组作用 24 h 和 48 h；C 和 F 代表维生素 E 协同组作用 24 h 和 48 h。当 300 mmol/L ETOH 与肝细胞 HHL-5 作用 48 h 后，细胞培养液中的 LDH 含量达到 354.65.24±11.21 U/L，说明此时肝细胞 HHL-5 已经受到严重氧化损伤。在 CH 预孵育 24 h 和 48 h 后，与模型组相比胞外的 LDH 渗出率显著降低。而给药协同组可以使 LDH 的渗出率最低降低至 199.21±7.05 U/L ($p<0.05$)。但是，在结果中我们可以看出 CH 单独作用的保护作用高于协同作用。其原因是由于 LDH 释放法测定的培养液中乳酸脱氢酶的含量，而 CCK-8 法测定的是细胞线粒体内的脱氢酶进行颜色反应，由于测定部位不同，就存在结果差异。

2.4 CH 分别与 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 对胞内 MDA 含量的影响

丙二醛 (MDA) 是胞内脂质过氧化的重要指标，丙二醛的含量过高会破坏细胞内蛋白质等合成生物大

分子，进而造成机体内多种疾病的生成。正常肝细胞 HHL-5 中的 MDA 含量仅为 8.71±0.84 nmol/mg 蛋白质。而当乙醇作用 48 h 后，胞内 MDA 含量高达 30.13±0.66 nmol/mg 蛋白质 ($p<0.05$)。在 CH 与 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 预先作用 24 h 和 48 h 时可有效抑制胞内的 MDA 生成量使其生成量控制在 17.53±0.67 nmol/mg 和 22.83±0.36 nmol/mg 之间，而在给药 CH 相同剂量情况下，Vit.A 协同组对胞内 MDA 生成的抑制作用高于 Vit.C 和 Vit.E 组 ($p<0.05$)。

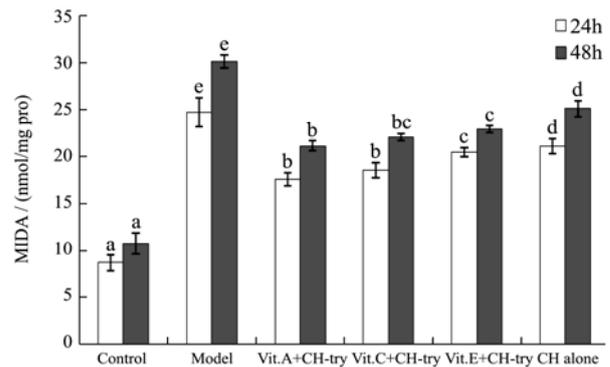


图4 CH 单独、分别与 Vit. A、Vit. C 和 Vit. E 共同处理对 HHL-5 细胞内 MDA 含量的影响

Fig.4 Effects of treatment with CH alone, CH + Vit. A, CH + Vit. C, and CH + Vit. E on intracellular MDA levels in HHL-5 cells

2.5 CH 分别与 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 对胞内 ROS 含量的影响

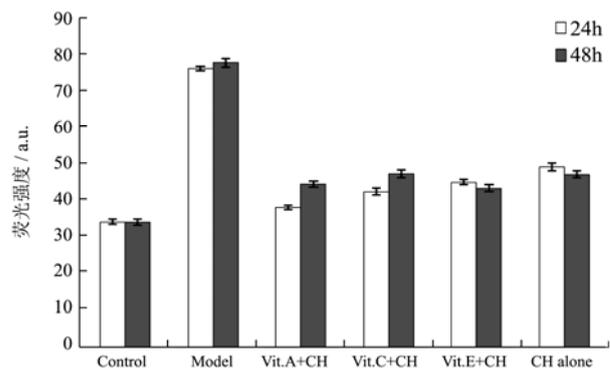


图5 CH 单独、分别与 Vit. A、Vit. C 和 Vit. E 共同处理对 HHL-5 细胞内 ROS 水平的影响

Fig.5 Effects of treatment with CH alone, CH + Vit. A, CH + Vit. C, and CH + Vit. E on intracellular ROS levels in HHL-5 cells

CH 分别与 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 共同处理肝细胞 HHL-5 24 h 和 48 h，并采用荧光探针 DCFH-DA 测定细胞内总 ROS，结果如图 5 所示。模型组 (ETOH) 细胞的荧光强度为 76.76 和 78.33，协同处理组 24 h 的细胞荧光强度为 Vit.E+CH>Vit.C+CH>Vit.A+CH，协同组处理 48 h 的细胞荧光强度为 CHVit.C+CH>

Vit.E+CH>Vit.A+CH。CH 分别与 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 共同处理细胞后,细胞内总 ROS 水平显著降低。这表明,CH 分别与 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 共同均能降低乙醇诱导肝细胞 HHL-5 产生的 ROS,并且 Vit.A 协同组的保护作用明显好于 Vit.C 和 Vit.E 组。

3 结论

3.1 乙醇是引起急、慢性肝损伤和肝硬化的主要原因之一,乙醇的氧化代谢 90% 都在肝脏内进行,影响机体抗氧化系统的平衡,进而影响肝细胞的 DNA 的损伤,其机制与肝细胞膜脂质过氧化增加密切相关。本实验中,随着乙醇作用浓度的增加和时间的延长,MDA 水平升高,LDH 含量升高。表明肝细胞活力逐渐降低,脂质过氧化严重,细胞内抗氧化酶水平不断下降,在 300 mmol/L,乙醇损伤 48 h 时,影响程度最为明显。本实验结果证明乙醇摄入导致肝细胞抗氧化系统和代偿作用减弱,导致氧化损伤。这也可能是有乙醇在肝脏内代谢产生大量的自由基,攻击细胞膜脂质、蛋白质和核酸,使肝细胞处于促氧化物质明显增多和抗氧化物质明显减少的氧化应激状态,最终损害细胞结构与功能。

3.2 本实验中,不同浓度的 CH 分别与 Vit.A、Vit.C 和 Vit.E 共同处理,能有效提高肝细胞 HHL-5 的存活率,降低 MDA 的生成和 LDH 的含量,同时能有效地降低乙醇诱导的肝细胞 HHL-5 凋亡,使其凋亡率恢复到正常水平,且 Vit.A 协同组高于其他两个协同组。说明肝细胞抗氧化能力增强和细胞内脂质过氧化作用减弱。

3.3 由以上可知,摄入酪蛋白水解物抗氧化肽时,在人体内正常补充维生素类的元素时,可以有效的提高酪蛋白水解物的抗氧化活性;可以明显降低了乙醇损伤 HHL-5 细胞内的活性氧和防止自由基过量积累,降低类氧化应激,预防的细胞凋亡,提高机体的抗氧化水平,发挥护肝保肝的效果,这与 CH 协同体外的抗氧化性有关,关于抗氧化的机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Tom Luedde, Neil Kaplowitz, Robert F Schwabe. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(4): 765-783
- [2] Singal A K, Kamath P S, Gores G J, et al. Alcoholic hepatitis: current challenges and future directions [J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2014, 12(4): 555-564
- [3] Conde de la Rosa L, Moshage H, Nieto N. Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease [J]. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 2008, 100(3): 156-163
- [4] Gut I, Nedelcheva V, Soucek P, et al. Cytochromes P450 in benzene metabolism and involvement of their metabolites and reactive oxygen species in toxicity [J]. *Environ. Health Perspect*, 1996, 104(6): 1211-1218
- [5] Longato L, Ripp K, Setshedi M, et al. Insulin resistance, ceramide accumulation, and endoplasmic reticulum stress in human chronic alcohol-related liver disease [J]. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2012, 60(10): 1-15
- [6] K Wang. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis [J]. *Cell Death and Disease*, 2014, 5(5): 986-996
- [7] Jayashree Bagchi Chakraborty, Fiona Oakley, Meagan J Walsh. Mechanisms and biomarkers of apoptosis in liver disease and fibrosis [J]. *International Journal of Hepatology*, 2012, 2012(10): 1-10
- [8] Abraham T Girgih, Chibuikwe C Udenigwe, Fida M Hasan, et al. Antioxidant properties of salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC [J]. *Food Research International*, 2013, 52(8): 315-322
- [9] Matheus Augusto de Bittencourt Pasquali, Daniel Pens Gelain, Fares Zeidán-Chuliá et al. Vitamin A (retinol) downregulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) by oxidant-dependent activation of p38 MAPK and NF-κB in human lung cancer A549 cells [J]. *Cellular Signalling*, 2013, 25(4): 939-954
- [10] Jing-yun Wang, Ping-ping Sun, Yong-ming Bao, et al. Vitamin E renders protection to PC12 cells against oxidative damage and apoptosis induced by single-walled carbon nanotubes [J]. *Toxicology in Vitro*, 2012, 26(1): 32-41
- [11] Power O, Jakeman P, FitzGerald R J. Antioxidative peptides: enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides [J]. *Amino Acids*, 2012, 44(3): 797-820
- [12] Martha Phelan S, Aisling Aherne-Bruce, Dara O'Sullivan, et al. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells [J]. *International Dairy Journal*, 2009, 19(5): 279-285
- [13] María José García-Nebot, Isidra Recio, Blanca Hernández-Ledesma. Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 65(3): 155-161