

# 基于 PC12 细胞模型分析大豆蛋白水解物对神经元氧化损伤的保护作用

刘静波, 刘文超, 徐梦蕾, 刘吉云, 李良煜

(吉林大学营养与功能食品研究室, 吉林长春 130062)

**摘要:** 本文基于 PC12 细胞模型研究大豆蛋白水解物 (Soybean protein isolate hydrolysates, SPIHs) 对神经元氧化损伤的保护作用。以大豆蛋白为原料, 经过酶解和膜分离得到四种分子量不同的水解物, 我们首先检测了 SPIHs 的抗氧化能力; 然后用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 PC12 细胞, 建立神经元氧化损伤模型, 并以适当浓度的 SPIHs 处理细胞, 通过检测各种生物学指标评价对细胞氧化损伤的保护作用。结果显示, 低分子量的 SPIHs 表现出最强的抗氧化活性; 能够提高损伤细胞的存活率和抗氧化酶活力, 减少乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放量和丙二醛 (MDA) 的生成, 抑制细胞活性氧 (ROS) 的累积 ( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$ ), 且变化呈现一定的剂量依赖关系。研究认为, 低分子量的 SPIHs 对神经元氧化损伤具有保护作用, 可以作为功能性成分用于保护神经元氧化损伤相关的功能食品和保健品的开发。

**关键词:** 大豆蛋白水解物; PC12 细胞; 氧化应激; 细胞毒性

文章编号: 1673-9078(2015)4-8-12

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.002

## Neuroprotective Effects of Soybean Protein Isolate Hydrolysates against Neuronal Oxidative Damage in PC12 Neuronal Cells

LIU Jing-bo, LIU Wen-chao, XU Meng-lei, LIU Ji-yun, LI Liang-yu

(Laboratory of Nutrition and Functional Food, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** The neuro-protective effects of soybean protein isolate hydrolysates (SPIHs) against neuronal oxidative damage were investigated in a PC12 cell model in this study. Four hydrolysates with different molecular weights were obtained from soybeans (raw material) through enzymatic hydrolysis and membrane separation. The antioxidant properties of the SPIHs were also investigated. Subsequently, a neuronal oxidative damage model was constructed by stimulating PC12 cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. SPIHs at appropriate concentrations were used to treat the damaged cells; the effect of SPIHs on cellular oxidative damage was evaluated using various biological indices. The results of these analyses indicated that low molecular weight SPIHs exhibited the most potent antioxidant activities, and caused a dose-dependent improvement in the neuronal cell viability, reduction in lactate dehydrogenase (LDH) release and malondialdehyde (MDA) formation, and suppression of intracellular accumulation of reactive oxygen species (ROS) ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ). Based on the results of this study, low molecular weight SPIHs were believed to protect neuronal cells against neuronal oxidative damage, and could be utilized as a functional component in functional food and health products to protect against neuronal oxidative damage.

**Key words:** soybean protein isolate hydrolysates (SPIHs); PC12 cells; oxidative stress; cytotoxicity

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 和帕金森 (Parkinson's disease, PD) 等是严重危害人类健康的一类神经退行性疾病<sup>[1]</sup>, 给家庭、社会和医疗界带来了沉重的负担。大脑是人类重要的生命器官, 脑部具有高的代谢率和高浓度的不饱和脂肪酸, 而且大量的铁离子和弱的抗氧化酶系统使得脑组织更容易受到活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的损伤<sup>[2]</sup>。机体内

收稿日期: 2014-08-18

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD33B03); 吉林大学研究生创新基金资助项目 (2014116)

作者简介: 刘静波 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 营养与功能食品

氧化与抗氧化之间的平衡对细胞的生存和功能起着至关重要的作用, 当两者失衡会造成细胞内 ROS 大量堆积<sup>[3]</sup>。过量的 ROS 会造成脂质过氧化反应, 进而损伤细胞膜, 诱导细胞内的相关信号通道改变, 破坏 DNA 和细胞组件等<sup>[4]</sup>。从而导致神经元的损伤和凋亡, 引起相关的神经退行性疾病。目前, 大量的研究证明内源性和外源性的抗氧化物质都可以保护神经组织免受氧化应激损伤<sup>[5]</sup>, 于是, 开发和探索天然的神经元保护剂引起了大家的广泛关注。

大豆是中国重要的传统食物, 同时大豆蛋白是一种重要的潜在的生物活性肽资源库, 酶解蛋白可以释

放出多种具有特殊活性的肽段。天然蛋白源的酶解产物,因其具有低分子量、高活性、易吸收和低副作用等特点,受到越来越多人的研究和开发<sup>[6]</sup>。大豆蛋白酶解物(Soybean protein isolate hydrolysates, SPIHs)已经被研究证明其具有降血压、抗血栓、抗淀粉样蛋白和抗氧化等多种生物活性<sup>[7]</sup>,正因其具有较高的抗氧化和抗淀粉样蛋白的特点,预示其可能具有较强的神经元保护作用,但还没有被具体研究。

本研究以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导PC12细胞建立神经元氧化损伤模型,通过检测各种生物学指标评价SPIHs的神经元保护作用并初步分析其作用机制,为深入研究其在神经退行性疾病中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白,哈高科大豆食品有限责任公司; 2.4L Alcalase 蛋白酶,丹麦Novozymes公司;大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤(PC12细胞),购自中国科学院细胞库;乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和BCA试剂盒,购自中国海门碧云天公司;DMEM培养基、胎牛血清,购自美国Gibco公司;EDTA, Fluorescein, AAPH, Trolox 和 DCFH-DA, 购自美国Sigma公司;MTS, 购自美国Promega公司;其他化学试剂均购自中国北京化工厂。

### 1.2 主要仪器与设备

CR20B2型高速冷冻离心机,日本日立公司;ZD-2型电位滴定仪,上海精密科学仪器公司;AG-204型电子天平,瑞士Mettler Toledo公司;多功能酶标仪,美国Bio-Tek公司;超净工作台,上海精密实验仪器设备有限公司;CO<sub>2</sub>细胞培养箱,上海力申科学仪器有限公司;-80℃超低温冰箱,青岛Haier医用低温科技有限公司;倒置生物显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 SPIHs的制备

大豆分离蛋白配制为质量分数10%的溶液,90℃预处理10min;在60℃、pH 8.0、加酶量5.18×10<sup>-2</sup> AU/g的条件下,用Alcalase碱性蛋白酶酶解4h,水解过程中持续加入0.5 mol/L NaOH,控制pH 8.0;酶解液90℃水浴处理10min灭酶,1 mol/L HCl调pH至4.4,10000 r/min离心15 min除去沉淀;将上清液

进行透析脱盐,透析袋截留分子量100 u。将上述得到的大豆蛋白酶解液在恒流蠕动泵的压力作用下进入膜分离系统,依次经过30 ku、10 ku和3 ku三块超滤膜,得到四种分子量不同的大豆蛋白水解组分SPIHs1(>30 ku)、SPIHs2(10 ku~30 ku)、SPIHs3(3 ku~10 ku)和SPIHs4(0~3 ku)冷冻干燥后保存备用。

#### 1.3.2 SPIHs的抗氧化活力测定

##### 1.3.2.1 Fe<sup>2+</sup>螯合法

采用Fe<sup>2+</sup>螯合法检测SPIHs的螯合能力,参考Dinis<sup>[8]</sup>等人的方法,SPIHs的螯合能力以EDTA当量(mg EDTA equivalents per gram dried weigh, mg EDTA/g)来表达。

##### 1.3.2.2 ORAC法

用ORAC法检测SPIHs的抗氧化能力,参考D. Huang<sup>[9]</sup>等人的方法进行,SPIHs的ORAC值以Trolox(μmol Trolox equivalent per gram dried weigh, μmol TE/g)来表达。

##### 1.3.2.3 抑制亚油酸自氧化法

SPIHs抑制亚油酸自氧化能力的测定参考Osawa & Namiki<sup>[10]</sup>的方法,并做适当修改。0.5 mg的样品溶解于5 mL的50 mM磷酸盐缓冲液(pH 7.0),在棕色玻璃瓶中依次加入5 mL的样品溶液,5 mL的无水乙醇,65 μL的亚油酸,再加蒸馏水调整到12.5 mL,在混合器上混合均匀,用硅胶塞密封,放在60℃恒温培养箱中保温,每隔24 h测定吸光度。吸光度值的测定方法参考Mitsuda<sup>[11]</sup>等人试验方法,计算抑制率。

#### 1.3.3 细胞培养及细胞活力的测定

PC12细胞株使用DMEM培养基(含10%的胎牛血清,青霉素100 U/mL,链霉素100 μg/mL,pH 7.2~7.4),在37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,所有试验均在细胞接种培养24 h生长稳定后进行。

采用MTS法检测细胞活力,PC12细胞接种于96孔板中(1×10<sup>5</sup> cells/mL,80 μL/well),待细胞生长稳定后加入SPIHs继续培养24 h,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激细胞12 h;各孔加入20 μL的MTS(0.5 mg/mL),继续培养1 h后测490 nm处吸光度,计算细胞活力。细胞形态变化通过倒置生物显微镜观察并拍照。

#### 1.3.4 细胞培养液中LDH活性测定

PC12细胞(1×10<sup>5</sup> cells/mL,800 μL/well)接种于24孔板中,待细胞生长稳定后加入SPIHs或VE培养24 h,200 μM的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激细胞12 h;收集各孔培养液于96孔板中,按LDH试剂盒说明书测定LDH含量。

#### 1.3.5 细胞内CAT、SOD和MDA含量测定

PC12细胞(2×10<sup>5</sup> cells/mL,2.5 mL/well)接种于6孔板中,待细胞生长稳定后加入SPIHs或VE培养24

h, 200 μM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激细胞 12 h; 细胞裂解后 10000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 蛋白含量、CAT 和 SOD 活力、MDA 含量通过相应试剂盒进行检测。

### 1.3.6 细胞内 ROS 的测定

细胞内活性氧的测定参考 Hong & Joseph<sup>[12]</sup> 的试验方法。简单来说, PC12 细胞接种于 24 孔板中(1×10<sup>5</sup> cells/mL, 800 μL/well), 细胞生长稳定后加入 SPIHs 或 VE 培养 24 h。移除培养液, PBS 清洗两遍, 在含有 100 μM 的 DCFH-DA 的无血清培养基中继续培养 30 min。移除 DCFH-DA 后, 加入 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 PBS 溶液中继续培养, 并开始计时连续检测细胞的荧光强度 (Excitation, 485±20 nm; Emission, 530±20 nm)。细胞内 ROS 的增加率计算公式, (F<sub>t30</sub>-F<sub>t0</sub>)/F<sub>t0</sub>×100, F<sub>t0</sub> 是 0 min 时的荧光值, F<sub>t30</sub> 是 30 min 时的荧光值。

### 1.3.7 统计学处理

数据表示为平均值±标准偏差, 用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, 以 p<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SPIHs 的抗氧化能力

许多研究已表明, 神经元氧化损伤的保护作用与保护剂的抗氧化能力有直接关系<sup>[4]</sup>。本研究通过 Fe<sup>2+</sup>螯合、ORAC 和抑制亚油酸自氧化试验评价 SPIHs 的抗氧化能力, 结果见表 1。试验结果与先前的研究结果相符合, 抗氧化能力与分子质量程负相关, 低分子量的 SPIHs4 具有最强的抗氧化能力。

表 1 SPIHs 的抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activities of SPIHs

	Fe <sup>2+</sup> 螯合/ (mg EDTA/g)	ORAC/ (μmol TE/g)	亚油酸自氧化 抑制率/%
SPIHs1	1.80±0.05	81.8±14.9	9.58±2.55
SPIHs2	4.00±0.14	129.6±1.7	25.07±3.13
SPIHs3	6.18±0.12	171.6±15.4	60.00±3.38
SPIHs4	7.37±0.15	235.1±23.6	76.31±2.39

注: Means ± SD, n=6.

### 2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 SPIHs 对 PC12 细胞活力的影响

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一种重要的 ROS, 能够诱导氧化应激导致 PC12 细胞的凋亡和坏死<sup>[2]</sup>。在初期试验时, 为了建立合适的细胞模型, 以不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激细胞 12 h, 随着浓度的增加细胞活力逐渐降低 (Fig. 1a), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 200 μM 时细胞活力为 42.9%, 所以选取 200 μM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 制作氧化损伤模型。

经筛选确定采用 0.1~1.0 mg/mL 的 SPIHs, 与 PC12 细胞共同培养 24 h。结果显示, 在此浓度范围的 SPIHs 对细胞的活力不会产生影响, 不具有细胞毒性和促增殖作用 (Fig. 1b)。但是不同浓度的 SPIHs 预保护 24 h 后经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12 h, 其对 PC12 细胞活力具有明显的作用效果, 如图 1c, 1 mg/mL 的 SPIHs4 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组相比细胞活力显著增加 (p<0.01)。结果表明, SPIHs 对 PC12 细胞的氧化损伤具有保护作用, SPIHs4 的作用效果最强。

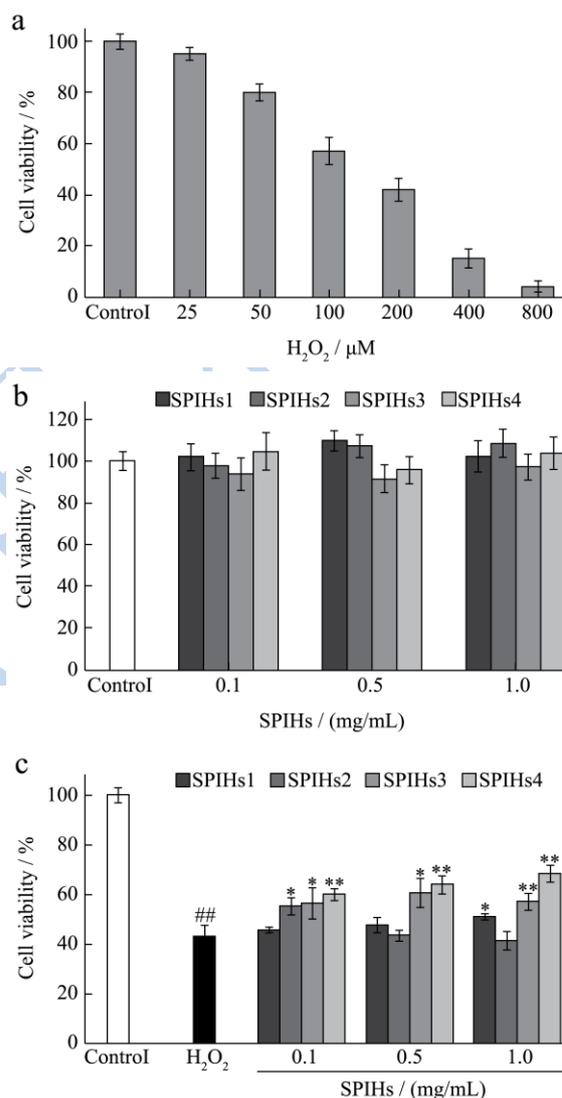


图 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 SPIHs 对 PC12 细胞活力的影响

Fig 1 The effects of SPIHs and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the viability of PC12 cells

注: Means±SD, n=6, ##p<0.01 vs对照组, \*\*p<0.01, \*p<0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组。

### 2.3 SPIHs4 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞膜损伤的影响

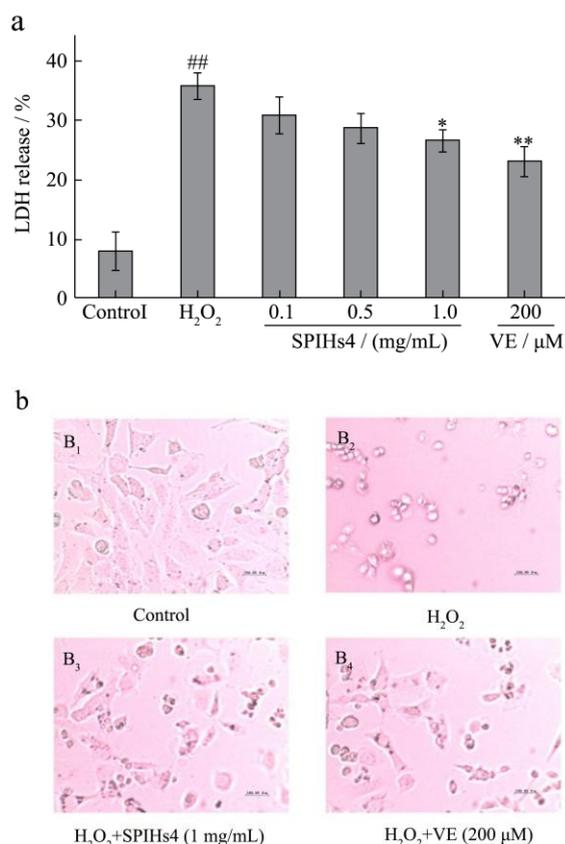


图 2 SPIHs 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞膜损伤的影响

Fig 2 Effect of SPIHs on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell membrane damage in PC12 cells

注: Means ± SD, n=3, <sup>##</sup>p<0.01 vs 对照组, <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*</sup>p<0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组。

LDH 是细胞内一种稳定的细胞质酶,当细胞膜受到损伤后,LDH 释放进入细胞培养液中,所以 LDH 释放量是评价细胞膜完整性和细胞毒性的一项重要指标<sup>[13]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的模型组 LDH 释放量相对正常组明显增加(p<0.01),不同浓度的 SPIHs4 能显著降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 LDH 释放,且成浓度依赖性 (Fig.2a)。通过倒置生物学显微镜可以更清晰的观察到细胞形态的变化。正常组细胞为梭形,大小基本相同,具有清晰的轮廓;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞发生扭曲变成圆形,突触变短,细胞边缘仍然清晰;SPIHs4 和 VE 保护组较损伤组贴壁细胞增加,圆形细胞数量减少,部分突触恢复正常。结果表明, SPIHs4 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞膜损伤具有保护作用。

#### 2.4 SPIHs 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞内 CAT、SOD 活性和 MDA 含量的影响

ROS 诱导的细胞毒性通常伴随着脂质过氧化增加,细胞膜流动性下降,一些生物酶活性降低等<sup>[4]</sup>。

CAT 和 SOD 形成了一种重要的保护系统来对抗氧化应激损伤,SOD 可以催化超氧化物自由基生成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,CAT 负责清除产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,同时,MDA 是一种重要的氧化损伤指标<sup>[14]</sup>。如图 3 所示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以明显抑制细胞内 CAT 和 SOD 的活性,提高 MDA 水平(p<0.01);SPIHs4 和 VE 保护组较损伤组能够显著提高 CAT 和 SOD 的活性,降低 MDA 水平(p<0.01)。结果表明, SPIHs4 可能是通过促进抗氧化酶的表达保护 PC12 细胞对抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化损伤,同时,抑制脂质的过氧化反应阻止 ROS 进入细胞。

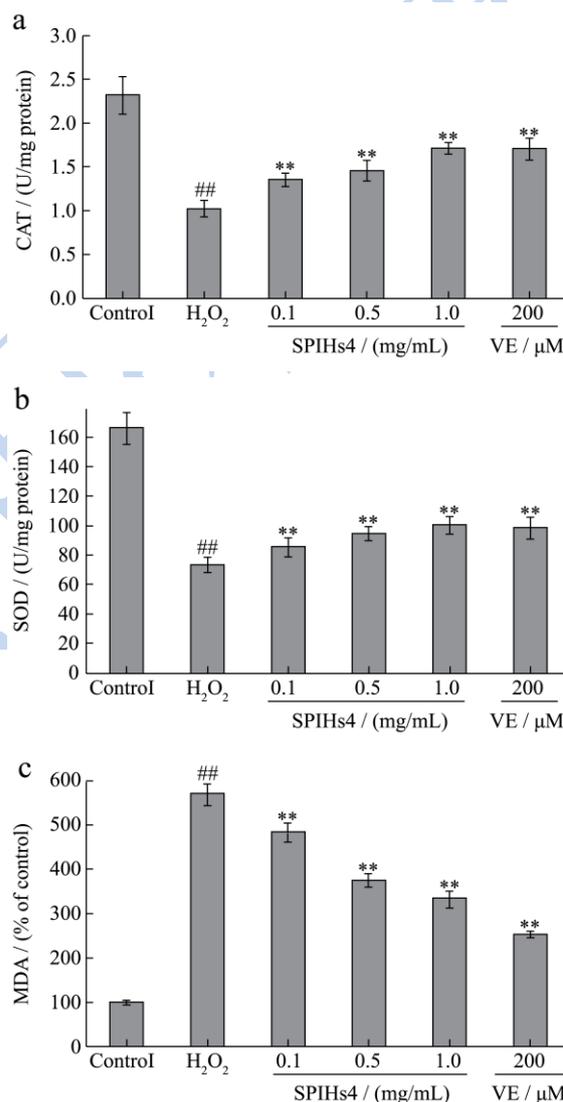


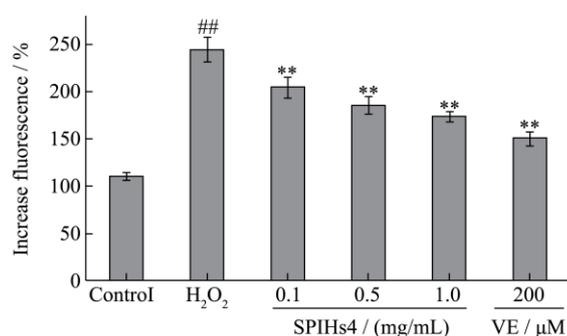
图 3 SPIHs 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞内 CAT、SOD 活性和 MDA 含量的影响

Fig 3 Effect of SPIHs4 on the CAT and SOD activities, and MDA content in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured PC12 cells

注: Means ±SD, n=6, <sup>##</sup>p<0.01 vs 对照组, <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*</sup>p<0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组。

#### 2.5 SPIHs 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞内 ROS 的

影响

图4 SPIHs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导PC12细胞内ROS的影响Fig.4 The effect of SPIHs on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced intracellular accumulation of ROS in PC12 cells

注: Means ±SD, n=4, ##p<0.01 vs对照组, \*\*p<0.01, \*p<0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组。

使用DCFH-DA探针检测细胞内的ROS,本身没有荧光的DCFH-DA可穿过细胞膜进入细胞,在胞内生成DCFH,DCFH被活性氧化生成荧光物质DCF,荧光强度与细胞内的ROS水平成正比<sup>[12]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用PC12细胞30 min后,与对照组相比ROS水平明显增加(p<0.01);SPIHs4和VE保护组较H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组细胞内ROS水平显著降低(p<0.01)。结果表明,SPIHs4可能通过降低胞内ROS的产生起到保护细胞的作用。

### 3 结论

本研究以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导PC12细胞建立神经元氧化损伤模型,结果表明低分子量的SPIHs能够提高损伤细胞的存活率,降低细胞膜的氧化损伤,增加细胞内抗氧化酶活性,清除细胞内的ROS,从而减少ROS所诱导PC12细胞的凋亡,实现保护PC12细胞的作用。低分子量SPIHs具有强的抗氧化能力,其表现出来的神经元保护作用可能是通过酶解物中的某些肽类中和自由基和其他的一些ROS,促进抗氧化酶的表达和抑制毒性化合物的积累等途径发挥作用。所以,进一步的研究重点将是对蛋白酶解物进行深入的分离和纯化,鉴定出活性肽的组成,澄清结构和功能之间的关系,这对开发和研究天然的神经元保护剂具有重要意义。

### 参考文献

[1] Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2010, 345(1-2): 91-104

[2] Kapinska A, Gromadzka G. Oxidative stress and natural

antioxidant mechanisms: the role in neurodegeneration. From molecular mechanisms to therapeutic strategies [J]. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 2013, 67: 43-53

- [3] 赵谋明,陈卉平,任娇艳.核桃粕、核桃仁酶解物抗氧化活性的研究[J].*现代食品科技*,2013,10:2335-2339,2367
- ZHAO Mou-ming, CHEN Hui-ping, REN Jiao-yan. The antioxidant activities of walnut protein and its enzymolysis product [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 10: 2335-2339, 2367
- [4] 段秀红,齐申,赵雅婷,等.基于ESR和细胞培养体系的海参肠自溶寡肽抗氧化活性研究[J].*现代食品科技*,2014,5:28-32
- DUAN Xiu-hong, QI Shen, ZHAO Ya-pin, WU Hai-tao. Analysis of antioxidant activities of oligopeptides from sea cucumber guts based on esr and cell culture system [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 5: 28-32
- [5] Venuprasad M, Kumar KH, Khanum F. Neuroprotective effects of hydroalcoholic extract of ocimum sanctum against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced neuronal cell damage in SH-SY5Y cells via its antioxidative defence mechanism [J]. *Neurochemical Research*, 2013, 38(10): 2190-2200
- [6] Zhang L, Li J, Zhou K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(7): 2084-2089
- [7] Ravichandran M, Hettiarachchy N. Preparation of soy protein hydrolysates through alcalase treatment using response surface methodology with alzheimer's beta-amyloid (A beta 1-42) peptide aggregation inhibition property [J]. *FASEB J.*, 2013, 27
- [8] Dinis TC, Madeira VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1994, 315(1): 161-169
- [9] Huang DJ, Ou BX, Hampsch-Woodill M, et al. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(7): 1815-1821
- [10] Osawa T, Namiki M. Natural antioxidants isolated from eucalyptus leaf waxes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1985, 33(5): 777-780
- [11] Mitsuda H, Yuasumoto K, Iwami K. Antioxidation action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid [J]. *Eiyō to Shokuryō*, 1996, 19(3): 210-214

- [12] Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 27(5): 612-616
- [13] Hong H, Liu G-Q. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin [J]. Life Sciences, 2004, 74(24): 2959-2973
- [14] Shen W, Song D, Wu J, Zhang W. Protective effect of a polysaccharide isolated from a cultivated Cordyceps mycelia on hydrogen peroxide - induced oxidative damage in PC12 cells [J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(5): 675-680

现代食品科技