

不同蛋白源酶解产物对过氧化氢诱导损伤 PC12 细胞的保护作用研究

李文治, 徐巨才, 苏国万, 赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文以 H₂O₂ 诱导损伤的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞为细胞模型, 分别研究了三种蛋白源酶解产物(脑活素、鳕鱼蛋白肽和核桃蛋白肽)对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用。结果表明, H₂O₂ 的加入会使得 PC12 细胞的细胞数目减少, 部分胞体皱缩成圆形或椭圆形, 周围光晕消失, 且随着 H₂O₂ 浓度的增加, 细胞存活率逐渐降低。脑活素可获得最好的 PC12 细胞损伤保护作用, 核桃蛋白肽次之, 而鳕鱼蛋白肽作用不明显; 此外, 结果表明脑活素、鳕鱼蛋白肽和核桃蛋白肽对受损伤细胞的存活和增殖也能起一定的改善作用。因此, 核桃蛋白肽是一种改善脑部功能性障碍的潜在原料。

关键词: PC12 细胞; 脑活素; 鳕鱼蛋白肽; 核桃蛋白肽; 氧化损伤

文章编号: 1673-9078(2016)10-22-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.004

Neuroprotective Effects of Different Protein Hydrolysates against Oxidative Stress-induced Cytotoxicity in PC12 Cells

LI Wen-zhi, XU Ju-cai, SU Guo-wan, ZHAO Mou-ming

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Here, the effects of three protein hydrolysates (cerebrolysin, cod peptide, and walnut peptide) on rat pheochromocytoma (PC12) injured by H₂O₂ was evaluated. The results showed that addition of H₂O₂ decreased the number of viable PC12 cells and altered cell morphology, resulting in shrunken circular or oval shapes accompanied by disappearance of the peripheral halo. However, cerebrolysin exhibited the strongest protective effects against H₂O₂-induced oxidative injury in PC12 cells, followed by walnut peptide, whereas no significant effect was observed in the presence of cod peptide. Additionally, all three hydrolysates supported proliferation and survival of the injured cells. These findings indicated that walnut peptide constituted a potential raw food material capable of improving cerebral dysfunction.

Key words: PC12; cell; cerebrolysin; cod peptide; walnut peptide; oxidative injury

脑活素 (Cerebrolysin) 是以猪脑蛋白为原料, 通过生物酶解制备得到的脑蛋白水解物, 含有约 25% 的多肽和 75% 的氨基酸, 是目前有效治疗老年痴呆症和中风后遗症的一种临床药物^[1]。脑活素适用于治疗原发性痴呆、血管性痴呆、中轻度中风后的认知功能障碍、混合性痴呆以及颅脑损伤后脑功能障碍的改善。通过研究发现脑活素具有神经营养和神经保护功效, 类似于天然存在的神经生长因子 (NGF, nerve growth factor) 和脑源性神经营养因子 (BDNF, brain-derived neurotrophic factor), 它能影响或干预兴奋性毒性、自

收稿日期: 2015-08-10

基金项目: 广东省战略性新兴产业核心技术攻关 (2012A080800014,

2012A020800002); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2013AA102201)

作者简介: 李文治 (1977-), 男, 博士, 主要从事功能性食品方面的研究

通讯作者: 赵谋明 (1964-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究

由基形成和炎症反应, 在不同类型的细胞损伤模型和神经退行性疾病的动物模型中能够增加神经元的存活率^[2]。

分化的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (PC12 细胞) 具有神经元的结构特性和代谢特征, 且克服了原代神经元细胞不能永久性传代的缺点, 因此 PC12 细胞常被作为神经损伤研究的细胞材料。为了寻找可用于预防和治疗阿兹海默症的药物, 科研工作者常采用 H₂O₂ 诱导氧化应激损伤的 PC12 细胞作为神经损伤的体外细胞模型进行研究。目前已有一些黄酮类和多酚类天然产物被报道具有保护 H₂O₂ 诱导损伤的 PC12 细胞的作用, 如槲皮素^[3]、维生素 C^[3]、柑橘黄酮^[4]、咖啡酸苯乙酯^[5]、没食子酸^[6]、没食子酸甲酯^[6]等。此外, 也有一些多肽和蛋白水解物相继被报道, 如谷胱甘肽^[7]、乳清蛋白酶解物^[8,9]、麦胚蛋白酶解物^[10]、火麻仁蛋白酶解物^[11]等均具有一定的 PC12 细胞保护作用。目前

已有许多不同蛋白源的酶解物或活性肽被报道具有抗氧化活性,然而大部分抗氧化活性评价指标是基于清除活性氧自由基(ROS)或活性氮自由基(RNS)的体外化学评价方法,缺点是其结果与体内生物活性的关联性比较差^[12]。因此,为了更为全面地评价活性肽的抗氧化活性,建立和应用以细胞模型为载体的评价方法是很有必要的。

本文以 H₂O₂ 诱导损伤的 PC12 细胞作为细胞模型,分别研究脑活素、鳕鱼蛋白肽和核桃蛋白肽三种不同蛋白源酶解物对 PC12 细胞的保护作用,以期为制备改善脑部功能性障碍的活性提供方法指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

脑活素(Cerebrolysin),奥地利艾威特药品有限公司,每 mL 含脑蛋白水解物(Cerebroprotein hydrolysate) 215.2 mg; 法国鳕鱼蛋白肽,上海艾苛蜜

进出口有限公司;核桃蛋白肽,自制;木瓜蛋白酶(酶活力 60 万 U/g),广州华琪生物技术有限公司;大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12),中国科学院细胞库;杜尔伯科极限必需培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)、链霉素和青霉素,美国 Gibco 公司。噻唑蓝(MTT),美国 Sigma-Aldrich 公司;其它试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器设备

全波长扫描式多功能读数仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;倒置相差生物显微镜,日本 Olympus 公司;流式细胞仪,德国 Partec 公司;CO₂ 恒温培养箱,上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃蛋白肽的制备

低温核桃粕→加水(料液比 1:20)→85 °C 预处理 15 min (使核桃蛋白适度变性)→酶解(木瓜蛋白酶,加酶量 1% (m/m), 55 °C, 6 h)→灭酶(沸水浴 15 min)→冷却→离心(8000 r/min, 4 °C, 20 min)→过滤→浓缩→喷雾干燥→核桃蛋白肽

表 1 核桃粕及核桃蛋白肽相关成分

Table 1 Composition of defatted walnut meal and peptide

	蛋白质/%	多糖/%	脂肪/%	水分/%	灰分/%
核桃粕	45.37±1.47	13.15±0.59	11.54±0.42	8.52±0.42	6.93±0.37
核桃蛋白肽	63.51±1.02	6.98±0.26	6.46±0.61	4.27±0.14	6.21±0.22

1.2.2 细胞培养

PC12 细胞用 DMEM 培养基进行培养,并加入 10%胎牛血清(FBS)及青霉素、链霉素各 100 IU/mL,放入 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中静置培养。每 1~2 d 更换 1 次培养液,每 3~4 d 传代一次。

1.2.3 H₂O₂ 诱导的细胞损伤模型的建立

取对数生长期的 PC12 细胞,通过稀释将细胞密度调整为 5×10⁴ 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔接种 100 μL。试验设为对照组和实验组。空白对照组未经任何处理。细胞生长 24 h 后,实验组分别加入不同浓度的脑活素、深海鱼蛋白肽、核桃蛋白肽,预孵育 12 h 后,加入 H₂O₂ 使其终浓度为 0.1 mmol/L,继续孵育 2 h。吸弃掉培养基,加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT (噻唑蓝) 孵育 4 h 后,再加入 150 μL 每孔的二甲基亚砷(DMSO)溶解反应生成的甲瓚,待显色完全后,利用全波长扫描式多功能读数仪于 490 nm 波长处测定各孔的吸光值,DMSO 在 490 nm 波长下的吸光值记为空白值。按照下列公式(1)计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = (A - A_0) / (A_0 - A') \times 100\%$$

式中: A₀ 为空白组 OD 值, A 为实验组 OD 值或对照组 OD 值, A' 为空白值。

1.2.4 细胞形态观察

用 H₂O₂ 诱导处理 PC12 细胞后,在倒置相差显微镜下观察细胞形态,并用专用数码相机对各组中典型的细胞形态进行拍照。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

调整神经生长激活细胞浓度接种于 6 孔板,置于 37 °C 培养箱继续培养 72 h,加入 1.2.3 中筛选确定的 H₂O₂ 浓度作用 30 min,再分别加入脑活素、鳕鱼蛋白肽和核桃蛋白肽与细胞一起孵育培养 48 h,同时设置空白对照组。培养时间结束,用 0.25% 的无 EDTA 胰酶消化收集细胞,用预冷的 PBS 润洗两次,在 1000 rpm 转速条件下离心 5 min。将细胞重悬于 500 μL 缓冲液中,室温下,避光加入 5 μL Annexin-V-FITC,轻轻混匀后,加入 5 μL PI,轻轻混匀,室温、避光、反应 5~15 min。在 1 h 内,利用流式细胞仪进行观察和检测。

1.3 数据分析

试验平行测定 3 次,实验结果表述为平均值±标准偏差,采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 6.0 对数据进行统计分析和作图。对于各组间差异的显著性比较,

采用单因素方差分析 (ANOVA), 显著性水平为 $p=0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 过氧化氢诱导细胞损伤模型的建立

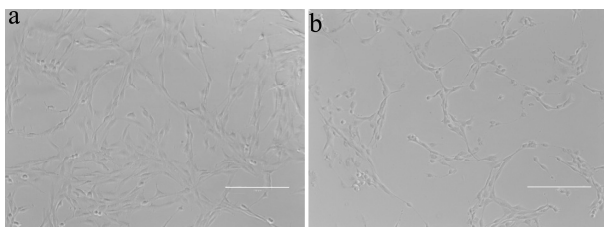


图1 过氧化氢对 PC12 细胞作用形态学图片 ($ba=20 \mu\text{m}$)

Fig.1 Effect of H_2O_2 on morphology of PC12 cells

注: a, 空白对照组; b, 模型组 (H_2O_2 处理)。

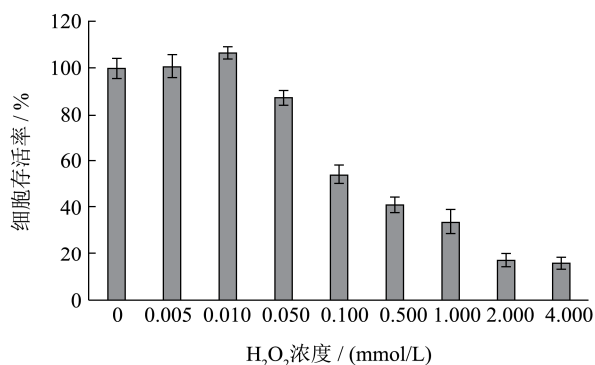


图2 过氧化氢对 PC12 细胞存活率影响

Fig.2 Effect of H_2O_2 on PC12 cell viability

过氧化氢对 PC12 细胞的损伤结果如图 1 所示, 从图 1a 可以看出, 正常的 PC12 细胞呈长梭状或纤维状且胞体饱满, 细胞贴壁生长, 伪足的生长状况良好, 周围有明显的光晕, 相邻细胞连接成网络状。经过过氧化氢损伤后, PC12 细胞的细胞数目减少, 部分胞体皱缩成圆形或椭圆形, 并且周围光晕消失 (图 1b)。图 2 所示为不同浓度 H_2O_2 对 PC12 细胞存活率的影响。当 H_2O_2 浓度 $<0.01 \text{ mmol/L}$ 时, 细胞损伤效果不明显, 细胞存活率为 95% 以上; 当 H_2O_2 浓度达到 0.05 mmol/L , 出现明显的细胞损伤现象, 且随着 H_2O_2 浓度的增加, 细胞的存活率逐渐降低。当 H_2O_2 浓度为 0.10 mmol/L 时, 细胞存活率仅为 53.67%, 几乎达到一半左右的细胞损伤, 表明 H_2O_2 适合于氧化损伤细胞模型的建立。因此, 本实验选取浓度为 0.10 mmol/L 的 H_2O_2 建立细胞损伤模型。

2.2 脑活素对过氧化氢损伤 PC12 细胞存活率影响

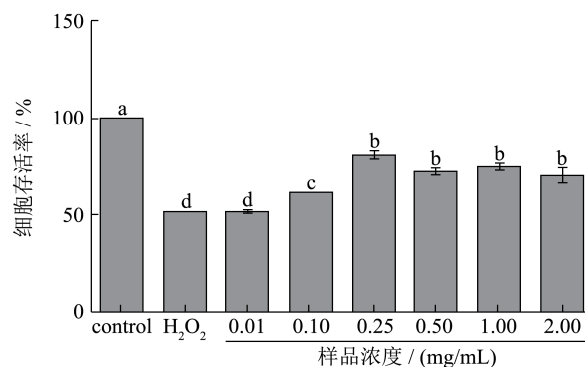


图3 脑活素对过氧化氢损伤 PC12 细胞存活率影响

Fig.3 Effect of cerebroslyn on improved PC12 cell viability against H_2O_2 -induced damage

脑活素对过氧化氢损伤的 PC12 细胞存活率影响如图 3 所示, 经 1 mmol/L 的过氧化氢损伤后, 细胞存活率下降至 $51.14 \pm 1.04\%$ 。当预加入浓度为 0.10 mg/mL 的脑活素与 PC12 细胞孵化时, 经 H_2O_2 处理的细胞存活率较模型组显著升高至 60.67% ($p < 0.05$)。当脑活素浓度继续升至 0.25 mg/mL , 细胞存活率升高至 79.85% 。然而, 当脑活素的浓度超过 0.25 mg/mL 后, 继续提高其浓度对细胞存活率的影响不显著 ($p > 0.05$)。脑活素是猪脑蛋白水解物, 是一种多肽 (25%) 和氨基酸 (75%) 的混合物, 具有一定的营养功能和抗氧化特性^[14]。Hartbauer 等^[14]发现脑活素与鸡胚神经元细胞孵育 4 d 能显著提高细胞的存活率, 并且在 $0.025 \sim 0.4 \text{ mg/mL}$ 的范围内细胞存活率与脑活素浓度呈正相关; 此外研究还发现脑活素能提高无血清培养基中 PC12 细胞的存活率^[15]。其原因可能是脑活素中的活性肽或游离氨基酸既能够直接清除活性氧自由基, 又可充当细胞的营养物质从而提高 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞的存活率, 即具有保护和营养双重功效。

2.3 鳕鱼蛋白肽对过氧化氢损伤 PC12 细胞保护作用研究

如图 4 所示, 在本实验条件下鳕鱼蛋白肽对于过氧化氢损伤的 PC12 细胞无明显保护作用, 并且在浓度大于等于 1.0 mg/mL 时反而具有一定的损伤作用。一般来说, 对 H_2O_2 诱导损伤的 PC12 细胞的保护作用可能通过以下途径进行调控: (1) 提高过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和还原酶 (GR) 等酶类的活性以清除 H_2O_2 ; (2) 直接清除活性氧自由基; (3) 抑制膜损伤; (4) 抑制 DNA 损伤; (5) 维持正常的线粒体膜电位^[4]。文献中有利用不同细胞模型对鳕鱼抗氧化活性研究的报道, 例如 Ngo 等

[16]发现鳕鱼胶原蛋白肽具有自由基清除活性,并且对大鼠巨噬细胞 RAW 264.7 氧化诱导的 DNA 损伤具有保护作用。Mendis 等[17]发现无须鳕鱼皮明胶水解物能提高人肝癌细胞 Hep3B 中抗氧化酶类(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶)的酶活。本实验中,鳕鱼低聚肽对于 H₂O₂ 诱导损伤的 PC12 细胞没有显著的保护作用,分析原因可能是由于酶解工艺与文献报道中有所不同,所得的成分也不尽相同,导致其所含能清除活性氧自由基的抗氧化肽段较少或对抗氧化酶系的作用不显著等。

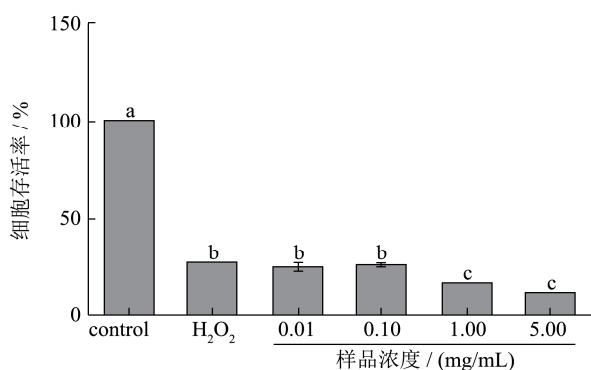


图4 鳕鱼低聚肽对过氧化氢损伤 PC12 细胞存活率影响

Fig.4 Effect of cod peptides on improved PC12 cell viability against H₂O₂-induced damage

2.4 核桃蛋白肽对过氧化氢损伤 PC12 细胞保护作用研究

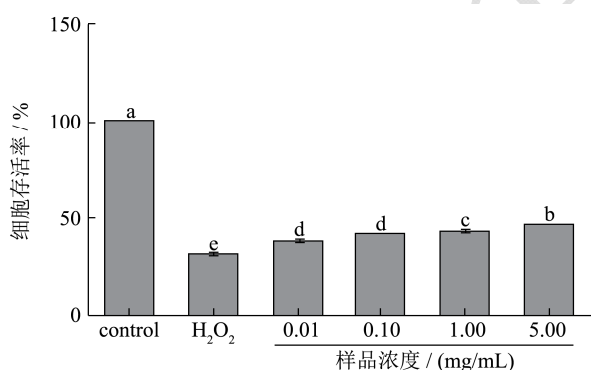


图5 核桃蛋白肽对过氧化氢损伤 PC12 细胞存活率影响

Fig.5 Effect of walnut peptides on improved PC12 cell viability against H₂O₂-induced damage

由图 5 可知,核桃蛋白肽对于过氧化氢损伤的 PC12 细胞具有一定的保护作用,但保护效果不及脑活素。核桃蛋白肽对 PC12 细胞过氧化损伤的保护效果与浓度呈现正相关关系,即核桃肽浓度在 0.01~5.0 mg/mL 的范围内,细胞存活率随着核桃肽浓度的升高而升高。空白样品中过氧化氢损伤 PC12 细胞后细胞存活率为 31.13%,但核桃肽浓度为 1.0 mg/mL 时,细

胞存活率上升至 42.37%。Chen 等[18]从还原力、铁离子螯合能力、羟基自由基和 DPPH 自由基清除率以及抑制亚油酸过氧化等方面证实了核桃蛋白水解物的抗氧化活性,可以推测核桃肽对 H₂O₂ 诱导损伤的 PC12 细胞具有保护作用的机制可能是核桃肽能够直接清除活性氧自由基(ROS)[4]。亦有文献报道其他一些植物源的蛋白酶解物对 H₂O₂ 诱导损伤的 PC12 细胞具有保护作用,如 Zhu 等[10]发现 1.0 mg/mL 的脱脂麦胚蛋白酶解物可使 H₂O₂ 损伤的 PC12 细胞的存活率提高 32.85%; Lu 等[11]和 Zheng 等[19]分别从火麻仁蛋白酶解物、花生蛋白酶解物中分离纯化得到对 H₂O₂ 损伤的 PC12 细胞具有保护作用的多肽。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

表 2 流式细胞仪测定细胞凋亡结果 (2 mg/mL)

Table 2 Flow cytometric analysis of changes in apoptosis in the presence of protein hydrolysates (2 mg/mL)

组别/项目	UL/%	UR/%	LL/%	LR/%
空白组	7.75	4.37	65.91	21.97
损伤对照	0.44	24.63	11.62	63.31
脑活素组	0.32	17.59	18.08	64.01
鳕鱼肽组	0.13	16.74	19.69	63.44
核桃肽组	0.25	16.14	19.02	64.59

注:以 AnnexinV-FITC 为横轴,PI 为纵轴;左上象限(UL)为机械性损伤细胞;右上象限(UR)为晚期凋亡细胞或者坏死细胞;左下象限(LL)为阴性正常细胞;右下象限(LR)为早期凋亡细胞。

以上是预先添加一定浓度的样品(脑活素、鳕鱼肽和核桃肽)与 PC12 孵化一段时间后,再加入 H₂O₂ 对 PC12 细胞进行损伤,考察的是添加不同样品后的 PC12 细胞对 H₂O₂ 损伤的抵抗作用。本节将在 PC12 细胞中加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 H₂O₂ 诱导凋亡,再加入终浓度 2 mg/mL 样品(脑活素、鳕鱼肽和核桃肽)溶液继续培养 48 h,培养时间结束,收集细胞上机流式检测,考察样品对受损伤细胞存活和增殖的改善作用,试验结果见图 1 和表 2。

经过 Annexin-V-FITC/PI 双染后, H₂O₂ 模型组经流式细胞仪检测呈现 4 个细胞群,即机械性损伤细胞(UL)、晚期凋亡细胞或者坏死细胞(UR)、正常活细胞(LL)和早期凋亡细胞(LR)。在正常 PC12 细胞中,流式细胞仪检测出 PC12 中绝大部分为正常细胞(65.91%),早期死亡细胞仅为 21.97%;而 H₂O₂ 模型组在 0.1 mmol/L 的 H₂O₂ 诱导下,PC12 细胞中早期凋亡细胞上升为 63.31%,且有 24.63%为晚期凋亡或坏死细胞,仅有 11.62%为正常细胞,说明 H₂O₂ 对 PC12

的损伤非常严重,且明显影响细胞后期的存活和增殖;当向经 H₂O₂ 损伤后的细胞中添加脑活素、鳕鱼蛋白肽和核桃蛋白肽样品继续培养,与 H₂O₂ 模型组相比,早期死亡细胞几乎无明显变化,但晚期凋亡或坏死细胞明显降低(16.41%~17.59%),正常细胞增加至 18% 以上,表明脑活素、鳕鱼蛋白肽和核桃蛋白肽均能对经 H₂O₂ 损伤的细胞的存活和增殖起到一定的改善作用,且三组样品的作用效果相当。

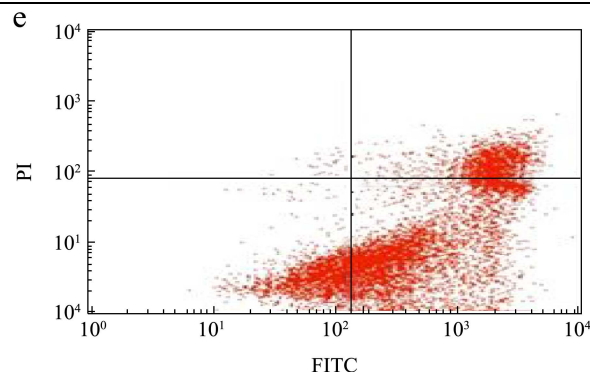
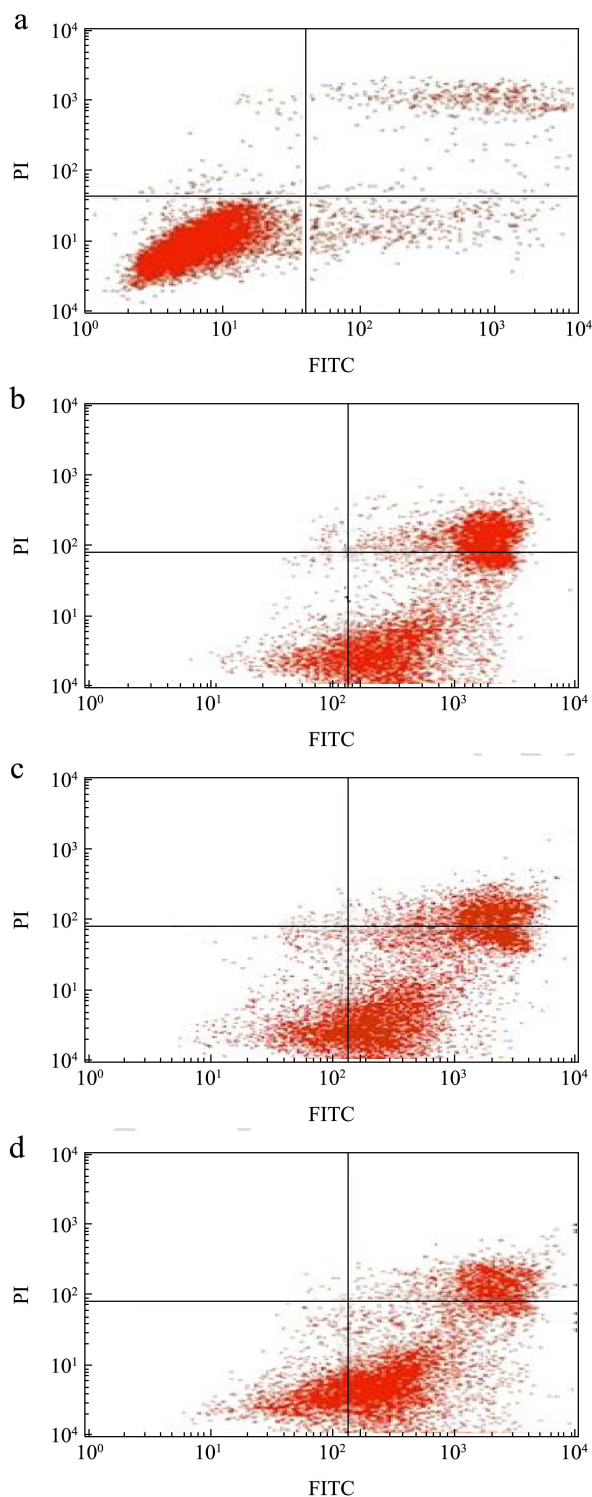


图 6 流式细胞仪检测细胞凋亡散点图

Fig.6 Scatter plot of apoptotic cells detected by flow cytometry

注: a, 空白组; b, 模型组 (H₂O₂ 处理); c, 2.0 mg/mL 脑活素+H₂O₂; d, 2.0 mg/mL 鳕鱼肽+H₂O₂; e, 2.0 mg/mL 核桃肽+H₂O₂。

3 结论

通过上述实验可知, H₂O₂ 对于 PC12 细胞生长具有较强的杀伤作用,且随着 H₂O₂ 浓度的增加,细胞存活率逐渐降低;当分别预加入脑活素和核桃蛋白肽与 PC12 细胞孵育后再经 H₂O₂ 损伤,细胞存活率均得到有效提升。添加脑活素(0.25 mg/mL)使得细胞存活率高达 79.85%,而添加核桃蛋白肽(1.0 mg/mL)也可使细胞存活率提升至 42.37%。此外,鳕鱼蛋白肽未对 H₂O₂ 损伤的 PC12 细胞呈现出显著的保护作用 ($p>0.05$)。此外,当向经 H₂O₂ 损伤的 PC12 细胞中加入脑活素、鳕鱼蛋白肽和核桃蛋白肽共同培养,三者均能明显减低晚期凋亡细胞或者坏死细胞的比例,明显提升正常细胞的比例。因此,脑活素和核桃蛋白肽在一定程度上可起到保护 H₂O₂ 对 PC12 细胞的损伤作用,并对受损伤细胞的存活和增殖能起一定的改善作用。

参考文献

- [1] Riley C, Hutter-Paier B, Windisch M, et al. A peptide preparation protects cells in organotypic brain slices against cell death after glutamate intoxication [J]. Journal of Neural Transmission, 2006, 113(1): 103-110
- [2] Vázquez-Roque R A, Ramos B, Tecuatl C, et al. Chronic administration of the neurotrophic agent cerebrolysin ameliorates the behavioral and morphological changes induced by neonatal ventral hippocampus lesion in a rat model of schizophrenia [J]. Journal of Neuroscience Research, 2012, 90(1): 288-306
- [3] Heo H J, Lee C Y. Protective effects of quercetin and vitamin

- C against oxidative stress-induced neurodegeneration [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(25): 7514-7517
- [4] Hwang S L, Shih P H, Yen G C. Neuroprotective effects of citrus flavonoids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(4): 877-885
- [5] Shi H, Xie D, Yang R, et al. Synthesis of caffeic acid phenethyl ester derivatives, and their cytoprotective and neurotogenic activities in PC12 cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62 (22):5046-5053
- [6] Crispo J A G, Piché M, Ansell D R, et al. Protective effects of methyl gallate on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 393(4): 773-778
- [7] Gu L, Zhao M, Li W, et al. Chemical and cellular antioxidant activity of two novel peptides designed based on glutathione structure [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(11): 4085-4091
- [8] Zhang Q X, Ling Y F, Sun Z, et al. Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(11): 2001-2006
- [9] Jin M M, Zhang L, Yu H X, et al. Protective effect of whey protein hydrolysates on H₂O₂-induced PC12 cells oxidative stress via a mitochondria-mediated pathway [J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 847-852
- [10] Zhu K X, Guo X, Guo X N, et al. Protective effects of wheat germ protein isolate hydrolysates (WGPIH) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cells [J]. Food Research International, 2013, 53(1): 297-303
- [11] Lu R R, Qian P, Sun Z, et al. Hempseed protein derived antioxidative peptides: purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells [J]. Food Chemistry, 2010, 123(4): 1210-1218
- [12] Sarmadi B H, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review [J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949-1956
- [13] Hartwig K, Fackler V, Jaksch-Bogensperger H, et al. Cerebrolysin protects PC12 cells from CoCl₂-induced hypoxia employing GSK3 β signaling [J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2014, 38: 52-58
- [14] Hartbauer M, Hutter-Paier B, Skofitsch G, et al. Antiapoptotic effects of the peptidergic drug cerebrolysin on primary cultures of embryonic chick cortical neurons [J]. Journal of Neural Transmission, 2001, 108(4): 459-473
- [15] Safarova E R, Shram S I, Grivennikov I A, et al. Trophic effects of nootropic peptide preparations cerebrolysin and semax on cultured rat pheochromocytoma [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2002, 133(4): 401-403
- [16] Ngo D H, Ryu B M, Vo T S, et al. Free radical scavenging and angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49(5): 1110-1116
- [17] Mendis E, Rajapakse N, Kim S K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(3): 581-587
- [18] Chen N, Yang H, Sun Y, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia L.*) protein hydrolysates [J]. Peptides, 2012, 38(2): 344-349
- [19] Zheng L, Su G, Ren J, et al. Isolation and characterization of an oxygen radical absorbance activity peptide from defatted peanut meal hydrolysate and its antioxidant properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(21): 5431-5437