

酪蛋白水解物类蛋白反应修饰产物对 H₂O₂ 诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUPVC) 氧化损伤的保护作用

许金龙¹, 陈芳芳¹, 庞佳楠¹, 李铁晶^{1,2}

(1. 东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

(2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 本研究以 Neutrase 0.8 L 对酪蛋白进行水解, 水解后的酪蛋白 (HC) 分别导入外源性氨基酸苯丙氨酸、组氨酸与脯氨酸进行类蛋白反应。所得的修饰产物 (HCPHE、HCHIS 和 HCPRO) 体外的 DPPH·清除活性, 羟自由基清除能力和还原能力与 HC 相比最大可分别提高 30.51%、45.83% 和 42.81% ($p < 0.05$)。HUPVC 与修饰产物单独预孵育 24 h 后经 300 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 氧化损伤考察修饰产物对 HUPVC 的保护作用, CCK-8 法测定细胞存活率结果表明修饰产物高剂量组的细胞成活率分别高于 HC 组 7.86%、5.21% 和 10.52% ($p < 0.05$), 与茶多酚 (TP) 给药组无明显差异 ($p > 0.05$), 并存在剂量依赖关系。与氧化损伤模型组相比, HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 可有效降低 LDH 渗出率, MDA 生成量, SOD 活力, 降低效果强于同浓度的 HC 组, 与此同时可使 GSH-Rd, CAT 的活力显著增强, 然而细胞内 GSH 的含量变化不明显。综上所述, 三类蛋白反应修饰产物对 H₂O₂ 诱导的 HUPVC 损伤具有很好的保护作用, 且保护效果高于 HC。

关键词: 酪蛋白水解物; 类蛋白反应; 抗氧化; 人脐静脉内皮细胞

文章编号: 1673-9078(2016)8-41-47

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.007

Protective Effect of Plastein Reaction-modified Casein Hydrolysates on H₂O₂-induced Injury in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

XU Jin-long¹, CHEN Fang-fang¹, PANG Jia-nan¹, LI Tie-jing^{1,2}

(1. Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(2. College of Food Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Casein was hydrolyzed by neutrase (0.8 L), and then the hydrolyzed casein (HC) was modified with phenylalanine (PHE), histidine (HIS), and proline (PRO) through plastein reaction. *In vitro* 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) radical-scavenging abilities, hydroxyl radical-scavenging abilities, and reducing powers of the corresponding products (HCPHE, HCHIS, and HCPRO) were significantly higher than those of HC by 42.81%, 45.83%, and 30.51%, respectively ($p < 0.05$). The modified products (HCPHE, HCHIS, and HCPRO) were incubated with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) for 24 h, and the protective effect of the modified products was evaluated after the HUVECs were injured using 300 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂. Cell viability was measured using the CCK-8 method. The results showed that the cell viability of the groups treated with a high dose of HCPHE, HCHIS, or HCPRO was significantly higher than that of the group treated with HC by 7.86%, 5.21%, or 10.52% ($p < 0.05$), respectively, and there was no significant difference between the high dose group and the group treated with tea polyphenols (TP) ($p > 0.05$); furthermore, the relationship was dose-dependent. HCPHE, HCHIS, and HCPRO effectively decreased the leakage of lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) content, and superoxide dismutase (SOD) activity, compared with the HC group at the same concentration. Furthermore, HCPHE, HCHIS, and HCPRO significantly enhanced the activities of glutathione reductase (GSH-Rd) and catalase (CAT), while the change in the content of glutathione (GSH) in the cells did not significantly change. The study showed that HCPHE, HCHIS, and HCPRO had a good protective effect on H₂O₂-induced injury in HUVECs, with the protective effect being better than that of HC.

Key words: casein hydrolysates, plastein reaction, antioxidant, human umbilical vein endothelial cells

收稿日期: 2015-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201337)

作者简介: 许金龙 (1989-) 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养; 通讯作者: 李铁晶 (1973-) 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品化学与营养

“抗氧化悖论”在人类非传染性疾病（癌症与阿尔茨海默病和糖尿病）中常用作描述氧自由基和活性氧（ROS）的含义。修复受损的生物分子发生故障会引起机体生理反应产生过剩的自由基。进而体内形成ROS如羟基自由基和超氧自由基并引起生理氧化损伤许多生物分子如蛋白质、DNA等。研究已经发现，疲劳和许多人类疾病都与ROS有关^[1]。因此，抗氧化剂的应用将有助于减少机体内的氧化损伤，从而降低人类疾病的发病率。

食源性蛋白质酶水解产生的生物活性肽具有优异的抗氧化能力，在人体内能抑制脂质过氧化，其体内的作用机制包括活性氧自由基的失活、自由基清除、金属螯合和氢过氧化物的形成减少^[2]。目前已从鹰嘴豆、大麻种子、牡蛎等动植物蛋白水解物中提取抗氧化肽^[3-5]。酪蛋白占乳中总蛋白含量的80%左右，它在体外和体内经酶的作用会发生水解，产生具有影响细胞功能的生物活性肽。这些生物活性肽会使消化、内分泌、免疫、神经和营养等生物过程发生应答反应。此外，酪蛋白水解物中的活性肽具有降压、催眠、矿物结合、抗血栓、抗菌、免疫调节和抗氧化活性^[5-10]。

目前研究中获得酪蛋白中活性肽的方法大多以酶水解后分离纯化为主。酪蛋白水解物经外源性氨基酸导入发生类蛋白反应（plastein reaction）在体外的抗氧化活性测定中显示出较高的抗氧化活性^[11]，但对细胞作用的抗氧化活性及作用机理尚没有研究。食源性化合物如从红酒和葡萄中发现的抗氧化剂白藜芦醇，人参中的活性成分人参皂甙，大蒜中活性成分的大蒜素在培养的人脐静脉内皮细胞（HUPVC）中的作用都显示出氧化应激活性氧的增加，在血管内皮功能障碍的表现中起着关键的作用^[12,13]。因此本研究的主要目的是探究酪蛋白水解物经Plastein反应修饰后对H₂O₂诱导HUPVC氧化损伤的保护作用，并与酪蛋白水解物对其保护作用加以对照，以细胞存活率（cell viability）、胞外乳酸脱氢酶（LDH）、丙二醛（MDA）、谷胱甘肽（GSH）、超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽还原酶（GSH-Rd）和过氧化氢酶（CAT）的含量或活性为测定指标，判断酪蛋白水解物经过Plastein反应后对细胞抗氧化能力的影响，为其应用建立理论基础。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要试剂

酪蛋白，北京奥博星生物技术有限责任公司；Neutrased 0.8 L（3 kU/g 蛋白），诺维信；L-苯丙氨酸甲

酯盐酸盐，阿拉丁试剂股份有限公司；组氨酸甲酯盐酸盐，阿拉丁试剂股份有限公司；脯氨酸甲酯盐酸盐，阿拉丁试剂股份有限公司；过氧化氢，天津市耀华化学试剂有限公司；DPPH，Sigma公司；邻二氮菲，天津科密欧化学试剂公司；铁氰化钾，天津市博迪化工有限公司。茶多酚，成都曼思特生物科技有限公司；胎牛血清，HyClone公司；RPMI 1640培养基，HyClone公司；胰蛋白酶（126 kU/g），Amresco公司；人脐静脉内皮细胞，康众康民原细胞库—南京剑桥生物技术有限公司；Cell Counting Kit-8(CCK-8)，同仁化学研究所；LDH测试盒，南京建成生物工程研究所；SOD测试盒，南京建成生物工程研究所；CAT测试盒，南京建成生物工程研究所；MDA测试盒，南京建成生物工程研究所；BCA法蛋白定量测试盒，南京建成生物工程研究所。

1.1.2 主要仪器

Alpha 1-4 中型冻干机，德国 Martin Christ 公司；Model 680 酶标仪，美国 Bio Rad Laboratories 公司；UV-2401PC 紫外可见分光光度计，日本岛津公司；HF-90CO₂ 培养箱，力康公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酪蛋白水解物的制备及酪蛋白水解物的 Plastein 反应

根据 Yue^[11]等研究方法，并加以改进。酪蛋白配制成 10%（*m/V*）溶液并用 2 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 7.2，加入 Neutrased 0.8 L（3 kU/g 蛋白），45 °C 下酶解 6 h，迅速放入 95 °C 水浴中灭酶 15 min，冷却至室温后 5000 r/min 离心 20 min 除去沉淀。所得的上清液冻干后保存于 -20 °C 备用。

利用 Plastein 反应对酪蛋白水解物（hydrolyzed casein, HC）进一步修饰，制备的酪蛋白水解物作为类蛋白反应的底物，利用 Neutrased 0.8 L 在 50% 的水-乙醇体系中催化类蛋白反应。根据前期实验确定最适反应条件为：反应温度为 25 °C，底物浓度为 40%

（*m/V*），Neutrased 0.8 L 的添加量为 3.1 kU/g 蛋白质，外源性氨基酸苯丙氨酸、组氨酸、脯氨酸添加比例为 0.6 mol/mol 游离氨基，反应时间为 6 h。反应结束后在 95 °C 水浴中灭酶 15 min。根据 Anne Pihlanto^[10]的研究结果 N-端为 Phe 或 His 的氨基酸序列其抗氧化活性较强及本实验室前期研究^[11]确定导入外源性氨基酸为 Phe、His 和 Pro，所得的导入苯丙氨酸酪蛋白水解物修饰产物（HCPHE）、组氨酸酪蛋白水解物修饰产物（HCHIS）、脯氨酸酪蛋白水解物修饰产物（HCPRO）冻干后储存 -20 °C 备用。

1.2.2 HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 的抗氧化活性分析

1.2.2.1 DPPH 自由基的活性

配制浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ DPPH 乙醇溶液, 存于暗处待用, 取 1 mL DPPH 乙醇溶液与 2 mL 的样品溶液在具塞试管中混合, 室温下暗处放置 30 min 后, 测定其在 517 nm 处吸光值。乙醇作为空白对照, DPPH 自由基清除率的计算方法如下^[3]:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除活性}(\%) = \frac{\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{空白}}} \times 100$$

1.2.2.2 羟自由基清除能力

2 mL 溶于 0.15 mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液的邻二氮菲 (0.75 mmol/L) 与 2 mL 溶于 0.15 mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲液的 FeSO_4 (0.75 mmol/L) 充分混合, 加入 1 mL 样品和 1 mL 质量分数为 0.01% 的 H_2O_2 。混合物在 37 $^\circ\text{C}$ 保温 60 min, 在 536 nm 下测定, 公式如下^[3]:

$$\text{羟自由基清除能力}(\%) = \frac{A_s - A_1}{A_0 - A_1} \times 100$$

其中 A_s 为样品的吸光值; A_1 为邻二氮菲, FeSO_4 和 H_2O_2 的对照溶液吸光值; A_0 为邻二氮菲和 FeSO_4 的空白溶液的吸光值。

1.2.2.3 还原能力

取 2 mL、0.2 mol/L 的磷酸缓冲溶液 (pH 6.6) 与 2 mL 质量分数为 1% 铁氰化钾溶液混合, 加入 2 mL 样品使样品终浓度为 2 mg/mL, 50 $^\circ\text{C}$ 保温 30 min, 冷却并加入 2 mL、10% 的三氯乙酸; 取 2 mL 上清液加入 2 mL 蒸馏水和 0.4 mL、0.1% 氯化铁, 混合均匀; 反应 10 min 后在 700 nm 测定吸光度^[3]。

1.2.3 HUPVC 的培养

人脐静脉内皮细胞从液氮罐中取出冻存的人体脐静脉血管内皮细胞株, 放入水浴锅中解冻, 然后于细胞间超净台中将细胞转移至预先加入含有 10 mL 胎牛血清的离心管中, 1000 r/min 离心 5 min。吸弃上清, 加入新的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 反复吹打, 使细胞分散均匀, 转移至培养瓶中置于 37 $^\circ\text{C}$ 含 5% 二氧化碳的细胞培养箱中培养, 隔日换液。当细胞生长至 80%~90% 融合度时, 吸弃旧培养液, 加入 3 mL PBS (pH 7.2~7.4) 洗 3 次后吸弃 PBS, 加入胰酶消化 4 min, 加入含胎牛血清的 RPMI1640 培养液终止胰酶的作用, 反复吹打细胞, 使之从瓶壁脱落成细胞悬液, 吹打均匀后传代培养细胞培养瓶中, 置于培养箱中培养。细胞生长融合至 80% 时, 胰酶消化, 收集, 细胞计数, 以按适宜浓度密度分别种于 96 孔板 (每孔 100 μL) 和 6 孔板 (每孔 3 mL), 细胞贴壁后

待用^[6]。

1.2.4 H_2O_2 诱导 HUPVC 损伤模型的建立

用无血清 1640 培养基将稀释成 0、100、200、300、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 6 个剂量组, 分别加入 96 孔板中, 每孔 100 μL , 分别作用 12、24、48 h 后, 将上清弃掉, 采用 CCK-8 法^[14]进行细胞存活率检测, 每孔加入 20 μL CCK-8 溶液, 继续培养 2 h, 振荡混匀, 在 96 孔酶标仪上检测各孔光密度 (OD) 值, 检测波长 450 nm。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{处理组}_{\text{OD}} - \text{调零组}_{\text{OD}}}{\text{对照组}_{\text{OD}} - \text{调零组}_{\text{OD}}} \times 100$$

1.2.5 HC、HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 对 HUPVC 的存活率影响

HUPVC 以 1×10^4 接种于 96 孔板中, HC 和 HCPHE 等样品用无血清 RPMI 1640 培养基进行溶解, 将其配制成 0.5、1、2 mg/mL 三个剂量, 正常对照组加入无血清培养基, 实验组组每孔含药溶液, 预孵育后, 按 CCK-8 方法检测细胞存活率。

1.2.6 HC、HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 对 H_2O_2 诱导损伤 HUPVC 保护的时效关系

正常对照组和 H_2O_2 氧化损伤模型组每孔加无血清培养基, HC、HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 各剂量组 (0.5、1、2 mg/mL) 分别预孵育 12 和 24 h 后, 弃上清, 加入 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用后, 按 CCK-8 方法检测细胞存活率。以确定三种类蛋白反应修饰产物保护诱导损伤的 HUPVC 最佳作用时间和作用浓度。

1.2.7 HC、HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 对诱导血管内皮细胞损伤的保护作用

将细胞接种于 6 孔板, 实验分组为, 正常对照组 (Control): 每孔给予 2 mL 无血清培养基; 模型组 (Model): 每孔给予浓度 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 作用 24 h; 阳性对照 (Vc) 组: 给予终浓度 0.167 $\mu\text{g/mL}$ Vc; 茶多酚 (TP) 组: 给予终浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 TP; HC、HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 给药组: 给予终浓度为 0.5、1、2 mg/mL 孵育 24 h 后, 给予浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 2 mL。

实验结束后离心收集细胞上清, 消化收集各组细胞, 每组加 1 ML PBS, 采取反复冻融的方法, 直至细胞破碎, 使内溶物流出, 离心, 吸取上清, 进行蛋白定量 (BCA 法^[6])。检测细胞上清液中的 LDH 含量, 细胞中 SOD、CAT 和 GSH-Rd 的活力及 GSH, MDA 的含量, 操作步骤按试剂盒说明书进行测定。

1.2.8 数据统计

采用 Excel 2010 软件进行实验数据处理, 以平均值 \pm 标准差的形式表示。用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析及 Duncan 多重比较分析, $p < 0.05$ 认为差异

明显。

2 结果与讨论

2.1 Plastein 反应对抗氧化活性的影响

如表 1 所示 HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 的抗氧化活性指标 DPPH 自由基的活性, 羟自由基清除能力和还原能力与未修饰前 HC 的相关指标最大可分别提高 30.51%、45.83%和 42.81% ($p < 0.05$)。说明只是通过酶催化作用得到的酪蛋白水解物, 由于受蛋白质一级结构中肽键的影响, 其抗氧化能力的提高受到限制。而通过类蛋白反应可以使肽分子的末端连接肽片段或氨基酸残基, 导致某些氨基酸的序列发生改变, 产生新的肽分子, 进而实现肽分子的结构或氨基酸的序列发生重新组合, 使其生物活性发生改变, 此外大多数高活性的抗氧化肽都含有疏水性氨基酸。这与 Yue^[11]的研究结果一致。Vc 在浓度相同条件下的 DPPH 清除活性和还原能力分别为 85.26 ± 1.31 和 59.21 ± 2.29 , 因此本实验中所得的产物体外抗氧化活性低于 Vc。

表 1 酪蛋白水解物 (HC) 及其类蛋白反应修饰产物 (HCPHE、HCHIS 和 HCPRO) 的抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activities of casein hydrolysates and casein hydrolysates modified with phenylalanine, histidine, and proline by plastein reaction

样品	DPPH·清除活性 /%	羟自由基清除 能力/%	还原能力
HC	36.21 ± 0.56^a	0.48 ± 0.01^a	18.31 ± 0.52^a
HCPHE	47.26 ± 0.96^c	0.63 ± 0.02^c	25.45 ± 1.54^c
HCHIS	39.36 ± 1.21^b	0.56 ± 0.06^b	22.54 ± 2.12^b
HCPRO	46.22 ± 0.89^c	0.70 ± 0.05^c	26.15 ± 1.26^c

注: DPPH·清除活性、羟自由基清除能力、还原能力测定时样品的蛋白质含量浓度分别为 1 mg/mL、9 mg/mL 和 6 mg/mL, 同一列值后上标不同字母代表 one-way ANOVA 分析差异显著 ($p < 0.05$)。

2.2 H₂O₂ 诱导 HUPVC 损伤模型的建立

线粒体是细胞内活性氧代谢的细胞器, 由于 H₂O₂ 诱导细胞氧化损伤, 进而使细胞内的线粒体破坏, 最终导致细胞死亡。研究结果如图 1 所示, 细胞存活率测定结果表明 HUPVC 的存活率随着 H₂O₂ 的作用时间延长而降低, 当 H₂O₂ 的浓度为 200 μmol/L 作用 48 h 或浓度为 300 μmol/L 作用 24 h 时, HUPVC 的存活率都可达到 50%左右, 达到了该损伤模型的造模条件。综合本实验造模时间因素考虑, 最后采用浓度为 300 μmol/L H₂O₂ 作用 24 h 为细胞氧化损伤模型建立的条

件。

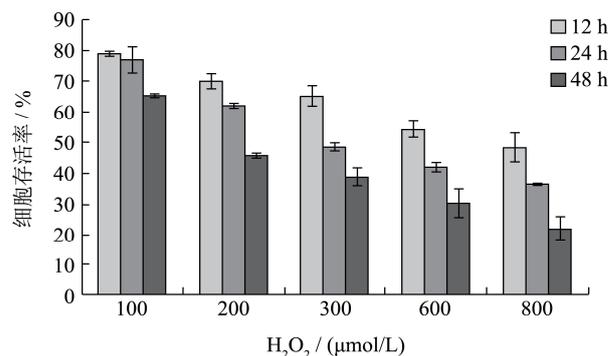


图 1 不同浓度的 H₂O₂ 及孵育时间对 HUPVC 的细胞存活率影响
Fig.1 Effect of different concentrations and incubation times of H₂O₂ on the viability of HUVECs

2.3 HC、HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 对 HUPVC 的存活率影响

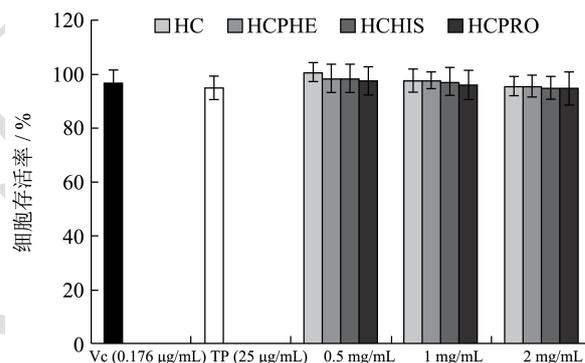


图 2 不同浓度的酪蛋白水解物 (HC) 及其类蛋白反应修饰产物 (HCPHE) 对 HUPVC 存活率的影响
Fig.2 Effects of different concentrations of casein hydrolysates and casein hydrolysates modified with phenylalanine, histidine, and proline via plastein reaction on HUVEC viability

Fig.2 Effects of different concentrations of casein hydrolysates and casein hydrolysates modified with phenylalanine, histidine, and proline via plastein reaction on HUVEC viability

根据 CCK-8 测定的细胞存活率的结果如图 2 显示, 正常细胞在孵育 24 h 的存活率为 $100 \pm 5.21\%$, HC(0.5、1、2 mg/mL)预孵育 24 h 细胞的存活率分别为 $97.21 \pm 4.75\%$ 、 $99.00 \pm 5.24\%$ 和 $95.27 \pm 4.14\%$, 这与 Martha Phelan^[6]的关于酪蛋白水解物对人 Jurkat T 细胞的研究结果类似。类蛋白修饰产物 HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 预孵育 24 h 细胞的最低存活率分别为 $98.52 \pm 5.21\%$ 、 $97.92 \pm 3.43\%$ 和 $95.69 \pm 4.25\%$, 给药组和正常细胞对照组差异性不显著 ($p > 0.05$), 因此可以说明类蛋白修饰产物 HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 对正常 HUPVC 无影响。

2.4 HC、HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 对 H₂O₂

诱导损伤 HUPVC 保护的时效关系

三种类蛋白反应修饰产物单独给药正常 HUPVC, 预孵育时间设定参照细胞生长代谢周期及 Martha Phelan^[6], 预孵育 12 和 24 h 后, 加入 300 μmol/L H₂O₂ 作用, CCK-8 检测结果显示, 与正常对照组相比, 模型组细胞活力显著降低。与模型组相比, Vc 组、TP 组、HC 组、HCPHE 组、HCHIS 组和 HCPRO 组细胞活力显著提高, 而且 HC 和 HCPHE 组、HCHIS 组和 HCPRO 组在孵育相同时间和浓度条件下, HC 组的细胞活力显著低于 HCPHE 组、HCHIS 组和 HCPRO 组 ($p < 0.05$), 但给药 HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 组间差异不显著 ($p > 0.05$)。研究中发现 HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 对血管内皮细胞的保护作用与剂量呈依赖性, 高剂量 (2 mg/mL) 组与茶多酚作用 12 h 相比差异不具有统计学意义 ($p > 0.05$), 但与阳性对照 Vc 组存在显著差异 ($p < 0.05$)。在药物孵育时间的选择上, 单独给药 HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 预孵育 24 h 对细胞的保护作用显著高于 12 h ($p < 0.05$), 因此可以说明最佳孵育时间为 24 h。如图 3 所示。

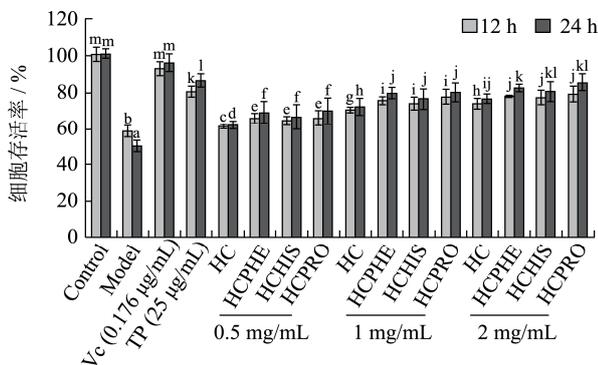


图 3 不同浓度的酪蛋白水解物 (HC) 及其类蛋白反应修饰产物 (HCPHE、HCHIS、HCPRO) 对 HUPVC 氧化损伤模型存活率的影响
Fig.3 Effect of different concentrations of casein hydrolysates (HC) and casein hydrolysates modified with phenylalanine, histidine, and proline via plastein reaction (HCPHE) on the viability of HUVECs injured using H₂O₂

注: 不同字母代表 one-way ANOVA 分析差异显著 ($p < 0.05$)。

2.5 HC、HCPHE、HCHIS 和 HCPHE 对胞外乳酸脱氢酶 (LDH) 的影响

细胞由于受到 H₂O₂ 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 (LDH) 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。

当 300 μmol/L H₂O₂ 与 HUPVC 作用 24 h 后, 细胞培养液中的 LDH 含量达到 565.24±5.21 U/L, 此实验中正常细胞中的 LDH 仅为 125±15.26 U/L, 说明此时 HUPVC 已经达到严重氧化损伤。在 HC 预孵育 24 h 后, 与模型组相比胞外的 LDH 渗出率显著降低 ($p < 0.05$), 而给药 HCPHE (2 mg/mL)、HCHIS (2 mg/mL) 和 HCPRO (2 mg/mL) 可以使 LDH 的渗出率分别降低至 385.65±4.11 U/L、376±12.11 U/L 和 370±13.09 U/L ($p > 0.05$)。

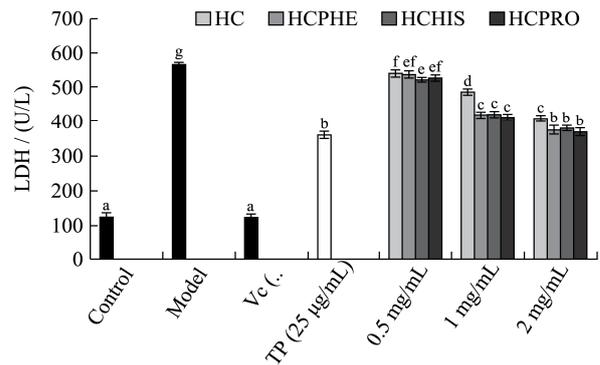


图 4 不同浓度的酪蛋白水解物 (HC) 及其类蛋白反应修饰产物 (HCPHE、HCHIS、HCPRO) 对 HUPVC 氧化损伤模型的 LDH 的影响
Fig.4 Effect of different concentrations of casein hydrolysates and casein hydrolysates modified with phenylalanine, histidine, and proline via plastein reaction on the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) in the HUVECs injured using H₂O₂

注: 不同字母代表 one-way ANOVA 分析差异显著 ($p < 0.05$)。

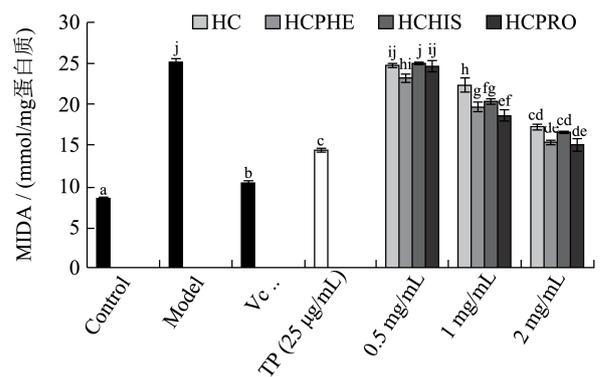


图 5 不同浓度的酪蛋白水解物 (HC) 及其类蛋白反应修饰产物 (HCPHE、HCHIS、HCPRO) 对 HUPVC 氧化损伤模型的 MDA 影响
Fig.5 Effect of different concentrations of casein hydrolysates and casein hydrolysates modified with phenylalanine, histidine, and proline via plastein reaction on malondialdehyde (MDA) in the HUVECs injured using H₂O₂

注: 不同字母代表 one-way ANOVA 分析差异显著 ($p < 0.05$)。

2.6 HC、HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 对细胞

中丙二醛 (MDA) 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^[14]。正常 HUPVC 中的 MDA 含量仅为 8.47 ± 2.3 nmol/mg 蛋白质。而当 H_2O_2 作用 24 h 后, 胞内 MDA 含量高达 25.22 ± 3.21 nmol/mg 蛋白质 ($p < 0.05$)。在 HC 与类蛋白反应修饰产物预先作用 24 h 时可有效抑制胞内的 MDA 生成量使其生成量控制在 15.35 ± 0.30 nmol/mL

表 2 不同浓度的酪蛋白水解物 (HC) 及其类蛋白反应修饰产物 (HCPHE、HCHIS 和 HCPRO) 对 HUPVC 氧化损伤模型细胞内的 GSH、SOD、GSH-Rd 和 CAT 的影响

Table 2 Effect of different concentrations of casein hydrolysates and casein hydrolysates modified with phenylalanine, histidine, and proline via plastein reaction on intracellular glutathione (GSH) content, and activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GSH-Rd), and catalase (CAT) in the HUVECs injured using H_2O_2

组别	GSH 含量 U/(min·mg 蛋白质)	SOD 活力 U/mg	GSH-Rd 活力 U/(min·mg 蛋白质)	CAT 活力 U/(min·mg 蛋白质)
Control	110.51 ± 11.26^b	18.26 ± 0.29^k	11.25 ± 1.81^{bc}	50.21 ± 1.27^g
Model	57.22 ± 14.52^a	9.98 ± 0.39^{ab}	8.20 ± 1.23^a	22.12 ± 0.88^a
Vc (0.125 μ g/mL)	75.26 ± 20.12^a	18.20 ± 0.15^k	18.21 ± 1.52^f	49.56 ± 1.32^g
TP (25 μ g/mL)	72.64 ± 18.38^a	17.99 ± 0.42^k	16.21 ± 1.22^{ef}	43.25 ± 0.98^f
HC (0.5 mg/mL)	59.76 ± 12.19^a	10.35 ± 0.21^b	11.83 ± 0.89^{bc}	26.81 ± 1.21^b
HC (1 mg/mL)	57.38 ± 10.22^a	12.41 ± 0.32^d	12.98 ± 0.39^{bcd}	32.51 ± 1.51^c
HC (2 mg/mL)	63.51 ± 13.82^a	14.56 ± 0.11^f	13.26 ± 0.58^{bcde}	35.26 ± 0.87^d
HCPHE (0.5 mg/mL)	59.87 ± 19.29^a	10.52 ± 0.51^b	11.91 ± 1.35^{bc}	27.32 ± 0.52^b
HCPHE (1 mg/mL)	61.84 ± 16.25^a	14.33 ± 0.23^f	14.11 ± 2.11^{cde}	34.56 ± 0.67^d
HCPHE (2 mg/mL)	69.21 ± 15.46^a	16.24 ± 0.49^h	15.41 ± 1.09^{def}	40.12 ± 1.30^e
HCHIS (0.5 mg/mL)	60.23 ± 15.21^a	9.51 ± 0.53^a	10.51 ± 2.01^{ab}	26.28 ± 0.91^b
HCHIS (1 mg/mL)	68.92 ± 22.26^a	11.21 ± 0.49^c	13.56 ± 1.96^{cde}	33.67 ± 1.24^{cd}
HCHIS (2 mg/mL)	69.23 ± 17.21^a	15.29 ± 0.61^g	14.98 ± 2.35^{de}	38.51 ± 0.66^e
HCPRO (0.5 mg/mL)	58.29 ± 19.14^a	10.62 ± 0.35^{bc}	11.26 ± 0.98^{bc}	27.23 ± 1.22^b
HCPRO (1 mg/mL)	59.21 ± 20.00^a	13.21 ± 0.25^e	14.01 ± 1.64^{cde}	35.11 ± 0.56^d
HCPRO (2 mg/mL)	65.21 ± 15.62^a	17.05 ± 0.41^j	16.01 ± 2.08^{ef}	42.23 ± 0.64^f

注: 不同字母代表 one-way ANOVA 分析差异显著 ($p < 0.05$)。

谷胱甘肽 (GSH) 是细胞内氧化平衡主要的调节剂, 细胞受到氧化胁迫时, GSH 的含量会迅速降低。如表 2 在 HUPVC 细胞受到 H_2O_2 作用 24 h 后, GSH 的含量显著下降至 57.22 ± 14.52 nmol/mg 蛋白质 ($p < 0.05$)。细胞在给药 HCPHE、HCHIS 或 HCPRO 预孵育 24 h, 之后与 H_2O_2 作用对其氧化损伤情况下, 可以发现 HCPHE、HCHIS 或 HCPRO 在不同浓度下与 HUPVC 作用 24 h 时, 细胞内的 GSH 升高不显著 ($p > 0.05$), 造成此种结果的原因可能是因为在细胞受

和 24.52 ± 0.49 nmol/mL 之间, 而在给药 HC 与类蛋白反应修饰产物相同剂量情况下, HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 对胞内 MDA 生成的抑制作用高于 HC ($p < 0.05$), 如图 5 所示, 此时 HCPRO 对胞内 MDA 生成的抑制作用强于 HCPHE 与 HCHIS 两组, 但与 HCPHE 组无统计学差异 ($p > 0.05$)。

2.7 HC、HCPHE、HCHIS 和 HCPRO 对

HUPVC 细胞内 GSH、SOD、GSH-Rd 和 CAT

的影响

到 H_2O_2 氧化损伤时, 细胞内的谷胱甘肽过氧化物酶失活导致的。与此种结果不同的是, 经过 HCPHE、HCHIS 或 HCPRO 处理的细胞中 SOD, GSH-Rd 和过氧化氢酶 (CAT) 的活力显著提高, 与模型组和对照组差异性显著 ($p < 0.05$)。值得说明的是, 与 HC 组相比, HCPHE 组、HCHIS 组和 HCPRO 组细胞中 SOD, GSH-Rd 和过氧化氢酶 (CAT) 的活力也有所提高。综合分析 HCPRO 对细胞的作用强于 HCPHE 及 HCHIS, 这可能是因为在本实验的反应条件下, 可使

水解的肽段 N-端连接更多的 Pro, 有助于增强其抗氧化活性。

3 结论

本文考察 HC 和三种类蛋白反应修饰产物分别对 H₂O₂ 诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用, 通过细胞成活率, LDH、MDA、GSH、SOD、GSH-Rd 和 CAT 与细胞氧化相关指标的测定, 最终确定 HC 与三种类蛋白反应修饰产物都对损伤 HUPVC 细胞具有保护作用并存在剂量依赖关系, 而且在同等剂量给药条件下 HCPRO、HCHIS 和 HCPCRO 的保护效果强于 HC 的保护效果。说明酪蛋白水解物经过类蛋白反应后会提升其 HUPVC 细胞的抗氧化能力, 为抗氧化肽的制备提供了一种新的方法。

参考文献

- [1] Halliwell B. The antioxidant paradox: Less paradoxical now? [J]. British Journal of Clinical Pharmacology, 2013, 75(3): 637-644
- [2] Udenigwe C C, Aluko R E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing and potential health benefits [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(1): 11-24
- [3] Torres-Fuentes C, Contrera M D M, Recio I, et al. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2015, 180(10): 194-202
- [4] Girgih A T, He R, Malomo S, et al. Structure and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa L.*) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 6(5): 384-394
- [5] Wang Q K, Li W, He Y H, et al. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*) [J]. Food Chemistry, 2014, 145(15): 991-996
- [6] Phelan M, Aherne-Bruce S A, O'Sullivan D, et al. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells [J]. International Dairy Journal, 2009, 19(5): 279-285
- [7] Guinane C M, Kent R M, Norberg S, et al. Generation of the antimicrobial peptide caseicin A from casein by hydrolysis with the rmoysinenzymes [J]. International Dairy Journal, 2015, 49(10): 1-7
- [8] J Malinowski, M Klempt, I Clawin-Rädecker, et al. Identification of a NFκB inhibitory peptide from tryptic β-casein hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2015, 165(15): 129-133
- [9] 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, 2013, 44(9): 797-820
- [10] Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(11): 1306-1314
- [11] Yue N, Li T J, Zhao X H. The impact of extrinsic amino acids and solvent fractionation on the *in vitro* antioxidant activity of plastein reaction-stressed casein hydrolysates [J]. Food Technology and Biotechnology, 2013, 51(2): 224-232
- [12] Spanier G, Xu H, Xia N, et al. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4) [J]. Journal of Physiology and Pharmacology, 2009, 60(4): 111-116
- [13] Kwok H H, Ng W Y, Yang M S M, et al. The ginsenoside protopanaxatriol protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced cell injury and cell death by modulating intracellular redox status [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2010, 48(2): 437-445
- [14] Zhang Q X, Jin M M, Zhang L, et al. Hydrophobicity of whey protein hydrolysates enhances the protective effect against oxidative damage on PC 12 cells [J]. Journal of Dairy Research, 2015, 82(1): 1-7