

酸化蛋清粉的体外降血脂及抗氧化作用

黄兰青, 马美湖, 刘远远, 陈雨洁

(华中农业大学食品科技学院, 国家蛋品加工技术研发分中心, 湖北武汉 430070)

摘要: 为探究酸化蛋清粉对油酸诱导 HepG2 细胞建立的体外肝细胞脂肪堆积的清除作用, 将质量浓度分别为 4 mg/mL、2 mg/mL、0.8 mg/mL 的酸化蛋清粉孵育经 1.0 mol/L 的油酸诱导 24 h 的 HepG2 细胞后, 用油红 O 染色观察细胞内脂质沉积情况, 测定细胞内 TC、TG 含量及 SOD 活性的变化, 检测 ROS 荧光强度, 测定 DPPH 自由基及 ·OH 自由基的清除率。结果显示酸化蛋清粉浓度为 2 mg/mL 时具有最显著的降血脂效果, TG 和 TC 的清除率分别为 27.27%±0.02%、44.66%±0.02%; SOD 活性及 ROS 荧光检测结果显示: 随着酸化蛋清粉浓度的升高, 细胞内抗氧化能力呈现上升趋势; DPPH 自由基和 ·OH 自由基的清除能力随酸化蛋清粉浓度升高呈现出显著的随剂量依赖性的上升趋势, 当酸化蛋清粉浓度 18 mg/mL 时, 其清除率分别为 88.58%±0.04%、87.82%±0.03%。结果证明酸化蛋清粉具有显著的体外降血脂及抗氧化作用。

关键词: 酸化蛋清粉; HepG2 细胞; 降血脂; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2020)03-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.3.001

In vitro Hypolipidemic and Antioxidant Effects of Acidified Egg White Powder

HUANG Lan-qing, MA Mei-hu, LIU Yuan-yuan, CHEN Yu-jie

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to investigate the effect of acidified egg white powder on the clearance of the accumulated fat in HepG2 cells induced by oleic acid in a high-fat model, the 1.0 mol/L oleic acid-induced HepG2 cells (induction time 24 h) were incubated with acidified egg white powder (mass concentration: 4 mg/mL, 2 mg/mL and 0.8 mg/mL respectively). Lipid deposition was observed with the aid of oil red O staining. The changes in TC and TG contents and SOD activity in cells, as well as the fluorescence intensity of ROS and the scavenging rates of DPPH radical and OH radical were measured. The results showed that acidified egg white powder had the most significant hypolipidemic effect when its concentration was 2 mg/mL, with the clearance rates of TG and TC as 27.27%±0.02% and 44.66%±0.02% respectively. The results of SOD activity and ROS fluorescence detection showed that with an increase of the concentration of acidified egg white powder, the antioxidant capacity of the cells showed an upward trend (The DPPH· and OH· scavenging capacities showed a significant dose-dependent upward trend).. When the concentration of acidified egg white powder was 18 mg/mL, the clearance rates were 88.58%±0.04% and 87.82%±0.03%, respectively. The results proved that acidified egg white powder had significant *in vitro* hypolipidemic and antioxidant effects.

Key words: acidified egg white powder; HepG2 cell; hypolipidemic; antioxidant

引文格式:

黄兰青, 马美湖, 刘远远, 等. 酸化蛋清粉的体外降血脂及抗氧化作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(3): 1-8

HUANG Lan-qing, MA Mei-hu, LIU Yuan-yuan, et al. *In vitro* hypolipidemic and antioxidant effects of acidified egg white powder [J].

Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 1-8

我国心脑血管疾病发病率呈现逐年升高且日益年

收稿日期: 2019-09-04

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0400302); 湖北省自然科学基金项目 (2017CFB349); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2662015QD020)

作者简介: 黄兰青 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品科学与技术

通讯作者: 马美湖 (1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 肉类蛋品科学

轻化趋势^[1]。目前, 心脑血管疾病已成为危害人体健康最严重的疾病。高脂血症作为心血管疾病的重要危险因素之一, 其在动脉粥样硬化和脑血管疾病的发生和发展中起着重要作用, 预防和治疗高脂血症是防治心脑血管疾病的重要途径^[2]。血脂升高时, 易受到自由基的攻击, 导致脂质过氧化增强, 产生大量脂质过氧化物^[3,4]。研究表明人类很多代谢疾病和衰老均与活性氧对机体大分子的氧化损伤程度有关^[5], 要从根本

上治疗和预防这类疾病就必须从消除机体自由基入手,通过捕获或碎灭氧自由基,恢复体内自由基的平衡^[6]。目前,临床上降血脂试剂(洛伐他汀、贝特类等)广泛应用于诊断和维持血脂的正常水平^[7]。然而,这些药物在临床应用时会产生严重副作用,例如体重增加、胃肠障碍、水肿等,并且它们对并发症的治疗效果非常有限^[8]。相比于化学合成的试剂,天然产物通常被认为是毒性和副作用较小,目前可部分代替化学药物用于治疗发病初期的血脂异常患者。

醋蛋液是传统的食疗保健品,集康复、治疗和预防“三效合一”。醋蛋液具备醋和鸡蛋的所有营养成分和食疗作用,在制作过程中,蛋清在酸性条件下降解,生成了具有生物活性的低分子量的氨基酸及寡肽,使醋和鸡蛋的食疗价值被提高^[9]。以高度米醋浸泡鸡蛋并辅以其它的营养物质制成的醋蛋液,受到广大消费者的欢迎^[10]。因为醋蛋的制作简单方便、服用安全、疗效显著,拥有广泛的市场基础和前景,临床实践和动物实验证明,醋蛋液具有降血脂、降血压和抗氧化等保健功能^[11]。许多研究证明,醋蛋液作为一种纯天然的保健食品,长期服用是安全的,对人体没有任何的毒副作用^[12-14]。此外,醋蛋液能够促进动物的肠道蠕动,提高细胞的免疫功能,降低脑组织的过氧化作用^[15]。艾华^[16]等通过研究发现,醋蛋液有很好的调节血脂和抗氧化的作用。赖晓全^[17]等通过实验证明了醋蛋液对于患有高脂血症的大鼠具有明显的降血脂作用。临床实践证明,醋蛋对高血压症状和血液流变学的具有显著的改善疗效^[18]。

本实验通过 1.0 mol/L 油酸诱导 HepG2 细胞建立脂肪堆积模型,通过不同浓度的经 9 ° 米醋浸泡酸化的蛋清粉孵育诱导后的高脂细胞 24 h 后对细胞进行油红 O 染色及细胞内甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、活性氧(ROS)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性进行测定,同时测定酸化蛋清粉对 DPPH 自由基和 OH 自由基的清除率。以期探究出酸化蛋清粉对肝细胞脂肪累积的清除及抗氧化作用。

1 材料与方法

1.1 原料与仪器

1.1.1 实验材料

蛋清取自湖北神丹公司购买的全蛋;市售 9 ° 糯米醋;HepG2 细胞,中国科学院细胞库;胎牛血清(FBS),北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司;盘尼西林-链霉素,美国 Hyclone 公司;TC 试剂盒,北京普利莱基因技术有限公司;TG 试剂盒,北京普利莱基因技

术有限公司;cck-8 试剂盒,北京庄盟生物科技有限公司;SOD 试剂盒,南京建成生物科技有限公司;ROS 试剂盒,南京建成生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

二氧化碳培养箱,德国 Thermo Scientific 公司;荧光倒置显微镜,日本 Olympus 公司;超净工作台,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;台式低速离心机,上海安亭科学仪器厂;数显电子恒温水浴锅,巩义市予华仪器有限责任公司;微量加样器,德国 Eppendorf 公司;超纯水系统,英国 ELGA 公司;液氮罐(30 L),四川亚西低温设备公司;酶标仪,联想生物科技有限公司;高速冷冻离心机,美国 Sigma 公司;冷冻干燥机,德国 Christ 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

将新鲜鸡蛋的蛋清与 9 ° 米醋按照蛋清与醋的质量比为 3:1 的比例浸泡 48 h 后进行均质,2800 r/min 均质 3 min 后避光室温保存 24 h^[19],经 72 h 后完成浸泡过程,再将酸化后的蛋清液进行喷雾干燥后收集,喷雾干燥参数为:进料速度为 700 mL/h,进口温度为 170 °C,后续实验采用酸化蛋清粉处理 HepG2 细胞。

1.2.2 细胞培养

将细胞冻存管从液氮中取出,迅速放入 37 °C 温水中,待其完全融化,迅速转移到超净工作台中,把溶液转入到灭菌后的 10 mL 离心管中,于离心机中 3000 r/min 离心 5 min 后弃掉上清,加入 3 mL a-MEM 低糖培养基(含 10%胎牛血清、1%青霉素、1%链霉素)中吹打均匀后移入 25 cm³ 培养瓶中,置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验,细胞长至 70%~80% 时进行传代培养,隔天换一次液^[20]。

1.2.3 细胞活性测定

用 96 孔板接种细胞,使细胞质量浓度达到 5×10⁴ 个/孔,细胞贴壁 2 h 后,分别将样品及模拟胃肠道消化样品用 a-MEM 培养液(加入 1% BSA)配制成不同质量浓度后,分别加 100 μL 至各孔中,培养 24 h。用 cck-8 试剂盒检测细胞活性。

1.2.4 油红 O 染色观察

油红 O 的配制:0.5 g 油红 O 溶解于 100 mL 异丙醇中,过滤后避光保存在 4 °C 环境下。用时以油红 O 母液与双蒸水质量比为 3:2 的比例配制,静置 10 min 后过滤,现配现用。

在 12 孔板中间滴加一滴培养基,加入载玻片后接种细胞,贴壁 6 h 后饥饿处理细胞(用不含牛血清的

培养基) 12 h, 将培养基吸出后加入 1.0 mol/L 的油酸处理 12 h, 将样品用 a-MEM (含 1% BSA) 培养液配制成不同质量浓度后, 分别加 1 mL 至各孔中, 待细胞长至 70%~80% 后吸出上清液, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 在加入 4% 多聚甲醛常温固定 20 min 后用 PBS 清洗两遍, 加入 60% 异丙醇分化数秒后用双蒸水停止分化, 加入油红 O 染液染色 1 h, 75% 酒精脱色 2 s 后用蒸馏水洗去浮色, 加入苏木素染色 2 min, 用蒸馏水洗去浮色后在倒置显微镜 40× 下观察拍照。红色为脂滴, 蓝色为细胞核^[21]。

1.2.5 甘油三脂 (TG) 含量测定

将细胞以 1.2×10^6 个/孔接种至 6 孔板上, 贴壁 6 h 后饥饿处理细胞 (用不含牛血清的培养基) 12 h, 将培养基吸出后加入 1.0 mol/L 的油酸处理 12 h, 将样品用 a-MEM (含 1% BSA) 培养液配制成不同质量浓度后, 分别加 2.5 mL 至各孔中, 待细胞长至 70%~80% 后吸出上清液, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 用胰酶消化后离心, 去掉上清液, 按比例每 1×10^6 个细胞加 0.1 mL 裂解液, 混匀, 静置 10 min 后进行 TC 含量的测定^[22]。

1.2.6 总胆固醇 (TC) 含量测定

细胞处理方法同 1.2.5 步骤, 用 TC 试剂盒测定 TC 含量。

1.2.7 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定

细胞处理方法同 1.3.5 步骤, 用 SOD 试剂盒测定 SOD 活性。

1.2.8 活性氧 (ROS) 荧光检测

将细胞以 4×10^4 个/孔接种至四周不透光底板透光的 96 孔板中, 贴壁 6 h 后饥饿处理细胞 (用不含牛血清的培养基) 12 h, 将培养基吸出后加入 1.0 mol/L 的油酸处理 12 h 后吸出, 将样品用 a-MEM (含 1% BSA) 培养液配制成不同质量浓度后孵育诱导后的细胞 24 h 后吸出, 用 ROS 试剂盒进行荧光拍照^[22]。绿色荧光强度与 ROS 含量呈正比关系。

1.2.9 DPPH 自由基清除率测定

空白组: 2 mL 乙醇与 2 mL 新鲜配置的 DPPH·乙醇溶液 (0.2 mol/L) 混合均匀, 在室温黑暗处反应 30 min, 在 517 nm 处测定反应液的吸光值, 以无水乙醇作为空白参比; 样品组: 2 mL 样品溶液与 2 mL 新鲜配置的 DPPH·乙醇溶液 (0.2 mol/L) 混合均匀, 在室温黑暗处反应 30 min, 在 517 nm 处测定反应液的吸光值, 以无水乙醇作为空白参比; 对照组: 将 A 组中的 DPPH·乙醇溶液换成样品溶液, 其他不变, 在 517 nm 处测定反应液的吸光值^[23]。

样品中的 DPPH 自由基清除能力通过下列公式计算:

$$\text{Scavenging activity}(\%) = [A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 为空白组溶液的吸光值; A_x 为样品组溶液的吸光值; A_{x_0} 为对照组样品的吸光值。

1.2.10 OH 自由基清除率测定

样品组: 2 mL 8.8 mol/L 过氧化氢溶液与 2 mL 9 mol/L 水杨酸·乙醇、2 mL 9 mol/L 硫酸亚铁溶液和 2 mL 样品溶液 (1 mg/mL) 混合均匀, 在 37 °C 水浴反应 30 min, 然后在 510 nm 处测吸光值; 对照组: 6 mL 超纯水与 2 mL 样品混合均匀, 在 37 °C 水浴反应 30 min, 然后在 510 nm 处测吸光值; 空白组: 将样品组中的样品溶液换成超纯水, 其他不变, 在 37 °C 水浴反应 30 min, 然后在 510 nm 处测吸光值^[24]。

样品中的 OH 自由基清除活性计算公式如下:

$$\text{Scavenging activity}(\%) = [A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 为空白组溶液的吸光值; A_x 为样品组溶液的吸光值; A_{x_0} 为对照组溶液的吸光值。

1.2.11 统计学方法

采用 IBM SPSS Statistics 21 统计软件。所有数据用平均值±方差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义, 用 Origin 85 软件作图。

2 结果与分析

2.1 细胞活性测定

表 1 不同质量浓度酸化蛋清粉孵育 HepG2 细胞 24 h 后的存活率

Table 1 Survival rate of HepG2 cells incubated with different concentration of acidified-egg white powder for 24 hours ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	质量浓度/(mg/mL)	$A_{450\text{nm}}$	存活率/%
对照组	-	0.52 ± 0.04^{bc}	100.00 ^{bc}
实验组	0.20	0.47 ± 0.02^c	79.91 ± 0.06^c
	0.40	0.48 ± 0.02^c	81.17 ± 0.04^c
	0.60	0.49 ± 0.02^c	87.44 ± 0.09^{de}
	0.80	0.51 ± 0.02^c	92.47 ± 0.06^{cd}
	1.00	0.53 ± 0.01^{bc}	101.26 ± 0.04^{bc}
	2.00	0.55 ± 0.02^{ab}	108.79 ± 0.08^b
	4.00	0.59 ± 0.02^a	125.11 ± 0.09^a
	6.00	0.36 ± 0.01^d	37.23 ± 0.04^f

注: 表中小写字母不同表示具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

由表 1 可知, 经不同质量浓度酸化蛋清粉孵育 24 h 后, HepG2 细胞的活性有较大差异。质量浓度在 0.2~0.6 mg/mL 范围内, 酸化蛋清粉对 HepG2 细胞有较明显的抑制作用, 存活率低于 80%。当质量浓度在 0.8~4.0 mg/mL 时, 细胞存活率均高于 90%, 证明在

该质量浓度范围内酸化蛋清粉对细胞具有促进增殖的作用,可以进行下一步的实验;质量浓度为 6.0 mg/mL 时细胞存活率低于 50%,表现出明显的细胞毒性。酸化蛋清粉浓度过高时会对 HepG2 细胞产生较强的细胞毒性,使细胞的正常增殖受到抑制^[25]。后续实验采用的质量浓度在无毒性范围内,分别为 0.8 mg/mL、2.0 mg/mL、4.0 mg/mL。

2.2 油红 O 染色观察

HepG2 细胞是人源肝癌细胞株,具有与正常肝细胞相似的生物合成能力,是目前国际上公认的研究肝脏脂代谢的良好细胞模型^[26]。采用油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积,用酸化蛋清粉孵育 24 h 后,经油红 O 染色评价脂肪的积累^[27]。由图 1 可知,镜下观察空白组未见明显红染脂滴,诱导组红色脂滴面积所占比例明显多于空白组,说明油酸诱导成功建立肝细胞脂肪堆积模型;不同质量浓度样品孵育细胞 24 h 后,相较于油酸诱导组,红色脂滴所占比例明显减少,说明酸化蛋清粉对脂质具有一定的清除作用^[28]。1 mol/L 的油酸诱导使得 HepG2 细胞内脂滴大量聚集形成高脂状态,诱导组红色脂滴明显高于空白组,当用不同质量浓度的酸化蛋清粉孵育诱导的高脂 HepG2 细胞 24 h 后,酸化蛋清粉中的部分活性成分对细胞内脂滴进行清除,使得染色后视野内红色脂滴明显减少,但不同质量浓度样品处理组之间红色脂滴所占比例没有显著性差异,对于具体降脂效果还需进一步实验证明。

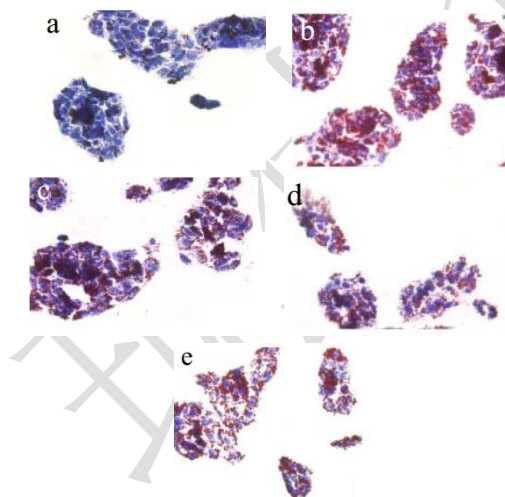


图 1 不同质量浓度酸化蛋清粉孵育后 HepG2 细胞油红 O 染色
Fig.1 Oil red O staining of HepG2 cells incubated with different concentration of acidified-egg white powder

注: a.空白组; b.诱导组; c.4.0 mg/mL; d.2.0 mg/mL; e.0.8 mg/mL。图 5 同。

2.3 甘油三酯 (TG) 含量测定

高脂血症是导致脂质和脂肪代谢的主要内分泌疾病之一。高脂血症的主要特点是升高 TG、TC 水平^[29]。由图 2 可知,诱导组相较于空白组, TG 含量升高 57.96%,说明油酸诱导成功建立肝细胞脂肪堆积模型,三组样品处理组相较于诱导组 TG 含量都具有显著性降低 ($p < 0.05$),质量浓度为 0.8 mg/mL 和 4 mg/mL 时 TG 的含量与诱导组相比分别降低 18.18%、20.13%;质量浓度为 2 mg/mL 时, TG 含量相较于诱导组降低 27.27%,具有最显著的降脂效果 ($p < 0.05$)。酸化蛋清粉能显著降低细胞内 TG 含量,但降脂效果不具有剂量依赖性。1 mol/L 的油酸诱导使得 HepG2 细胞内脂质含量大量增加,诱导组 TG 含量显著高于空白组,当用不同质量浓度的酸化蛋清粉孵育诱导的高脂 HepG2 细胞 24 h 后,酸化蛋清粉中的活性成分对细胞内的甘油三酯进行清除,使得样品处理组细胞内 TG 含量显著低于诱导组^[30],但不同质量浓度样品处理组之间 TG 的清除率没有显著性差异,对于酸化蛋清粉中具体降脂活性成分还需进一步实验证明。酸化蛋液中的酶、辅酶及有机酸能补充在三羧酸循环不顺畅时所缺的有机酸、酶、辅酶使三羧酸循环顺畅、心血管血液循环顺畅、新陈代谢旺盛从而起到防治心血管病的作用^[31]。

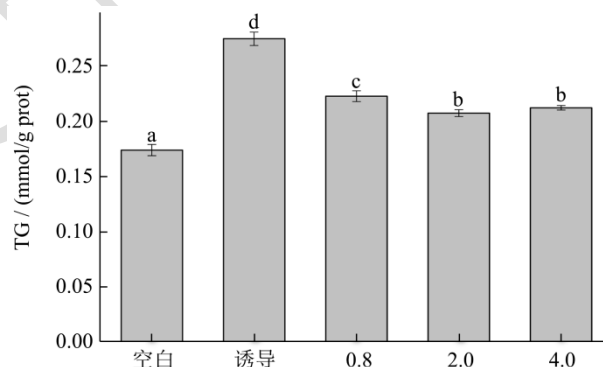


图 2 不同质量浓度酸化蛋清粉孵育后 HepG2 细胞内 TG 含量
Fig.2 The intracellular TG content of HepG2 cells incubated with different concentration of acidified-egg white powder

注: 图中小写字母不同表示具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

图 3、4、6、7 同。

2.4 总胆固醇 (TC) 含量测定

由图 3 可知,诱导组相较于空白组, TC 含量升高 119.61%,说明油酸诱导成功建立肝细胞脂肪堆积模型,三组样品处理组相较于诱导组 TC 含量都具有显著性降低 ($p < 0.05$)。质量浓度为 0.8 mg/mL 和 4 mg/mL 时,与诱导组相比, TC 含量分别降低 36.94%、25.07%;质量浓度为 2 mg/mL 时 TC 的含量降低 44.66%,具有最显著的降脂效果 ($p < 0.05$),说明酸化

蛋清粉的降脂效果不呈现剂量依赖性。这与前面 TG 含量的测定结果相似。1 mol/L 的油酸诱导使 HepG2 细胞内脂质大量积累, 诱导组 TC 含量显著高于空白组, 机体维持胆固醇平衡的 3 条途径分别是合成、降解、排出体外, 当用不同质量浓度的酸化蛋清粉孵育诱导的高脂 HepG2 细胞 24 h 后, 推测酸化蛋清粉中的寡肽、辅酶等促进细胞内总胆固醇的降解, 使得样品处理组细胞内 TC 含量显著低于诱导组^[32]。与 TG 清除率相比, 酸化蛋清粉对于 TC 的清除能力更强。

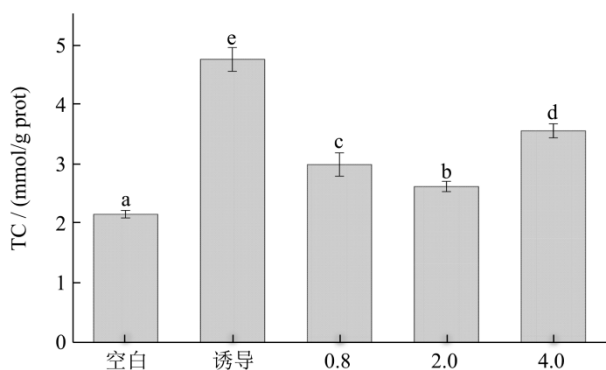


图3 不同质量浓度酸化蛋清粉孵育后 HepG2 细胞内 TC 含量
Fig.3 The intracellular TG content of HepG2 cells incubated with different concentration of acidified-egg white powder

2.5 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定

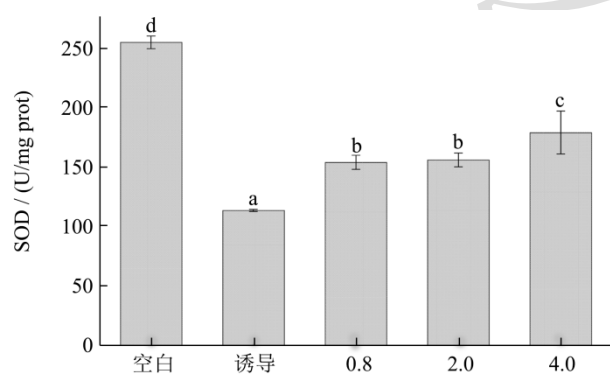


图4 不同质量浓度酸化蛋清粉孵育后 HepG2 细胞内 SOD 活性
Fig.4 SOD activity in HepG2 cells incubated with different concentration of acidified-egg white powder

由图 4 可知, 诱导组相较于空白组 SOD 活性显著降低 ($p < 0.05$), 说明油酸使细胞内 SOD 活力降低。随着酸化蛋清粉质量浓度的升高, 细胞内 SOD 含量逐渐升高。质量浓度为 0.8 mg/mL、2 mg/mL 时 SOD 活性不具有显著性差异, 与诱导组相比, SOD 活性分别升高 35.30%、37.15%; 质量浓度为 4 mg/mL 时, SOD 活性升高 57.30%。质量浓度为 4 mg/mL 时具有最显著的降血脂效果 ($p < 0.05$), 说明酸化蛋清粉能够提高细胞内 SOD 活性。氧化应激及脂质过氧化被认为是多种代谢疾病的共同病理生理基础, 清除体外多

余的自由基是目前临床上治疗许多疾病的基础。SOD 是一种活性蛋白质, 推测酸化蛋清粉激活了细胞内 SOD 的某种激活剂^[33], 使得细胞内 SOD 活性呈现剂量依赖性的上升。醋本身具有抗氧化及降血脂作用, 同时醋可以使蛋清中的蛋白质降解, 释放出的蛋白寡肽及氨基酸, 具有生物活性, 使醋的治疗功能大大的提高^[34]。

2.6 活性氧 (ROS) 荧光检测

由图 5 可知, 诱导组相较于空白组, 绿色荧光的强度显著升高, 说明油酸处理使细胞内 ROS 含量显著升高, 随着酸化蛋清粉质量浓度的升高, 视野内绿色荧光强度呈现降低趋势, 说明随着样品处理质量浓度的升高, 细胞内 ROS 含量逐渐降低。图 5 中, E 图相较于 B 图, 绿色荧光强度具有显著性降低, 这些结果表明酸化蛋清粉具有一定的抗氧化效果。细胞的过氧化酶体、胞质的需氧脱氢酶等在代谢过程中催化可产生活性氧^[35], 酸化蛋清粉可增强细胞内自由基清除能力, 降低 ROS 的产生, 从而起到抗氧化应激, 防止氧化损伤的效果。体内氧化应激损伤的重要防御机制是治疗代谢综合征心血管疾病的潜在治疗靶点^[36]。

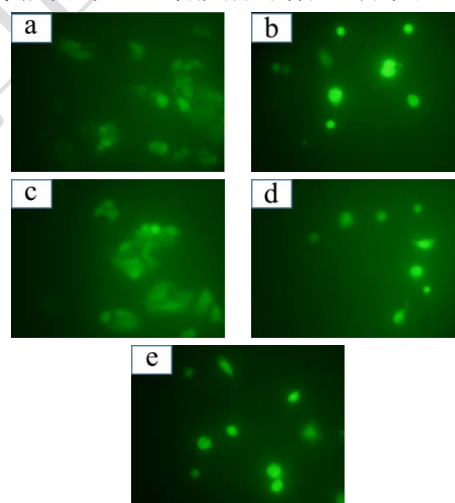


图5 不同质量浓度酸化蛋清粉孵育后 HepG2 细胞内 ROS 含量
Fig.5 The ROS content in HepG2 cells incubated with different concentration of acidified-egg white powder

2.7 DPPH 自由基清除率测定

DPPH 自由基在有机溶剂中是一种稳定的自由基, 呈紫色, 在 517 nm 处有强吸收, 在有自由基清除剂存在时, ·DPPH 的孤电子被配对, 使其颜色变浅, 在最大吸收波长处的吸光度变小, 且这种颜色的变浅程度与配对电子数成化学计量关系。因此, 可通过在此波长处吸光度的测定来评价自由基的清除情况^[37]。陈黎斌等的研究均显示, 醋蛋液酶解产物对 DPPH 自由

基高达 95.00% 以上^[38-40]。由图 6 可知,随着酸化蛋清粉质量浓度的升高,样品对 DPPH 自由基的清除能力呈现显著性升高趋势 ($p < 0.05$),且当质量浓度为 18 mg/mL 时 DPPH 自由基的清除率高达 88.58%,说明酸化蛋清粉具有显著的体外抗氧化作用。

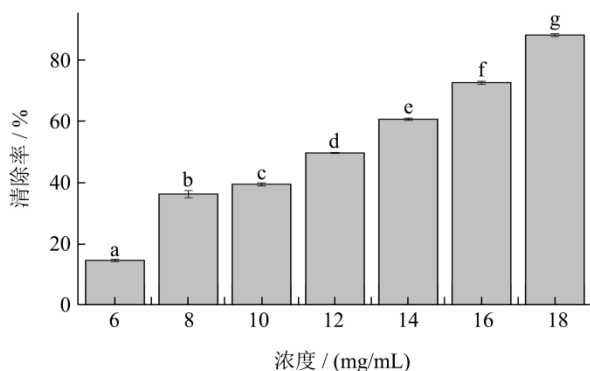


图 6 不同质量浓度酸化蛋清粉的 DPPH 自由基清除率

Fig.6 The DPPH radical scavenging rate of different concentration acidified-egg white powder

2.8 OH 自由基清除率测定

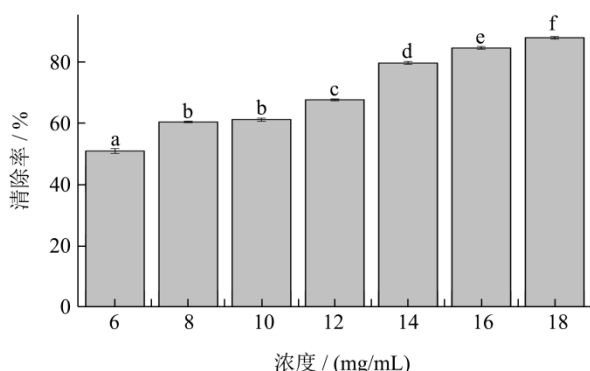


图 7 不同质量浓度酸化蛋清粉的 OH 自由基清除率

Fig.7 The OH radical scavenging rate of different concentration acidified-egg white powder

由图 7 可知,随着酸化蛋清粉质量浓度的升高,样品对 OH 自由基的清除能力呈现出显著性升高趋势 ($p < 0.05$),且当质量浓度为 18 mg/mL 时 OH 自由基的清除率达到 87.82%,说明酸化蛋清粉具有显著的体外抗氧化作用。当酸化蛋清粉的质量浓度达到一定值后,其清除率增加的趋势趋于平缓。体系具有显著的体外抗氧化能力,醋制作过程中产生的总酚、总黄酮等具有较强的抗氧化作用,食醋中的蛋白对抗氧化起重要作用^[41],醋浸泡蛋清的过程中蛋清会产生一些抗氧化肽清除 OH 自由基。

3 结论

1.0 mol/L 油酸诱导 HepG2 细胞 24 h 后,经油红 O 染色、TG、TC 含量测定可以证明诱导组成功建立

高脂模型,随着酸化蛋清粉处理浓度升高,TG、TC 含量都表现出不同程度的降低,说明酸化蛋清粉具有一定的降血脂效果,其中,当酸化蛋清粉浓度为 2.0 mg/mL 时 TG 和 TC 的清除率分别达到 27.27%、44.66%。细胞内 SOD 活性测定及 ROS 的荧光检测结果显示酸化蛋清粉具有抗氧化作用,同时体外的抗氧化实验也证明酸化蛋清粉具有浓度依赖性的 DPPH 和 OH 自由基清除能力,当酸化蛋清粉浓度 18 mg/mL 时,其 DPPH 和 OH 自由基清除率分别为 88.58%、87.82%。结果证明酸化蛋清粉具有显著的体外降脂及抗氧化作用。酸化蛋清粉降血脂的作用机理尚不明确,需要进一步对其降脂通路及具体降脂活性成分进行探究。

参考文献

- [1] 余林德,陈占利.中西医治疗高脂血症临床研究进展[J].亚太传统医药,2014,10(22):35-38
YU Lin-de, CHEN Zhan-li. Clinical research progress of Chinese and western medicine in the treatment of hyperlipidemia [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2014, 10(22): 35-38
- [2] Clark A M, Desmeules M, Luo W, et al. Socioeconomic status and cardiovascular disease: risks and implications for care [J]. Nature Reviews Cardiology, 2009, 6(11): 712-722
- [3] 莫言主编.医用自由基生物学导论[M].北京:人民卫生出版社,1989
Editor-in-chief of MO Yan. Introduction to Medical Free Radical Biology [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1989
- [4] Suzuki S. Comparative free radical scavenging action of angiotensin converting enzyme inhibitor with and without the sulfhydryl radical [J]. Pharmacology, 1993, 47(1): 61-65
- [5] Cuzmcrea S, Riley D, Ceputi A P, et al. Antioxidant therapy: a phamiacological approach in shock, in tlamation, and ieche-mia/mpfusion injury [J]. Pharmaeol Rev, 2001, 53: 135-139
- [6] 陈黎斌,王烈喜,姚玉静,等.醋蛋抗氧化活性研究进展[J].中国调味品,2012,37(2):21-24
CHEN Li-bin, WANG Lie-xi, YAO Yu-jing, et al. Progress in antioxidant activity of vinegar-egg [J]. Chinese Condiments, 2012, 37 (2): 21-24
- [7] 王灿楠,贺珍,杨向东,等.醋蛋液营养价值的动物实验研究[J].中国公共卫生,1994,10:375
WANG Can-nan, HE Zhen, YANG Xiang-dong, et al. Animal experimental study on the nutritional value of vinegar-egg juice [J]. Public Health of China, 1994, 10:375

- [8] Hanefeld M. The role of acarbose in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus [J]. *Journal of Diabetes & Its Complications*, 1998, 12(4): 228-237
- [9] 安冬梅,孟长军.醋蛋液研究的最新进展[J].*中国酿造*, 2012, 31(7):22-24
AN Dong-mei, MENG Chang-jun. Recent progress in vinegar egg juice research [J]. *Brewing in China*, 2012, 31 (7): 22-24
- [10] Cara L. Overview of the guidelines and evidence for the pharmacologic management of type 2 diabetes mellitus [J]. *Pharmacotherapy*, 2011, 31(12Suppl): 37S-43S
- [11] 王丹波,王林富,许加广,等.醋蛋液浸泡中蛋白质的变化及醋蛋粉的制备研究[J].*食品科技*,2006,31(5):48-50
WANG Dan-bo, WANG Lin-fu, XU Jia-guang, et al. Protein changes in vinegar egg soaking and preparation of vinegar-egg powder [J]. *Food Science and Technology*, 2006, 31(5): 48-50
- [12] 吴桂贞,陈黎斌.醋蛋液制作工艺的确定及醋蛋液的酶解[J].*安徽农业科学*,2007,35(7):2078-2079,2130
WU Gui-zhen, CHEN Li-bin. The determination of vinegar-egg foaming technology and enzymatic hydrolysis of vinegar-egg juice [J]. *Anhui Agricultural Science*, 2007, 35(7): 2078-2079, 2130
- [13] 王莘,苏玉春,董浩,等.蛋类的不同加工工艺对脂肪、胆固醇含量的影响[J].*食品工业科技*,2005,5:159-161
WANG Shen, SU Yu-chun, DONG Hao, et al. Effects of different egg processing technologies on fat and cholesterol content [J]. *Food Industry Technology*, 2005, 5: 159-161
- [14] 杜卓英,王电垒,朱光州.醋蛋液生产技术[J].*中国调味品*, 1993,3:20-22
DU Zhuo-ying, WANG Dian-lian, ZHU Guang-zhou. Production technology of vinegar-egg juice [J]. *Chinese Condiment*, 1993, 3: 20-22
- [15] 杨萍芳.醋蛋液的营养成分分析[J].*检测与分析*,2007,9:36-38
YANG Ping-fang. Nutritional composition analysis of vinegar-egg solution [J]. *Detection and Analysis*, 2007, 9: 36-38
- [16] 艾华,吴玲,陈吉棣,等.醋蛋液调节血脂和抗氧化作用的初步实验研究[J].*食品科学*,1997,18(10):3-5
AI Hua, WU Ling, CHEN Ji-di, et al. Preliminary experimental study on the effects of vinegar-egg juice on blood lipid and antioxidation [J]. *Food Science*, 1997, 18(10): 3-5
- [17] 赖晓全,黄连珍,于东,等.醋蛋液对高脂饲料大鼠血脂的影响[J].*中国公共卫生学报*,1996,15(5):288-289
LAI Xiao-quan, HUANG Lian-zhen, YU Dong, et al. Effects of vinegar-egg liquid on blood lipid of rats fed with high fat diet [J]. *Journal of Public Health of China*, 1996, 15(5): 288-289
- [18] 李琳,王红,闫桂华,等.高血压病的九度醋蛋治疗和血液流变学观察[J].*医学理论与实践*,1995,6:265-266
LI Lin, WANG Hong, YAN Gui-hua, et al. Nine degree vinegar-egg treatment and hemorheological observation of hypertension [J]. *Medical Theory and Practice*, 1995, 6: 265-266
- [19] 张娜,李笑梅.醋蛋液浸泡工艺确定及氨基酸组分分析[J].*中国调味品*,2010,35(11):73-76
ZHANG Na, LI Xiao-mei. Soaking technology of vinegar-egg liquid and analysis of amino acid composition [J]. *Chinese Condiment*, 2010, 35(11): 73-76
- [20] Xin M, Sun Y, Chen H, et al. Propylene glycol guluronate sulfate (PGGS) reduces lipid accumulation *via* AMP-activated kinase activation in palmitate-induced HepG2 cells [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114(15): 26-34
- [21] Mehdizadeh A, Bonyadi M, Darabi M, et al. Common chemotherapeutic agents modulate fatty acid distribution in human hepatocellular carcinoma and colorectal cancer cells [J]. *Bioimpacts*, 2017, 7(1): 31-39
- [22] Zhang L, Li H X, Pan W S, et al. Novel hepatoprotective role of Leonurine hydrochloride against experimental non-alcoholic steatohepatitis mediated *via* AMPK/SREBP1 signaling pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 110: 571-581
- [23] Toppo A J, Chandra S, Jha D, et al. *In vitro* evaluation of anti-acetylcholinesterase and free radical scavenging potential of leaf extracts of some selected medicinal plants [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2019, 9(2): 60-65
- [24] Perezgonzalez A, Galano A. OH radical scavenging activity of edaravone: mechanism and kinetics [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115(5): 1306-14
- [25] Ju J, Zheng Z, Xu Y J, et al. Influence of total polar compounds on lipid metabolism, oxidative stress and cytotoxicity in HepG2 cells [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2019, 18(1): 37
- [26] Miura K, Yang L, van-Rooijen N, et al. Tolllike receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice [J]. *Hepatology*, 2013, 57(2): 577-589

- [27] Wen-Chung H, Ya-Ling C, Hui-Chia L, et al. Ginkgolide C reduced oleic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells [J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2018, 26(8): 1178-1184
- [28] Xiang D, Chu T, Li M, et al. Effects of pyrethroid pesticide, cis-bifenthrin on lipogenesis in hepatic cell line [J]. Chemosphere, 2018: 201
- [29] Xu Yu, Zhang Xuan, Yan Xiao-Hui, et al. Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 706-716
- [30] Shi W, Hou T, Liu W, et al. The hypolipidemic effects of peptides prepared from *Cicer arietinum* in ovariectomized rats and HepG2 cells [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2018, 99(2): 576-586
- [31] 安冬梅,孟长军.醋蛋液研究的最新进展[J].中国酿造, 2012,31(7):22-24
AN Dong-mei, MENG Chang-jun. Recent progress in vinegar-egg juice research [J]. Brewing in China, 2012, 31(7): 22-24
- [32] 张珊,郭俊霞,张艳贞,等.牛磺酸对 HepG2 细胞胆固醇水平的影响[J].食品科学,2014,35(23):284-287
ZHANG Shan, GUO Jun-xia, ZHANG Yan-zhen, et al. Effects of taurine on cholesterol levels in HepG2 cells [J]. Food Science, 2014, 35(23): 284-287
- [33] Liang R, Zhang Z, Lin S. Effects of pulsed electric field on intracellular antioxidant activity and antioxidant enzyme regulating capacities of pine nut (*Pinus koraiensis*) peptide QDHCH in HepG2 cells [J]. Food Chemistry, 2017, 237: 793-802
- [34] Fushimit, Tayamak, Fukayam, et al. Acetic acid enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats [J]. J Nutrit, 2001, 131(7): 1973-1977
- [35] 何胜,张元,梁海燕,等.虾钳草、叶里含珠对 $\cdot\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$ 清除率影响的实验研究[J].当代医学,2011, 8:3-4
HE Sheng, ZHANG Yuan, LIANG Hai-yan, et al. Experimental study on the effects of shrimp forceps and pearl in leaves on the clearance rates of $\cdot\text{O}_2$ and $\cdot\text{OH}$ [J]. Contemporary Medicine, 2011, 8: 3-4
- [36] 陈继承.醋粉中降血脂成分筛选及其对脂质代谢的调控[D].杭州:浙江大学,2011
CHEN Ji-cheng. Screening of hypolipidemic components in vinegar powder and their regulation on lipid metabolism [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011
- [37] Elsharif S S, Gendy E N G E, Elshamy A I, et al. Chemical composition and TLC-DPPH-Radical scavenging activity of cyperus alternifolius rothb. essential oils [J]. Journal of Essential Oil-Bearing Plants JEOP, 2018, 20(4): 1125-1130
- [38] Mayara T F, Nayara S, Ryan R, et al. An antioxidant potential, quantum-chemical and molecular docking study of the major chemical constituents present in the leaves of *curatella americana* linn [J]. Pharmaceuticals, 2018, 11(3): 72
- [39] 于娅.牡蛎活性肽的制备及生物活性研究[D].无锡:江南大学,2004
YU Ya. Preparation and biological activity of oyster active peptide [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2004
- [40] 李亚辉,马艳弘,黄开红,等.响应面法优化复合酶提取芦荟多糖工艺及其抗氧化活性分析[J].食品科学,2014,35(18): 63-68
LI Ya-hui, MA Yan-hong, HUANG Kai-hong, et al. Response surface methodology for optimizing the extraction of polysaccharide from *aloe vera* by complex enzyme and analysis of its antioxidant activity [J]. Food Science, 2014, 35(18): 63-68
- [41] 张盛,景浩.食醋中主要抗氧化成分的分析研究[J].农产品加工,2012,2:75-78
ZHANG Sheng, JING Hao. Analysis and study on the main antioxidant components in vinegar [J]. Processing of Agricultural Products, 2012, 2: 75-78