

羊乳酪蛋白酶解物对秀丽线虫衰老的改善作用

朱秋轶¹, 宋玉¹, 刘星雨¹, 刘果¹, 潘婉婷¹, 曹素芳², 陈薛琪¹, 乔子骄¹, 彭小雨², 潘丽娜², 曹庸^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 澳优乳业(中国)有限公司, 湖南长沙 410000)

摘要: 该研究利用秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)模型研究了羊乳酪蛋白酶解物(Goat Milk Casein Hydrolysates, GMCH)的抗衰老及体内外抗氧化作用。通过对比 GMCH 实验组和大肠杆菌对照组秀丽线虫的寿命、运动能力、脂褐素水平等指标来研究 GMCH 的抗衰老作用, 通过自由基清除实验以及测定线虫体内抗氧化酶活性评价 GMCH 的体内外抗氧化活力, 同时测定秀丽线虫在过氧化氢、百草枯及热应激条件下的寿命。结果表明, 与对照组相比, 喂食 0.1 mg/mL 羊乳酪蛋白酶解物的线虫的平均寿命延长 9.33%, 体内脂褐素水平降低了 65.00%, 同时 GMCH 对线虫的生殖能力和运动能力没有负面影响, 对线虫氧化应激和热应激有一定的保护作用; GMCH 具有一定的体外抗氧化能力并且能够提高线虫体内抗氧化酶活力, 与对照组相比, 实验组 SOD 活力提高 43.30%、CAT 活力提高 124.40%、GSH 活力提高 176.90%、MDA 含量降低 78.70%。综上所述, GMCH 能够延长线虫的寿命, 降低线虫体内脂褐素积累, 提高线虫在应激条件下的抵抗能力和体内抗氧化酶活力, 具有较好的抗衰老活性。

关键词: 羊乳酪蛋白酶解物; 延缓衰老; 秀丽隐杆线虫; 氧化应激; 抗氧化酶

文章编号: 1673-9078(2023)06-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0466

Ameliorating Effect of Goat Milk Casein Hydrolysates on Senescence of *Caenorhabditis elegans*

ZHU Qiuyi¹, SONG Yu¹, LIU Xingyu¹, LIU Guo¹, PAN Wanting¹, CAO Sufang², CHEN Xueqi¹, QIAO Zijiao¹, PENG Xiaoyu², PAN Lina², CAO Yong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Australian Dairy (China) Co. Ltd., Changsha 410000, China)

Abstract: In this study, the anti-aging and antioxidant activities of goat milk casein hydrolysates (GMCH) were studied *in vitro* and *in vivo* using a *Caenorhabditis elegans* model. The anti-aging effect of GMCH was studied by comparing the lifespan, exercise ability, lipofuscin level and other indicators of *Caenorhabditis elegans* between the GMCH experimental group and the *E. coli OP50* control group. The *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of GMCH were evaluated by the free radical scavenging experiment and the activities of antioxidant enzymes in *C. elegans*. At the same time, the lifespan of *C. elegans* under hydrogen peroxide, paraquat and heat stress conditions were determined. The results showed that compared with the control group, the average lifespan of the nematode fed with 0.1 mg/mL goat casein hydrolysate was prolonged by 9.33%, and the lipofuscin level in the body decreased by 65.00%. Meanwhile, GMCH had no negative impact on the reproductive and motor ability of the nematode, and had a certain protective effect on oxidative stress and heat stress of the nematode. GMCH had a certain *in vitro* antioxidant capacity and could improve the activities of antioxidant enzymes *in vivo*. Compared with the control group, the SOD activity of the experimental group increased by 43.30%, the CAT activity increased by 124.40%, the GSH activity increased by 176.90%, and the MDA content decreased by 78.70%. In summary, GMCH can prolong the lifespan of nematodes, reduce lipofuscin accumulation in nematodes, improve the resistance and the activities of antioxidant enzyme inside the body of nematodes under stress conditions, thereby having a good anti-aging activity.

引文格式:

朱秋轶, 宋玉, 刘星雨, 等. 羊乳酪蛋白酶解物对秀丽线虫衰老的改善作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(6): 1-9.

ZHU Qiuyi, SONG Yu, LIU Xingyu, et al. Ameliorating effect of goat milk casein hydrolysates on senescence of *Caenorhabditis elegans* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 1-9.

收稿日期: 2022-04-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972078); 中国博士后面上项目(2020M672651); 湖南省营养健康食品工程技术研究中心创新平台与人才计划(2019TP2066)

作者简介: 朱秋轶(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1842424908@qq.com

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学、天然产物化学, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

Key words: goat milk casein hydrolysates; ag-delaying; *Caenorhabditis elegans*; oxidative stress; antioxidase

随着现代社会的发展,人口老龄化趋势日益加重,衰老及衰老相关疾病成为人们关心的社会问题之一。目前,自由基理论是最为流行的衰老理论之一。自由基理论指出,机体的新陈代谢过程中有大量自由基产生,这些自由基会引起细胞损伤进而导致衰老^[1]。活性氧自由基的积累会造成脂质过氧化反应的发生,打破体内自由基产生与消除的平衡,进一步加速机体衰老^[2]。衰老从另一方面来说是自由基损伤累积的结果,因此控制体内的氧化系统平衡对于抗衰老及预防衰老相关疾病至关重要。

与牛乳相比,羊乳的蛋白质和脂肪特性等更接近人乳,更适合各类人群饮用^[3]。酪蛋白是牛乳和羊乳中的主要蛋白质,含有多种氨基酸,其酶解产物具有丰富的生物活性。如:Shu等^[4]使用4种商业酶分别对羊乳源和牛乳源酪蛋白进行酶解,结果表明碱性蛋白酶处理组产物的水解度和血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性最高,同时羊乳源酪蛋白酶解产物的ACE抑制活性高于牛乳源酪蛋白酶解产物。李志成等^[5]对山羊乳酪蛋白酶解工艺进行优化,经过酶解后的山羊乳酪蛋白体外抗氧化活性显著增强。而羊乳酪蛋白酶解物的抗衰老活性鲜有报道。

秀丽隐杆线虫作为经典的生物学模型,已经在衰老研究领域得到了广泛应用。秀丽线虫生活在温带土壤中,具有生命周期短,繁殖能力强,体积小、易于培养等优点^[6],并且与人类基因有80%的同源性^[7]。最近的研究表明秀丽线虫寿命的延长与抵抗环境压力的能力之间具有强相关性,Luo等^[8]的研究表明0.75 mmol/L剂量的人参寡肽显著延长秀丽线虫的寿命,同时提高秀丽线虫的抗氧化应激和抗热应激能力;Chen等^[9]喂养秀丽线虫柚粗黄酮,结果表明柚粗黄酮能够延长线虫在正常和氧化应激下的寿命,同时增加内源性抗氧化防御系统中主要酶的活性。

本研究在前期实验的基础上,通过体内和体外实验评价GMCH的抗衰老、抗氧化活性,探索其中潜在抗衰老天然活性物质,为羊乳资源的深度开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

羊乳酪蛋白,澳优乳业有限公司;谷胱甘肽、ABTS,上海易恩化学技术有限公司;DPPH,莱恩生物科技有限公司;生化分析试剂盒均购于南京建

成生物工程研究所;其他试剂均为国产分析纯。

EnSpire 酶标仪,美国PerkinElmer公司;LRH系列生化培养箱,上海一恒科技有限公司;体式显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司;倒置荧光显微镜,上海蔡康光学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 GMCH的制备

称取一定质量的酪蛋白置于锥形瓶中,以料液比1:10加入一级去离子水,胰蛋白酶添加量为0.4% (m/m),酶解2.5 h,酶解过程用2 mol/L的NaOH溶液调整酶解液的pH值为8.0,酶解温度控制为40℃。酶解结束后95℃灭酶10 min,冷却到室温,10 000 r/min离心15 min去除酶及未被酶解的蛋白质等大分子物质,随后冻干得到GMCH干粉。

1.2.2 线虫的培养

根据林春秀等^[10]的方法将*E. coli OP50*涂布至线虫生长培养基(Nematode Growth Medium, NGM),随后将线虫转移至培养*E. coli OP50*的平板上,所有线虫都在20℃恒温恒湿培养箱中培育。

1.2.3 线虫的同期化

参考文献^[11]的方法,用M9缓冲溶液将年轻成虫冲洗至无菌EP管中,将一级水、NaOH和 $m=10\%$ NaClO按体积比1:1:1混合作为秀丽线虫裂解液,将裂解物与无菌EP管中混合,震荡后置于低速离心机上3 000 r/min离心1 min,弃上清,再用M9冲洗线虫2次,离心弃上清后用移液枪吸取EP管底部虫卵滴于涂菌后的NGM培养基上,约48 h后裂解的线虫体内的受精卵基本发育成L4期幼虫,完成同步化。

1.2.4 给药途径

试验操作参考文献^[12]的方法,以质量浓度1 mg/mL配置GMCH样品溶液,经0.22 μm孔径无菌滤头过滤除菌,将除菌后的样品溶液和*E. coli OP50*溶液以1:9的比例充分混合并涂布在NGM培养基表面,对照组中样品溶液以等体积无菌水替代。

1.2.5 寿命测定

试验操作参考Chen等^[13]的方法并略作改动,将同期化后的虫卵转移至药物处理板和空白对照板,每组3个平行,每个平行60条线虫。给药从同期化第一天开始,在产卵期间,每天将线虫转移至新的NGM板中,此后每隔一天转移一次。每天计数死亡线虫,直至所有个体死亡,对轻微机械刺激没有反应的线虫个体视为死亡,体内孵化的线虫和逃逸的线虫不在计

数范围内, 实验组与对照组同时进行。线虫平均寿命公式为:

$$N = \frac{1}{n} \sum_j \frac{x_j + x_{j+1}}{2} dj \quad (1)$$

式中:

N —线虫平均寿命, d;

j —年龄天数, d/h;

dj —死于年龄区间 (x_j, x_{j+1}) 线虫的数量;

n —线虫的总数。

1.2.6 脂褐素的测定

试验操作参考文献^[14]的方法并略作改动, 野生型 N2 线虫在同期化后的第 1 天开始给药, 每组 3 个平行, 每个平行约 15 条秀丽线虫, 每天将秀丽线虫挑至新的药物板, 培养 7 d 后, 将线虫用 $m=5\%$ NaN_3 麻醉, 放在滴有 $m=8\%$ 琼脂糖垫的载玻片上。使用倒置荧光显微镜在 485 nm 激发波长和 530 nm 发射波长下测量总 GFP 荧光, 采用 10 倍物镜。使用 Image J 软件测量线虫肠道中的平均荧光强度, 整理数据并作图。

1.2.7 运动能力的测定

野生型 N2 线虫在同期化后的第一天开始给药, 每组 3 个平行, 每个平行约 15 条秀丽线虫, 每天将秀丽线虫挑至新的药物板, 在第 3 天、第 7 天和第 11 天时将线虫挑至未涂菌的 NGM 培养基上, 使用体式显微镜观察线虫的运动, 记录线虫在 30 s 内的头部摆动次数^[15]。随后测定线虫的移动力, 根据线虫对机械刺激的反应将其分为三类 (A 类: 线虫自发运动, 不需要机械刺激; B 类: 线虫必须受到机械刺激才运动; C 类: 线虫受到触碰刺激后只摆动头或尾), 数据结果用百分比表示^[11]。

1.2.8 H_2O_2 诱导的氧化应激寿命测定

试验操作参考 Lin 等^[16]的方法, 挑取 60 只药物处理 72 h 的线虫暴露于含有 $\varphi=0.1\%$ H_2O_2 的 NGM 培养基中, 其中 H_2O_2 体积分数为 30%。每隔 30 min 观察并记录各组线虫的死亡情况, 直至所有线虫死亡, 线虫死亡判定标准同寿命实验。

1.2.9 百草枯诱导的氧化应激寿命测定

实验操作参考文献^[11]的方法, 野生型 N2 线虫在同期化后的第一天开始给药, 每组 3 个平行, 每个平行约 50 条秀丽线虫, 给药处理 72 h 后将线虫转移至百草枯浓度为 10 mmol/L 的线虫生长培养基中, 每天记录各组线虫的死亡情况, 直至所有线虫死亡, 线虫死亡判定标准同寿命实验。

1.2.10 热应激下的寿命测定

热应激试验操作参考 Li 等^[17]的方法, 野生型 N2 线虫在同期化后的第 1 天开始给药, 每组 3 个平行,

每个平行 60 条秀丽线虫, 将同期化 72 h 后的线虫从 20 °C 的培养箱转移到 37 °C 培养箱中培养, 每隔 1 h 观察并记录各组线虫的死亡情况, 直至所有线虫死亡, 线虫死亡判定标准同寿命实验。

1.2.11 生殖能力测定

试验操作参考文献^[18]的方法并略作改动, 每个实验组 5 个板, 每板 2 条线虫, 线虫同期化 48 h 后挑取至各板, 此时记为第一天, 每隔 24 h 将线虫转移至新板中, 直至线虫不再产卵, 所有产卵板置于 20 °C 恒温恒湿培养箱中孵育, 48 h 后计数即为产卵量。

1.2.12 体外抗氧化活性的测定

1.2.12.1 DPPH 自由基清除活性测定

参考刘星雨等^[19]的方法, 取 96 孔板, 每孔中加入 50 μL 样品 (1 mg/mL) 和 150 μL DPPH 反应液 (0.5 mmol/L), 轻微震荡混匀, 室温下避光反应 30 min, 在 517 nm 波长下测定 OD 值 (A_2), 上述反应中, 一级水替代样品测定的 OD 值为空白 (A_0), 一级水替代 DPPH 反应液测定的 OD 值为空白 (A_1)。以谷胱甘肽作为阳性对照组, 每个实验组设置 3 个平行。DPPH 自由基清除率公式为:

$$C_1 = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C_1 —DPPH 自由基清除率, %;

A_0 —一级水替代样品测定的 OD 值;

A_1 —一级水替代 DPPH 反应液的 OD 值;

A_2 —样品与 DPPH 反应液混匀的 OD 值。

1.2.12.2 ABTS⁺ 自由基清除活性测定

参考文献^[19]的方法, 将 ABTS 溶液 (7 mmol/L) 和过硫酸钾溶液 (2.45 mmol/L) 以 1:1 比例混匀, 室温条件下避光反应 12~16 h, 形成 ABTS⁺。用一级水将 ABTS⁺ 溶液稀释 20 倍, 使稀释后的 ABTS⁺ 溶液在 734 nm 处吸光值为 0.7。取 96 孔板, 每孔中加入 100 μL 样品溶液和 100 μL ABTS⁺ 稀释液, 轻微震荡混匀, 37 °C 条件下恒温避光反应 10 min, 在 734 nm 波长下测定 OD 值 (A_2)。上述反应中, 一级水替代样品测定的 OD 值为空白 (A_0), 一级水替代 ABTS⁺ 稀释液测定的 OD 值为空白 (A_1)。以谷胱甘肽作为阳性对照组, 每个实验组设置 3 个平行。ABTS⁺ 自由基清除率公式为:

$$C_2 = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C_2 —ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_0 —一级水替代样品的 OD 值;

A_1 ——一级水替代 ABTS⁺ 稀释液的 OD 值;

A_2 ——样品与 ABTS⁺ 稀释液混匀的 OD 值。

1.2.12.3 超氧阴离子自由基清除活性测定

参考文献^[19]的方法, 一级水配置 Tris-HCl 溶液 (50 mmol/L, pH 值 8.2)、邻苯三酚溶液 (25 mmol/L)、盐酸溶液 (8 mol/L), 上述溶液提前在 25 °C 恒温水浴锅中保温 10 min。取 96 孔板, 每孔加入 120 μ L Tris-HCl 溶液、40 μ L 样品溶液和 20 μ L 邻苯三酚溶液, 25 °C 下准确反应 5 min 后加入 20 μ L 盐酸溶液终止反应, 在 420 nm 波长下测定 OD 值 (A_2)。上述反应中, 一级水替代样品测定的 OD 值为空白 (A_0), 一级水替代邻苯三酚溶液测定的 OD 值为空白 (A_1)。以谷胱甘肽作为阳性对照组, 每个实验组设置 3 个平行。超氧自由基清除率公式为:

$$C_3 = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

C_3 ——超氧阴离子自由基清除率, %;

A_0 ——为一级水替代样品的 OD 值;

A_1 ——为一级水替代邻苯三酚的 OD 值;

A_2 ——为样品与邻苯三酚反应的 OD 值。

1.2.12.4 羟自由基清除活性测定

参考文献^[19]的方法略作改动。将配置好的样品溶液 (1 mg/mL)、硫酸亚铁溶液 (3 mmol/L)、过氧化氢溶液 (9 mmol/L)、水杨酸乙醇溶液 (6 mmol/L) 提前在 37 °C 下恒温预热 10 min, 取 96 孔板, 每孔中加入 20 μ L 样品、60 μ L 硫酸亚铁溶液、60 μ L 过氧化氢溶液、60 μ L 水杨酸乙醇溶液, 轻微震荡, 37 °C 恒温避光反应 30 min, 510 nm 处测定 OD 值 (A_2), 上述反应中一级水替代样品测定的 OD 值为空白 (A_0)、一级水替代过氧化氢溶液与硫酸亚铁溶液测定的 OD 值为对照 (A_1)。以谷胱甘肽为阳性对照组, 每个实验组设置 3 个平行, 羟基自由基清除率公式为:

$$C_4 = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\% \quad (5)$$

式中:

C_4 ——羟基自由基清除率, %;

A_0 ——一级水替代样品的 OD 值;

A_1 ——一级水替代过氧化氢、硫酸亚铁混合液的 OD 值;

A_2 ——样品与硫酸亚铁、过氧化氢和水杨酸乙醇溶液混匀的 OD 值。

1.2.13 体内抗氧化酶活性的测定

参考文献^[20]的方法略作改动, 野生型 N2 线虫在同期化后的第 1 天开始给药, 每组 3 个平行, 给药 96 h 后用 M9 缓冲液将线虫冲洗并收集至 EP 管中, 每管

线虫数量不少于 1 000 条, 生理盐水反复清洗 3 次, 将线虫匀浆, 随后使用高速冷冻离心机在 4 °C 下以 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清备用。按照南京建成生物工程研究所试剂盒的说明书对秀丽线虫匀浆液中 SOD 活力、CAT 活力、GSH 活力和 MDA 含量进行测定。

1.3 数据分析

所有实验均至少重复三次, 采用 Graphpad Prism 7.0 绘制图表, 结果以平均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 并通过 SPSS1 9.0 软件采用单因素方差分析法进行显著性分析, $P < 0.05$ 为显著差异。其中, 生存曲线使用 Graphpad Prism 软件进行 log-rank 检验分析显著性。

2 结果与讨论

2.1 对延缓秀丽线虫衰老的影响

2.1.1 寿命的测定

在标准培养条件下, 野生型秀丽线虫的寿命约为 2~3 周。由图 1 可知, 与对照组相比实验组对秀丽线虫的寿命延长有促进作用, 线虫生存曲线显著右移。由表 2 可知, 秀丽线虫的平均寿命延长了 9.33% ($P < 0.05$), 中位寿命延长了 14.07% ($P < 0.05$), 最大寿命延长了 14.06% ($P < 0.05$)。结果表明, GMCH 能明显延长线虫的寿命。大量研究表明, 乳源蛋白中含有具有抗衰老作用的肽段。刘星雨等^[19]从牛乳酪蛋白酶解物中筛选出 4 条含 14~19 个氨基酸的活性肽段, 使用活性肽含量为 13.28% 的酶解物进行线虫寿命实验, 样品组线虫平均寿命延长了 17.27%。沈鹏等^[21]以 4 mg/mL 的乳源性小肽 DELQ 喂养线虫, 相较于对照组, 线虫的平均寿命延长了 7.20%, 最大寿命延长了 3 d。

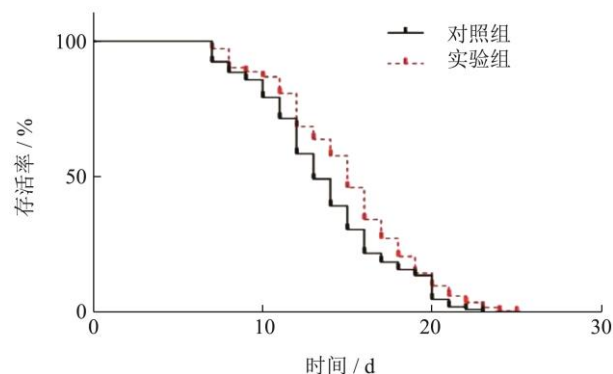


图 1 标准条件下野生型 N2 的存活曲线

Fig.1 The effect of flavonoid extract from milk derived sleep-promoting peptide on the lifespan of *C. elegans*

2.1.2 脂褐素的测定

脂褐素随线虫年龄增长而增多,聚集在肠道,是线虫机体衰老过程中细胞损伤的标志物,能够自发荧光^[22]。由图 2 所示,经 GMCH 处理后,脂褐素积累明显受到抑制,实验组脂褐素水平相较于对照组降低了 65.06% ($P<0.05$)。结果表明,GMCH 有较好的抗衰老作用,能够有效降低线虫体内的脂褐素水平。有研究表明,在 280 $\mu\text{g/mL}$ 的给药质量浓度下,在第 8 天时,紫薯提取物组线虫体内脂褐素积累较空白组降低 33.9%^[23]。

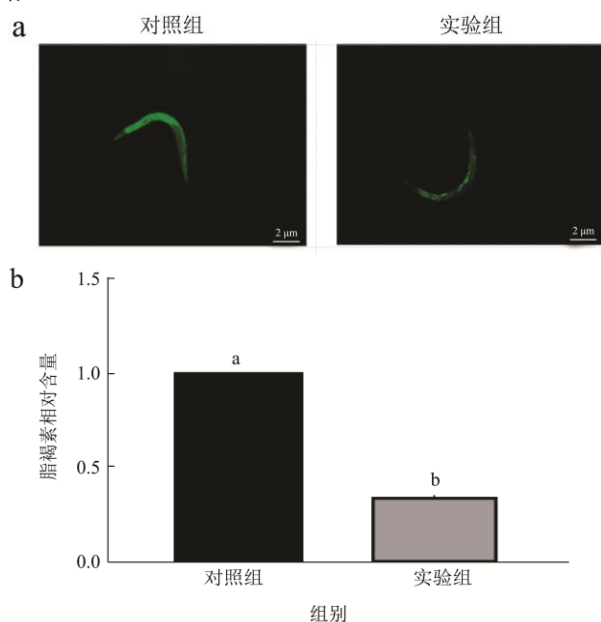


图 2 GMCH 对线虫体内相对脂褐素含量的影响

Fig.2 Effect of goat milk casein hydrolysates on the content of lipofuscin in *C. elegans*

注:图中不同小写字母表示统计学差异显著 ($P<0.05$);下同。

2.1.3 运动能力的测定

随着年龄的增长的,线虫的肌肉发生退化,运动能力随之下降^[18]。为了确定 GMCH 是否可以通过增强运动能力来延长寿命,我们测试了 GMCH 处理在线虫不同生命阶段对其头摆次数和移动力的影响。如图 3a 所示,与空白对照组相比,实验组线虫在第 3 天、第 7 天和第 11 天的头部摆动次数均分别增加 13.45%, 11.41% 和 5.05%, 并且在第 7 天时实验组与对照组的头部摆动次数有显著差异 ($P<0.05$)。如图 3b 所示,线虫的年龄与移动力呈负相关,随着线虫年龄的增加,自发运动线虫所占的比例逐渐减少,但是实验组和对照组的移动力水平无显著性差异。结果表明,GMCH

在延长线虫寿命的同时,对其运动能力没有负面影响。

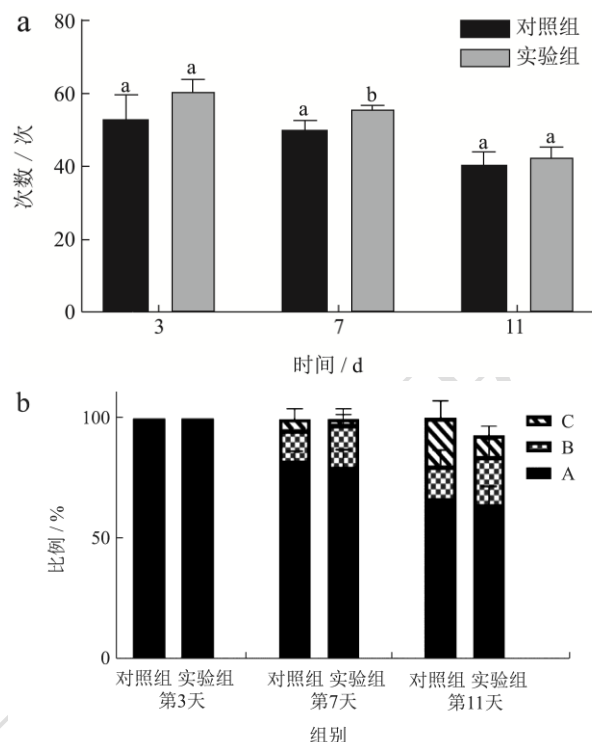


图 3 GMCH 对秀丽隐杆线虫的运动能力的影响

Fig.3 The effect of goat milk casein hydrolysates on motor capacity of *C. elegans*

2.1.4 生殖能力的测定

“利弊权衡”机制表明延长寿命将以降低或失去生殖能力为代价^[24],所以研究 GMCH 对线虫生殖能力的影响至关重要。如图 4 所示,与对照组相比,实验组的产卵量在第 1 天时和第 2 天有所增多(65.97%),在第 3 天时有所减少(62.65%),但线虫的总产卵量并无显著差异。说明 GMCH 并不是以牺牲生殖能力为代价来延长寿命的。

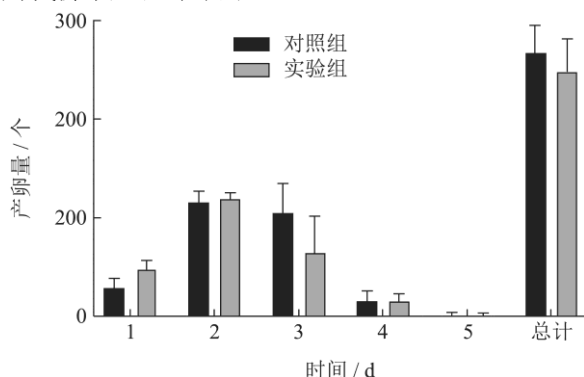


图 4 GMCH 对线虫生殖能力的影响

Fig.4 The effect of goat milk casein hydrolysates on the fertility of *C. elegans*

表 1 GMCH 对自由基的清除率

Table 1 Free radical scavenging rate of goat milk casein hydrolysates

| 抗氧化活性指标 | 清除率/% | | | |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | DPPH 自由基 | ABTS ⁺ 自由基 | 超氧阴离子自由基 | 羟自由基 |
| 谷胱甘肽 (0.1 mg/mL) | 34.15±1.43 ^a | 11.43±3.26 ^a | 44.24±2.27 ^a | 10.52±1.49 ^a |
| GMCH (0.1 mg/mL) | 23.71±1.12 ^b | 6.90±1.20 ^b | 27.84±1.92 ^b | 7.87±0.58 ^a |

注: 表中每行不同小写字母表示统计学差异显著 ($P<0.05$); 下表同。

2.2 体外抗氧化活性测定

自由基衰老理论提出, 增强抗氧化能力与延缓衰老密切相关, 因此我们研究了 GMCH 的抗衰老作用是否跟抗氧化能力有关。首先, 采用 4 种自由基清除实验评价 GMCH 的体外抗氧化活性。由表 1 可知, GMCH 具有一定的 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基清除能力, 相同浓度下, 效果分别为谷胱甘肽的 62.94% 和 69.65%。GMCH 清除 ABTS 自由基和羟自由基的能力相对较弱, 分别为 6.90% 和 7.87%, 其中羟自由基清除率与阳性对照组无显著性差异。

综上所述, GMCH 有一定的体外抗氧化能力, 其中 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基清除能力较强, ABTS⁺自由基和羟自由基清除能力较弱。有研究在料液比为 3:50, 中性蛋白酶和碱性蛋白酶的添加量分别为 4 000 U/g 和 250 U/g, 酶解物温度 45 °C, 酶解时间 24 h 的条件下对山羊乳酪蛋白进行酶解, 得到的酶解物有较强的 ABTS⁺自由基和羟自由基清除能力, 而 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基清除能力较弱^[5], 但强于未经酶解的酪蛋白, 羊乳酪蛋白酶解物的体外抗氧化能力与其酶解工艺息息相关。Pun 等^[25]采用 ABTS⁺自由基清除实验和超氧阴离子清除实验测定受试物的体外抗氧化活性, 通过测定线虫体内蛋白质羰基化合物水平评价受试物的体内抗氧化活性, 结果表明体外实验活性较好的受试物在体内实验中没有表现出抗氧化活性, 而体外实验活性最差的受试物在体内实验中表现出较好的抗氧化活性。受试物的体外抗氧化功效不能预测其体内活性, 因此, 我们需要进一步探究 GMCH 是否具有体内抗氧化能力。

2.3 对秀丽线虫体内抗氧化应激、热应激及抗氧化酶的影响

2.3.1 对野生型 N2 线虫 H₂O₂ 应激的影响

衰老延缓与抗氧化活性密切相关, 有研究表明, 乳源活性肽可能通过增强线虫的抗氧化能力而起到延长寿命的作用^[21]。同时, 应对压力的能力与秀丽隐杆

线虫的预期寿命也有很好的相关性^[26], 因此我们研究了 H₂O₂ 应激条件下 GMCH 对线虫寿命的影响。如图 5 所示, 在 H₂O₂ 急性氧化胁迫下, 实验组线虫生存曲线的显著右移 ($P<0.05$)。由表 2 可知, 秀丽线虫的平均寿命得到极显著延长, 延长了 12.59%, 中位寿命和最大寿命分别延长了 6.00% 和 12.50%。结果表明, GMCH 可以提高线虫对 H₂O₂ 氧化应激的抵抗能力。

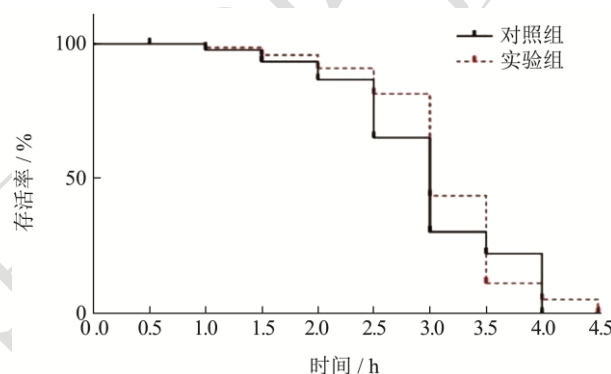


图 5 H₂O₂ 诱导的氧化胁迫下野生型 N2 的存活曲线

Fig.5 Survival curve of mutant TK22 under H₂O₂ -induced oxidative stress

2.3.2 对野生型 N2 线虫百草枯应激的影响

如图 6 所示, 在百草枯急性氧化胁迫下, 实验组线虫生存曲线的显著右移 ($P<0.05$)。由表 2 可知, 秀丽线虫的平均寿命延长 12.64%, 最大寿命延长 33.33%。结果表明, GMCH 可以提高线虫对百草枯氧化应激的抵抗能力。

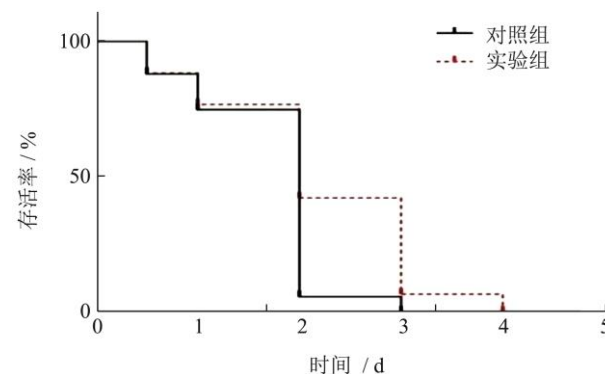


图 6 百草枯诱导的氧化胁迫下野生型 N2 的存活曲线

Fig.6 Survival curve of mutant TK22 under paraquat-induced oxidative stress

表2 线虫存活时间统计分析

Table 2 Statistical analysis of survival time of *C. elegans*

| 处理条件 | 组别 | 平均寿命 ⁽¹⁾ | 中位寿命 ⁽²⁾ | 最大寿命 ⁽³⁾ | P-value ⁽⁴⁾ |
|-------------------------------|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| 正常 | 对照组 | 13.60±0.45 ^a | 13.00±0.82 ^a | 21.33±0.47 ^a | <0.01 |
| | 实验组 | 14.87±0.41 ^b | 14.83±0.24 ^b | 24.33±0.47 ^b | |
| H ₂ O ₂ | 对照组 | 2.78±0.08 ^a | 2.83±0.29 ^a | 4.00±0.05 ^a | <0.05 |
| | 实验组 | 3.13±0.07 ^b | 3.00±0 ^a | 4.50±0 ^a | |
| 百草枯 | 对照组 | 1.74±0.04 ^a | 2.00±0 ^a | 3.00±0 ^a | <0.05 |
| | 实验组 | 1.96±0.07 ^b | 2.00±0 ^a | 4.00±0 ^b | |
| 热应激 | 对照组 | 6.61±0.10 ^a | 6.67±0.47 ^a | 12.67±0.47 ^a | <0.01 |
| | 实验组 | 7.08±0.18 ^b | 7.14±0.24 ^a | 13.67±0.47 ^a | |

注: (1) 平均寿命的计算方法见公式 (1); (2) 中位寿命是指存活率等于 50%的时间; (3) 最大寿命是指存活率等于 0%的时间; (4) 通过将实验组与对照组比较, 使用 log-rank 检验计算 P 值。

2.3.3 对野生型 N2 线虫热应激的影响

如图 7 所示, 在 35 °C 急性热应激环境下, 实验组线虫生存曲线的显著右移 ($P < 0.05$)。由表 2 可知, 秀丽线虫的平均寿命得到显著延长 ($P < 0.05$), 延长了 7.11%, 中位寿命和最大寿命分别延长了 7.05% 和 7.89%。结果表明, GMCH 可以提高线虫对热应激的抵抗能力。

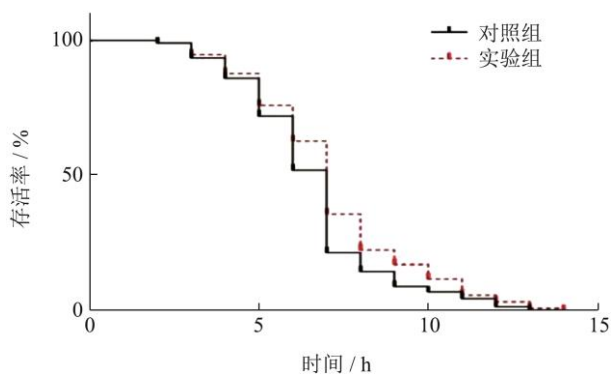


图 7 热应激胁迫下野生型 N2 的存活曲线

Fig.7 Survival curve of the *C. elegans* N2 strain under heat shock stress

2.4 体内抗氧化酶活性测定

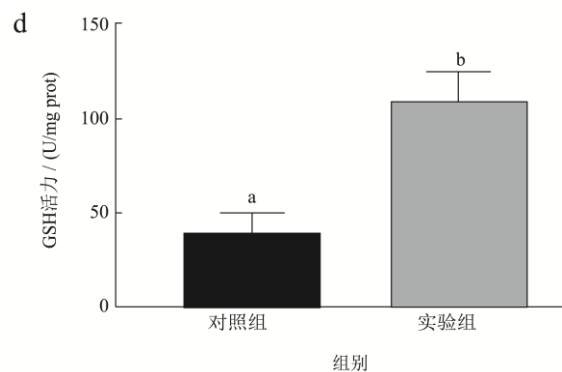
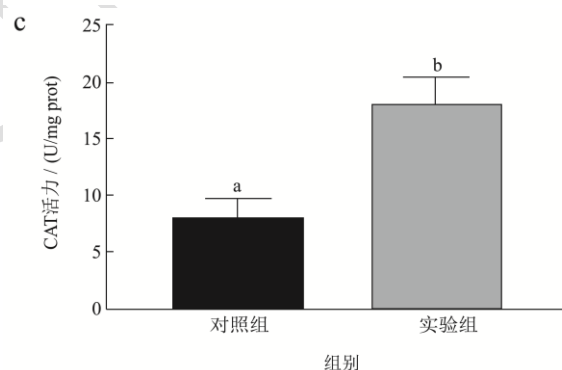
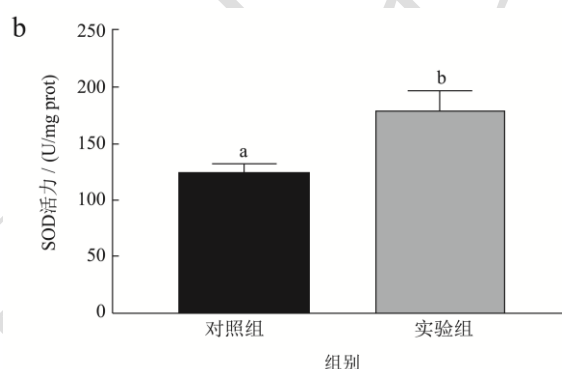
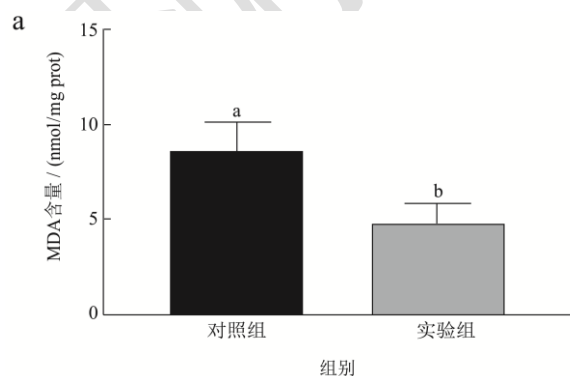


图 8 GMCH 对线虫体内 SOD、CAT、GSH 和 MDA 的影响
Fig.8 The effect of goat milk casein hydrolysates on SOD, CAT, GSH and MDA in *C. elegans*

氧化应激可以通过抗氧化防御系统来抵消,包括酶促抗氧化剂和非酶抗氧化剂。SOD 是生物体中重要的抗氧化酶,能够催化超氧阴离子自由基歧化生成氧和过氧化氢, CAT 促进 H_2O_2 分解成水和氧气^[27], GSH-Px 通过催化 GSH 向 GSSG 的转化来保护细胞免受损害^[28]。MDA 是生物体内脂质氧化产生的一种天然产物,被广泛应用为脂质氧化的指标^[29],由图 8a 可知,在 MDA 含量测定中,与对照组相比,实验组的 MDA 含量显著降低了 78.70% ($P<0.05$)。由图 8b~8d 可知,在线虫体内抗氧化酶活力的测定中,与对照组相比,实验组的 SOD 酶活力显著提高了 43.30% ($P<0.05$)、实验组 CAT 活力显著提高了 122.40% ($P<0.05$)、实验组 GSH 活力显著提高了 176.90% ($P<0.05$)。结果表明,GMCH 能够显著提高秀丽线虫体内抗氧化酶活性并降低 MDA 含量,从而增强秀丽线虫的抗氧化防御系统。Zhang 等^[30]对小球藻蛋白进行酶解,发现其酶解产物在延长线虫寿命的同时提高线虫体内抗氧化酶活性,在 4 mg/mL 的给药质量浓度下,小球藻蛋白酶解物能够显著提高线虫体内 CAT 活力和 SOD 活力。

3 结论

本文对 GMCH 的抗衰老和抗氧化活性进行初步研究,结果表明,样品能够显著延长线虫寿命并减少线虫体内脂褐素的沉积。GMCH 具有良好的延缓线虫衰老的作用,并且在发挥抗衰老活性的同时不会对线虫的生殖能力和运动能力造成不良影响。DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基和 ABTS⁺ 自由基清除实验显示 GMCH 在体外有一定的抗氧化活性,其中 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基清除能力分别是阳性对照组的 62.94% 和 69.65%。进一步探究 GMCH 在体内的抗氧化功能发现,GMCH 可以显著降低线虫体内 MDA 含量同时提高 SOD、CAT 和 GSH 酶活力,并且提高线虫对 H_2O_2 、百草枯氧化应激和热应激的抵抗能力。相较于牛乳,目前国内外对羊乳功能活性成分相关研究较少,本文研究了羊乳酪蛋白酶解物对秀丽隐杆线虫的抗衰老及体内外抗氧化作用,为羊乳资源的综合利用和深度开发提供了理论依据和实验基础。

参考文献

- [1] 李祥,张泽生,汤新慧,等.紫薯提取物对秀丽隐杆线虫寿命的影响[J].现代食品科技,2017,33(10):1-6.
- [2] 王轶菲,陈纯,王红,等.山楂提取物延缓秀丽隐杆线虫衰老作用的研究[J].营养学报,2016,38(4):391-396.
- [3] 高婧昕,毛学英.羊乳组成及功能特性研究进展[J].中国乳

业,2019,8:160-164.

- [4] Shu G, Huang J, Bao C, et al. Effect of different proteases on the degree of hydrolysis and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity in goat and cow milk [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(4): 101.
- [5] 李志成,蒋爱民,熊清权,等.山羊乳酪蛋白酶解物制备及体外抗氧化活性研究[J].食品科学,2011,32(23):82-86.
- [6] Shen P, Yue Y, Zheng J, et al. *Caenorhabditis elegans*: A convenient *in vivo* model for assessing the impact of food bioactive compounds on obesity, aging, and Alzheimer's disease [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2018, 9: 1-22.
- [7] 况琪斐,陈巧超,张玲,等.阿魏酸通过胰岛素/IGF 信号通路和 DAF-16 促进秀丽隐杆线虫寿命和应激抵抗力[J].中山大学学报(医学科学版),2021,42(2):193-201.
- [8] LUO Qiang, LIU Jie, WANG Huailing, et al. Structural characterization of ginseng oligopeptides and anti-aging potency evaluation in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Rsc Advances*, 2020, 10(65): 39485-39494.
- [9] Chen H, Wang J, Liu X, et al. Optimization in continuous phase-transition extraction of crude flavonoids from finger citron fruit and evaluation on their antiaging activities [J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(3): 1636-1648.
- [10] 林春秀,林伊梓,沈少丹,等.苦瓜青钱柳复合茶对秀丽线虫的抗氧化作用[J].食品与发酵工业,2020,46(23):178-183.
- [11] Lin C, Zhang X, Zhuang C, et al. Healthspan improvements in *Caenorhabditis elegans* with traditional Chinese herbal tea [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 36: 4057841.
- [12] Lin C, Lin Y, Xiao J, et al. Effect of *Momordica saponin* and *Cyclocarya paliurus* polysaccharide-enriched beverages on oxidative stress and fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Sci Food Agric*, 2021, 101(8): 3366-3375.
- [13] Chen Y, Onken B, Chen H, et al. Mechanism of longevity extension of *Caenorhabditis elegans* induced by pentagalloyl glucose isolated from eucalyptus leaves [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(15): 3422-3431.
- [14] Lin C, Xiao J, Xi Y, et al. Rosmarinic acid improved antioxidant properties and healthspan via the IIS and MAPK pathways in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biofactors*, 2019, 45(5): 774-787.
- [15] 王晋,张风,周爱梅,等.虾头、虾壳抗氧化肽的分离纯化及其对秀丽隐杆线虫的抗氧化作用[J].食品科学,2019,40(3): 56-63.
- [16] LIN Chunxiu, SU Zuanxian, LUO Jia, et al. Polysaccharide extracted from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) *Ilijinskaja* enhanced stress resistance in *Caenorhabditis*

- elegans* via skn-1 and hsf-1 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 243-254.
- [17] LI Wei, LI Ziyin, PENG Mingjun, et al. Oenothrin B boosts antioxidant capacity and supports metabolic pathways that regulate antioxidant defense in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food & Function, 2020, 11(10): 9157-9167.
- [18] 罗卿心, 刘晓娟, 曹庸, 等. 虾青素对秀丽隐杆线虫衰老的影响及其机制的初步研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(9): 56-60.
- [19] 刘星雨, 曹素芳, 朱秋铁, 等. 牛乳源促睡眠肽的体外抗氧化活性评价及对秀丽隐杆线虫的体内抗氧化作用[J]. 食品科学, 2022, 43(5): 151-157.
- [20] Lin C, Chen Y, Lin Y, et al. Antistress and anti-aging activities of *Caenorhabditis elegans* were enhanced by *Momordica* saponin extract [J]. Eur J Nutr, 2021, 60(4): 1819-1832.
- [21] 沈鹏, 程志才, 陈静, 等. 乳源性小肽 DELQ 的抗衰老功效研究[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(9): 7-11.
- [22] Brunk U T, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(5): 611-619.
- [23] 李祥, 张泽生, 汤新慧, 等. 紫薯提取物对秀丽隐杆线虫寿命的影响[J]. 现代食品科技, 2017, 33(10): 1-6.
- [24] Gruber J, Tang S Y, Halliwell B. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans* [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1100: 530-542.
- [25] Pun P B, Gruber J, Tang S Y, et al. Ageing in nematodes: do antioxidants extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*? [J]. Biogerontology, 2010, 11(1): 17-30.
- [26] Manuel J M, Riddle D L. Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity [J]. Genetics, 2003, 163(1): 171-180.
- [27] Finkel T, Holbrook N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408(6809): 239-247.
- [28] Raes M, Michiels C, Remacle J. Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase [J]. Free Radic Biol Med, 1987, 3(1): 3-7.
- [29] 王凤, 肖楚翔, 刘淑珍, 等. 榴莲核黄酮的提取及对秀丽线虫氧化衰老的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 123-129.
- [30] Zhang Y, Jiang W, Hao X. et al. Preparation of the enzymatic hydrolysates from *Chlorella vulgaris* protein and assessment of their antioxidant potential using *Caenorhabditis elegans* [J]. Mol Biotechnol, 2021, 63: 1040-1048.