

酪蛋白源七肽 AVPYPQR 在不同体系中 抗氧化活性的构效关系比较

王晨阳, 赵谋明, 郑淋

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文为了探讨酪蛋白源七肽 AVPYPQR 在不同体系中的抗氧化活性及构效关系, 比较研究了 AVPYPQR 及其相关片段 PYPQ、PYPQR、VPYPQ、VPYPQR 和 AVPYPQ 在体外化学方法和细胞模型中的抗氧化能力。结果表明, 在 ABTS 自由基清除能力和氧自由基吸收能力 (ORAC) 等体外化学方法中 6 条肽的活性都高于标准抗氧化剂 Trolox, 其中 Val、Ala 和 Arg 残基的同时存在降低 AVPYPQR 的 ABTS 自由基清除能力, 而 Arg 残基存在提升了 AVPYPQR 的 ORAC 活性。在细胞氧化损伤模型中, 6 条多肽对 AAPH 诱导红细胞溶血都有保护作用, 其中 AVPYPQR 保护效果最好, Ala 和 Arg 残基存在提升其保护效果; H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型中, 除 PYPQ, 其他多肽都具有显著保护效果($p < 0.05$), 其中 Ala、Val 和 Arg 残基都可以提升保护效果, 但是没有叠加作用。综上, 除 PYPQ, 其它 5 条多肽在在体外化学方法和细胞模型中都表现出较强抗氧化活性, 但无显著性相关, 且不同方法中 Val、Ala 和 Arg 残基对 AVPYPQR 活性影响不同。

关键词: 多肽; 抗氧化; 构效关系

文章编号: 1673-9078(2019)06-77-83

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.011

Comparison on the Structure-activity Relationship of the Antioxidant Activity of Casein-derived Heptapeptide AVPYPQR in Different Systems

WANG Chen-yang, ZHAO Mou-ming, ZHENG Lin

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

Abstract: In order to investigate the antioxidant activity and structure-activity relationship of casein-derived heptapeptide AVPYPQR in different systems, the antioxidant activity of AVPYPQR and its related fragments PYPQ, PYPQR, VPYPQ, VPYPQR and AVPYPQ were compared in this study using *in vitro* chemical assays and cellular models. The results showed that the six peptides exhibited higher ABTS free radical scavenging activity and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) than the standard antioxidant, Trolox. The co-occurrence of Val, Ala and Arg residues led to a reduced ABTS radical scavenging activity of AVPYPQR, while the presence of Arg residue resulted in an enhanced ORAC. In the cell oxidative damage model, all the six peptides offered protection against AAPH-induced erythrocyte hemolysis. Among which, AVPYPQR exhibited the greatest protective effect, and the presence of Ala and Arg residues improved further such an effect. In H₂O₂-induced HepG2 cell oxidative damage model, all the peptides showed ($p < 0.05$) significant protective effect except for PYPQ, and the Ala, Val and Arg residues could enhance the protection but without an addictive effect. In summary, all the peptides, except for PYPQ, had strong antioxidant activity in both *in vitro* chemical assays and cellular models, but no significant correlation was found among the detected activities in different assays. The influence of Val, Ala and Arg residues on the antioxidant activity of AVPYPQR varied between analysis assays.

Key words: peptides; antioxidant; structure-activity relationship

氧化应激指机体在遭受外界有害刺激时, 产生过量的自由基, 导致细胞损伤, 从而引发多种疾病, 包

收稿日期: 2018-08-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0400200); 博士后创新人才支持计划资助项目(BX201700081)

作者简介: 王晨阳(1995-), 女, 硕士, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 郑淋(1989-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品生物技术

括动脉粥样硬化、关节炎、糖尿病和癌症等。随着生活水平的提高, 抗氧化产品的开发越来越受到人们的关注。食品来源的抗氧化肽因具有安全、健康、低分子量和易吸收等特性被广泛研究和应用^[1]。

目前抗氧化肽的筛选主要通过体外化学测定方法, 如脂质氧化降解、自由基清除和螯合金属离子能力^[2]。大量研究表明, 在体外化学测定方法中, 多肽的抗氧化特性与其氨基酸组成、排列顺序、疏水性和

分子量等相关^[3,4]。其中,多肽序列中的氨基酸残基被认为是影响多肽抗氧化活性的最重要因素^[5]。具有供电子或供氢能力的氨基酸,如 His、Tyr、Trp、Cys 和 Met 对多肽抗氧化活性贡献最大,而疏水性、酸性及碱性氨基酸等残基也均会影响多肽抗氧化活性。体外化学测定方法虽然方便,但是不能真实地模拟和反映细胞内抗氧化系统和生理环境,未充分考虑多肽的体内新陈代谢和稳定等。细胞模型可以模拟人体的动态生理体系,花费较低、周期较短,对于研究和筛选抗氧化剂具有重要意义^[6],其中 HepG2 细胞^[7,8]和红细胞^[9,10]等常用来作为氧化损伤模型的靶细胞。但是,目前在体外化学方法中表现出较强活性的抗氧化肽,在细胞模型中是否也具有活性还未知,且其构效关系尚不明确。

在我们前期研究中发现,一条源于酪蛋白 β -casein 第 192-198 位片段的七肽 AVPYQR 具有很强的体外抗氧化活性,如 ABTS⁺ 和 ROO[·]清除能力,且其含 Tyr 的相关片段如 PY 及 PYP 等也具有很强的活性,而 AV、AVP、PQ 及 PQR 等不含 Tyr 残基的片段均没有表现出明显的活性。说明这条七肽体外活性主要是由于该肽段序列中含有 Tyr 残基。虽然 AVPYQR 在体外化学方法中具有很强的活性,但是该肽在细胞模型中的抗氧化活性还未知,此外,序列中疏水性氨基酸残基 Val(V)和 Ala(A)以及碱性氨基酸残基 Arg(R)对该肽抗氧化活性的影响也未知。因此,本文基于 AVPYQR 的结构,设计合成了另外五条肽段,即 PYPQ、PYPQR、VPYPQ、VPYPQR 和 AVPYQR,比较研究了这 6 条多肽在 ABTS 法、ORAC 法、AAPH 诱导人血红细胞溶血模型和 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型中的抗氧化活性,从而探讨 AVPYQR 及相关片段在体外化学和细胞方法中的抗氧化活性的差异,同时考察了 Val、Ala 和 Arg 残基的存在对其活性的影响,从而初步探究 AVPYQR 在不同体系中的构效关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(Trolox)、荧光素二钠盐(FL)、2,2-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(AAPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)及 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT),购于美国 Sigma-Aldrich 公司;DEME 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(Trypsin)、青霉素及链霉素,购于美国 Thermo Scientific 公司;合成肽购于上海吉

尔生化有限公司,包括 PYPQ、PYPQR、VPYPQ、VPYPQR、AVPYQR 和 AVPYQR,纯度均大于 95%;其他化学试剂均为国产分析纯,购于广州精科化玻仪器公司。

1.2 仪器与设备

ME 204 电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;Varioskan Flash 全波长扫描多功能读数仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;TCS-SP5 荧光显微镜,德国 Leica 显微系统有限公司;1300 A2 生物安全柜,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;CO₂ 恒温培养箱,美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 ABTS 自由基清除能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) 法

ABTS⁺ 储存液的配制:将 7 mM ABTS 溶液与 2.45 mM 过硫酸钾等体积混合,在室温下放置 12~16 h。使用前,采用 50 mM pH=7.4 磷酸缓冲液将 ABTS⁺ 储存液稀释至空白组(即 50 μ L pH 7.4 磷酸缓冲液与 150 μ L ABTS⁺ 稀释液的混合液)在 734 nm 下的吸光度值为 0.70 \pm 0.02。然后取 150 μ L 稀释后的 ABTS⁺ 溶液与 50 μ L 浓度为 50 μ M 的多肽样品溶液在 96 微孔板中 30 $^{\circ}$ C 下反应 30 min,每 6 min 测定一次吸光值。以不同浓度的 Trolox 溶液(30、60、90、120 和 150 μ M)代替多肽溶液作为 Trolox 阳性对照组。

$$\text{ABTS 自由基清除率 (\%)} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100\%$$

其中: A₀ 为空白组的吸光度值, A_s 为多肽样品组的吸光度值。

以 Trolox 的浓度和 ABTS 清除率建立直线回归方程,根据回归方程计算多肽样品的 ABTS 清除率,结果以 Trolox 当量(Trolox equivalent, TE)表示,即 μ mol TE/ μ mol 样品。

1.3.2 氧自由基吸收能力 (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) 法

该反应在 75 mM pH=7.4 磷酸缓冲液体系中进行。将 20 μ L 浓度为 40 μ M 的多肽样品溶液和 120 μ L 终浓度为 70 mM 荧光素溶液一起加入 96 孔荧光板中(样品组),在 37 $^{\circ}$ C 下培养 15 min 后,加入 60 μ L 终浓度为 12 mM AAPH 溶液。震荡 30 s,采用全波长扫描多功能读数仪,以激发波长 485 nm 和发射波长 520 nm,进行荧光强度测定。每 1 min 记录一次荧光值,记录 100 min。分别以 20 μ L pH 7.4 磷酸缓冲液和不同浓度(20、40、60、80 和 100 μ M) Trolox 溶液代替多肽

溶液, 作为空白组和 Trolox 阳性对照组。荧光下的面积衰变曲线(AUC)计算为:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=100} \frac{f_i}{f_0}$$

其中: f_0 为初始荧光读数时间 0 分, f_i 是荧光读数的时间 i 分。

对应一个样品的净 AUC 计算如下:

$$\text{net AUC} = \text{AUC}_{\text{样品}} - \text{AUC}_{\text{空白}}$$

以 Trolox 的浓度和 net AUC 建立直线回归方程, 根据回归方程计算多肽的 ORAC 值, 结果以 Trolox 当量 (Trolox equivalent, TE) 表示, 即 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ 样品。

1.3.3 AVPYRQR 及其片段对 AAPH 诱导人红细胞损伤的溶血率影响

将新鲜健康成人血液采集于肝素钠真空采血管中, 4 °C, 3000 r/min 下离心 10 min。取上清, 使用 pH=7.4 PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 和 1.5 mM KH_2PO_4) 溶液清洗 4 次, 取一定量的红细胞沉淀, 用 PBS 稀释至 10% 的悬浮液。取 100 μL 上述溶液于 96 孔细胞培养板中。加入 50 μL 浓度为 1 mM 的多肽样品溶液(样品组)或 PBS(AAPH 组)于 37 °C 生化培养箱中培养 30 min, 再加入 100 μL 的 200 mM AAPH 溶液, 在 37 °C 下有氧损伤 3 h。取 200 μL 红细胞反应液, 加入 1 mL PBS 稀释, 在 4 °C, 3000 r/min 下离心 10 min。取 200 μL 上清液于 96 孔透明微孔板中, 采用多功能读数扫描仪测定 540 nm 下吸光值, 即 A_{sample} 。取相同体积的红细胞反应液, 加入 1 mL 的 4 °C 预冷超纯水使细胞全部裂解, 同等条件下处理后测的吸光度值为 A_{water} 。

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{water}}} \times 100\%$$

1.3.4 AVPYRQR 及其片段对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用

将 HepG2 细胞接种在含 10% FBS、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 链霉素和 100 U/L 青霉素的 DMEM 培养基中, 在 37 °C、5% CO_2 恒温培养箱中培养。取对数生长期细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 于 37 °C, 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。去除培养基, 加入 100 μL 多肽浓度为 50 μM 的培养基, 空白对照组加入 100 μL 基础培养基, 培养 24 h。去除培养基, 使用 PBS[pH 7.4 basic(1X), gibco]洗涤 1 次。采用 MTT 法测定多肽的存活率。每孔加入 100 μL 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液, 培养 4 h, 去除培养基, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜, 震荡 10 min, 570 nm 波长下测定吸光度值。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100\%$$

其中: A_{sample} 为多肽样品组的吸光度值, A_{control} 为空白对照组的吸光度值。

取对数生长期细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h。去除培养基, 空白对照组加入 100 μL 基础培养基, H_2O_2 损伤组分别加入 H_2O_2 浓度为 700, 900, 1000 和 1200 μM 培养基, 损伤 4 h。去除培养基, 使用 PBS 洗涤 1 次。使用上述 MTT 法测定细胞存活率。以细胞存活率接近 50% 的 H_2O_2 浓度作为最适损伤浓度。

使用最适 H_2O_2 损伤浓度来测定 6 条多肽对 HepG2 细胞的保护作用。取对数生长期细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h。去除培养基, 空白对照组和损伤组加入 100 μL 的基础培养基, 多肽样品组分别加入 100 μL 对应肽浓度为 25 μM 的培养基, 培养 24 h。去除培养基, 空白对照组加入 100 μL 基础培养基, 损伤组和多肽样品组加入 100 μL H_2O_2 浓度最适损伤浓度的培养基, 损伤 4 h。使用上述 MTT 法测定细胞存活率。

1.4 数据分析

所有的测定均重复三次, 结果以平均值 \pm 标准偏差表示。数据采用 IBM SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc, Chicago IL, USA) 进行单因素方差分析, 并以 Duncans 多重比较法进行显著性差异的分析 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 AVPYRQR 及其相关片段的理化特性

酪蛋白源七肽 AVPYRQR 及其相关的五条肽段的理化性质如表 1 所示, 包括肽链长度、相对分子量、等电点、净电荷及疏水性值。可以看出, 这 6 条肽段由 4 至 7 个氨基酸残基组成, 相对分子量介于 503.24 至 829.44 u 之间, 而疏水性在 7.78 到 10.09 kcal/mol 之间。PYPQ 的疏水性值为 8.24 kcal/mol, 在其 N 端增加 Val(V) 残基得到多肽 VPYPQ, 其疏水性值减少, 为 7.78 kcal/mol, 说明肽段中的 Val(V) 残基可以增加多肽的疏水性。比较 PYPQR 和 VPYPQR 的疏水性发现相同的规律。相比于多肽 VPYPQ, 多肽 AVPYRQR 的疏水性值增加, 为 8.28 kcal/mol, 说明肽段中 Ala(A) 残基增加多肽的亲水性。比较 VPYPQR 和 AVPYRQR 的疏水性发现相同的规律。PYPQ、VPYPQ 和 AVPYRQR 的等电点分别为 5.16、5.51 和 5.48, 均小于

7; 而当 C 端增加 Arg(R) 残基后, 等电点均大于 7, 为 9.53, 同时净电荷也从 0 变为 1, 说明增加 Arg(R) 后, 三条肽变为碱性肽。同时, AVPYQPQR、PYPQR

和 VPYPQR 的疏水性值最大, 分别为 10.09、10.05 和 9.59, 说明在 C 端增加 Arg(R) 残基之后, 其亲水性增强, 进入疏水区域所需要的自由能更高。

表 1 AVPYQPQR 及其片段理化性质

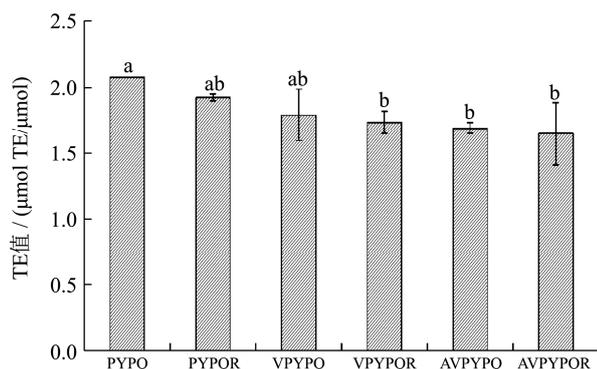
Table 1 Physical and chemical properties of AVPYQPQR and its fragments

多肽序列	缩写	长度	相对分子质量/u	等电点	净电荷	疏水性/(kcal/mol)*
Pro-Tyr-Pro-Gln	PYPQ	4	503.24	5.16	0	8.24
Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg	PYPQR	5	659.34	9.53	1	10.05
Val-Pro-Tyr-Pro-Gln	VPYPQ	5	602.31	5.51	0	7.78
Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg	VPYPQR	6	758.41	9.53	1	9.59
Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln	AVPYPQ	6	673.34	5.48	0	8.28
Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg	AVPYQPQR	7	829.44	9.53	1	10.09

注: *等电点和疏水性通过网站 <http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/index.html> 计算得到, 其中疏水性是指一条肽从水相环境到疏水环境如辛醇所需要的自由能, 基于 Wimley-White 标度计算得到。

2.2 AVPYQPQR 及其片段在 ABTS 法中的抗氧化活性

化活性

图 1 AVPYQPQR 及其片段在 ABTS 法中的清除 ABTS^{·+} 活性Fig.1 The ABTS^{·+} scavenging activity of AVPYQPQR and its fragments in ABTS assay

注: 字母不同表示差异显著 $p < 0.05$, 下同。

ABTS^{·+}清除活性是目前最常用的体外测定抗氧化活性方法之一。图 1 呈现了 AVPYQPQR 及其相关片段的 ABTS^{·+}清除活性。TE 值表示多肽的 ABTS^{·+}清除活性与同等摩尔浓度的 Trolox 的比值, 值越高, 说明其活性越强。从图中可以看出, 这 6 条多肽 TE 值都大于 1 μmol TE/μmol, 说明 6 条多肽的抗氧化活性都高于标准抗氧化剂 Trolox。其中 PYPQ 清除 ABTS^{·+}的能力最强, TE 值为 2.08 μmol TE/μmol, 而 AVPYQPQR 清除 ABTS^{·+}的能力最弱, TE 值为 1.65 μmol TE/μmol。这 6 条多肽中均含有一个活性残基即 Tyr 残基, 该残基上的酚羟基可以提供电子还原 ABTS^{·+}[11], 是这 6 条多肽均具有很强的清除 ABTS^{·+}的能力的主要原因。Ohashi Y 等[12]研究也发现具有很强的清除 ABTS^{·+}自由基活性的三肽, 其活性与含有 Tyr

残基相关。

比较三条肽 PYPQ、VPYPQ 和 AVPYPQ 清除 ABTS^{·+}能力, 发现增加 Val 或 Ala 残基对 TE 值无显著影响。PYPQR、VPYPQR 和 AVPYQPQR 清除 ABTS^{·+}能力也具有相同的规律。通过两两比较 PYPQ 和 PYPQR、VPYPQ 和 VPYPQR、AVPYPQ 和 AVPYQPQR 的 TE 值, 并未发现碱性氨基酸 Arg 残基对这些肽清除 ABTS^{·+}活性具有显著性的影响。因此, 在 ABTS 法中, 肽段中的 Val, Ala 和 Arg 残基对 6 条多肽的抗氧化活性没有显著性影响, 推测是在 ABTS 法中, 6 条多肽的抗氧化活性主要与 Tyr 残基相关。Val, Ala 和 Arg 残基虽然会影响多肽的亲疏水性, 从而影响其在水相中稳定和分散, 但不是影响抗氧化活性的主要因素, 而且单个氨基酸残基的增加对其疏水性影响不大, 所以对其抗氧化活性没有显著影响。但是, 与 PYPQ 相比, AVPYQPQR 的 TE 值显著降低, 说明当 3 个氨基酸残基同时存在时, AVPYQPQR 的活性显著降低。

2.3 AVPYQPQR 及其片段在 ORAC 法中的抗氧化活性

采用 ORAC 法测定了 6 条多肽清除 ROO[·]的活性, 结果如图 2 所示。ORAC 法是模拟生物体内 ROO[·]清除能力的一种抗氧化活性测定方法。这 6 条多肽清除 ROO[·]的 TE 值都大于 1 μmol TE/μmol, 其中 PYPQR 的 TE 值最高, AVPYPQ 的 TE 值最低, 分别为 2.27 和 1.47 μmol TE/μmol, 这说明这 6 条肽清除 ROO[·]的活性都高于标准抗氧化剂 Trolox, PYPQR 的清除 ROO[·]活性最强。在 ORAC 法中, 具有酚羟基的 Tyr 可以与自由基反应生成新的自由基, 由于苯环的共轭

效应,新的自由基更加稳定,从而阻断了自由基的链式反应^[11]。因此,这6条多肽中的Tyr同样是清除ROO·的核心氨基酸,使得这6条多肽在ORAC法中具有很强的抗氧化活性。Power O等^[6]从甘薯蛋白水解物中鉴定出5条具有较强清除ROO·的活性的多肽,并指出多肽的活性与其含有Tyr残基相关。

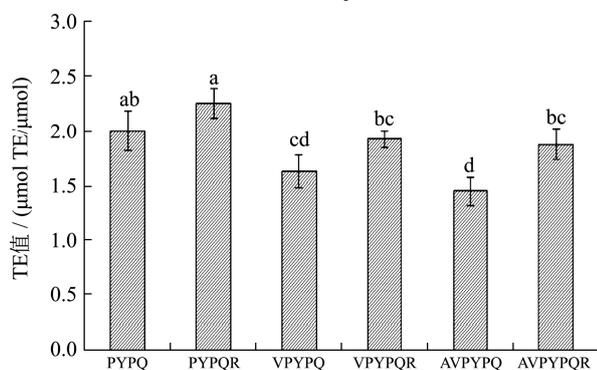


图2 AVPYPQR及其片段在ORAC法中的清除ROO·活性

Fig.2 The ROO· scavenging activity of AVPYPQR and its fragments in ORAC assay

比较多肽VPYPQ和AVPYPQ、VPYPQR和AVPYPQR的TE值,发现肽链中增加Val残基TE值下降,不利于其清除ROO·。比较多肽VPYPQ和AVPYPQ、VPYPQR和AVPYPQR的TE值没有显著性差异,说明肽段中增加Ala残基对其清除ROO·能力没有显著性影响。两两比较PYPQ和PYPQR、VPYPQ和VPYPQR、AVPYPQ和AVPYPQR的TE值,发现只有AVPYPQ增加Arg残基形成AVPYPQR时,其TE值增加。而其他两组TE值都没有显著性差异。说明Arg残基存在可以提升多肽AVPYPQR清除ROO·的能力。因此,在ORAC法中,Val残基的存在降低其清除ROO·活性,Ala残基对其活性没有影响,而Arg残基增加多肽AVPYPQR的抗氧化活性。

2.4 AVPYPQR及其片段对AAPH诱导人红细胞损伤的保护作用

AAPH诱导人红细胞溶血模型模拟细胞内ROO·造成氧化损伤过程。AAPH产生ROO·,可以促进细胞膜上的脂质过氧化,损伤细胞膜和生物大分子,导致细胞溶血。AVPYPQR及其相关肽段对AAPH诱导的血红细胞的氧化损伤保护作用,如图3所示。在未添加AAPH时,正常组中溶血率非常低,只有不到1.65%,说明红细胞在PBS溶液中非常稳定,在37℃下孵育3h基本没有发生溶血现象。当添加了AAPH进行氧化损伤3h后,溶血率增加至40.37%。这主要是由于红细胞膜受到AAPH热分解产生的

ROO·的攻击,导致红细胞发生溶血的现象。但是,当向红细胞中添加这些多肽预保护后再添加AAPH进行损伤,其溶血程度相对于AAPH组则显著性降低,溶血率在21.26%~31.78%之间,与AAPH组都有显著性差异,说明这6条多肽都具有保护人红细胞免于AAPH损伤的效果。在这些多肽中,AVPYPQR预保护组的溶血率最低,仅为21.26%,说明该肽保护AAPH诱导的氧化损伤效果最好。

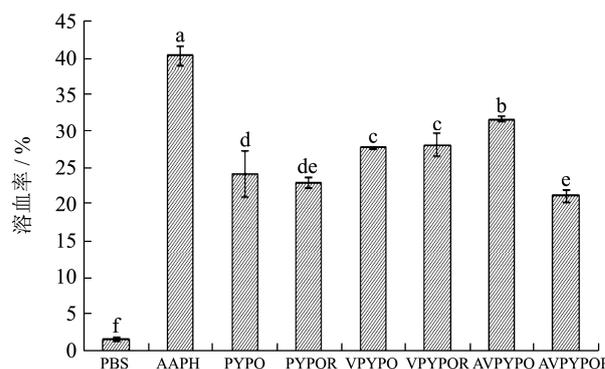


图3 AVPYPQR及其片段对AAPH诱导的人红细胞溶血的保护作用

Fig.3 Protective effects of AVPYPQR and its fragments on AAPH-induced hemolysis in human erythrocytes

两两比较PYPQ和VPYPQ, PYPQR和VPYPQR的溶血率,发现多肽中增加Val残基,溶血率增加,对AAPH诱导的人红细胞溶血的保护效果降低。为了考察Ala和Arg残基对AVPYPQR保护效果的影响,将AVPYPQR的溶血率与分别VPYPQR和AVPYPQ的比较,发现Ala和Arg残基的存在都显著降低了多肽AVPYPQR的溶血率,增强了多肽保护AAPH诱导红细胞损伤的效果。该规律和ORAC法中的规律相似,推测由于两个方法都是以清除ROO·自由基能力来评价抗氧化活性。

2.5 AVPYPQR及其片段对H₂O₂诱导HepG2细胞损伤的影响

图4a为HepG2细胞在浓度为700, 900, 1000, 1200 μM H₂O₂中孵育4h后存活率变化。随着H₂O₂浓度的增加,细胞存活率逐渐降低。当H₂O₂含量为700 μM时,细胞存活率为100.52%,与空白对照组没有显著性差异。当H₂O₂浓度为900 μM时,细胞存活率为64.38%,与空白对照组有显著的差异($p < 0.05$)。因此,选用900 μM的H₂O₂浓度作为损伤浓度。从图4b中看出, HepG2细胞在肽浓度为50 μM的培养基中培养24h,细胞存活率虽然有一些变化,但是与空白对照组相比,没有统计学上的差异。因此,认为

HepG2 细胞在 6 条多肽浓度为 50 μM 及以下的培养液中培养 24 h 时, 增殖和毒性没有显著的影响。

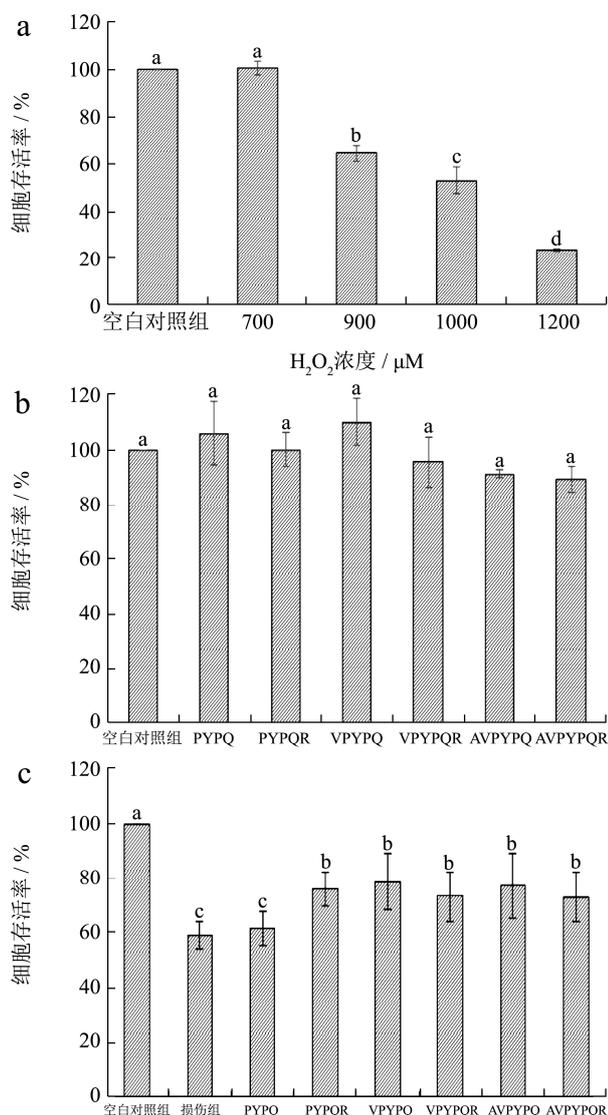


图 4 不同浓度的 H₂O₂ 对 HepG2 细胞的损伤作用 (a), AVPYPQR 及其片段对 HepG2 细胞的毒性 (b) 和 AVPYPQR 及其片段对 H₂O₂ 损伤 HepG2 细胞的保护作用 (c)

Fig.4 The effect of different concentrations of H₂O₂ on the viability of HepG2 cells (a), the toxicity of AVPYPQR and its fragments to HepG2 Cells (b) and effect of AVPYPQR and its fragments on the survival rate of H₂O₂ injured HepG2 cells (c)

图 4c 为不同多肽对 H₂O₂ 损伤 HepG2 细胞存活率的影响。在 H₂O₂ 损伤 HepG2 细胞模型中, H₂O₂ 与细胞内的金属离子发生 Fenton 反应, 生成羟基自由基, 可诱导细胞内 ROS 积累并损害细胞抗氧化防御体系, 从而造成细胞损伤^[13]。损伤组细胞在 900 mM 的 H₂O₂ 的孵育 4 h, 细胞存活率为 59.47%, 与空白对照组的细胞存活率有显著的差异 ($p < 0.05$), 说明该浓度 H₂O₂ 造模成功。与损伤组相比, 加入多肽预保护 24 h 后, 除 PYPQ, 细胞存活率为 61.87%, 与损伤组没有统计

学上的差异, 其他多肽都显著提高细胞存活率 ($p < 0.05$), 具有保护 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的效果。其中 VPYPQ 的细胞存活率最高, 为 79.01%, 具有最好的保护效果。Tonolo F 等^[14]鉴定出牛奶来源的抗氧化肽 AVPYPQR, 并证明其具有减轻 H₂O₂ 诱导的 Caco-2 细胞氧化损伤的效果。PYPQ 在 ABTS 法, ORAC 法和 AAPH 诱导血红细胞氧化损伤模型中都具有抗氧化活性。但是, 在 H₂O₂ 损伤 HepG2 细胞模型中却没有保护作用, 说明利用该模型研究多肽抗氧化活性时, 细胞对多肽的吸收, 多肽细胞内的稳定性和细胞内潜在的抗氧化体系也应被考虑。因此, 推测 PYPQ 活性的丧失, 可能与能否被细胞吸收, 在细胞内的稳定性, 清除羟基自由基的能力, 诱导体内抗氧化系统发挥作用的能力等有关, 有待进一步研究。

将多肽 PYPQ 的细胞存活率分别与 AVPYPQ、VPYPQ 和 PYPQR 的比较, 发现在多肽 PYPQ 的基础上增加 Ala、Val 和 Arg 残基都显著增加了细胞的存活率, 增加了多肽保护细胞的效果。同时与 PYPQ 相比, AVPYPQR 的细胞存活率也显著增加。但是 AVPYPQR 与 AVPYPQ、VPYPQR 和 PYPQR 相比, 细胞存活率没有显著差异。说明在 PYPQ 的基础上增加单个氨基酸残基, 可以增加多肽的保护效果, 但是增加多个氨基酸没有增效作用。

2.6 不同方法评价 AVPYPQR 及其片段抗氧化活性比较

通过 Pearson 分析 AVPYPQR 及其片段在 ABTS 法、ORAC 法、AAPH 诱导血红细胞溶血模型和 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞损伤模型中抗氧化活性的相关性, 结果见表 2。四种方法两两之间的都没有相关性。ABTS 和 ORAC 法都是考察抗氧化肽自由基清除活性。但是, 在评价 AVPYPQR 及其片段的抗氧化活性时, 其结果并不相关。虽然 Tyr 残基在这两种方法中都是起关键作用的氨基酸。但是, ORAC 法以 AAPH 作为自由基来源, 抗氧化剂通过提供氢离子而形成更为稳定的自由基, 从而阻断自由基链式反应。ABTS 法则是基于电子转移的一种方法, 考察抗氧化剂的氧化还原能力, 抗氧化剂提供电子还原人工合成的 ABTS^{·+} 自由基。因此, 6 条肽在 ORAC 法中的构效关系与 ABTS 法有一定差异。AAPH 诱导血红细胞溶血模型考察多肽清除的 ROO[·] 的能力。但是, 不同于 ORAC 法, 该细胞模型还会涉及抑制细胞膜脂质过氧化的能力, 因此, 6 条肽在 ORAC 法和 AAPH 诱导血红细胞溶血模型中抗氧化结果并不相关。在 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞

氧化损伤模型中,细胞对多肽的吸收代谢以及对多肽细胞内抗氧化体系的调节作用都影响多肽的抗氧化活性。在该模型中6条肽的抗氧化活性受到很多因素的

影响。因此,在使用4种抗氧化活性测定方法评价6条多肽的抗氧化活性时,两两之间没有相关性。

表2 ABTS法、ORAC法、AAPH诱导红细胞溶血模型和H₂O₂诱导HepG2细胞损伤模型测定AVPYPQR及其片段抗氧化活性相关性

Table 2 Correlations among ABTS assay, ORAC assay, AAPH-induced human erythrocytes hemolysis model and H₂O₂-induced HepG2

cell injury model in determining antioxidant activities of AVPYPQ and its fragments

项目	ABTS法	ORAC法	AAPH诱导红细胞溶血模型	H ₂ O ₂ 诱导HepG2细胞损伤模型
ABTS法	1.00			
ORAC法	0.56	1.00		
AAPH诱导红细胞溶血模型	-0.30	-0.75	1.00	
H ₂ O ₂ 诱导HepG2细胞损伤模型	-0.68	-0.40	-0.40	1.00

3 结论

酪蛋白来源的肽 AVPYPQR 和其相关片段 PYPQ、PYPQR、VPYPQ、VPYPQR 和 AVPYPQ 在 ABTS 法, ORAC 法和 AAPH 诱导人血红细胞溶血模型中都具有较强的抗氧化活性。在 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型中,除 PYPQ,其他多肽都具有保护细胞的活性。在4种不同的体外抗氧化活性测定方法中,6条多肽的抗氧化活性两两之间没有相关性,同时,不同方法中 Val, Ala 和 Arg 残基对抗氧化活性的影响不同。因此,在评价多肽的抗氧化活性时,应参考不同的方法的综合结果。同时,这些多肽在细胞内发挥抗氧化作用机理还有待进一步研究,在生物体内的抗氧化活性还需进一步验证,从而为抗氧化肽的筛选和应用提供理论依据。

参考文献

- [1] Sarmadi B H, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review [J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949-1956
- [2] Somogyi A O, Kl A R, P Eter Pusztai, et al. Antioxidant measurements [J]. Physiological Measurement, 2007, 28: R41-R55
- [3] Zou T, He T, Li H, et al. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins [J]. Molecules, 2016, 21(1): 72
- [4] 郑淋. 抗氧化肽的构效关系及定向制备的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015
- [5] ZHENG Lin. Structure-activity relationship and directed preparation of antioxidant peptides [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015
- [6] Wu R, Wu C, Liu D, et al. Overview of antioxidant peptides derived from marine resources: the sources, characteristic, purification, and evaluation methods [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(7): 1815-1833
- [7] 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(3): 797-820
- [8] 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
- [9] Zhang X, Wang L, Wang R, et al. Protective effects of rice dreg protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG-2 cells [J]. Food & Function, 2016, 7(3): 1429-1437
- [10] Phruksanan W, Yibchok-anun S, Adisakwattana S. Protection of *Clitoria ternatea* flower petal extract against free radical-induced hemolysis and oxidative damage in canine erythrocytes [J]. Research in Veterinary Science, 2014, 97(2): 357-363
- [11] Yang H, Korivi M, Lin M, et al. Antihemolytic and antioxidant properties of pearl powder against 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride-induced hemolysis and oxidative damage to erythrocyte membrane lipids and proteins [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(4): 898-907
- [12] Zheng L, Zhao Y J, Dong H Z, et al. Structure-activity relationship of antioxidant dipeptides: Dominant role of Tyr, Trp, Cys and Met residues [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 21: 485-496
- [13] Ohashi Y, Onuma R, Naganuma T, et al. Antioxidant properties of tripeptides revealed by a comparison of six different assays [J]. Food Science & Technology International Tokyo, 2015, 21(5): 695-704

(下转第 69 页)