

# 牡蛎寡肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 L02 人肝细胞的保护作用

刘淑集, 许旻, 路海霞, 廖登远, 苏永昌, 王茵, 潘南, 陈晓婷, 苏捷, 刘智禹

(福建省水产研究所, 福建省海洋生物增养殖与高值化利用重点实验室, 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 国家海水鱼类加工技术研发分中心(厦门), 福建厦门 361013)

**摘要:** 为了研究牡蛎寡肽对自由基清除作用及对人肝细胞 L02 细胞氧化损伤的保护作用, 测定了牡蛎寡肽对羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 的清除率, 并建立过氧化氢 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 氧化损伤人肝细胞 L02 的模型, 研究牡蛎寡肽对氧化损伤 L02 细胞的存活率、活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS)、抗氧化酶系 (superoxide dismutase/SOD, glutathione/GSH) 含量的影响。结果表明, 牡蛎寡肽对羟自由基的 IC<sub>50</sub> 为 0.38 mg/mL。2 mg/mL 牡蛎寡肽对于 L02 细胞的增殖率仍为 123.98%。模型组 SOD 和 GSH 水平分别降低了 40%、64.87%, 而 ROS 增加了 1 倍。当添加不同剂量牡蛎寡肽后, 中剂量组细胞中 SOD 含量几乎恢复到正常组水平, GSH 活性也提高了 118.89%, ROS 水平降到模型组的 62.43%, 说明牡蛎寡肽对 L02 细胞无毒, 能降低氧化损伤的 L02 细胞内的 ROS 水平, 显著提高 SOD 和 GSH 含量, 对细胞起到保护作用。因此, 牡蛎寡肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致氧化损伤的人肝 L02 细胞具有保护作用, 可能是通过清除自由基, 保护细胞内抗氧化酶系活性, 抑制 ROS 的过多积累来实现。

**关键词:** 牡蛎寡肽; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 氧化损伤; 自由基; L02 细胞

文章编号: 1673-9078(2020)05-1-6

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.001

## Protective Effects of Oyster Oligopeptide against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Damage in Human L02 Cells

LIU Shu-ji, XU Min, LU Hai-xia, LIAO Deng-yuan, SU Yong-chang, WANG Yin, PAN Nan, CHEN Xiao-ting, SU Jie, LIU Zhi-yu

(Fisheries Research Institute of Fujian, Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resource, National Research and Development Center for Marine Fish Processing (Xiamen), Xiamen 361013, China)

**Abstract:** To study the scavenging capacity of free radicals and protective effect of oyster oligopeptide against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced oxidative damage in human liver L02 cells were determined. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury model was established to analyze the influence of oyster oligopeptide on the survival rate of L02 cells, level of reactive oxygen species (ROS), and contents of antioxidant enzymes (superoxide dismutase/SOD and glutathione/GSH). Results showed that IC<sub>50</sub> of oyster oligopeptide for hydroxyl free radical was 0.38 mg/mL. The proliferation rate of L02 cells treated with oyster oligopeptide at 2 mg / mL was still 123.98%. The levels of SOD and GSH of the model group treated with 400  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased by nearly 40% and 64.87%, respectively, while the level of ROS increased by a factor of two. After the addition of oyster oligopeptide at different concentrations, the level of SOD in the middle dosage group was almost reversed to the normal level, while the activity of GSH increasing by 118.89% and the level of ROS decreasing to 62.43% of that for the model group. These results indicated that oyster oligopeptide was nontoxic to L02 cell, and could decrease the level of ROS and enhance the contents of antioxidant enzyme SOD and GSH in the oxidative stressed L02 cells, providing protective effects on cells. Therefore, oyster oligopeptide was capable of

引文格式:

刘淑集,许旻,路海霞,等.牡蛎寡肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 L02 人肝细胞的保护作用[J].现代食品科技,2020,36(5):1-6

LIU Shu-ji, XU Min, LU Hai-xia, et al. Protective effects of oyster oligopeptide against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human L02 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 1-6

收稿日期: 2019-11-01

基金项目: 福建省海洋经济发展补助资金(留省部分)项目(FJHJF-L-2017-1); 福建省海洋高新产业发展专项(闽海洋高新[2014]20号, 闽海洋高新[2016]07号); 福建省科技重大专项(2014NZ0001-1); 厦门市海洋经济创新发展区域示范项目(12GZP001SF02)

作者简介: 刘淑集(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 水产品加工及海洋生物活性物质研究

通讯作者: 刘智禹(1971-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 水产品加工及综合利用

protecting human L02 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury, possibly through scavenging free radicals, protecting cellular antioxidant enzymes, and inhibiting the excessive accumulation of ROS.

**Key words:** oyster oligopeptide; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; oxidative injury; free radical; L02 cell

牡蛎是一种常见的大宗水产贝类,几乎遍布我国沿海各省。牡蛎味道鲜美,营养丰富,富含蛋白质、糖原、牛磺酸、锌及其它微量元素等活性物质,是一种潜在的天然保健食品。根据已有的报道显示,牡蛎多肽具有抑制 ACE 活性、抗氧化、调节免疫、抗菌等生物活性,如邱娟等<sup>[1]</sup>提取出了牡蛎 ACE 抑制肽,其 IC<sub>50</sub> 为 0.80 mg/mL; LIU 等<sup>[2]</sup>提取的牡蛎抗菌肽 Cgpep33,能够抑制多种细菌和真菌;刘淑集等<sup>[3]</sup>研究牡蛎寡肽能够正面调节由 CTX 引起的免疫低下小鼠的免疫功能。牡蛎多糖具有预防糖尿病、抗肿瘤等功效;牡蛎牛磺酸能够抗疲劳、增强免疫力等功效。但是,当前牡蛎的应用还是以鲜食或简单加工成干制品、制成蚝油等调味品,对其进行精深加工利用较少,利用其功能活性成分开发出健康功能性产品已成为今后研究方向与热点。

氧化和机体的生命健康密切相关,活性氧(reactive oxygen species, ROS)是指一类含氧的化学反应性化学物质,包括羟基自由基、单线态氧、 $\alpha$ -氧、过氧化物和超氧化物等,在细胞内不断产生和清除,在细胞信号传导中扮演了重要角色,参与多种生理和病理过程。过氧化氢(Hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)是体内代谢的产物,同时也是一种 ROS,在诱导细胞的损伤乃至死亡中起关键作用。外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 易穿透细胞膜,与细胞内的还原型铁离子通过 Fenton 反应,生产高度毒性的羟自由基,引起胞内 ROS 累积,同时也会刺激胞内其它种类 ROS 的产生;过量产生的 ROS 会引起细胞氧化应激,引起细胞重要组成如蛋白、脂质体等过氧化,继而引发线粒体功能障碍,从而发生细胞功能紊乱、氧化损伤<sup>[4]</sup>。所以可以用产生 ROS 的多少来判断机体受到氧化应激而损伤的程度。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的细胞氧化损伤已成为研究细胞氧化应激损伤的重要模型之一。为进一步了解牡蛎寡肽的抗氧化活性及对氧化应激损伤的保护作用,本实验在体外检测牡蛎寡肽对自由基清除能力的基础上,建立 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤 L02 人肝细胞模型,探讨牡蛎寡肽对氧化损伤细胞内的抗氧化酶系及 ROS 的影响,为牡蛎寡肽往保健食品开发方向提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

超级电热恒温水浴锅(DKB-501A型),上海精宏实验设备有限公司;酶标仪(Multiskan FC),美国 Thermo;紫外可见分光光度计(UV-1100),上海美谱达仪器有限公司;二氧化碳培养箱(CR-80),澳州恒立;倒置显微镜(LH50A型),Olympus;立式灭菌锅(STIKMJS),美国施都凯;超低温冰箱(DW-86L388),海尔;高速冷冻离心机(5804R);德国 Eppendorf 公司;涡旋振荡器(IKA MS3basic),德国 IKA。

胎牛血清 FBS、胰蛋白酶,美国 GIBCO 公司;RPMI-1640 完全培养基、SOD、GSH 试剂盒,碧云天生物技术研究所;MTS,美国 Sigma 公司;PBS,美国 HyClone;Bradford 蛋白浓度测定、Hank's 液、牛血清白蛋白 BSA,美国 Pierce 公司;DCFH-DA,美国 Bioluminor 公司;链霉素、青霉素,山东鲁抗医药股份有限公司;无水乙醇、水杨酸、FeSO<sub>4</sub>、Tris、盐酸、邻苯三酚、抗坏血酸、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,市售分析纯。

### 1.2 样品及细胞株

人肝细胞 L02 细胞株,中山大学。

牡蛎寡肽,参照文献<sup>[5]</sup>进行提取制备,将牡蛎肉匀浆,加入 2 倍水、胰蛋白酶(7500 U/g)和风味蛋白酶(450 U/g),调 pH 8.0,在 50 °C 条件下酶解 5 h,100 °C 灭酶 10 min,冷却,三层纱布过滤,滤液依次通过陶瓷膜(200 目)、截留分子量为 5000 u 和 1000 u 的超滤膜及纳滤膜,冻干,获得牡蛎寡肽粉,通过 GPC 测定分子量低于 1000 u 的占 93%以上。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 清除羟自由基能力测定

羟自由基清除率的测定参考 Li Yanhong<sup>[6]</sup>的方法并进行改进。取不同浓度的样品溶液 1.0 mL,分别加入 0.5 mL 硫酸亚铁(9.0 mmol/L),0.5 mL 水杨酸-无水乙醇(9.0 mmol/L),0.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(8.8 mmol/L),搅拌均匀,37 °C 恒温水浴 30 min,测定 510 nm 吸光度,记为 A。以蒸馏水代替样品,测定吸光度记为 A<sub>空</sub>;以蒸馏水代替 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,测定吸光度记为 A<sub>0</sub>。以 Vc 作为阳性对照;牡蛎寡肽对羟自由基清除率 P 公式为:

$$P = \frac{A_{空} - (A - A_0)}{A_{空}} \times 100\%$$

### 1.3.2 细胞培养

将复苏后的 L02 细胞株接种于含 10%胎牛血清、1%双抗的 RPMI 1640 培养液,放入 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱孵育。细胞铺满培养瓶底 80%左右时,用 1 mL 胰酶消化 1 min,按 1:3 传代,培养 3 代后用于后续实验。

### 1.3.3 牡蛎寡肽溶液剂量的筛选

取对数生长期的 L02 细胞,用胰酶消化后加入 RPMI 1640 培养液,倒置显微镜下计数,调节细胞浓度至  $2.0 \times 10^5$  个/mL。将细胞悬浮液接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ L,5% CO<sub>2</sub>、37 °C 下培养 24 h,弃细胞培养液,加入用 RPMI 1640 配置的不同浓度的牡蛎寡肽溶液(浓度分别为 0、62.5、125、250、500、1000  $\mu$ g/mL,培养 24 h,弃去培养液,用 PBS 洗 3 遍,用 MTS 法测定 OD 值,观察细胞的生长状态,并根据公式存活率%=实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times$ 100,计算细胞存活率。

### 1.3.4 L02 细胞过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 损伤模型的建立

取对数生长期的 L02 细胞,用胰酶消化后加入 RPMI 1640 培养液,倒置显微镜下计数,下培养 24 h,弃细胞培养液,加入用 RPMI 1640 配置的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液,终浓度分别为 0 (空白组)、200、4000、600、800、1000  $\mu$ M,每组浓度设定 6 个平行。继续培养 24 h,弃细胞培养液,用 PBS 洗涤 3 次后加入 200  $\mu$ L RPMI1640,每孔再加入 10  $\mu$ L MTS 溶液 (5 mg/mL),继续培养 4 h,弃上清,加入 150  $\mu$ L DMSO,轻微振荡至紫色结晶溶解,常温放置 10 min,测定 570 nm 吸光度,按公式抑制率%= (空白组-实验组)/空白组 $\times$ 100,计算 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞 L02 的抑制率。

### 1.3.5 细胞中 SOD、GSH 含量的测定

将 10 mL L02 细胞培养液 ( $2.0 \times 10^5$  个/mL) 接种于细胞培养瓶中,在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 下孵育 24 h 至细胞贴壁,收集细胞,将贴壁细胞随机分 5 组,正常组和模型组添加 RPMI 1640 培养液,样品组分别添加 400、500、600  $\mu$ g/mL 牡蛎寡肽溶液,培养 24 h 后将细胞和细胞培养液分离。模型组和样品组加入 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 再继续培养 4 h。细胞培养液于 4 °C、1500 r/min 离心 5 min 后取上清液待测,细胞用 PBS 清洗细胞 3 次后,于 4 °C、1000 r/min 离心 10 min 后留细胞沉淀,再加入 PBS,冰水浴下超声破碎(功率 300 W,5 s/次,间隔 30 s,重复 3 次),采用试剂盒法测定 SOD、GSH 含量<sup>[7]</sup>,用 BCA 试剂盒方法测定蛋白质含量。

### 1.3.6 细胞内活性氧 (ROS) 检测

取对数生长期的 L02 细胞,加胰酶消化后加入

RPMI 1640 培养液,倒置显微镜下计数,调节细胞浓度至  $2.0 \times 10^5$  个/mL。将细胞悬浮液接种于 24 孔板,于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下孵育 24 h,弃细胞培养液。实验分组,正常组和模型组加入 RPMI 1640 培养液,样品组则加入 400、500、600  $\mu$ g/mL 牡蛎寡肽溶液,培养 24 h,收集细胞,用 10  $\mu$ M DCFH-DA 荧光探针标记细胞,37 °C 孵育 40 min,模型组和样品组加入 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 5 min,然后在激发波长 488 nm,发射波长 525 nm 下测定细胞中 DCF 的荧光值,即可反映细胞内 ROS 的产生量<sup>[8,9]</sup>。

### 1.3.7 数据处理

实验数据采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,结果都以平均值 (mean)  $\pm$  标准差 (SD) 表示,用 one way-ANOVA 进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 牡蛎寡肽对羟自由基的清除能力分析

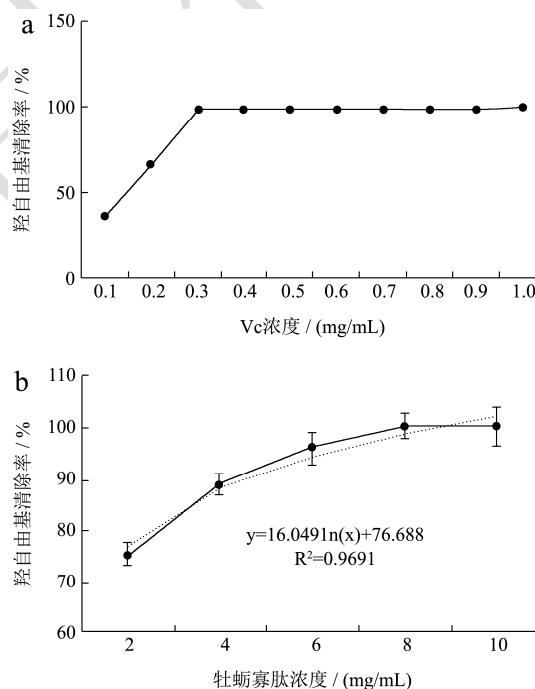


图 1 牡蛎寡肽体外清除羟自由基活性

Fig.1 The scavenging activity of oyster oligopeptide on  $\cdot$ OH *in vitro*

羟自由基是体内最具活性和分布最为广泛的自由基之一,几乎可以对任何细胞产生伤害,因此清除羟自由基可以作为判断抗氧化能力的重要依据<sup>[10]</sup>。硫酸亚铁和双氧水反应生成羟自由基,羟自由基氧化水杨酸的产物在 510 nm 处具有最大吸收,因此可以根据产物吸光度值来判断羟自由基多少。由图 1 可以看出牡蛎寡肽对羟自由基具有一定的清除能力,牡蛎寡肽

溶液在 2~10 mg/mL 范围内其清除率大大增加, 几乎成为线性关系, 当浓度达到为 6 mg/mL 左右时其羟自由基清除率即可达到 95%以上。牡蛎寡肽清楚羟自由基的拟合曲线方程式为  $y=16.049\ln(x)+76.688$ ,  $R^2=0.9691$ , 根据曲线方程式计算  $IC_{50}$  为 0.38 mg/mL, 说明牡蛎寡肽对清除羟自由基的能力较强, 且清除能力与浓度均有明显的量效关系。这结果与已有的相关报道结果类似, 甚至清除羟自由基的效果更好。如郝更新等<sup>[11]</sup>采用超滤法浓缩富集的<4000 u 牡蛎蛋白抗氧化活性肽对羟自由基的  $IC_{50}$  为 17.92 mg/mL, 组氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、色氨酸及苯丙氨酸得到了富集。余杰等<sup>[12]</sup>采用双酶酶解纯化获得相对分子质量为 751 的抗氧化活性肽组分,  $EC_{50}$  为 0.529 mg/mL。林海生等<sup>[13]</sup>也研究了牡蛎蛋白酶解物的抗氧化活性, 发现分子量主要集中在 500~3091 u, 当浓度为 25 mg/mL 时, 超氧自由基清除率和羟自由基的清除率分别为 68.86%和 21.20%。本文的牡蛎寡肽是采用外切酶与内切酶相结合的方法酶解牡蛎, 并通过陶瓷膜、超滤、纳滤等多级膜分离技术制备的, 更好地保留了有助于抗氧化活性的氨基酸, 因此具有较强的清除羟自由基能力。

## 2.2 牡蛎寡肽对 L02 细胞无毒剂量的确定

培养 L02 细胞, 将牡蛎寡肽分别配制成 0~2000  $\mu$ g/mL 浓度的溶液, 采用 MTS 法研究牡蛎寡肽对 L02 细胞增殖率的影响, 结果见图 2。牡蛎寡肽能够促进 L02 细胞的增殖, 随着浓度的增加, 增殖率也逐渐增加, 当牡蛎寡肽的浓度增加到 500  $\mu$ g/mL 后, 增殖率才略有降低的趋势, 但仍高于 100% ( $p<0.01$ ); 当牡蛎寡肽浓度高达 2000  $\mu$ g/mL, L02 细胞的增殖率仍为 123.98% ( $p<0.01$ ), 说明牡蛎寡肽对于 L02 细胞是无毒性的。

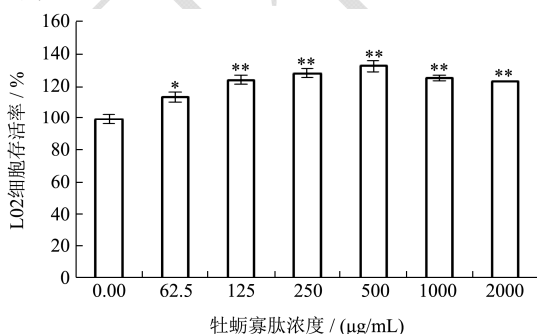


图 2 牡蛎寡肽对 L02 细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of oyster oligopeptide on the viability of L02 cell

## 2.3 不同浓度 $H_2O_2$ 对 L02 细胞增殖的影响

通过添加 0~1000  $\mu$ M  $H_2O_2$  不同浓度的  $H_2O_2$  对

L02 细胞进行氧化损伤, 建立  $H_2O_2$  损伤模型, 筛选  $H_2O_2$  的剂量。由图 3 可知, 随着  $H_2O_2$  浓度的加大, 对 L02 细胞的损伤逐渐增加, 当  $H_2O_2$  浓度达到 400  $\mu$ M 时, L02 细胞的存活率只剩下 55.70% ( $p<0.01$ ), 显著下降。太高浓度的  $H_2O_2$  对细胞造成的损伤过大, 会发生不可逆转的损伤, 不利于后期药物对其进行修复。因此, 选择浓度为 400、500、600  $\mu$ M 的  $H_2O_2$  作为损伤条件, 建立  $H_2O_2$  损伤模型, 进行后续实验。

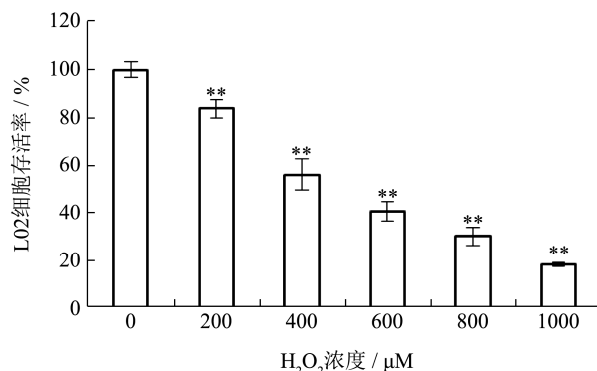


图 3 牡蛎寡肽对 L02 细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of oyster oligopeptide on the viability of L02 cell

## 2.4 牡蛎寡肽对 $H_2O_2$ 致 L02 细胞损伤的保护作用

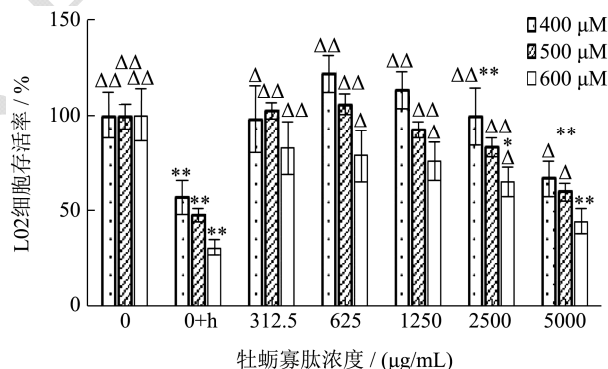


图 4 牡蛎寡肽对 L02 细胞存活率的影响

Fig.4 Effect of oyster oligopeptide on the viability of L02 cell

注: \*与正常对照组相比,  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ;  $\Delta$ 与模型组相比,  $\Delta p<0.05$ ,  $\Delta\Delta p<0.01$ 。

分别采用 400~600  $\mu$ M 的  $H_2O_2$  对 L02 细胞进行化学性损伤, 然后添加 0~5000  $\mu$ g/mL 不同浓度的牡蛎寡肽溶液, 研究牡蛎寡肽对受损伤肝细胞 L02 的保护作用。结果见图 4。肝细胞 L02 在 400、500、600  $\mu$ M 浓度的  $H_2O_2$  作用下, 细胞存活率都严重下降, 分别只剩下 57.55%、48.04%和 31.15%, 均显著下降 ( $p<0.01$ )。当添加了不同浓度的牡蛎寡肽后, 受损肝细胞的存活率均不同程度地回升。特别是当  $H_2O_2$  的浓度较小即 400  $\mu$ M 时, 浓度为 625  $\mu$ g/mL 的牡蛎寡

肽对受损肝细胞的存活率达到最高 122.43% ( $p<0.01$ ), 甚至还能促进细胞的增殖。但是再继续加大牡蛎寡肽溶液的浓度, 过多的外源物对于细胞会造成负担, 导致存活率又下降, 如当浓度提高到 5000  $\mu\text{g/mL}$  时, L02 细胞的存活率仅为 67.46% ( $p<0.05$ )。当 L02 细胞受到较高浓度如 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤, 后续的修复效果就比较差。因此, 可以揭示一定剂量的牡蛎寡肽对于  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起的 L02 肝细胞损伤具有一定的保护作用。

## 2.5 牡蛎寡肽对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导 L02 细胞 SOD、GSH 及 ROS 的影响

SOD 和 GSH 是在机体的氧化系统中起着重要的作用, 其水平的高低可以反映出机体对自由基清除能力的强弱<sup>[14]</sup>。在细胞氧化损伤的研究中,  $\text{H}_2\text{O}_2$  所造成的氧化损伤模型已成为研究各类细胞氧化损伤的重要工具<sup>[15]</sup>。ROS 是生物在有氧代谢的过程中是一种中间产物, 具有调控细胞生长、细胞凋亡等作用, 同时也具有细胞毒作用<sup>[16]</sup>, 是细胞在有氧代谢过程中产生的一系列活性氧簇<sup>[17]</sup>, 因此, ROS 作为一种常见的指标用于评价外源物质对机体的影响情况<sup>[18]</sup>。 $\text{H}_2\text{O}_2$  是一种与细胞氧化应激密切相关的 ROS, 能引起氧化损伤, 刺激细胞产生更多的 ROS<sup>[19]</sup>。据 Bing Feng<sup>[20]</sup>等的研究, 确定  $\text{H}_2\text{O}_2$  的诱导条件为浓度在 0.40~0.80 mM, 时间 6 h。本文通过对  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤浓度 0~1000  $\mu\text{M}$  的摸索, 确定以 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  作为损伤条件, 建立  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤模型。然后分别采用 400、500 和 600  $\mu\text{M}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$

对 L02 细胞进行氧化损伤, 然后添加一系列不同浓度的牡蛎寡肽溶液, 研究牡蛎寡肽对受损伤的肝细胞 L02 的保护作用。结果如表 1 所示, 用 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理, 模型组细胞 SOD 的含量比正常组的下降近 40% ( $p<0.01$ ), 而不同剂量的牡蛎寡肽溶液能够显著地抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  所引起的细胞 SOD 含量的减少 ( $p<0.01$ ), 分别是模型组 SOD 含量的 1.45、1.59、1.61 倍。当牡蛎寡肽溶液浓度达 625  $\mu\text{g/mL}$  时(中剂量组), 细胞 SOD 的含量几乎恢复到正常组的水平。高剂量组(1250  $\mu\text{g/mL}$ )的也恢复了 SOD 的水平。当用 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理模型组细胞 GSH 活性急剧下降 ( $p<0.01$ ), 仅为正常组细胞的 35.13%。而添加了不同浓度的牡蛎寡肽溶液处理, 能够显著地抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  所引起的细胞 GSH 活性的下降 ( $p<0.05$ ), 低、中、高剂量组的 GSH 含量分别比模型组的提高了 29.13%、118.89%、162.73%, 呈剂量依赖性。

由表 1 也可以看出, 加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激的细胞产生的 ROS 均比正常组多, 模型组产生的 ROS 几乎是正常组的 1 倍。用牡蛎寡肽溶液提前孵育的细胞, 与模型组相比, 产生的 ROS 含量明显下降, 且随着牡蛎寡肽剂量的增加, 细胞内产生的 ROS 显著减少, 低、中、高剂量组的 ROS 分别降低到模型组的 84.30%、62.43%、45.98%, 呈剂量效应 ( $p<0.01$ ), 且高剂量组的 ROS 水平已接近正常组水平。由此可见, 牡蛎寡肽能够抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 LO2 细胞产生 ROS。与魏颖等<sup>[21]</sup>的研究结果一致, 她研究表明含有相对分子量低于 1000 u 的八肽以下的牡蛎短肽, 具有抑制细胞内 ROS 生成的能力。

表 1 牡蛎寡肽对  $\text{H}_2\text{O}_2$  致 L02 细胞损伤的抗氧化相关酶含量的影响

组别	SOD/(U/mg prot)	GSH/(Umol/g prot)	ROS/(U/mg prot)
正常组	51.26±1.15**	66.75±0.64**	4299.67±122.35**
模型组	31.53±0.74 $\Delta\Delta$	23.45±0.56 $\Delta$	9143.00±257.78 $\Delta\Delta$
低剂量组	45.57±1.56 $\Delta$ **	30.28±0.24 $\Delta\Delta$ **	7708.33±181.33 $\Delta\Delta$ **
中剂量组	50.13±1.87**	51.33±0.97 $\Delta$ **	5708.12±111.23 $\Delta$ **
高剂量组	50.77±1.42**	61.61±1.09**	4204.67±224.26**

注:  $\Delta$  与正常对照组相比,  $\Delta p<0.05$ ,  $\Delta\Delta p<0.01$ ; \*与模型组相比,  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ 。

## 3 结论

3.1 采用体外清除羟自由基的方法测定了牡蛎寡肽的抗氧化能力, 结果表明牡蛎寡肽清除羟自由基的能力较强, 且清除能力与浓度均有明显的量效关系。

3.2 采用以  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激诱导人肝细胞 L02 细胞, 建立细胞氧化损伤模型, 加入不同剂量的牡蛎寡肽溶液, 研究牡蛎寡肽对氧化损伤 L02 细胞的保护作用。结果

表明, 牡蛎寡肽能够剂量依赖性地提高 SOD 含量和 GSH 活性, 抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的氧化损伤细胞 ROS 的增长。

3.3 综上所述, 牡蛎寡肽对  $\text{H}_2\text{O}_2$  致氧化损伤人肝细胞 L02 具有保护作用, 可能是通过保护细胞内抗氧化酶的活性、抑制 ROS 的过多产生和阻断氧自由基对细胞的破坏来实现, 其确切的作用通路及构效关系有待于进一步的深入研究。

## 参考文献

- [1] 邱娟,沈建东,翁凌,等.利用牡蛎制备 ACE 抑制肽的工艺优化[J].食品科学,2017,38(16):165-172  
QIU Juan, SHEN Jian-dong, WENG Ling, et al. Optimization of angiotensin-i converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Food Science, 2017, 38(16): 165-172
- [2] Liu Zunying, Dong Shiyuan, Xu Jie, et al. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin [J]. Food Control, 2008, 19: 231-235
- [3] 刘淑集,许旻,苏永昌,等.牡蛎寡肽对免疫底下小鼠模型免疫功能的影响[J].华南师范大学学报(自然科学版),2018, 50(2):70-76  
LIU Shu-ji, XU Min, SU Yong-chang, et al. Effect of oyster oligopeptide on immunologic function in immunosuppressive mice [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2018, 50(2): 70-76
- [4] Gorman AM, McGowan A, O'Neill C, et al. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration [J]. J Neurol Sci, 1996, 139(4): 45-52
- [5] 许旻,吴靖娜,苏捷,等.复合酶提取牡蛎抗氧化肽的工艺研究[J].福建水产,2014,36(5):368-375  
XU Min, WU Jing-na, SU Jie, et al. Optimizing conditions of antioxidative peptides from oyster by compound enzymatic hydrolysis [J]. Journal of Fujian Fisheries, 2014, 36(5): 368-375
- [6] Li Yanhong, Jiang Bo, Zhang Tao, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH) [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 444-450
- [7] Ce Shi, Xiangrong Chen, Zuoqia Liu, et al. Oleuropein protects L-02 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress by increasing SOD1, GPx1 and CAT expression [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 85: 740-748
- [8] Chao Zhu, Yuchen Dong, Haile Liu, et al. Hesperetin protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggered oxidative damage via upregulation of the Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway in ARPE-19 cells [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 88: 124-133
- [9] 王佳,孙霞,董四君.邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)对THP-1细胞IL-1 $\beta$ 和MMP-8表达及ROS的影响[J].生态毒理学报,2013,8(3): 350-356  
WANG Jia, SUN Xia, DONG Si-jun. Effects of DEHP on expression of IL-1 $\beta$  and ROS production in THP-1 cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 350-356
- [10] 张京芳,王冬梅,周丽,等.香椿叶提取物不同极性部位体外抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2007,7(5):12-17  
ZHANG Jing-fang, WANG Dong-mei, ZHOU Li, et al. Studies on antioxidative activities *in vitro* of different polarity fractions of extract from *Toona Sinensis* leaves [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2007, 7(5): 12-17
- [11] 郝更新,曹文红,郝记明,等.超滤法浓缩富集牡蛎蛋白抗氧化活性肽[J].食品工业科技,2013,34(11):77-80  
HAO Geng-xin, CAO Wen-hong, HAO Ji-ming, et al. Preparation and enrichment antioxidant peptides from oyster protein hydrolysate using ultrafiltration [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(11): 77-80
- [12] 余杰,杨振国,钟炼,等.酶法制备牡蛎抗氧化肽研究[J].海洋药物杂志,2012.31(3):31-36  
YU Jie, YANG Zhen-guo, ZHONG Lian, et al. Study on the preparation of antioxidative peptides from *Crassostrea gigas* by enzymolysis [J]. Chin J Mar Drug, 2012, 31(3): 31-36
- [13] 林海生,曹文红,章超桦,等.牡蛎蛋白酶解物的制备及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2013,34(16):163-168  
LIN Hai-sheng, CAO Wen-hong, ZHANG Chao-hua, et al. Study on preparation and antioxidant activity *in vitro* of enzymatic hydrolysis from oyster protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(16): 163-168
- [14] 卞梦瑶,方勇,裴斐,等.生姜油树脂对过氧化氢引起RAW264.7巨噬细胞损伤的保护作用[J].食品科学,2014, 35(1):244-249  
BIAN Meng-yao, FANG Yong, PEI Fei, et al. Protective effects of ginger oleoresin on hydrogen peroxide-induced toxicity in cultured RAW264.7 cells [J]. Food Science, 2014, 35(1): 244-249
- [15] 王晓茹,杜云广,王书华,等.荜苳昔和牡荆昔对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化损伤人红细胞的保护作用[J].神经药理学报,2016,6(4):1-12  
WANG Xiao-ru, DU Yun-guang, WANG Shu-hua, et al. Protective effects of orientin and vitexin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human erythrocytes [J]. Acta Neuropharmacologica, 2016, 6(4): 1-12
- [16] 翟顺生,赵贵先,张志会,等.活性氧(ROS)在三氧化二砷诱导人肝癌细胞株HepG2凋亡中的作用[J].农垦医学,2009, 31(5):385-389  
ZHAI Shun-sheng, ZHAO Gui-xian, ZHANG Zhi-hui, et al. Relationship between reactive oxygen species and apoptosis in HepG2 cells induced by arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) [J]. Journal of Nongken Medicine, 2009, 31(5): 385-389