

酶辅助提取人参-五味子复合蛋白酶解物的理化性质和抗氧化活性

史佳琳¹, 张涵¹, 王海东¹, 周泓妍¹, 张红印¹, 衣春光^{1*}, 严铭铭^{1,2*}

(1. 长春中医药大学东北亚中医药研究院, 吉林长春 130117)

(2. 吉林省中药保健食品科技创新中心, 吉林长春 130117)

摘要: 以人参、五味子为研究对象, 采用酶辅助提取法制备人参蛋白酶解产物 (*Panax ginseng* Protein Hydrolysates, PGPH)、五味子蛋白酶解产物 (*Schisandrae chinensis* Protein Hydrolysates, SCPH)、单混合蛋白酶解产物 (Single Mixed Protein Hydrolysates, SMPH) 和共提取复合蛋白酶解产物 (Co-extraction of Protein Hydrolysates, CPH), 对其理化性质和体外抗氧化活性进行研究, 并评估 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤后的修复效果。研究显示, 紫外吸收光谱中四种蛋白酶解产物在 280 nm 处均有蛋白特征峰, 红外吸收光谱中检测出二级结构的差异, 与其他蛋白酶解产物相比, CPH 电泳在 18、31 ku 处出现新条带, 并且 CPH 具有良好的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 清除能力、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS] 和羟基自由基清除能力, 分别为 86.62%、48.05% 和 95.96%, 同时还原能力为 13.57%。此外, CPH 可有效修复细胞氧化应激损伤, 降低胞内活性氧水平。综上, 该研究从大分子化合物的角度分析人参-五味子药对复合蛋白酶解物理化性质及体外抗氧化活性, 为抗氧化功能性食品或保健食品工业的开发与应用提供关于其抗氧化性能的参考依据。

关键词: 蛋白酶解产物; 理化性质; 自由基清除; 氧化应激; HepG2 细胞

文章编号: 1673-9078(2025)05-136-146

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0297

Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Enzyme-extracted *Panax ginseng*-*Schisandra chinensis* Protein Hydrolysates

SHI Jialin¹, ZHANG Han¹, WANG Haidong¹, ZHOU Hongyan¹, ZHANG Hongyin¹, YI Chunguang^{1*},
YAN Mingming^{1,2*}

(1. Northeast Asia Institute of Chinese Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)(2. Jilin Province Technology Innovation Center of Traditional Chinese Medicine Health Food, Changchun 130117, China)

引文格式:

史佳琳,张涵,王海东,等.酶辅助提取人参-五味子复合蛋白酶解物的理化性质和抗氧化活性[J].现代食品科技, 2025,41(5):136-146.

SHI Jialin, ZHANG Han, WANG Haidong, et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of enzyme-extracted *Panax ginseng*-*Schisandra chinensis* protein hydrolysates [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 136-146.

收稿日期: 2024-03-12

基金项目: 吉林省发展和改革委员会项目 (2023C029-3); 吉林省科技发展计划项目 (YDZJ202301ZYTS448)

作者简介: 史佳琳 (2000-), 女, 在读研究生, 研究方向: 中药化学, E-mail: 1473164520@qq.com

通讯作者: 严铭铭 (1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药化学, E-mail: yanmm595@126.com; 共同通讯作者: 衣春光 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药化学, E-mail: zhangdongmeil124@126.com

Abstract: *Panax ginseng* and *Schisandra chinensis* (Wuweizi) were used to prepare protein hydrolysates through enzyme-assisted extraction. The physicochemical properties and *in vitro* antioxidant activity of *P. ginseng* protein hydrolysates, *S. chinensis* protein hydrolysates, single mixed protein hydrolysates, and co-extracted protein hydrolysates (COPH) were evaluated, along with their respective effects on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in HepG2 cells. All hydrolysates showed characteristic absorption peaks at 280 nm, and distinct differences in secondary structure were observed in the infrared spectra. COPH exhibited new bands at 18 and 31 kDa during electrophoresis and demonstrated strong radical scavenging activity with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2, 2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and hydroxy radicals, as well as a ferric reducing ability of 13.57%. Additionally, COPH reduced reactive oxygen species in cells, alleviating oxidative stress. These findings suggest that *P. ginseng*-*S. chinensis* composite protein hydrolysates may have potential applications in antioxidant functional foods or dietary supplements.

Key words: protein hydrolysate; physicochemical properties; free radical scavenging; oxidative stress; HepG2 cells

蛋白质作为人体不可或缺的六大营养素之一，被誉为人体生命活动的承担者，对人体健康具有至关重要的作用^[1]。同时，植物蛋白质是人类饮食的重要组成部分，拥有诸多有益于健康的生理功能，如降低胆固醇、抗氧化，可预防与饮食相关的慢性疾病，包括糖尿病、心血管疾病、肥胖症等^[2]。众多学者目前正致力于研究黄芪、山药、枸杞等中药材中所含的植物蛋白，他们的研究成果显示，这些中药植物蛋白普遍展现出抗氧化、抗过敏、抗糖尿病以及抗癌等多重生物活性功能。

近年来，全球人口增长伴随各国减排目标，引发了蛋白质资源短缺问题，加之现有蛋白质资源在营养与生物活性上的不足，已成为全球性挑战。为应对此困境，提高现有蛋白质资源的利用效率、主动探寻新的蛋白质来源、并创新提升复合蛋白的营养价值，成为缓解蛋白质资源紧张的有效策略。因此，复合蛋白的研究开发变得尤为重要。复合蛋白是指两种或更多种简单蛋白的组合，避免单一蛋白资源的短缺和营养价值及生物活性的不完善。任广旭等^[3]的研究揭示，乳清蛋白与大豆蛋白结合形成的复合蛋白体系，凭借出色的消化性能，有助于确保血液中必需氨基酸的持续供应，进而推动肌肉蛋白的合成过程。此外，Tian 等^[4]采用等电点共沉淀技术制备大豆-小麦复合蛋白，结果表明，大豆和小麦经共沉淀处理后形成了一种新型的复合蛋白结构，其核心结构更加紧密，功能特性更加优异。目前，国内外大多数学者对于复合蛋白的研究主要集中在动物-植物的天然优质动植物蛋白而植物-植物天然活性复合蛋白研究较少^[5,6]。

本课题组前期研究发现，人参蛋白和五味子蛋

白均具有抗氧化、抗疲劳、抗衰老、提升免疫等功效^[7,8]。人参-五味子为临床经典配伍药对，源于《千金药方》中的“生脉散”。人参能够强健脾胃与肺气，同时具有恢复脉象、稳固脱症的作用；五味子则能收敛肺气、止汗，并能生津解渴，它还具备益气生津、恢复脉象的功效。人参-五味子药对本身就具有优良的生物活性，但现有的研究往往仅针对人参-五味子药对的小分子类成分研究^[9,10]，对配伍药对中蛋白类大分子化合物的研究尚为空白。因此本研究应用酶辅助提取法将人参、五味子两种蛋白进行单混与共提，构建人参-五味子复合蛋白酶解产物混合体系。研究人参-五味子单一、混合及共提取体系的理化特性与抗氧化活性，旨在为这两种中药复合蛋白在抗氧化功能性食品及健康产品开发中的应用提供理论支撑，并为进一步揭示其抗氧化活性调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人参、北五味子药材，购于吉林省长春中医药大学附属医院，经长春中医药大学姜大成教授鉴定为五加科植物人参 (*Panax ginseng* C.A.Mey.) 的干燥根和根茎和木兰科植物五味子 (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill) 干燥成熟的果实；蛋白质分子量标准、Folin-酚试剂、邻啡罗啉 (邻二氮菲)、1,1-二苯基-2-苦基肼 (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)、2,2-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐 ABTS (Diammonium Salt)、维生素 C，北京索莱宝科技有限公司； γ -半胱氨酰甘

氨酸, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 碱性蛋白酶 (100 U/mg), 上海源叶生物科技有限公司, Bradford 蛋白质定量试剂盒, 天根生化科技有限公司; 增强型 CCK-8 试剂盒 (Enhanced Cell Counting Kit-8)、PBS, 北京博奥森生物技术有限公司; 人肝癌细胞 HepG2、MEM 培养基, 武汉普诺赛生命科技有限公司; 胎牛血清、胰酶, 美国 Gibco 有限公司; Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Infinite M200 PRO 酶标仪, 瑞士 TECAN 公司; MS303S 千分之一分析天平、AL204 万分之一分析天平、AB135-S 十万分之一分析天平、S220-K-CN 标准型 pH 计, 梅特勒-托利多仪器有限公司; Mini-PROTEAN Tetra Cell 蛋白电泳仪, 美国 Bio-rad 公司; UV-3600i Plus 紫外可见分光光度计, IRAffinity-1s 傅里叶变换红外光谱仪, 日本岛津仪器有限公司; S82-2 磁力搅拌器, 上海志威电器有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅, 金坛市佳美仪器有限公司; SCIENTZ-50F 真空冷冻干燥机, 宁波新芝冻干设备股份有限公司; Sorvall LYNX 高速离心机, Invitrogen iBright FL 1000 凝胶成像仪, 美国 Thermo Fisher 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

1.3.1.1 人参蛋白酶解产物与五味子蛋白酶解产物的制备

各称取人参、五味子药材粉 30 g, 按 1:20 料液比加蒸馏水匀浆, 调 pH 值为 9.0, 温度为 55 ℃, 加入含有 1% 质量分数的碱性蛋白酶, 匀浆提取 3 h, 并间隔半小时调 pH 值为 9.0, 离心 (8 000 r/min) 10 min, 取上清, 调 pH 值为 3.5, 4 ℃ 下静置 2 h, 离心 (8 000 r/min) 10 min, 弃上清, 加蒸馏水使沉淀复溶调 pH 值为中性, 冷冻干燥为 PGPH 和 SCPH。

1.3.1.2 共提取蛋白酶解产物样品制备

将人参、五味子粉碎, 按人参、五味子质量比 6:1 比例混合。操作方法同 1.3.1.1.1, 制备 COPH。

1.3.1.3 单混合蛋白酶解产物样品制备

将冻干后的 PGPH 和 SCPH 按照 6:1 的比例混合, 加入蒸馏水, 溶解, 离心 (8 000 r/min) 10 min, 取上清,

上清为 SMPH。

1.3.2 人参-五味子蛋白酶解产物最佳比例筛选

1.3.2.1 不同人参、五味子质量比蛋白酶解产物的制备

将人参、五味子粉碎, 选择 9 种人参、五味子质量比 (2:3、1:1、2:1、3:1、4:1、6:1、1:2、1:3、1:4、1:6) 进行混合, 操作方法同 1.3.1.1, 制备不同质量比的人参-五味子复合蛋白酶解产物。

1.3.2.2 蛋白含量比较

采用考马斯亮蓝 Bradford 比色法测定 9 种不同人参-五味子比例的蛋白酶解产物的蛋白含量。依据文献^[11]所述方法绘制标准曲线, 并进行了调整。稀释后的不同样品水溶液用上述方法测定, 由标准曲线求得其质量浓度。计算样品蛋白质的含量:

$$W = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

W ——样品蛋白相对含量, %;

M_1 ——上清液蛋白质含量, mg;

M_2 ——不同样品中总蛋白含量, mg。

1.3.2.3 SDS-PAGE和Tris-Tricine-SDS-PAGE分析

将 9 种不同人参-五味子质量比的蛋白酶解产物的样品溶液质量浓度配置为 5 mg/mL, 参考文献^[11]的方法进行 SDS-PAGE。Tricine-SDS-PAGE 采用试剂盒说明书的方法, 进行 Tricine-SDS-PAGE。以评价不同人参-五味子质量比蛋白酶解产物的 SDS-PAGE 和 Tris-Tricine-SDS-PAGE。

1.3.2.4 自由基清除能力比较

采用国际公认的 DPPH· 及 ABTS· 清除试验, 评估五味子蛋白的 9 种酶解产物的自由基清除活性。参考文献的方法^[11]并稍作修改。

1.3.2.5 还原能力比较

以铁离子还原能力作为评价指标, 对 9 种人参-五味子质量比的蛋白酶解产物进行比较, 参考文献的方法^[11]并稍作修改。

1.3.3 理化性质

1.3.3.1 SDS-PAGE

制备质量浓度为 5 mg/mL PGPH、SCPH、SMPH、COPH 样品, 参考文献^[11]的方法进行 SDS-PAGE。

1.3.3.2 Tricine-SDS-PAGE

Tricine-SDS-PAGE 采用试剂盒说明书的方法, 进行 Tricine-SDS-PAGE。

1.3.3.3 紫外吸收光谱

0.45 μm 微孔滤膜过滤 5 mg 溶解于 10 mL 蒸馏水中的 PGPH、SCPH、SMPH、COPH, 蒸馏水作空白对照, 200~800 nm 内紫外全波长扫描, 280 nm 处观察 PGPH、SCPH、SMPH、COPH 吸收峰强弱。

1.3.3.4 傅立叶变换红外吸收光谱 (FTIR) 检测

准确称取 2 mg PGPH、SCPH、SMPH、COPH 与 200 mg KBr 混合碾磨, 压片, 红外吸收光谱分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描范围 $500\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$, 信号扫描累加 32 次。

1.3.4 自由基清除能力

1.3.4.1 DPPH 自由基

参考文献的方法^[11]并稍作修改, 配置样品溶液, 在 517 nm 波长下测定吸光度, 选用 Vc 和 GSH 作为阳性对照。设置样品对照组为 2 mL 甲醇替代 DPPH 溶液, 空白对照组则以 2 mL 蒸馏水替换样品溶液。通过以下公式计算其清除率:

$$D = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D ——DPPH 自由基清除率, %;

A_0 ——空白对照组吸光度;

A_1 ——样品组吸光度;

A_2 ——样品对照组吸光度。

1.3.4.2 ABTS⁺自由基

参考文献的方法^[11]并稍作修改, 配置工作液, 于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光静置 12~16 h, 后以 0.01 mol/L 、pH 值 7.4 的 PBS 缓冲液稀释, 确保 734 nm 处吸光度值位于 0.7 ± 0.2 区间, 设置为空白对照组。以 Vc 和 GSH 为阳性对照组, 734 nm 处测定吸光度。通过以下公式计算清除率:

$$A = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

A ——ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_0 ——空白对照组吸光度;

A_1 ——样品组吸光度。

1.3.4.3 羟基自由基

参考文献的方法^[11]并稍作修改, 以 Vc 和 GSH 为阳性对照组, 1 mL 蒸馏水代替样品溶液设置为空白对照组, 1 mL 蒸馏水代替 0.025% 体积分数 H_2O_2 溶液设置为样品对照组, 依据以下公式

计算清除率:

$$O = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

O ——羟基自由基清除率, %;

A_0 ——空白对照组吸光度;

A_1 ——样品组吸光度;

A_2 ——样品对照组吸光度。

1.3.5 还原能力

参考文献的方法^[11]并稍作修改, 配置样品溶液, 在 700 nm 波长下测定吸光度, 使用蒸馏水进行空白校正至零, 并设立样品对照组, 其中以 2.5 mL 蒸馏水替代样品溶液。还原能力通过以下公式计算:

$$F = A_1 - A_2 \quad (5)$$

式中:

F —— Fe^{3+} 还原能力;

A_1 ——样品组吸光度;

A_2 ——样品对照组吸光度。

1.3.6 HepG2 细胞氧化应激修复作用

1.3.6.1 HepG2 细胞培养与分组

参考文献的方法^[12]培养 HepG2 细胞, 设置正常对照组、模型组和实验组, 采用浓度分别为 50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的四种蛋白酶解产物干预 24 h。

1.3.6.2 对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞增殖率的影响

参考文献的方法^[12]并稍作修改, 按照 1.3.5.1 节分组。运用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活率, 遵循说明书指示测量吸光度值, 细胞存活率计算如公式所示:

$$S = \frac{A_1}{A_2} \times 100\% \quad (6)$$

式中:

S ——细胞存活率, %;

A_1 ——样品组吸光度;

A_2 ——样品对照组吸光度。

1.3.6.3 Calcein-AM/PI 双色荧光调亡染色

在 24 孔板内以每孔体积 0.5 mL、接种密度为每毫升 1.0×10^5 个的对数生长期的 HepG2 细胞, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 环境培养 24 h, 用 H_2O_2 造模 2 h 后分别加入浓度为 50 (低)、200 (中)、400 (高) $\mu\text{g/mL}$ 的四种蛋白酶解产物培养 24 h, 使用 PBS 进行 2~3 次洗涤后, 向每孔添加 500 μL 稀

释的 Calcein-AM 溶液，在 37 ℃ 下孵育 20 min。随后，用 PBS 洗涤 3 次，再加入 200 μL 稀释的 PI 溶液，于 37 ℃ 避光条件下孵育 5 min。最后，用 PBS 洗涤 2~3 次，将样本置于荧光显微镜下进行观察。

1.3.6.4 HepG2细胞中ROS水平测定

在 6 孔板内以每孔体积 2 mL、接种密度为每毫升 1.0×10^5 个的对数生长期的 HepG2 细胞，置于 37 ℃、体积分数为 5% CO₂ 环境下培养，用 H₂O₂ 造模 2 h 后分别加入质量浓度为 50（低）、200（中）、400（高）μg/mL 的四种蛋白酶解产物培养 24 h，向每孔加入浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA 荧光探针，在 37 ℃ 下避光反应 20 min。之后，使用预冷的 PBS 对细胞进行 3 次洗涤，最后将样本置于荧光显微镜下进行观察。

1.3.7 统计分析

所有上述试验均至少重复执行三次以确保数据可靠性，所收集的数据利用 Origin 2021 及 Excel 2021 软件进行统计分析，最终成果以平均值 ± 标准差的形式呈现。

2 结果与分析

2.1 人参五味子配比最佳比例筛选

2.1.1 蛋白含量筛选

以牛血清蛋白质量为横轴，吸光度为纵轴，得到标准曲线方程 $Y=0.125\ 8X+0.497\ 5$ ， $R^2=0.991\ 0$ 。

结果表明，此方程具有良好的线性相关性。如图 1 可知，人参-五味子比例为 6:1 的相对含量最高，质量分数达 36.96%，4:1 含量次之（质量分数达 35.53%），人参-五味子比例 1:3 的蛋白质含量最低质量分数为 12.56%。

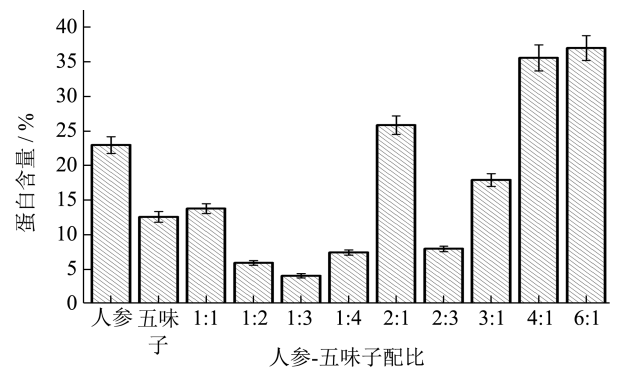


图 1 不同人参-五味子配比蛋白酶解产物的蛋白含量
Fig.1 Protein content of different ginseng-schisandra ratio protein hydrolysates

2.1.2 SDS-PAGE和Tris-Tricine-SDS-PAGE分析

不同人参-五味子配比的蛋白酶解产物条带如图 2 所示，在相同浓度下人参-五味子比例为 4:1、6:1、2:1 的亚基条带较深，说明其蛋白含量较高，但在 Tris-Tricine-SDS-PAGE 中可以看到人参-五味子比例为 6:1 的条带最深，由于在提取过程中加入碱性蛋白酶会使其产生更多的低分子量的人参-五味子复合蛋白酶解产物，因此可以看到人参-五味子比例为 6:1 的蛋白酶解产物更好。

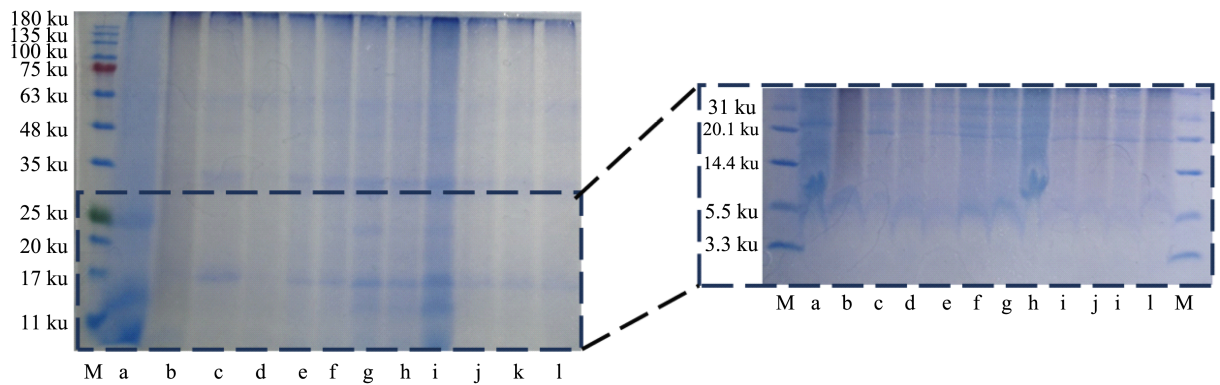


图 2 不同人参-五味子配比的蛋白酶解产物 SDS-PAGE 和 Tris-Tricine-SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE and Tris-Tricine-SDS-PAGE of protein hydrolysates with different ginseng-Schisandra ratio

注：M 为 Maker，a 为人参，b 为五味子，c 为 2:3，d 为 1:1，e 为 2:1，f 为 3:1，g 为 4:1，h 为 6:1，i 为 1:2，j 为 1:3，k 为 1:4，l 为 1:6。

2.1.3 人参-五味子不同比例的蛋白酶解产物的自由基清除能力与还原能力的对比

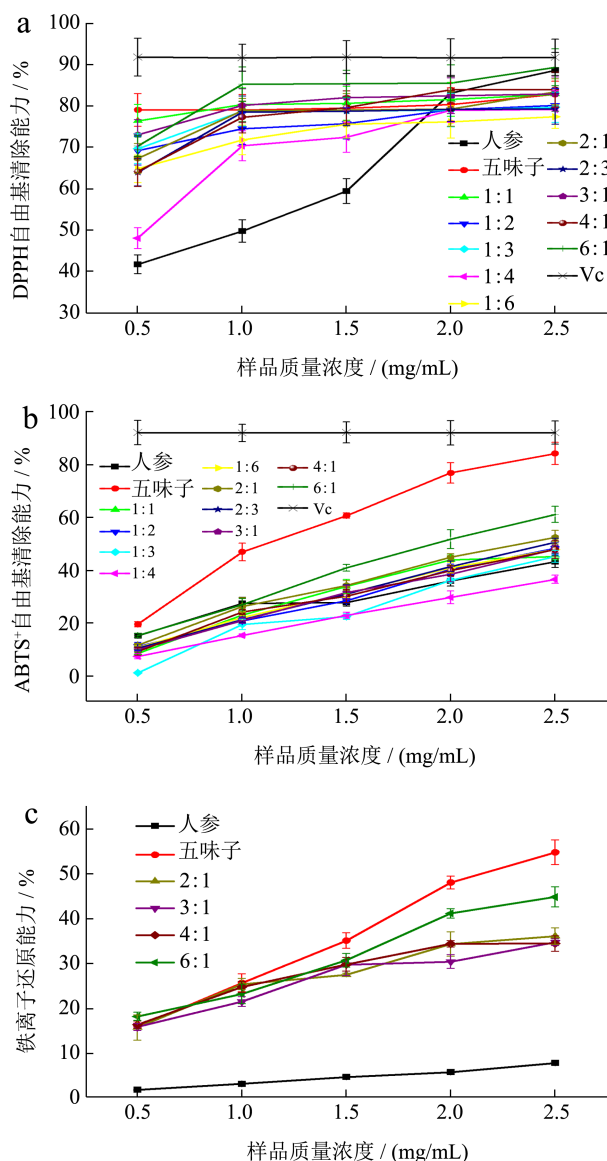


图3 不同人参-五味子配比的蛋白酶解产物的自由基清除能力及还原能力

Fig.3 The free radical scavenging ability and reducing ability of protein hydrolysates with different ginseng-schisandra ratios

由图 3a、3b 可知, 9 种人参-五味子比例的蛋白酶解产物均表现出一定的自由基清除能力。几种配比的蛋白酶解产物的 DPPH 与 ABTS⁺ 自由基清除能力随浓度的升高而升高, 在质量浓度为 2.5 mg/mL 时达到最大, 蛋白酶解产物在人参五味子质量比为 6:1 时, 对 DPPH 和 ABTS⁺ 的清除率相较于其他比例更高, 分别为 89.47% 和 60.88%, 并且其 DPPH 自由基清除能力接近 Vc (91.84%), 通过两种自由基清除实验说明, 人参五味子质量比 6:1 蛋

白酶解产物有着更好的 DPPH 与 ABTS⁺ 自由基清除能力, 而后选用四种比例 (6:1、2:1、3:1、4:1) 对还原能力进行研究, 如图 3c, 结果表明, 还原能力与样品质量浓度呈正相关, 随着质量浓度的升高而变大, 在质量浓度为 2.5 mg/mL 处最高, 在四种比例中人参-五味子 6:1 蛋白酶解产物的还原能力最强 (44.84%) > 2:1 (36.13%) > 3:1 (34.78%) > 4:1 (34.49%)。综上, 人参-五味子 6:1 蛋白酶解产物有着更好的蛋白含量, 自由基清除能力及还原能力, 因此采用人参-五味子 6:1 蛋白酶解产物作为人参-五味子共提取蛋白 (COPH) 用于后续实验研究, 并且采用单混合蛋白 (SMPH) 作为对照, 分析比较两种混合方式对蛋白理化性质及生物活性的影响。

2.2 理化性质

2.2.1 SDS-PAGE 电泳分析

由图 4 可知, PGPH 在 25、16、13 ku 处有明显条带, SCPH 条带颜色较浅, 可能是因为 SCPH 的蛋白含量较低, SMPH 和 PGPH 的条带基本一致, 而 COPH 的条带在 31、18 ku 处出现新条带, 可能是共提取的方法来提取人参-五味子蛋白酶解产物, 更能使人参蛋白酶解产物与五味子蛋白酶解产物更好的混合, 促进人参-五味子共提取蛋白酶解产物的二硫键的断裂。

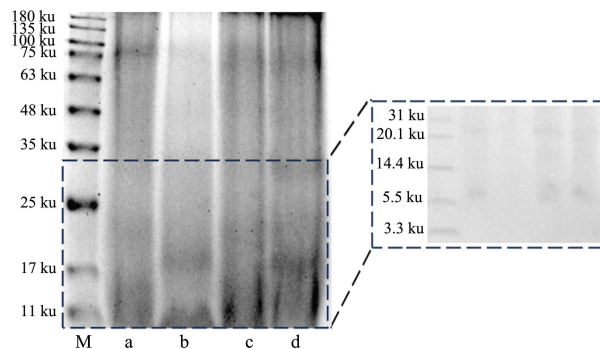


图4 四种蛋白酶解产物 SDS-PAGE 和 Tris-Tricine-SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE and Tris-Tricine-SDS-PAGE of four protein peptides

注: M 为 Marker, a 为 PGPH, b 为 SCPH, c 为 SMPH, d 为 COPH。

2.2.2 紫外吸收光谱分析

如图 5 显示了 PGPH、SCPH、SMPH、COPH 的紫外吸收光谱, 发现几种样品随吸收强度有所不同, 但最大吸收峰的位置并没有变化。共提取与单

一蛋白酶解产物的紫外吸收强度差异,可能源于采用了不同的提取溶剂,这改变了蛋白质的含量及其螺旋结构。图示中,COPH在280 nm波长下展现出最强的紫外吸收,表明其富含酪氨酸(Trp)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)等芳香族氨基酸。此现象或许归因于共提取时蛋白质空间结构展开,使得原本隐匿的内部疏水基团暴露,蛋白螺旋结构亦随之延展,进而促使色氨酸、酪氨酸等显色基团由疏水内部迁移至极性溶剂环境,增加了这些基团在蛋白质表面的分布,从而增强了紫外吸收。相反,SMPH可能导致蛋白质分子折叠并聚集,减少了暴露的发色基团数量,进而降低了紫外吸收强度。

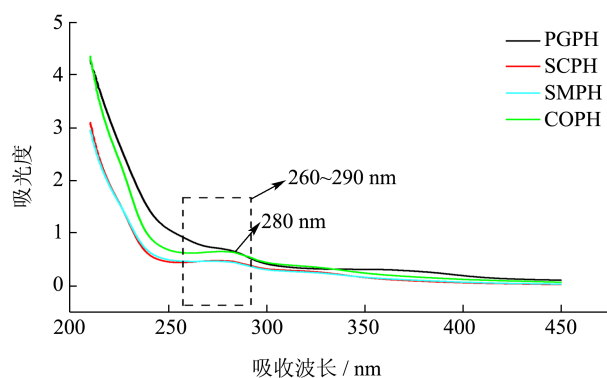


图5 四种蛋白酶解产物紫外吸收光谱

Fig.5 UV absorption spectra of four protein peptides

2.2.3 傅立叶变换红外吸收光谱(FT-IR)检测

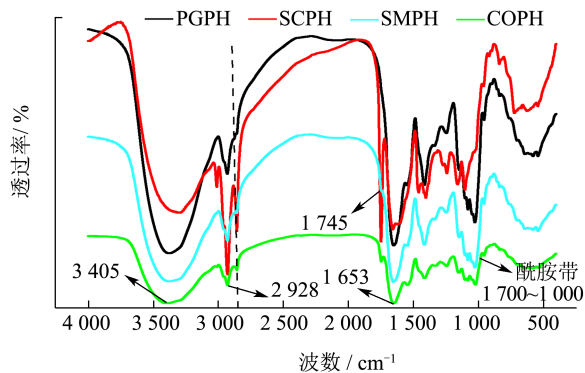


图6 四种蛋白酶解产物红外吸收光谱

Fig.6 Infrared absorption spectra of four protein peptides

如图6所示,所有样品在波数3600~3100 cm⁻¹范围内均呈现一条宽广且显著的谱带,这通常归因于蛋白酶解产物分子内部的结构特征及其分子间氢键、酰胺N-H键的伸缩振动,不同蛋白酶解产物在该范围吸收峰为3392 cm⁻¹(COPH)、3382 cm⁻¹(SMPH)、3397 cm⁻¹(SCPH)和3398 cm⁻¹(PGPH),SMPH与COPH吸收峰差异揭示了不同提取方式可能改变蛋白质内部的氢键效应、环张力、空间位阻

以及分子间与分子内的氢键状态。两者在2927 cm⁻¹处的峰位置几乎一致,表明两种提取方法对C-H键伸缩振动的影响微乎其微。位于2590~2500 cm⁻¹的弱吸收峰归属于巯基,其强度反映了巯基的含量。值得注意的是,SCPH在2856 cm⁻¹处展现出较强的吸收峰,这表明SCPH含有较高水平的巯基。

如图7所示在酰胺I带SCPH在1634 cm⁻¹处出现吸收峰说明SCPH的C=O键和C=N键的伸缩振动较高。这与邓永蓉研究发现的蚕豆蛋白酶解产物的红外吸收光谱类似^[13]。酯是一种常见的有机化合物,其在红外光谱中通常表现为在1720~1750 cm⁻¹范围内的吸收峰。四种蛋白酶解产物在1720~1750 cm⁻¹区域内的吸收峰为1744 cm⁻¹(COPH)、1742 cm⁻¹(SMPH)、1745 cm⁻¹(SCPH),这种吸收峰是由于酯中的碳氧双键(C=O)振动引起的。说明这三种蛋白酶解产物可能含有酯基,而SMPH在该范围中出现较强的吸收峰,说明SMPH中酯基含量较高。四种蛋白酶解产物的差异进一步揭示了内部结构的不同,导致了理化和抗氧化活性的差异。SMPH在1414 cm⁻¹处出现谱带说明SMPH可能含有-COOH。四种蛋白酶解产物在1480 cm⁻¹附近出现吸收峰为1482 cm⁻¹(COPH)、1484 cm⁻¹(SMPH)、1485 cm⁻¹(SCPH)、1483 cm⁻¹(PGPH),表明四种蛋白酶解产物可能存在甲基或亚甲基的官能团,这一区域的吸收峰通常与碳-碳单键振动有关。这与四种蛋白酶解产物在1190 cm⁻¹处出现吸收峰,说明这四种蛋白酶解产物可能存在羧酸,这一区域的吸收峰通常与羧酸中的C-O伸缩振动有关。

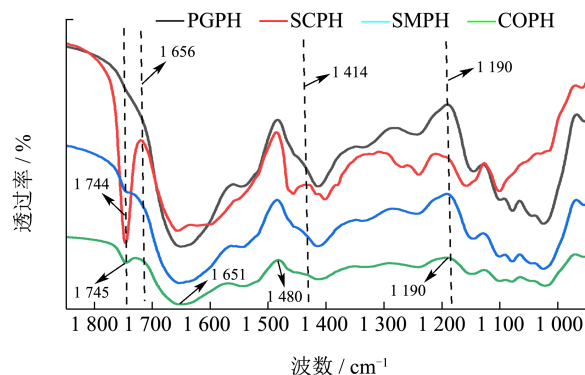


图7 各样品蛋白酶解产物酰胺带区域FT-IR的细节放大图

Fig.7 The details of the FT-IR amplification of the peptide amide band region of each sample were enlarged

2.3 自由基清除能力

2.3.1 羟基自由基清除率能力

由图8a可知,四种蛋白酶解产物对·OH均具

有一定的清除能力,各蛋白酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力均具有质量浓度依赖性,清除能力随质量浓度的提升而逐渐增强。Vc在2.0 mg/mL质量浓度时对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力趋于平衡,清除率为接近98%。PGPH和COPH在2.0 mg/mL质量浓度时对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力趋向于平缓。其中,COPH清除能力最高可达95.96%,此时的清除能力已经超越了阳性对照组中的谷胱甘肽,并接近Vc的清除水平。PGPH、SCPH和SMPH清除率最高能达到90.35%、95.61%、90.24%。因此,四种蛋白酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力大小为:COPH>SCPH>PGPH>SMPH,表明四种蛋白均具有一定 $\cdot\text{OH}$ 清除活性,且COPH的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力最好,为COPH的应用提供了参考。

2.3.2 DPPH自由基清除能力

如图8b所示,在测定浓度范围内,除SCPH外,随着样品质量浓度的增加,其他三种蛋白酶解产物对DPPH $\cdot$ 的清除能力也随之增强。在样品质量浓度为1.0 mg/mL时,COPH清除率趋向平缓。在四种蛋白酶解产物中,COPH的清除能力最高,在质量浓度为2.5 mg/mL时,清除能力达到最大值86.62%,这一水平已接近阳性对照组中Vc的清除能力。因此,四种蛋白酶解产物清除DPPH $\cdot$ 的能力排序为:COPH>SCPH>SMPH>PGPH,上述结果表明四种蛋白酶解产物中可能含有大量的供氢物质,能与自由基反应生成更稳定的产物,终止自由基链式反应。表明四种蛋白酶解产物,尤其是COPH,可以作为一种很好的DPPH $\cdot$ 清除剂。

2.3.3 清除ABTS⁺自由基能力

四种蛋白酶解产物ABTS⁺清除能力如图8c所示,四种蛋白酶解产物对ABTS⁺均具有一定的清除作用,随着质量浓度的增加,清除能力也越来越强。其中COPH在2.5 mg/mL质量浓度时,其清除率已达48.05%。表明COPH可以作为一种良好的ABTS⁺清除剂。

2.3.4 铁离子还原能力

在700 nm处光密度越大,样品的还原力越强^[14]。由图8d可知,SCPH的Fe³⁺还原能力优于其他三种蛋白酶解产物,原料的差异可能是导致碱液提取过程中抗氧化酶解产物含量有所不同的原因。在质量浓度范围0.1~2.0 mg/mL内,四种蛋白酶解产物的Fe³⁺还原能力随着样品质量浓度的提升

而增强,并在质量浓度为2.5 mg/mL时达到最高还原能力水平,COPH还原能力>SMPH>PGPH,说明共提取方法更能充分的混合SCPH和PGPH,为COPH的应用提供了参考。

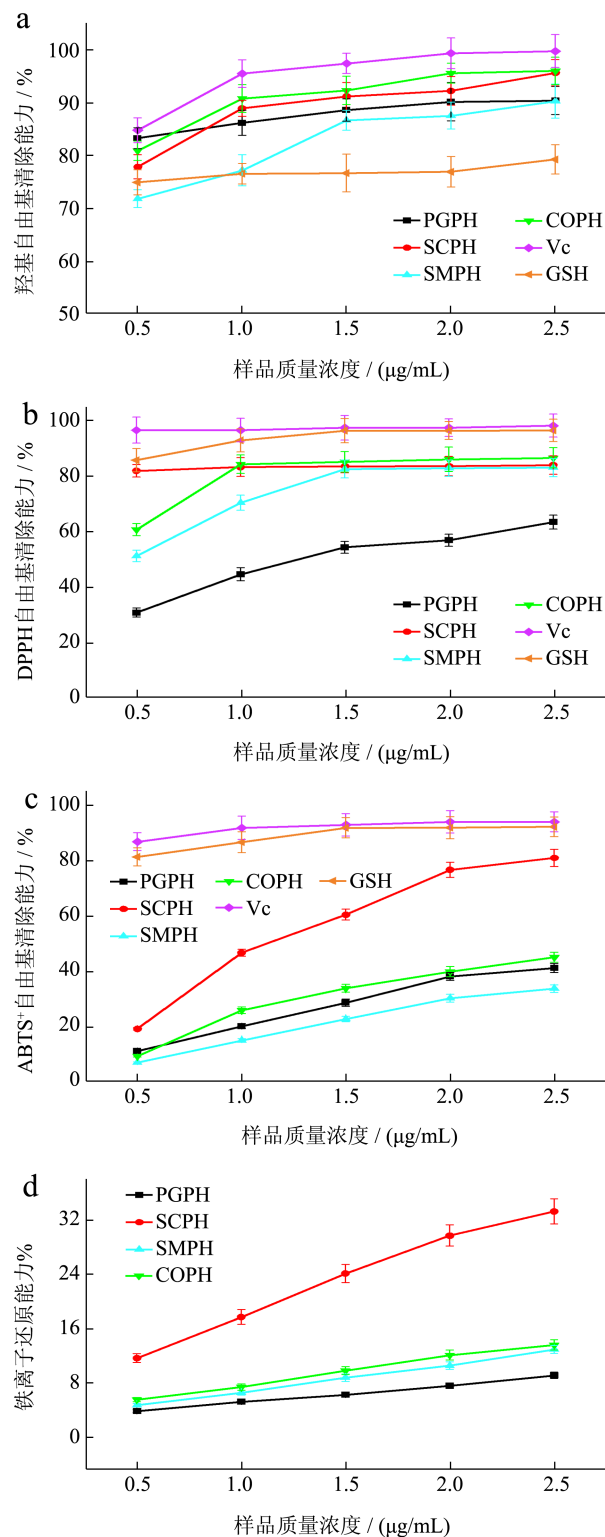


图8 四种蛋白酶解产物自由基清除能力及还原能力
Fig.8 Free radical scavenging ability and reducing ability of four protein hydrolysates

2.4 HepG2细胞氧化应激修复作用

2.4.1 四种蛋白对HepG2细胞存活率的影响

图9展示了四种蛋白酶解产物对HepG2细胞存活的影响。在400 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下,COPH组展现出最高的细胞活力。而对于SMPH组,当质量浓度超过300 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞活力开始下滑,表明在此质量浓度之上HepG2细胞受到损害。然而,所有组别的细胞存活率均保持在90%以上,符合正常存活标准。因此,后续研究将采用400 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度进行。

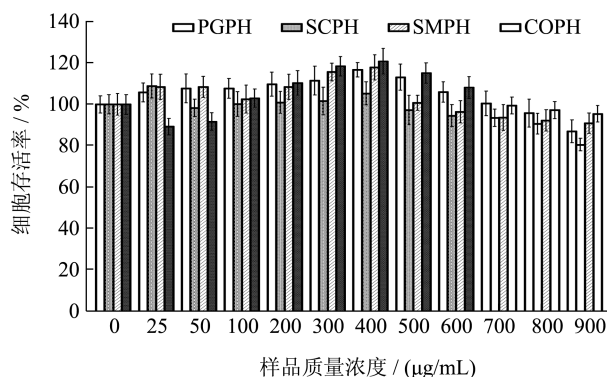


图9 四种蛋白酶解产物对HepG2细胞存活率的影响

Fig.9 The effect of four protein peptides on the survival rate of HepG2 cells

2.4.2 四种蛋白酶解产物对 H_2O_2 诱导HepG2细胞氧化应激损伤修复作用

细胞存活率作为衡量外界因素所致细胞损伤程度的重要指标,直观反映了细胞的健康状况。在氧化应激条件下,细胞内活性氧水平上升,对HepG2细胞构成氧化伤害,可能引发细胞凋亡或坏死。细胞存活率的高低,直接反映了HepG2细胞所受氧化损伤的轻重程度^[15]。通过前期研究,我们确定了以300 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 干预2 h作为构建氧化应激模型的条件,为后续研究奠定了基础。图10展示了四种不同剂量的蛋白酶解产物对HepG2细胞在氧化应激条件下存活率的影响。与空白对照组相比,模型组的细胞存活率显著降低至56.71%,这有力地证明了 H_2O_2 成功诱导了HepG2细胞的氧化应激模型。进一步地,与模型组相比,当HepG2细胞经过质量浓度为50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的四种蛋白酶解产物处理24 h后,其存活率随质量浓度的增加而逐渐上升。值得注意的是,在测定的质量浓度范围内,COPH处理后的细胞存活率始终保持在最高水

平,特别是在400 $\mu\text{g/mL}$ 时,其修复效果已接近阳性对照组。实验结果显示,这四种蛋白酶解产物均展现出对 H_2O_2 所致细胞损伤的修复能力,而COPH在修复 H_2O_2 诱导的HepG2细胞氧化应激损伤方面,其效果尤为突出,优于其他三种蛋白酶解产物。

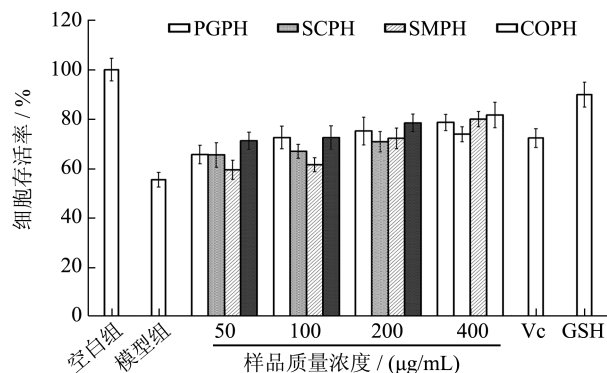


图10 不同质量浓度蛋白酶解产物对 H_2O_2 诱导HepG2细胞氧化应激损伤修复作用

Fig.10 Effects of different concentrations of protein peptides on the repair of oxidative stress injury induced by H_2O_2 in HepG2 cells

2.4.3 Calcein-AM/PI双色荧光凋亡染色

为了探究四种蛋白酶解产物如何影响HepG2细胞在 H_2O_2 诱导的氧化应激下的凋亡情况,我们采用了Calcein-AM/PI染色技术来观察凋亡细胞的染色质核形态。Calcein-AM能特异性地对活细胞进行染色,使其细胞质发出绿色荧光,而PI作为一种核染色染料,则无法穿透质膜完整的活细胞,仅能对死细胞的细胞核进行染色^[16,17]。图11的结果显示,与正常组细胞相比,模型组细胞出现了明显的皱缩现象,且细胞密度降低,绿色荧光减弱,红色细胞核变得更加明显。这表明 H_2O_2 诱导的氧化应激促进了HepG2细胞的凋亡过程。然而,与模型损伤组相比,分别加入四种蛋白酶解产物后,活细胞的绿色荧光强度普遍增强,而死细胞细胞核的红色荧光强度则有所减弱,其中COPH组显示的绿色荧光较强,红色细胞核相对较少,因此,四种蛋白酶解产物均具备修复HepG2细胞因 H_2O_2 诱导而产生的形态学改变的能力。并且COPH修复效果优于其他三种蛋白酶解产物,说明COPH有着更好的氧化应激修复能力,为COPH的开发提供参考和理论依据。

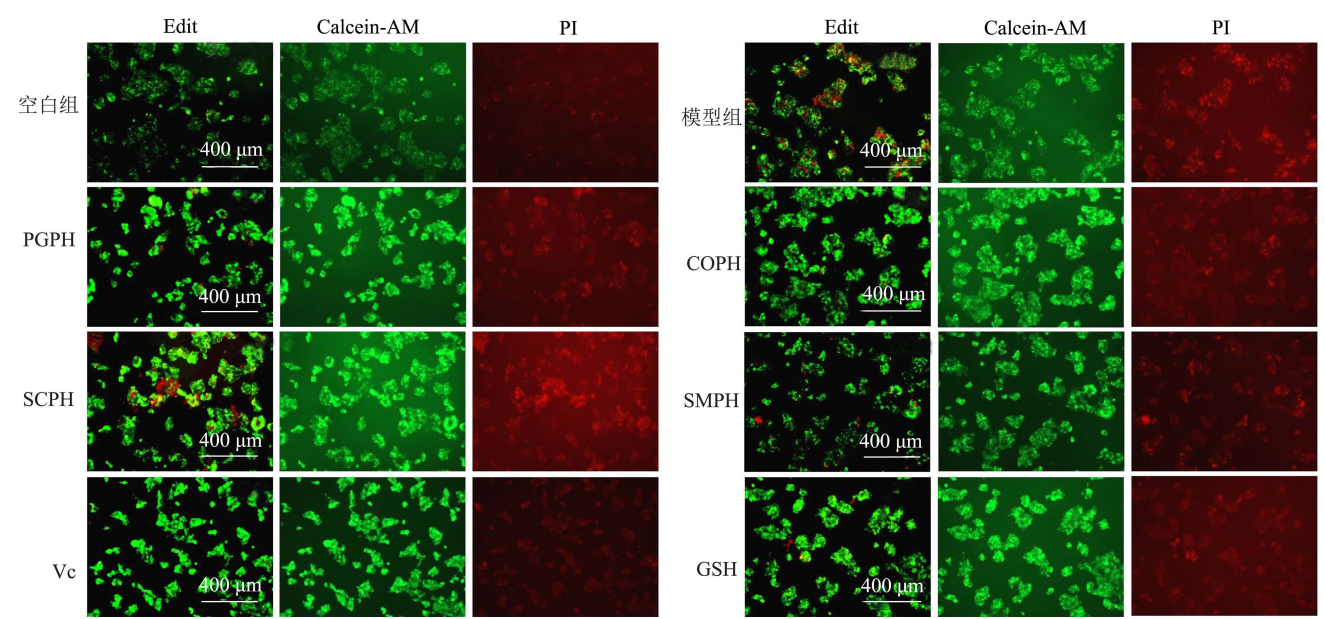


图 11 Calcein-AM/PI 双色荧光染色结果

Fig.11 Calcein-AM/PI double-color fluorescence staining results

2.4.4 对H₂O₂诱导HepG2细胞内ROS水平的影响

正常细胞内，ROS 的生成与清除维持着一种动态平衡状态。当细胞受到外界刺激时，内部 ROS 水平会上升，过量的 ROS 会对细胞的核酸、蛋白质及生物膜造成氧化损伤，从而打破细胞内的氧化还原稳态，引发氧化应激反应，最终导致细胞损伤与凋亡^[18]。DCFH-DA 荧光探针能够穿透质膜进入细胞质，并在细胞内被酯酶水解为非荧光的 DCFH。随后，DCFH 被 ROS 氧化成 DCF，发出绿色荧光，以此反映细胞内的活性氧水平。如图 12 所示，与正常组相比，模型组的 DCF 荧光强度及 ROS 含量显著升高，表明细胞遭受了严重的氧化应激。而在加入四种蛋白酶解产物后，DCF 荧光强度及 ROS 含量相较于模型组均有所下降。在测定浓度范围内，COPH 的 ROS 含量始终低于其他三种蛋白酶解产物。从图中绿色荧光强度及 ROS 含量来看，SCPH > PGPH > SMPH > COPH。实验结果表明，这四种蛋白酶解产物均能有效降低 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞内 ROS 含量，发挥抗氧化应激作用，对细胞的氧化应激损伤具有修复效果。其中，COPH 在清除氧化应激损伤细胞内过量 ROS 方面表现最优，而 SCPH 的 ROS 含量较高，可能与其蛋白含量较少有关。COPH 相较于 SMPH 的 ROS 含量更低，表明共提取方法更为优越，为 COPH 的进一步应用提供了有力参考。

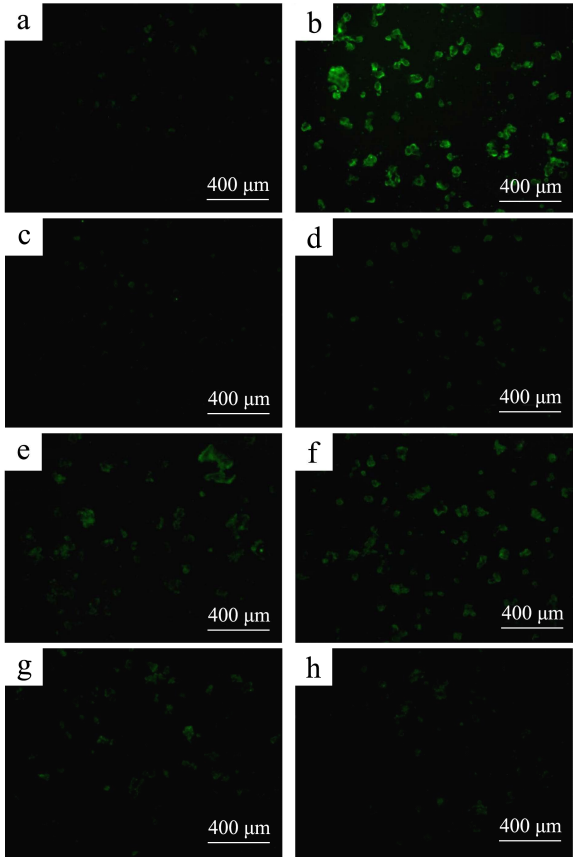


图 12 四种蛋白酶解产物对 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞胞内 ROS 水平荧光染色

Fig.12 Fluorescence staining of four protein peptides on H₂O₂-induced intracellular ROS levels in HepG2 cells

注：a 为空白组，b 为模型组，c 为 Vc，d 为 GSH，e 为 PGPH，f 为 SCPH，g 为 SMPH，h 为 COPH。

3 结论

本研究以人参-五味子共提取复合蛋白为主要研究对象,采用酶辅助提取法制备 PGPH、SCPH、SMPH、COPH,对四种蛋白的理化性质,自由基清除活性、还原能力和对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化应激损伤模型修复作用进行研究。理化性质的差异会对其体外抗氧化活性产生显著影响。根据体外抗氧化实验结果,人参-五味子共提取蛋白展现出了较好的自由基清除能力和还原能力。针对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞氧化应激, Copenh 能够提升细胞存活率,有效改善细胞在氧化应激后的形态变化,并减少细胞凋亡的发生。此外, Copenh 还能有效抑制细胞内 ROS 水平的上升,维护细胞膜系统的稳定性。综上所述,本研究通过对 Copenh 的研究,拟从大分子化合物的角度分析阐述人参-五味子药对蛋白酶解产物理化性质及活性的变化,为更好地了解中药共提取蛋白酶解产物的性质与生物活性提供数据支撑,为其在功能性健康食品领域的开发与应用提供了有价值的参考依据。

参考文献

- [1] 李方斯.大米蛋白与核桃蛋白异源共架体的构建及其在高内相乳液制备中的应用[D].无锡:江南大学,2022.
- [2] 曹歌.杏仁蛋白和乳清蛋白混合体系理化特性及功能性的研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2021.
- [3] 任广旭,朱大洲,张鸿儒,等.大豆与乳清蛋白协同释放必需氨基酸的动态模式研究[J].中国食物与营养,2015, 21(12):60-63.
- [4] TIAN T, REN K Y, TONG X H, et al. Co-precipitates proteins prepared by soy and wheat: Structural characterisation and functional properties [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 212: 536-546.
- [5] 张鸿儒,韩迪,谢晋,等.大豆-牛奶双蛋白益生菌酸奶配方的确定及其营养分析[J].食品工业科技,2018,39(21):91-95.
- [6] 周小虎.豌豆-草鱼共沉淀双蛋白的结构表征及功能特性研究[D].湛江:广东海洋大学,2022.
- [7] 李婕,赵雨,许宁,等.人参蛋白的药理作用[J].特产研究, 2022,44(2):121-126.
- [8] SHAO S, ZHANG H Y, YAN M M, et al. Antifatigue activity of glycoprotein from *Schisandra chinensis* functions by reducing oxidative stress [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2020, 1: 4231340.
- [9] 杨盼盼,张译文,李赛玉,等.基于网络药理学探讨“人参-五味子”药对防治肝细胞癌的药效物质和作用机制[J].沈阳药科大学学报,2025,42(1):42-51.
- [10] 陈皖晴,曹亚娟,吴建春,等.基于网络药理学预测“人参-五味子”药对治疗肺癌的作用机制[J].中华中医药学刊, 2020,38(10):177-182,293-294.
- [11] 王海东.五味子蛋白肽的制备和生物活性研究[D].长春:长春中医药大学,2023.
- [12] 周泓妍,郑怡,王海东,等.南、北五味子蛋白抗氧化活性和对HepG2细胞氧化应激损伤的修复作用[J].食品与发酵工业2024,50(7):51-60.
- [13] 邓永蓉,韩丽娟,杨希娟,等.膜分离蚕豆蛋白酶解产物的理化性质及生物活性[J].中国油脂,2022,47(6):92-99.
- [14] ASCHALEW T, NEWAYB, MEBRAHTU H, et al. Synthesis of fluorescent nitrogen and phosphorous co-doped carbon quantum dots for sensing of iron, cell imaging and antioxidant activities [J]. Journal of Fluorescence, 2021, 31(3): 763-774.
- [15] JOHN H, ALLEN H, AMELIA P, et al. PAK2 activated by Cdc42 and caspase 3 mediates different cellular responses to oxidative stress-induced apoptosis [J]. Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research, 2020, 1867(4): 118645.
- [16] 饶秀茸,崔博婧,付凡,等.Calcein-AM/PI双染法结合流式细胞术检测 $\gamma\delta$ T细胞毒性的方法[J].免疫学杂志,2016, 32(7):620-625.
- [17] CHU Q, JIA R Y, CHEN C W, et al. Apios americana Medik leaf extracts attenuate H_2O_2 -induced hepatotoxicity [J]. Food Bioscience, 2021, 41: 100996.
- [18] 陈丽花,陈少华,荣玉芝,等.具有抗氧化活性青稞酒糟蛋白酶解液对 H_2O_2 诱导HepG2细胞的保护作用[J].现代食品科技,2024,40(3):28-38.