

采用 HepG2 细胞模型评价酒醅中短肽 VPD 和 KGP 的抗氧化活性

姜云松¹, 李安军², 孙金沅¹, 赵东瑞¹, 李贺贺¹, 孙啸涛¹, 黄明泉¹, 孙宝国¹

(1. 食品质量与安全北京重点实验室, 北京食品风味化学重点实验室, 北京 100048)

(2. 安徽古井贡酒股份有限公司, 安徽亳州 236800)

摘要: 本研究针对前期实验从白酒酒醅中分离、提取和鉴定出的两种短肽 Val-Pro-Asp (VPD) 和 Lys-Gly-Pro (KGP) 的细胞水平抗氧化活性进行研究。以 AAPH 诱导氧化损伤的人体肝癌细胞(Human hepatoma cell, HepG2 cell)为模型, 测定短肽对细胞内活性氧(ROS)含量、抗氧化酶的活性等指标。结果表明, VPD 和 KGP 具有细胞内抗氧化活性, 其作用机制体现在可以显著降低细胞内 ROS 含量, 提高过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)三种酶的活力以及还原型谷胱甘肽(GSH)的含量, 同时也能够通过降低细胞内脂质过氧化水平, 如丙二醛(MDA)的含量来保护细胞免受氧化损伤, 并且两种多肽的抗氧化能力随着浓度的上升基本呈现一定的增强趋势。综上所述, 两种短肽在细胞水平具有一定的抗氧化能力, 这为后续通过调整白酒蒸馏工艺条件, 从而提高酒醅中功能性多肽进入白酒中的含量提供了可能。

关键词: 酒醅; 多肽; 人体肝癌组织细胞 (HepG2 细胞); 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2019)09-49-56

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.005

Evaluation on the Antioxidant Activity of VPD and KGP in Jiupei by HepG2 Cells Model

JIANG Yun-song¹, LI An-jun², SUN Jin-yuan¹, ZHAO Dong-rui¹, LI He-he¹, SUN Xiao-tao¹,
HUANG Ming-quan¹, SUN Bao-guo¹

(1.Beijing Laboratory for Food Quality and Safety, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

(2.Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

(3.Anhui Gujingong Co. Ltd., Bozhou 236800, China)

Abstract: In this study, the cells-level antioxidant activities of two peptides, Val-Pro-Asp (VPD) and Lys-Gly-Pro (KGP), which were extracted, isolated and identified from Jiupei of Baijiu, were studied. The antioxidative activities of two peptides were evaluated by measuring their effects on intracellular reactive oxygen species (ROS) content, activity of antioxidant enzymes and other indexes in AAPH induced oxidative-damaged human hepatoma cells (HepG2 cells) model. The result showed that VPD and KGP possessed intracellular antioxidant activity. The mechanism of the action was that they can significantly decrease the content of ROS in cells, increase the activity of three enzymes of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and reduced the glutathione (GSH) content. At the same time, they can also decrease the level of lipid peroxide in cells e.g. MDA content to protect cells from oxidative damage and capacity of two peptides basically increased with the rise of concentration. This provides the possibility to improve the contents of functional peptides from Jiupei into Baijiu by optimizing the distillation condition.

Key words: jiupei of baijiu; peptides; HepG2 cells; antioxidant activity

氧化应激通常指自由基在机体内产生的一种负面效应, 其产生的主要原因是体内氧化与抗氧化两种作用之间的失衡^[1]。氧化应激反应主要由生物好氧代谢的副产物-活性氧(Reactive oxygen species, ROS)引起^[2,3]。当机体处于正常状态时会产生适量的 ROS, 其可以作为信号传递分子, 在细胞和机体的发育、生长、分化和再生过程中起着重要作用, 也是吞噬细胞发挥吞噬和杀伤作用的主要介质^[4]。然而, 当机体处于病理状态时, 体内会产生过量的 ROS, 进而改变人体内

收稿日期: 2019-04-17
基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFD0400500); 国家自然科学基金资助项目(31301466; 31601556; 31701567)

作者简介: 姜云松(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能性多肽

通讯作者: 孙金沅(1983-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 白酒化学

某些蛋白质的结构,并且对人体造成一定的氧化损伤^[5],甚至产生一系列影响人体健康的疾病如炎症、高血压以及心血管等疾病^[4,6,7]。因此寻找有效的清除过剩自由基的物质并将其维持在适当水平是一个非常现实的热点问题。

动物和植物中通常含有较为理想的天然抗氧化剂,比如多酚。食物中的多肽作为天然的抗氧化剂之一,由于毒性较低且来源广泛,在对人类健康的有益影响上得到了越来越多的关注。目前,国内外研究人员已经从许多动植物蛋白水解物中,如鱼类^[8,9]、黑豆^[10]、小麦麸皮^[11]、酪蛋白^[12]、核桃粉^[13]、豌豆^[14]等鉴定出一系列抗氧化肽。Chen^[15]等人从小麦胚芽中提取出一种新型多肽 AREGETVVP,其能够对葡萄糖诱导的血管平滑肌细胞氧化应激产生预防作用。Zhang^[16]等人通过水解甘薯蛋白得到五种多肽 HDSASGQY、YYMVSA、HDSSEGQY、YYIVS 和 RYYDPL,并证明这几种多肽可以作为食品中潜在的抗氧化剂成分。Bordbar^[17]等从鱼肉的蛋白水解物中提取鉴定出了氨基酸序列为 GVSGHLID 的多肽,其具有较强的抗氧化能力,并且证明了其可以作为一种新型功能性食品成分,以促进人体健康。

前期研究中,从白酒酒醅中鉴定出来两种三肽 Val-Pro-Asp 和 Lys-Gly-Pro,并通过化学实验法对两种多肽的体外抗氧化能力进行了研究。由于体外化学方法缺乏生物相关性、生物的复杂机制、作用条件和体内代谢等方面的条件。因此,本研究旨在以 AAPH 诱导氧化损伤的人体肝癌细胞(HepG2 cell)为模型来测定两种多肽的细胞水平抗氧化能力。以细胞内主要的抗氧化酶:超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)以及谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase, GSH-Px)的活力和非酶系统中的丙二醛(Malonaldehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)以及氧化型谷胱甘肽(Oxidized glutathione, GSSG)的含量变化来评价两种多肽的抗氧化能力。

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)、TBS 缓冲盐(Tris-buffered Saline),Sigma-Aldrich(上海)有限公司;RIPA 裂解液,Solarbio Life Sciences(北京)有限公司;无水乙醇,国药集团化学试剂(北京)有限公司;2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(AAPH),Acros 试剂公司;PBS 缓冲液,厦门海标科技有限公

司;DMEM 培养基,Mediatech 生物技术公司;胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、无菌水、胰蛋白酶,Gibco 公司;MDA、SOD、CAT、GSH-Px、总蛋白(Bicinchoninic Acid, BCA)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;ROS、GSH/GSSG 测定试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒(Cell Counting Kit),Dojindo 公司。

1.2 仪器与设备

KH-500DE 型数控超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;涡旋仪 VORTEX 2;德国 IKA 公司;CO₂ 培养箱,美国赛默飞世尔科技公司;Molecule M2 酶标仪,美国分子仪器有限公司。

1.3 细胞的培养

HepG2 细胞由中国疾病预防控制中心提供。HepG2 细胞培养在细胞培养箱中,培养条件为 37 °C 以及 5% CO₂。培养基为 DMEM 培养基以及添加体积分数为 10%的 FBS。实验中所用 HepG2 细胞在处理前,融合度均达到 80%。

1.4 细胞存活率的测定

HepG2 细胞存活率通过 CCK-8 试剂盒进行测定。向经过不同浓度短肽(KGP 和 VPD)孵育后的 HepG2 细胞所在培养孔中加入 CCK-8 试剂。待反应完全后,用酶标仪测定 450 nm 下的吸光值。未经过样品和 AAPH 处理的细胞作为对照组。细胞存活率以样品组中存活细胞占对照组中存活细胞的百分比表示。

1.5 ROS 的测定

将 HepG2 细胞(1×10^5 /mL)培养在 96 孔板中。在 37 °C 以及 5% CO₂ 条件下培养 24 h。随后加入 100 μ L 融入不同种类(KGP 或 VPD)及浓度(2000 mg/L、1000 mg/L、500 mg/L)的多肽和 100 μ L 10 μ mol/L 的 DCFH-DA 的 DMEM 无血清培养基,37 °C 细胞培养箱内孵育 90 min。弃去培养基后用无血清培养液清洗细胞 3 次。加入 100 μ L AAPH (200 μ M),然后放入培养箱中继续孵育 0、25、50、90、180 min 后,取出并在酶标仪下测定,激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm。未做处理的细胞记为对照组,仅用 AAPH 处理的细胞记为 AAPH 组,经过 Trolox 和 AAPH 处理的细胞记为 Trolox 组。

1.6 短肽对细胞内 CAT、SOD、GSH-Px 活力

的影响

将 HepG2 细胞(1×10^5 /mL)培养在 24 孔板中。在 37 °C 以及 5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,将原始培养基吸除,加入含有一定浓度(2000、1000、500 mg/L)多肽(VPD 或 KGP)或 Trolox (500 mg/L)的 DMEM 培养基进行孵育。孵育 2 h 后,将原始培养基吸除,加入含有 AAPH (200 mM)的 DMEM 培养基在 37 °C 以及 5% CO₂ 条件下培养 2 h。未经过样品和 AAPH 处理的细胞作为对照组,只经过 AAPH 处理的细胞记为 AAPH 组,经过 Trolox (500 mg/L)和 AAPH 处理的细胞记为 Trolox 组。随后将原始培养基吸除,用 PBS 清洗孔板 3 次,向孔中加入胰蛋白酶、RIPA 裂解液,经离心后(5000 r/min, 10 min, 4 °C),收集上清液,按照试剂盒的操作要求测定细胞中 T-SOD、CAT、GSH-Px 的活性。结果表示为与对照组比较后的相对值。

1.7 短肽对细胞内 MDA、GSH、GSSG 和 BCA 含量的影响

按照 1.6 中相同步骤对细胞进行处理,并根据试剂盒的相关操作要求测定 MDA、GSH、GSSG 和 BCA 的含量。

1.8 数据分析

所有测定实验均重复至少三次,实验结果以平均值 $\pm$ 标准偏差(SD)表示。数据通过 IBM SPSS Statistics 19.0 (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,不同的字母表示了不同组别之间存在显著性差异($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度短肽对 HepG2 细胞存活率的影响

前期实验从白酒酒醅中鉴定出两种三肽 Val-Pro-Asp (VPD)和 Lys-Gly-Pro (KGP),其结构如图 1 所示。本实验采用 CCK-8 法来测定不同浓度的两种多肽对细胞存活率的影响。实验中选取了不同浓度的多肽(10000 mg/L, 5000 mg/L, 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L, 100 mg/L, 50 mg/L)在 37 °C, 5% CO₂ 浓度条件下孵育 24 h,其对 HepG2 细胞的存

活率的影响如图 2 所示。

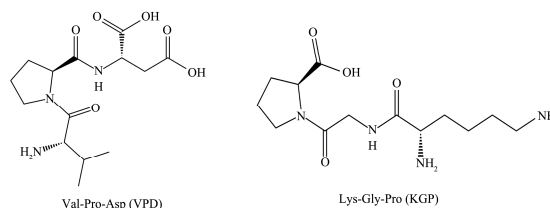


图 1 Val-Pro-Asp 和 Lys-Gly-Pro 结构图

Fig.1 Structures of Val-Pro-Asp and Lys-Gly-Pro

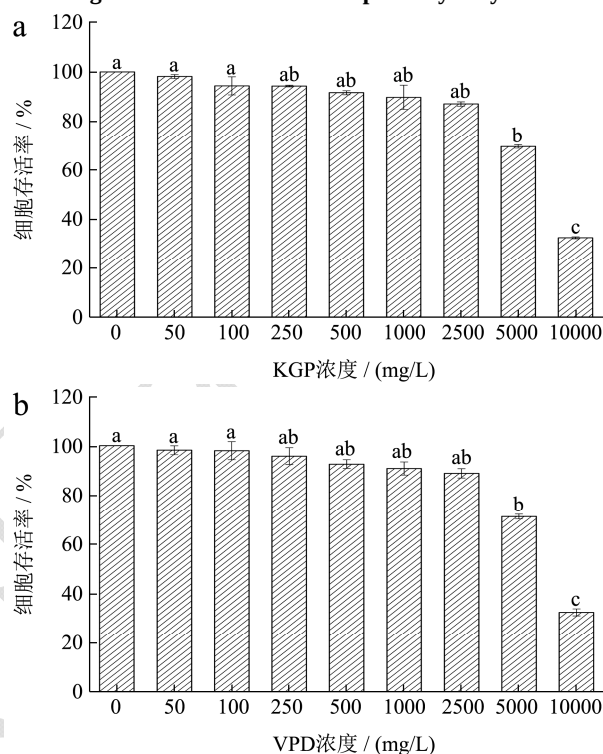


图 2 KGP 和 VPD 对细胞的存活率的影响

Fig.2 Influence of KGP and VPD on HepG2 cells viability

注: 不同的字母表示不同组别之间存在显著性差异($p < 0.05$), 下同。

由图 2 可以看出, HepG2 细胞的存活率随着短肽浓度的上升呈现下降的趋势。当两种短肽的浓度为 5000 mg/L 时, HepG2 细胞的存活率与对照组相比具有明显的下降趋势($p < 0.05$),此时细胞的存活率仅为 69.58%和 70.96%。因此,为了尽可能避免多肽本身对细胞造成较大的毒性作用的干扰,在后续的研究中选取了 2000 mg/L、1000 mg/L、500 mg/L 三种浓度进行实验。

2.2 KGP 和 VPD 对氧化损伤的 HepG2 细胞内 ROS 的清除作用

通过与对照组细胞内 ROS 的荧光值大小对比得出多肽对 ROS 的产生有一定的抑制作用,结果如图 3。

当加入多肽样品孵育处理细胞后,细胞内的

ROS 含量相对于 AAPH 组来说呈现明显下降的趋势, 细胞分别经过高(2500 mg/L)、中(1000 mg/L)、低(500 mg/L)浓度的两种多肽处理后, 细胞内的 ROS 含量相比于对照组在 0~60 min 内分别下降了 KGP: 9.81%~27.44%、1.48%~9.39%、4.73%~11.79%; VPD: 11.87%~17.83%、7.77%~12.84%、18.94%~23.24%。因此可以看出两种多肽处理细胞对于细胞 AAPH 所引发的氧化损伤有一定的抑制作用, 其中 VPD 的抑制作用更强。损伤细胞内 ROS 的含量随着多肽浓度的上升呈现下降趋势。从上述的结果可以得出如下的结论: 当通过不同浓度的 KGP 和 VPD 分别对由 AAPH 引发的氧化损伤的 HepG2 细胞进行孵育处理后, 细胞内的 ROS 含量与 AAPH 组比较呈现明显的下降趋势 ($p<0.05$), 且这种趋势对样品的浓度与孵育时间存在着一定相关性。高浓度样品组中细胞内的 ROS 含量最低时甚至低于对照组细胞内的 ROS 含量, 这充分说明两种多肽具有直接清除 AAPH 损伤细胞内的 ROS 的能力。

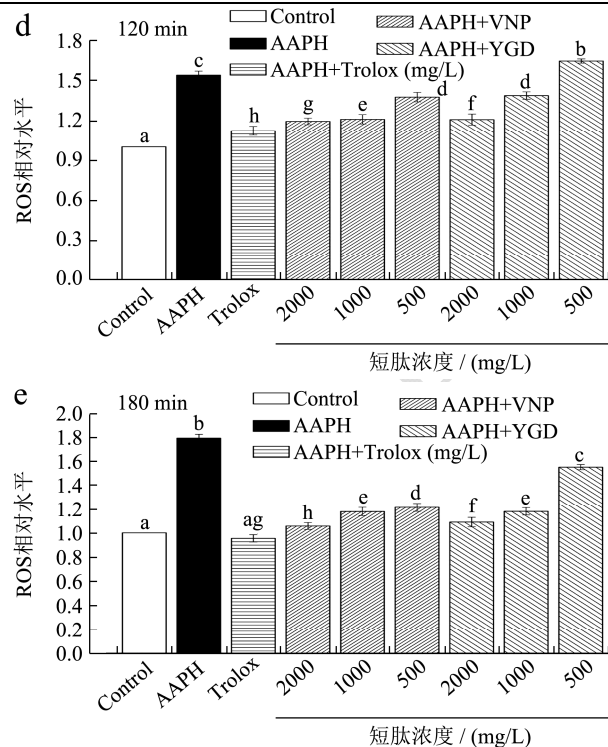
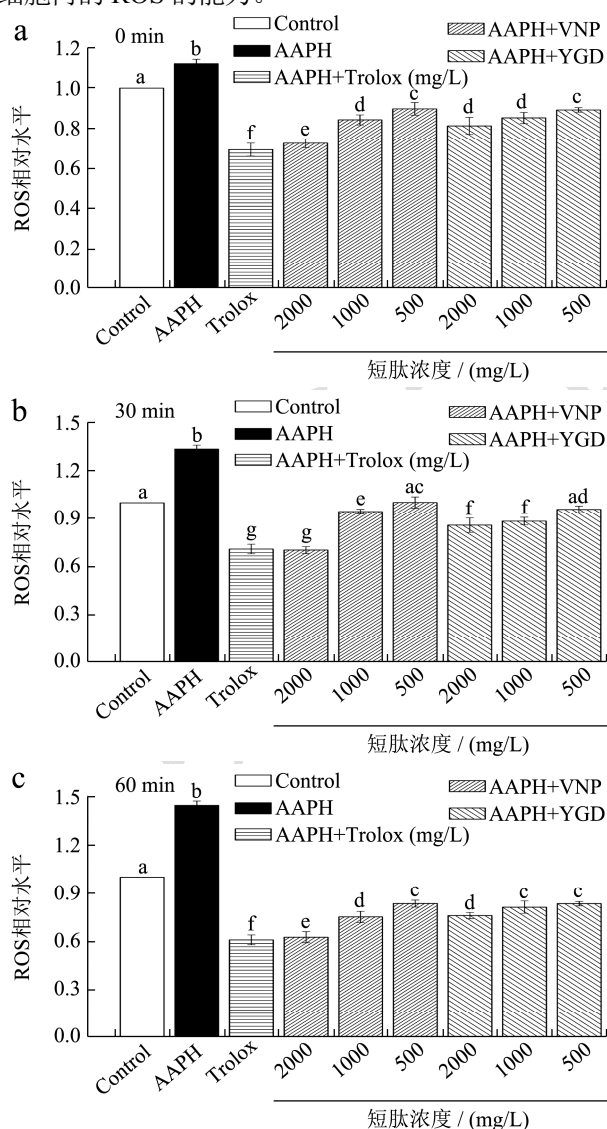


图3 KGP 和 VPD 对氧化损伤的 HepG2 细胞内 ROS 的清除作用
Fig.3 Effect of KGP and VPD on the clearance of ROS in oxidative-damaged HepG2 cells

注: a: 孵育 0 min 时细胞内 ROS 相对水平; b: 孵育 30 min 时细胞内 ROS 相对水平; c: 孵育 60 min 时细胞内 ROS 相对水平; d: 孵育 120 min 时细胞内 ROS 相对水平; e: 孵育 180 min 时细胞内 ROS 相对水平。

2.3 短肽对氧化损伤 HepG2 细胞内的抗氧化

酶活力的促进作用

2.3.1 短肽对氧化损伤 HepG2 细胞内 CAT 的作用分析

CAT 存在于细胞和组织中, 起到催化分解 H_2O_2 为 H_2O 和 O_2 的作用, 从而避免体内的氧化损伤^[18]。本实验中, 考察了两种短肽样品对细胞内 CAT 酶活性的影响, 结果如图 4a 所示。AAPH 组细胞内的 CAT 活性最低, 与对照组相比降低了 54.79%, 这表明 200 μM 的 AAPH 单独处理细胞 3 h 后使细胞内产生了严重的氧化损伤, CAT 酶的活性下降明显 ($p<0.05$)。而经过不同浓度的短肽样品处理 3 h 后, CAT 酶的活性相对 AAPH 组来说有明显 ($p<0.05$) 的提升, KGP 在 500~2000 mg/L 浓度范围内, CAT 的活性提升了 (100.77%~186.04%), VPD 在 500~2000 mg/L 浓度范围内, CAT 的活性提升了 (139.91%~297.09%)。上述结果能够说明这两种短肽能够显著增加损伤细胞内 CAT 酶的活性, 并使其水平提高至对照组之上。通过

对比加入三种不同浓度的两种多肽中 CAT 酶的活性可以得出, 经过相同浓度的两种短肽处理的细胞中, VPD 组的 CAT 酶的活性高于 KGP 组, 通过对比两种短肽的结构可以推测出 Val 在多肽的 N 端和 Asp 在多肽的 C 端时所表现出的提高细胞内 CAT 活力要强于 Lys 在多肽的 N 端和 Pro 在多肽的 C 端, 这与相关研究中表明多肽序列中存在疏水性氨基酸如 Leu、Pro、Phe 以及 Val 等对多肽的抗氧化活性起到至关重要的作用^[19-21]一致。

2.3.2 短肽对氧化损伤 HepG2 细胞内 GSH-Px 的作用分析

GSH-Px 是体内广泛存在的一种重要的过氧化物酶, 它能催化 GSH 转化为 GSSG, 将有毒的过氧化物还原为无毒的羟基化合物, 从而保护细胞膜的结构和功能免受过氧化物的干扰和破坏^[22,23]。本实验中考察短肽样品对细胞内 GSH-Px 酶活性的改变, 结果如图 4b 所示。AAPH 组细胞内的 GSH-Px 酶活性相比于对照组呈现明显 ($p<0.05$) 的下降趋势, 降低了 35.28%。这表明 AAPH 对细胞造成了较为严重的氧化损伤, 细胞内的抗氧化酶的活性被破坏。当采用不同浓度的两种短肽进行孵育处理之后, GSH-Px 酶活性相对 AAPH 组有了一定的提高, 短肽 KGP 组提高了 22.08%~29.49%, 短肽 VPD 组提高了 21.48%~30.88%。两种多肽相比 AAPH 组在 GSH-Px 活力上均有一定提升, 甚至接近于对照组。两种短肽之间在相同浓度下所展现出的提高 GSH-Px 活力的能力并没有显著性的差异。

2.3.3 短肽对氧化损伤 HepG2 细胞内 SOD 的作用分析

SOD 在人体氧化和抗氧化的平衡重起着作用, 其可以通过清除过量的超氧阴离子自由基来保护体内的细胞^[24]。本实验中考察两种短肽样品对细胞内的 SOD 酶活性的改变, 结果如图 4c 所示。由图 4c 可以看出, 当细胞经过 200 μ M 的 AAPH 处理后, 其细胞内 SOD 的活性明显低于对照组 (62.60%), 这说明 AAPH 对细胞造成了严重的氧化损伤。两种短肽在 2000 mg/L、1000 mg/L、500 mg/L 浓度内相比于 AAPH 组能够明显 ($p<0.05$) 提升 SOD 的活性 (KGP: 47.80%~52.60%; VPD: 49.20%~62.60%), 从以上结果可以看出, KGP 和 VPD 这两种短肽均表现出抑制 AAPH 所引发的细胞氧化损伤而导致的 SOD 酶活力降低的作用。在高浓度和中浓度 (2000 mg/L 和 1000 mg/L) 组别中, 两种短肽展现出了不同的能力, VPD 在这两个组别中的提高 SOD 酶活力的能力仍略高于 KGP 组。

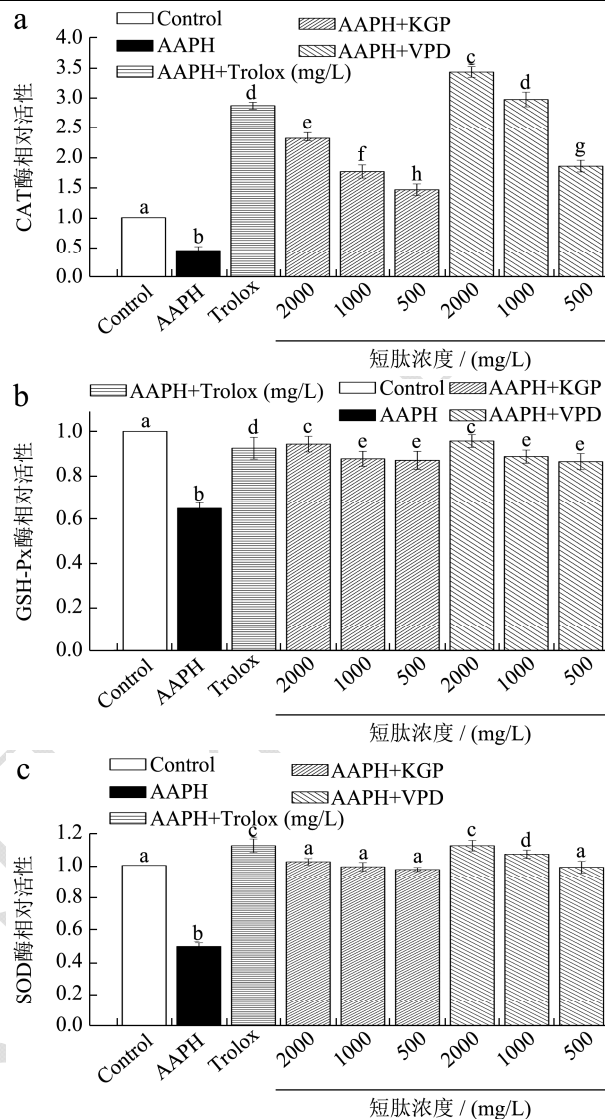


图 4 多肽对细胞内抗氧化酶系统的作用

Fig.4 Effect of peptides on the antioxidant enzyme system in HepG2 cells

注: a: CAT; b: SOD; c: GSH-Px。

短肽的抗氧化能力通常与氨基酸的种类、排列顺序、分子量和空间结构等有关。Wu^[3]和霍嘉颖^[25]分别从白酒中发现了抗氧化多肽 Ala-Lys-Arg-Ala (AKRA) 和 Arg-Asn-His (RNH), 两者同样能够提高细胞内 CAT、SOD 和 GSH-Px 等抗氧化酶的活性来保护细胞免受氧化损伤。通过比较能够看出, 短肽浓度相同时 (1000 mg/L 和 2000 mg/L) VPD 和 KGP 对 CAT、GSH-Px 酶活力的促进作用强于 RNH, 略低于 AKRA, 由于这四种短肽的分子量相差不明显, 因此猜测这可能是 Lys 和 Val 在 N 端和 Pro 和 Asp 在 C 端所表现出的提高 CAT 和 GSH-Px 酶活力的能力强于 Arg 和 His 分别在 N 端和 C 端时表现出的能力, 但弱于 Asp。以上研究表明不同多肽对不同抗氧化酶活力的提升有着

一定的差异,这可能是由于多肽两端的氨基酸与各种抗氧化酶结合能力的差异导致的。

2.4 短肽对氧化损伤的 HepG2 细胞内非酶抗

氧化系统的作用

2.4.1 短肽对氧化损伤的 HepG2 细胞中 GSH 和 GSSG 含量的影响

GSH 是细胞中重要的非酶类抗氧化物质之一,具有维持正常免疫系统和抗氧化功能的作用。因此,GSH 和其氧化态 GSSG 的水平是细胞氧化应激的主要信号^[26,27]。通过 GSH 试剂盒对细胞内的 GSH 含量进行检测,结果如图 5a 所示。经过 AAPH 处理后的细胞内 GSH 的相对含量最低,与对照组内细胞相差了 38.80%,这表明了 AAPH 对细胞内产生了一定程度的氧化损伤,从而导致细胞内的非酶抗氧化剂的含量急剧下降;而与 AAPH 组细胞不同的是,样品组细胞内的 GSH 的含量在一定程度上有所提升,并随着浓度的增加呈现上升的趋势,当两种短肽浓度为 2000 mg/L 时, GSH 含量提升最高,与对照组无明显区别 ($p<0.05$),这表明两种多肽对于提高细胞内的抗氧化能力有着重要的作用。

由图 5b 可以看出, AAPH 组中 GSSG 的含量要明显高于其他组别,这表明了 AAPH 对细胞产生了明显的氧化应激反应。而用两种不同浓度的短肽对细胞进行处理之后,细胞内的 GSSG 含量有了明显 ($p<0.05$) 的下降,其中 KGP 组别中高浓度组 GSSG 的含量最低,甚至明显 ($p<0.05$) 低于 Trolox 组。在 VPD 组中,中浓度组中的 GSSG 含量最低,同样明显 ($p<0.05$) 低于 Trolox 组。总体来看,与对照组相比,通过两种短肽处理后的细胞中 GSSG 含量都相较于 AAPH 组有了较为明显的降低 ($p<0.05$),与对照组中 GSSG 的含量并无明显 ($p<0.05$) 的差别,因此两种短肽对于抑制细胞内 GSSG 的生成有着明显的作用。

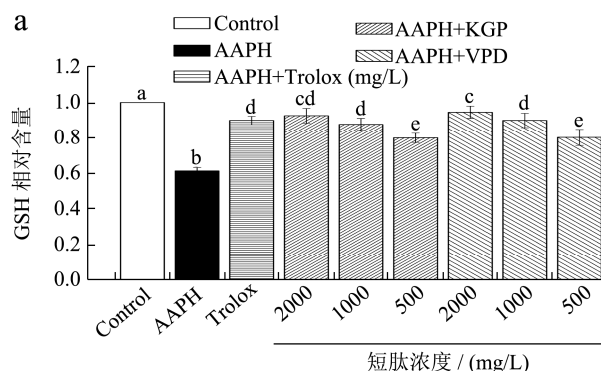
为了更深层次地比较 KGP 和 VPD 两种短肽对 AAPH 引发的氧化损伤细胞中 GSH 和 GSSG 水平的影响,对 GSH 与 GSSG 之间的转化比率进行了评估。结果如图 5c 所示,在 AAPH 组中, GSH 转化为 GSSG 的比率为最低组别。当在细胞中加入不同浓度的两种多肽后,甚至在最低浓度的组别中, GSH 转化为 GSSG 的比率与 AAPH 组相比有着明显 ($p<0.05$) 的提升。对于 KGP 来说,当浓度为最高 2000 mg/L 时,转化比率达到最高值 2.06,甚至明显高于 Trolox 组别。对于 VPD 组来说,当浓度为 1000 mg/L 时,转化比率达到最高值 1.60。而高浓度组别低于中浓度组别,可能是

由于当 VPD 的浓度为 1000 mg/L 左右时基本达到了饱和。从以上结果中可以得出,两种短肽对于 AAPH 引发的氧化损伤 HepG2 细胞中可以起到减缓 GSH 含量的降低和 GSSG 含量升高的作用,以此帮助细胞免受氧化应激损伤。

2.4.2 短肽对氧化损伤的 HepG2 细胞产生的丙二醛 (MDA) 的抑制作用

MDA 是由酯类分解形成的最终产物,它会导致细胞代谢和功能障碍,甚至死亡。作为一种对机体有毒性和副作用的分子,其在细胞中的含量可以反映机体中脂质过氧化的程度,从而能够间接地反映细胞的氧化损伤程度^[28,29]。通过 MDA 试剂盒测定了两种多肽样品对细胞内 MDA 含量的影响,结果如图 5d 所示。与上述实验相同, AAPH 组细胞产生的 MDA 水平在所有组别细胞中是最高的,与对照组相比有着较高的显著性差异 ($p<0.05$)。然而当不同浓度的两种多肽加入到细胞后,经过孵育处理,细胞内的 MDA 水平相比于 AAPH 组有了明显的降低,降低的趋势随着多肽浓度的升高越明显。对于低浓度 (500 mg/L) 的两种短肽处理,同样也可以在一定程度上降低细胞内 MDA 的生成量。高浓度 (2000 mg/L) 的两种短肽处理孵育后,即使再通过 AAPH 来诱发细胞产生相应的氧化应激反应,细胞内的 MDA 含量相比于对照组并无明显区别,这表明适宜浓度的短肽孵育可以通过抑制细胞内 MDA 的生成量来有效地避免由于 AAPH 所带来的细胞氧化损伤,这与吴继红^[30]和廖艳艳^[31]等人的研究相一致。

Wang^[32]等从玉米蛋白粉中鉴定出短肽 Gly-Leu-Leu-Leu-Pro-His (GLLLPH) 并且在细胞内同样表现出了一定的抗氧化能力,具有 His 残基的多肽通常能够降低细胞内脂质过氧化和提高 GSH 的含量^[25],然而与本研究鉴定出的多肽 KGP 和 VPD 相比,三种多肽都具有 Pro 残基,两种短肽具有 Gly 残基,因此猜测 Pro 和 Gly 在多肽的端位和内部时同样能够降低细胞内的脂质过氧化和提高 GSH 含量。



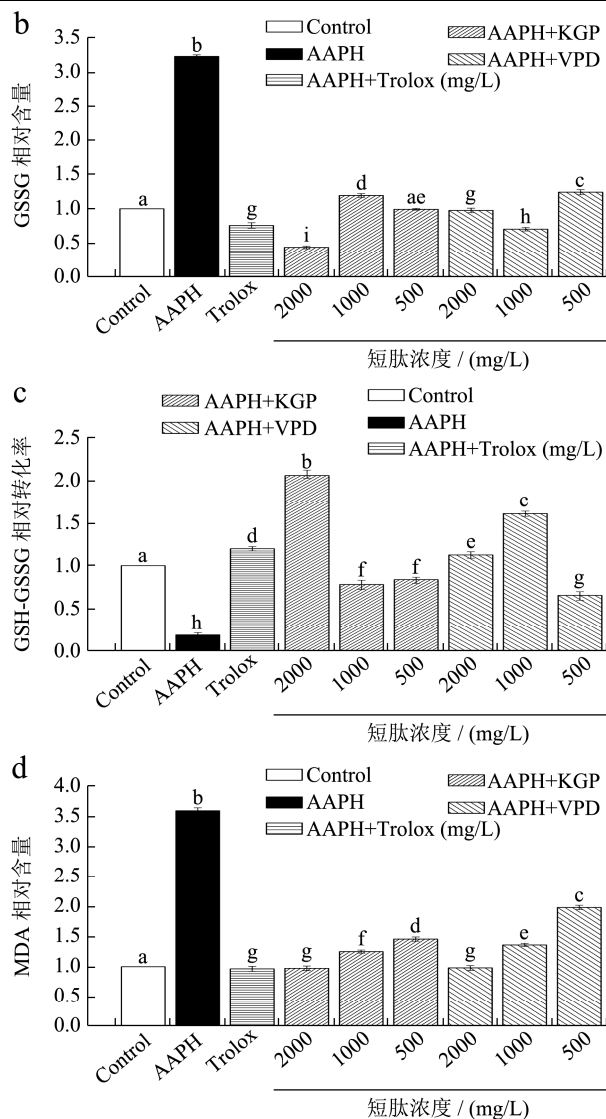


图5 多肽对细胞内抗氧化酶及非酶系统的作用

Fig.5 Effect of peptides on the non-enzyme system in HepG2 cells

注: a: GSH; b: GSSG; c: GSH 与 GSSG 转化率; d: MDA。

3 结论

本文以从白酒酒醅中鉴定出的两种三肽 Lys-Gly-Pro 和 Val-Pro-Asp 为研究对象,采用 AAPH 诱导的人体肝癌细胞氧化损伤模型,对 KGP 和 VPD 两种短肽的细胞水平抗氧化能力进行了测定。两种短肽均具有清除氧化损伤细胞中 ROS 的能力,能够通过提高细胞内三种抗氧化酶 CAT、GSH-Px 和 SOD 的活力以及调整细胞内非酶系统 MDA, GSH 和 GSSG 的含量,来提高细胞抗氧化能力。以上研究表明,酒醅中存在的多肽具有细胞抗氧化活性,这为后续通过优化蒸馏条件,提高白酒中具有抗氧化活性的多肽含量,从而增强白酒的健康性奠定了基础。

参考文献

- [1] Zandalinas S I, Mittler R. ROS-induced ROS release in plant and animal cells [J]. Free Radical Biological and Medicine, 2018, 122: 21-27
- [2] 吴继红,孙宝国,赵谋明,等.白酒中血管紧张素转换酶抑制肽的发现与研究[J].中国食品学报,2016,16(9):14-20
WU Ji-hong, SUN Bao-guo, ZHAO Mou-ming, et al. Discovery of a bioactive peptide, an angiotensin converting enzyme inhibitor in Chinese wine [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(9): 14-20
- [3] WU J, HUO J, HUANG M, et al. Structural characterization of a tetrapeptide from sesame flavor-type Baijiu and its preventive effects against AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(48): 10495-10504
- [4] Walton E L. The dual role of ROS, antioxidants and autophagy in cancer [J]. Biomedical Journal, 2016, 39(2): 89-92
- [5] 姚亮亮,张丁,刘家琛,等.余甘子对乙酰氨基酚(APAP)诱发的肝损伤的保护机制研究[J].现代食品科技,2019,35(3): 7-14
YAO Liang-liang, ZHANG Ding, LIU Jia-chen, et al. Phyllanthus emblica L. protected acetaminophen-induced hepatotoxicity via activating Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(3): 7-14
- [6] Anderson C, Milne G L, Park Y M, et al. Cardiovascular disease risk factors and oxidative stress among premenopausal women [J]. Free Radical Biological and Medicine, 2018, 115: 246-251
- [7] Li D J, Fu H, Tong J, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibits neointimal hyperplasia by suppressing inflammation and oxidative stress [J]. Redox Biological, 2018, 15:22-33
- [8] Zhang M X, Wang X C, Liu Y, et al. Isolation and identification of flavour peptides from Puffer fish (*Takifugu obscurus*) muscle using an electronic tongue and MALDI-TOF/TOF MS/MS [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1463-1470
- [9] Jang H L, Liceaga A M, Yoon K Y. Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 20: 433-442
- [10] López-Barrios L, Antunes-Ricardo M, Gutiérrez-Uribe J A.

- Changes in antioxidant and antiinflammatory activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates due to germination and enzymatic digestion [J]. Food chemistry, 2016, 203: 417-424
- [11] Zhang X, Gao H, Wang C, et al. Characterization and comparison of the structure and antioxidant activity of glycosylated whey peptides from two pathways [J]. Food Chemistry, 2018, 257(15): 279-288
- [12] Wang C, Wang B, Li B. Bioavailability of peptides from casein hydrolysate *in vitro*: Amino acid compositions of peptides affect the antioxidant efficacy and resistance to intestinal peptidases [J]. Food Research International, 2016, 81: 188-196
- [13] Hu F, Ci A T, Wang H, et al. Identification and hydrolysis kinetic of a novel antioxidant peptide from pecan meal using Alcalase [J]. Food Chemistry, 2018, 261: 301-310
- [14] Olagunju A, Omoba O, Enujiugha V, et al. Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An *in vitro* study [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 97: 269-278
- [15] Chen S, Lin D, Gao Y, et al. A novel antioxidant peptide derived from wheat germ prevents high glucose-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells *in vitro* [J]. Food and Function, 2017, 8(1): 142-150
- [16] Zhang M, Mu T-H. Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 43: 92-101
- [17] Bordbar S, Ebrahimpour A, Zarei M, et al. Alcalase-generated proteolysates of stone fish (*Actinopyga lecanora*) flesh as a new source of antioxidant peptides [J]. International Journal of Food Properties, 2018, 21(1): 1541-1559
- [18] Kaushal J, Mehandia S, Singh G, et al. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 16: 192-199
- [19] Zeng W C, Sun Q, Zhang W H, et al. Antioxidant activity *in vivo* and biological safety evaluation of a novel antioxidant peptide from bovine hair hydrolysates [J]. Process Biochemistry, 2017, 56: 193-198
- [20] Ai S, Soichi T, Toshihide N. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(12): 3661-3667
- [21] Gallego M, Mora L, Toldrá F. Characterisation of the antioxidant peptide AEEEYPDL and its quantification in Spanish dry-cured ham [J]. Food Chemistry, 2018, 258(30): 8-15
- [22] Olsvik P A, Kristensen T, Waagbo R, et al. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2005, 141(3): 314-323
- [23] 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
- [24] Zhang K-Y, Zhang Y-H, Wang Y, et al. Synthesis, crystal structure and efficient SOD activity of transition compounds constructed with 5-aminoisophthalic acid ligand [J]. Polyhedron, 2019, 160: 247-254
- [25] 霍嘉颖, 孙宝国, 郑福平, 等. 白酒中一种三肽 Arg-Asn-His 的鉴定及其细胞内抗氧化活性的研究 [J]. 食品科学, 39(23): 126-133
- HUO Jia-ying, SUN Bao-guo, ZHENG Fu-ping, et al. Identification of a tripeptides Arg-Asn-His from Chinese Baijiu and its antioxidant activity [J]. Food Science, 2018, 39(23): 126-133
- [26] Claeson A S, Gouveia-Figueira S, Stenlund H, et al. A standardized protocol for comparable analysis of GSH/GSSG by UHPLC-ESI-MS/MS for human plasma [J]. Journal of Chromatography B, 2019, 1104(1): 67-72
- [27] Lee E H, Kim H-Y, Hwang K Y. The GSH- and GSSG-bound structures of glutaredoxin from *Clostridium oremlandii* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014, 564: 20-25
- [28] Adnan M T, Amin M N, Uddin M G, et al. Increased concentration of serum MDA, decreased antioxidants and altered trace elements and macro-minerals are linked to obesity among Bangladeshi population [J]. Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews, 2019, 13(2): 933-938
- [29] Zhang W, Jia H, Niu C, et al. Effect of exogenous hydrogen peroxide on ROS balance and antioxidant response in Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* [J]. Aquaculture, 2019, 501: 293-303