

珍珠贝肽抗氧化与美白活性的多模型评估： 细胞、果蝇与斑马鱼体系比较

徐嘉欣¹, 黄潘钿¹, 杨秋变¹, 张笑莹¹, 李亚娟², 林碧敏², 苗建银^{1*}
(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)
(2. 华南农业大学基础实验与实践训练中心, 广东广州 510642)

摘要: 为了进一步探究珍珠贝肽的抗氧化和美白活性, 该研究旨在通过细胞和动物模型综合评估珍珠贝肽的抗氧化和美白作用。采用人肝癌细胞 (Hepatocellular Carcinoma G2 Cells, HepG2) 和 D-半乳糖诱导果蝇模型研究珍珠贝肽的抗氧化能力, 随后采用小鼠黑色素瘤细胞 (Mouse Melanoma Cells, B16F10) 和斑马鱼美白模型研究其美白能力。结果表明: 在抗氧化方面, 珍珠贝肽具有良好的细胞内抗氧化活性 ($EC_{50}=0.163\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 及对氧化损伤细胞具有良好的保护作用, 其中质量浓度为 $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的珍珠贝肽可使氧化损伤细胞存活率从 80.99% 恢复到 96.55% ($P<0.05$), 同时还可显著提升 D-半乳糖诱导果蝇体内超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 和过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活力, 并显著降低丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量 ($P<0.05$)。在美白方面, 珍珠贝肽 ($0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 能够显著降低 B16F10 细胞和斑马鱼的黑色素含量 (26.47%、32.33%) 及酪氨酸酶活性 (29.79%、56.72%)。对珍珠贝肽进行质谱鉴定, 结果表明珍珠贝肽具有很好的抗氧化和美白活性潜力。该研究为珍珠贝肽开发成皮肤健康食品原料提供了理论依据。

关键词: 珍珠贝; 活性肽; 细胞抗氧化; 果蝇模型; 斑马鱼; 结构鉴定

文章编号: 1673-9078(2026)06-47-57 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0527

Comprehensive Evaluation of the Antioxidant and Whitening Activities of Pearl Shell Peptides in Cell, *Drosophila melanogaster*, and Zebrafish Models

XU Jiixin¹, HUANG Pantian¹, YANG Qiubian¹, ZHANG Xiaoying¹, LI Yajuan², LIN Bimin², MIAO Jianyin^{1*}
(1.Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2.Experimental Basis and Practical Training Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To further investigate the antioxidant and whitening activities of pearl shell peptides, their antioxidant capacity was assessed in this study using HepG2 cell line and D-galactose-induced *Drosophila melanogaster* model. Subsequently, their whitening activity was examined using mouse melanoma cells (B16F10) and a zebrafish whitening model. Significant intracellular antioxidant

引文格式:

徐嘉欣,黄潘钿,杨秋变,等.珍珠贝肽抗氧化与美白活性的多模型评估: 细胞、果蝇与斑马鱼体系比较[J].现代食品科技, 2026,42(6):47-57.

XU Jiixin, HUANG Pantian, YANG Qiubian, et al. Comprehensive evaluation of the antioxidant and whitening activities of pearl shell peptides in cell, *Drosophila melanogaster*, and zebrafish models [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 47-57.

收稿日期: 2025-04-14; 修回日期: 2025-06-30; 接受日期: 2025-07-03
基金项目: 广西重点研发计划项目 (桂科 AB21220065)
作者简介: 徐嘉欣 (2000-), 女, 硕士, 研究方向: 食品新原料与功能性食品, E-mail: xujx0905@163.com; 共同第一作者: 黄潘钿 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食品新原料与功能性食品, E-mail: pantian0102@163.com
通讯作者: 苗建银 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: miaojy8181@scau.edu.cn

activity was demonstrated ($EC_{50}=0.163 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), with $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ peptides increased the viability of oxidative-damaged cells from 80.99% to 96.55% ($P<0.05$). Superoxide dismutase and catalase activities significantly increased in D-galactose-treated *D. melanogaster* ($P<0.05$), accompanied by reduced malondialdehyde content. For whitening effects, melanin content was significantly decreased by 26.47% in B16F10 cells and 32.33% in zebrafish, with corresponding tyrosinase activity reduction of 29.79% and 56.72%, respectively. The peptide profile was characterized by mass spectrometry, with identified sequences exhibiting strong correlation with bioactivity assessments. These findings collectively establish that pearl shell peptides possess dual antioxidant-whitening functionalities, providing a scientific foundation for their development as skin-health promoting nutraceutical ingredients.

Key words: pearl shell; bioactive peptides; cellular antioxidation; *Drosophila melanogaster* model; zebrafish; structural identification

由于体内氧化应激、炎症刺激或紫外线损伤、环境污染等内外界因素引起黄褐斑、雀斑、老年斑等黑色素过度沉积的皮肤问题困扰着大量人群。黑色素合成是酪氨酸酶 (EC1.14.18.1, tyrosinase, TYR) 的氧化催化底物酪氨酸或多巴自发反应所生成^[1], 因此常见美白剂通过抑制酪氨酸酶活力以减少黑色素的生成。另外, 氧化应激可能会加速酪氨酸酶的酶促反应, 同时黑色素可以被还原成无色前体物质^[2], 因此部分抗氧化剂可能有助于减缓黑色素生成反应或具有还原黑色素的能力, 是潜在的美白剂。

基于人群对抗氧化、美白剂的外用和内服的需求, 兼具安全性和高活性的皮肤健康功能食品原料备受关注。其中, 肽类具有无毒安全和易于吸收的优点^[3], 且可能同时兼具多种活性, 成为目前的研究热点之一^[4]。已有报道指出, 胶原蛋白肽在外敷和口服实验中具有抗皱、抗衰老、抗氧化和美白作用^[5]; 还原型谷胱甘肽具有抗氧化和美白活性^[5]; 米糠蛋白肽由于表现酪氨酸酶抑制和铜螯合能力^[6], 可能具有美白潜力; 鱼鳞肽具有保持皮肤水分和抑制黑色素生成作用^[7]。基于此, 从食源性蛋白中开发具有抗氧化和美白潜力的功能肽具有可行性和必要性。

马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 又称珍珠贝, 是中国海水珍珠养殖的主要品种。珍珠属药食同源物质, 传统中医认为其具有美白养颜功效。但珍珠作为重要珠宝原料之一, 价值较高但产量较少, 可用于制备活性肽的资源较少, 而产珠后贝肉富含蛋白质, 是开发生物活性肽的优质原料^[8]。但目前贝肉利用率低, 造成大量蛋白资源浪费和环境污染^[9], 亟需进行高值化应用转化。研究表明, 珍珠贝肽具有抗氧化^[10]、血管紧张素转化酶 (Angiotensin I-converting Enzyme, ACE) 抑制^[11]和创伤愈合^[12]、抗炎^[13]等多种活性。本团队前期研究发现通过中性蛋白酶酶解珍珠贝肉所获得的珍珠贝肽具有体外抗氧化活性和酪氨酸酶抑制活性^[14], 但珍珠贝肽是否具有生物层面上的抗氧化及美

白作用, 需要进一步探究。

本研究采用人肝癌细胞 (Hepatocellular Carcinoma G2 Cells, HepG2) 正常生长模型与氧化应激模型分别评价珍珠贝肽的细胞抗氧化作用和细胞氧化损伤保护作用, 并采用 D-半乳糖诱导果蝇模型进一步评价珍珠贝肽对于机体氧化应激的影响, 同时构建小鼠黑色素瘤细胞 (Mouse Melanoma Cells, B16F10) 美白模型和斑马鱼美白模型分别研究珍珠贝肽在细胞和动物层面的美白作用, 最后对珍珠贝肽进行结构鉴定, 分析其构效关系, 以期对珍珠贝肽的基础研究和高值化应用提供数据支持, 同时为开发具有抗氧化和美白多重功效的皮肤健康食品提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

珍珠贝肉, 由北海黑珍珠海洋生物科技有限公司提供。中性蛋白酶 ($10 \text{ kU}\cdot\text{g}^{-1}$), 南宁庞博生物工程有限公司; 还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl, DPPH) 和 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS), 上海源叶生物科技有限公司; 达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)、胎牛血清、磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffer Solution, PBS) 和青霉素-链霉素-新霉素抗生素混合物, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和二辛可宁酸蛋白浓度测定 (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, BCA) 试剂盒, 南京建成生物技术研究。其他化学试剂为分析纯。

1.2 仪器与设备

PHS-3D 型 pH 计, 上海佑科仪器有限公司; Enspire2300 多功能酶标仪, 美国 PE 公司; Alpha 2-4 LD plus 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; ME204 万分之一电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; L530-cence 台式低速自动平衡离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; Centrifuge 5415 R 低温超高速离心机, 德国 EPPENDORF 公司; Nikon SMZ460 体视镜, 日本尼康公司。

1.3 实验方法

1.3.1 珍珠贝肽的制备

本研究采用优化后的酶解工艺制备珍珠贝活性肽^[11]。具体制备流程如下: 首先将新鲜珍珠贝肉经组织破碎仪匀浆处理后, 按照 1:1 (m/m) 的比例加入超纯水混匀, 使用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调节体系 pH 值至 7.25。随后加入中性蛋白酶(添加量为底物质量的 0.4 wt.%), 在 50 °C 恒温水浴条件下酶解 3 h。酶解完成后, 将反应体系置于 90 °C 水浴中保持 15 min 以终止酶反应, 随后在 4 °C 条件下以 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 收集上清液。最终将获得的酶解液经真空冷冻干燥处理, 制成珍珠贝肽冻干粉, 保存于 -20 °C 超低温环境备用。该工艺条件通过前期响应面法优化确定, 可确保酶解产物的最佳生物活性。

1.3.2 基于HepG2细胞的抗氧化活性评价

1.3.2.1 细胞培养

本研究采用 HepG2 细胞系(传代次数控制在 20~35 代)进行实验。细胞培养体系采用使用添加了 0.10% (v/v) 的胎牛血清和 0.01% (v/v) 青霉素-链霉素-新霉素抗生素混合物的 DMEM 培养细胞。细胞培养条件为: 37 °C 恒温、5% (v/v) CO₂ 饱和湿度的培养环境。培养基每 48 h 更换一次, 当细胞密度达到 80%~90% 时进行传代。

1.3.2.2 细胞毒性测定

珍珠贝肽对 HepG2 细胞存活率影响采用 MTT 法测定^[15]。具体实验步骤如下: 将 HepG2 细胞以每孔 1×10⁴ 个的密度接种于 96 孔板, 在标准培养条件下 (37 °C、5% CO₂) 预培养 24 h 使细胞贴壁。随后, 实验组更换为含梯度质量浓度珍珠贝肽 (0.025~1 mg·mL⁻¹) 的培养基 (每孔 100 μL), 对照组仅添加等量完全培养基。继续培养 24 h 后, 移除培养液, 每孔加入 0.5 mg·mL⁻¹ MTT 工作液 (100 μL), 37 °C 避光孵育 4 h。弃去 MTT 溶液后, 每孔加入 100 μL 二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO), 低速振荡 10 min 使结晶充分溶解。最后使用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度

值, 按公式 (1) 计算细胞相对存活率。

$$S = \frac{A_t}{A_o} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

S—细胞存活率, %;

A_t—样品处理组的吸光值;

A_o—对照组的吸光值。

1.3.2.3 细胞内抗氧化活性测定

细胞内抗氧化活性 (Cellular Antioxidant Activity, CAA) 测定参考 Wolfe 等^[16]的方法进行测定。具体实验流程如下: 将 HepG2 细胞以每孔 6×10⁴ 个的密度接种于黑色 96 孔板, 在标准培养条件下培养 24 h 使细胞充分贴壁。随后, 实验组加入 50 μL 50 μmol·L⁻¹ 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate, DCFH-DA) 探针溶液与 50 μL 梯度质量浓度珍珠贝肽 (0.005~0.1 mg·mL⁻¹) 的混合液, 对照组和空白组分别加入等量探针溶液与无菌水。37 °C 避光孵育 1 h 后, 用预热的 PBS 缓冲液轻柔洗涤细胞 3 次。除空白组加入新鲜培养基外, 其余各组均加入 600 μmol·L⁻¹ 2,2'-偶氮二 (2-甲基丙基咪) 二盐酸盐 (2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH) (每孔 100 μL) 诱导氧化应激。立即置于荧光酶标仪中监测, 参数设置为: 激发波长 485 nm, 发射波长 528 nm, 每 5 min 记录一次荧光强度, 持续 60 min。实验全程设置 GSH 作为阳性对照。通过分析荧光强度-时间曲线下面积 (Area Under the Curve, AUC), 按公式 (2) 计算 CAA 值。

$$A = \left(1 - \frac{AUC_t - AUC_o}{AUC_c - AUC_o}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中:

A—样品细胞抗氧化能力, CAA 值;

AUC_t—样品处理组荧光曲线面积;

AUC_c—对照组荧光曲线面积;

AUC_o—空白组荧光曲线面积。

1.3.2.4 珍珠贝肽对AAPH诱导损伤将HepG2细胞的保护作用

基于本团队前期的 AAPH 损伤模型研究^[17], 系统评价珍珠贝肽对 HepG2 细胞的保护效应。实验方案如下: 将处于对数生长期的 HepG2 细胞按每孔 1×10⁴ 个的密度接种于 96 孔培养板, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 使细胞贴壁。随后分组处理: 保护组加入含不同质量浓度珍珠贝肽的培养基 (每孔 100 μL), 模型组和空白对照组加入等体积完全培养基。预处理 24 h 后, 保护组和模型组分别加入含 AAPH (终浓度 0.25 mmol·L⁻¹ 和 10 mmol·L⁻¹) 的培养基 50 μL 建立氧

化损伤模型,空白对照组加入等量新鲜培养基。继续培养 24 h 后,采用 MTT 比色法检测细胞活力:每孔加入 100 μL MTT 工作液 ($0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 形成甲臞结晶,弃去上清后加入 100 μL DMSO 溶解结晶,于酶标仪 490 nm 处测定吸光值。实验设置等浓度 GSH 作为阳性药物对照,所有实验均独立重复 3 次以确保结果可靠性。

1.3.3 基于D-半乳糖诱导果蝇氧化模型的抗氧化活性评价

D-半乳糖诱导的氧化应激模型是研究衰老机制的生物模型^[18],其作用机理在于:当生物体摄入过量 D-半乳糖时,半乳糖氧化酶催化其转化为醛糖和过氧化氢 (H_2O_2),进而产生大量超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 和羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 等活性氧簇 (ROS)^[19]。这些自由基可攻击生物大分子,导致氧化损伤累积。CAT 和 SOD 是人体必需的抗氧化酶^[20],其中,SOD 能够将机体内的氧自由基分解成 H_2O_2 ,CAT 将进一步将过氧化氢分解为水和氧气^[21],从而消除氧自由基等对机体的影响。因此,在 D-半乳糖致果蝇氧化衰老模型中探究 CAT 和 SOD 两种酶的含量能够反映出该模型的氧化损伤程度。

1.3.3.1 果蝇培养

本研究采用标准果蝇培养体系进行实验。野生型果蝇饲养于恒温恒湿培养箱中,环境参数设置为:温度 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $65\%\pm 5\%$ 、12 h/12 h 光暗循环。基础培养基的配制参照邱现创等^[22]的配方略作修改:首先将 85 g 玉米粉、7.5 g 琼脂和 65 g 蔗糖溶于 750 mL 蒸馏水中,煮沸至完全溶解。待培养基冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,依次加入 7 g 活性干酵母和 5 mL 丙酸(防腐剂),充分混匀后分装至灭菌果蝇管(每管 2 mL)。

1.3.3.2 D-半乳糖诱导果蝇模型构建

取 8 h 内羽化未交配的果蝇,乙醚麻醉后鉴定性别,将雌雄果蝇分开,以 $40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ D-半乳糖致果蝇氧化模型,分别设置 D-半乳糖-珍珠贝肽低剂量组 ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中剂量组 ($2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高剂量组 ($4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、空白对照组和 D-半乳糖组。每组雌、雄果蝇各 3 管,每管果蝇 30 只,每 3 d 更换一次培养基。

本研究建立 D-半乳糖诱导的果蝇氧化应激模型。具体操作如下:收集羽化后 8 h 内未交配的果蝇,经乙醚轻度麻醉后进行性别鉴定并分组。实验设置:空白对照组(基础培养基)、D-半乳糖模型组 ($40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 D-半乳糖+珍珠贝肽低剂量组 ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),每组设雌雄各 3 个生物学重复,每个重复 30 只果蝇,饲养于含相应处理培养基的果蝇管中。培养条件维持 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、65% 相对湿度,每 72 h 更换新鲜培养基以避免代谢产物积累。该实验设计可系统评估珍珠贝肽对氧化损伤

果蝇的保护作用。

1.3.3.3 果蝇中抗氧化酶SOD和CAT活力及MDA含量的测定

在培养 3 周后,将各实验组果蝇冷冻处死后破碎处理,使用 CAT、SOD、MDA 和 BCA 试剂盒分别测定细胞中抗氧化酶 CAT 活力、SOD 活力及 MDA 含量,并测定 BCA 结果进行归一化处理。

1.3.4 基于B16F10细胞的美白活性评价

1.3.4.1 细胞培养

本研究采用 B16F10 小鼠黑色素瘤细胞系(传代次数控制在 10~25 代)进行实验,使用添加了 $\varphi=0.10$ 的胎牛血清和 $\varphi=0.01$ 青霉素-链霉素-新霉素抗生素混合物的基础培养基培养细胞。细胞培养条件为: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温、5% CO_2 的培养环境,培养基每 48 h 更换一次新鲜培养液,细胞长至 80%~90% 进行传代培养。

1.3.4.2 细胞毒性评价

将 B16F10 细胞以每孔 1×10^4 个的浓度接种到 96 孔板中,采用 1.3.2.2 中 MTT 法测定不同质量浓度珍珠贝肽对 B16F10 细胞存活率的影响。

1.3.4.3 细胞的黑色素含量和酪氨酸酶活力的测定

本研究参考 Jeon 等^[23]的方法测定黑色素含量和酪氨酸酶活力。将 B16F10 细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养 24 h。样品处理组分别加入含不同质量浓度样品 (10、25 和 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的培养基 2 mL,空白对照组加入等量完全培养基,继续培养 48 h。细胞处理后,用预冷 PBS 洗涤 3 次,每孔加入 200 μL 裂解缓冲液冰上裂解。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离上清和沉淀,将上清液和沉淀分别用于测定酪氨酸酶活力和测定黑色素含量。取 20 μL 上清液与 180 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 多巴溶液 ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 反应, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 2 h 后测定 475 nm 吸光度值。沉淀部分用 250 μL 碱性溶解液 ($1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 含 $\varphi=0.10$ 的 DMSO) 处理, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h 后测定 405 nm 吸光度值。以 GSH 为阳性对照,所有数据均通过 BCA 试剂盒测定的蛋白浓度进行标准化处理。

1.3.5 基于斑马鱼的美白活性评价

1.3.5.1 斑马鱼培养

斑马鱼饲养与繁殖实验按以下条件进行:将野生型斑马鱼饲养于水温 $28.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 7.5~8.5 环境中。繁殖前,将 10 组斑马鱼按雌雄 1:2 的比例分别置于配种缸的两侧隔间中。经过 12 h 的暗适应处理后,移除隔离挡板并恢复光照刺激使斑马鱼交配获得胚胎。收集产卵后 2 h 内的胚胎,筛选发育正常、卵膜完整的健康胚胎(受精率 $\geq 80\%$) 用于后续实验。

1.3.5.2 斑马鱼存活试验

收集健康斑马鱼胚胎在 96 孔板中, 以每孔 1 尾的密度铺板, 每孔 180 μL 的体积加入不同质量浓度样品 ($0.025\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 每 24 h 观察胚胎死亡情况及畸形情况, 连续观察 5 d, 观察不同质量浓度样品对斑马鱼发育的影响。

1.3.5.3 斑马鱼的黑色素含量和酪氨酸酶活力的测定

收集受精 24 h 后的健康斑马鱼卵, 将发育正常的胚胎以每孔 20 尾密度接种于 12 孔板, 分别暴露于含梯度质量浓度样品 (10 、 50 、 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 2 mL 培养液中, $28.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 48 h。以 GSH 为阳性对照, 处理结束后在体视显微镜下观察胚胎形态并记录黑色素分布特征, 采集背侧和侧位图像。收集斑马鱼经预冷蒸馏水洗涤后液氮速冻, 加入 200 μL 预冷裂解缓冲液, 通过三次冻融循环充分破碎组织, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离上清和沉淀组分。上清液和沉淀分别测定酪氨酸酶活力和黑色素含量, 处理同 1.3.4.3, 所有数据均通过 BCA 法测定的总蛋白含量进行标准化处理, 确保结果可比性。本实验以 GSH 作为阳性对照。

1.3.6 质谱鉴定

将具有抗氧化和美白活性的珍珠贝肽进行结构鉴定。样品经 $\varphi=0.001$ 甲酸水溶液溶解后, 通过 C18 固相萃取柱 (Acclaim PepMap 100, $75\text{ }\mu\text{m}\times 20\text{ mm}$) 脱盐纯化。采用纳升级液相色谱-质谱联用系统 (EASY-nanoLC 1200 串联 Q Exactive™ Plus) 进行分析, 色谱分离条件为: 反相 C18 毛细管柱 ($75\text{ }\mu\text{m}\times 20\text{ mm}$), 流动相 A ($\varphi=0.001$ 甲酸水溶液) 和 B ($\varphi=0.001$ 甲酸乙腈溶液), 流速 $300\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样体积 $5\text{ }\mu\text{L}$, 电喷雾电压 2 kV 。质谱采用数据依赖性采集模式, 自动在 MS 和 MS/MS 采集间切换。原始数据经 Peaks Studio 8.5 软件对 MS/MS 数据进行序列分析, 通过比对 Uniprot 数据库中马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 的蛋白质序列, 鉴定活性肽段的氨基酸组成及一级结构。

1.3.7 数据处理

所有实验设 3 平行, 采用 Excel 软件 (2019) 进行计算, 样本间差异采用 SPSS 软件 (IBM, NY, USA) 对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 数据图采用 Origin 2021 绘制。

2 结果与分析

2.1 基于HepG2细胞模型研究珍珠贝肽的抗氧化活性

2.1.1 细胞毒性测定

本研究采用 MTT 法评价不同质量浓度珍珠贝肽

对 HepG2 细胞存活率的影响。如图 1 所示, 珍珠贝肽处理组的 HepG2 细胞存活率均高于对照组, 表明珍珠贝肽在 $0.025\sim 1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内对 HepG2 细胞无毒性作用。

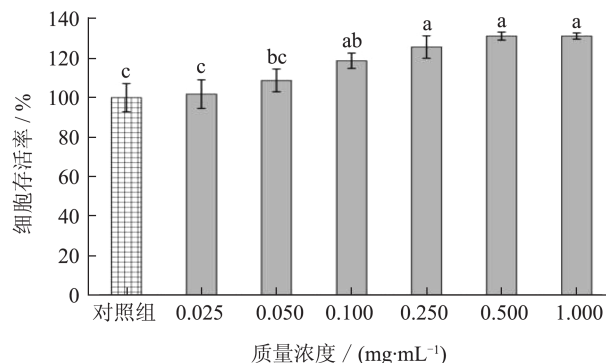


图 1 珍珠贝肽对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of pearl shellfish peptides on the survival rate of HepG2 cells

注: 不同字母表示数据之间具有显著差异 ($P<0.05$)。下同。

2.1.2 细胞内抗氧化活性评价

细胞内脂肪酶将荧光探针 DCFH-DA 降解为 DCFH, 在 AAPH 诱导下被氧化为荧光 DCF, 具有抗氧化能力的物质可保护探针不被氧化^[16]。如图 2 所示, 珍珠贝肽和阳性对照均具有细胞内抗氧化活性且呈质量浓度依赖性。已报道质量浓度 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 下罗非鱼肽的 CAZA 值约为 35^[24], 同质量浓度下珍珠贝肽的 CAA 值为 50.92, 其更高的 CAA 值表明珍珠贝肽具有良好的细胞内抗氧化活性。珍珠贝肽的细胞内抗氧化能力 EC_{50} 值为 $0.163\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (表 1), 由图 2 可知, 在质量浓度范围 $0.01\sim 0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 珍珠贝肽组与阳性对照组的 CAA 值无显著性差异 ($P>0.05$), 其珍珠贝肽抗氧化活性与还原型谷胱甘肽相当。

本研究采用 DCFH-DA 荧光探针法评价珍珠贝肽的细胞内抗氧化活性 (CAA)。其作用机制为: 非荧光探针 DCFH-DA 经细胞内酯酶水解生成 DCFH, 在 AAPH 诱导的氧化应激条件下被氧化为荧光物质 DCF, 而抗氧化剂可通过清除自由基保护 DCFH 不被氧化^[16,24]。实验结果 (图 2) 显示, 珍珠贝肽表现出显著的浓度依赖性抗氧化效应 ($R^2=0.982$)。值得注意的是, 在 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下, 珍珠贝肽的 CAA 值达 50.92, 较文献报道的罗非鱼肽 (35) 提高 45.5%^[24]。通过剂量效应曲线计算得到珍珠贝肽的 EC_{50} 值为 $0.163\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (表 1), 且在 $0.01\sim 0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内, 其抗氧化活性与阳性对照 GSH 无统计学差异 ($P>0.05$), 表明低质量浓度珍珠贝肽即可达到与

GSH 相当的抗氧化效果。这些数据充分证明珍珠贝肽具有优异的细胞内自由基清除能力，其抗氧化效能显著优于其他水产源活性肽。

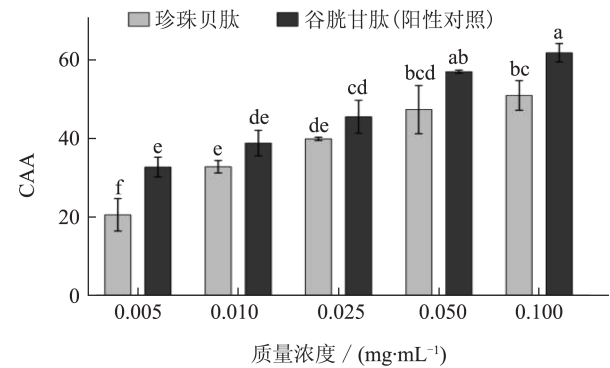


图2 珍珠贝肽的 HepG2 细胞抗氧化活性评价

Fig.2 Evaluation of cellular antioxidant activity in HepG2 of pearl shellfish peptides

表 1 珍珠贝肽在细胞抗氧化活性评价中的半数有效浓度 (EC₅₀)

Table 1 The median effective concentrations (EC₅₀) of cellular antioxidant activity of pearl shellfish peptides

类别	EC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
珍珠贝肽	0.163
还原型谷胱甘肽 (阳性对照)	0.030

2.1.3 对AAPH诱导HepG2细胞损伤的保护作用

在前期研究中，利用 10 mmol·L⁻¹ 和 0.25 mmol·L⁻¹ 两种浓度的 AAPH 分别构建了细胞存活率为 80% 和 50% 的 HepG2 细胞氧化损伤模型^[7]，并在此模型上开展了珍珠贝单体肽对强弱两种氧化损伤程度下细胞的保护研究。本实验继续沿用前期研究中的两种细胞损伤模型，探究珍珠贝肽对 AAPH 诱导 HepG2 细胞损伤的保护作用。

如图 3 所示，与空白对照组对比，10 mmol·L⁻¹ 和 0.25 mmol·L⁻¹ AAPH 损伤组均能显著降低细胞存活率 ($P < 0.05$)，成功构建损伤模型。由图 3a 可知，在细胞存活率为 50% 的损伤模型中，质量浓度为 0.025、0.05、0.1 和 0.2 mg·mL⁻¹ 的珍珠贝肽将细胞存活率从 48.73% 分别提升到 57.03%、59.30%、60.56% 和 64.15%，并且对细胞氧化损伤的保护效果均优于同质量浓度的阳性对照组。而在图 3b 细胞存活率为 80% 的损伤模型中，质量浓度为 0.05、0.1 和 0.2 mg·mL⁻¹ 的珍珠贝肽将细胞存活率从 80.99% 分别提升至 81.96%、93.80% 和 96.55%，其对细胞氧化损伤的保护效果均与同质量浓度的阳性对照相当，且在 0.1 和 0.2 mg·mL⁻¹ 两个质量浓度下，珍珠贝肽处理组的细胞存活率与空白对照组十分接近，无显著性差异 ($P > 0.05$)。由此可得，珍珠贝肽不仅在强氧化损伤模型中对 HepG2 细

胞的保护作用显著，而且在一定质量浓度下，还可保护弱氧化损伤模型中的 HepG2 细胞免受氧化损伤，使其细胞活力保持在正常细胞的水平。因此，珍珠贝肽在细胞水平上表现出了良好的抗氧化活性。

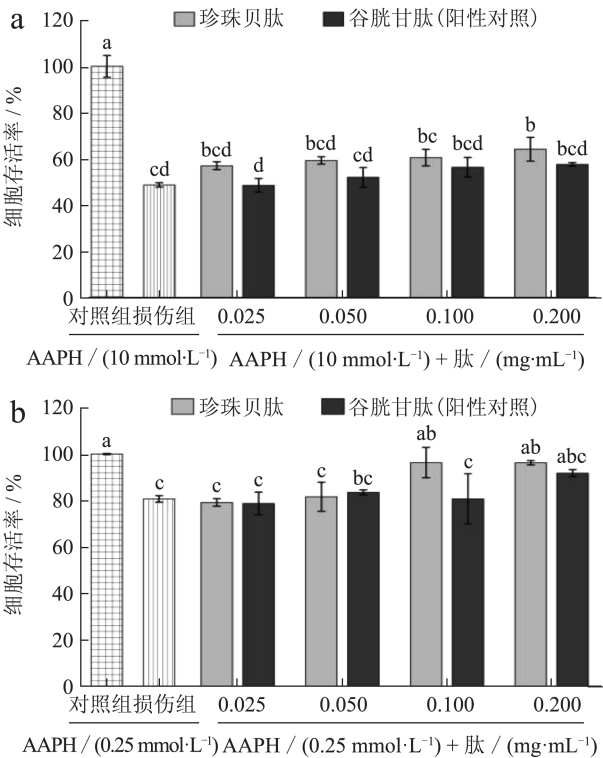


图3 珍珠贝肽和 GSH 对 AAPH 诱导损伤 HepG2 细胞的保护作用

Fig.3 Cytoprotective effect of antioxidant from pearl shellfish peptides on AAPH-induced injury of HepG2 cells

注：(a) 50% 细胞存活率模型；(b) 80% 细胞存活率模型。

2.2 基于D-半乳糖致果蝇氧化衰老模型研究珍珠贝肽的抗氧化活性

2.2.1 对CAT和SOD活力的影响

如图 4 和图 5 所示，半乳糖组中果蝇体内的 CAT 和 SOD 活力均低于空白对照组，说明投喂高剂量的 D-半乳糖后，果蝇体内的抗氧化酶活力均受到了一定程度的影响，成功构建氧化衰老模型。由图 4a 可知，雌性果蝇实验中，珍珠贝肽处理组的 CAT 活力均高于 D-半乳糖组，且在质量浓度为 4 mg·mL⁻¹ 时，CAT 活力比 D-半乳糖组显著提升了 36.32% ($P < 0.05$)；另外，通过图 4b 可知，雄性果蝇实验中，在低中高质量浓度的珍珠贝肽处理后，其 CAT 活力均显著高于 D-半乳糖组 ($P < 0.05$)，尤其在珍珠贝肽质量浓度为 4 mg·mL⁻¹ 时，实验组果蝇体内的 CAT 活力与空白对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。如图 5a 所示，雌性果蝇实验中，珍珠贝肽处理组的果蝇 SOD 活力均

高于 D-半乳糖组, 其中珍珠贝质量浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其 SOD 活力相比 D-半乳糖组显著提升了 23.74% ($P < 0.05$); 同时, 由图 5b 可知, 雄性果蝇中 SOD 活力均高于 D-半乳糖组, 但无显著性 ($P > 0.05$)。

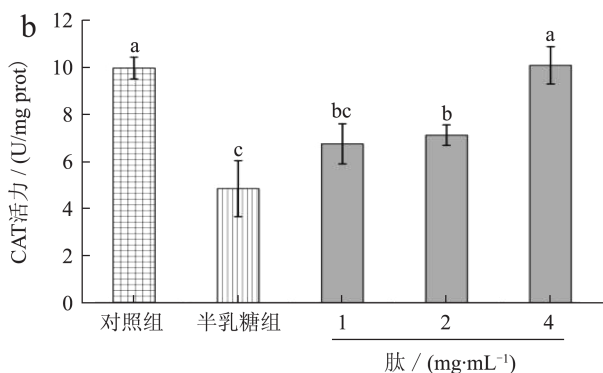
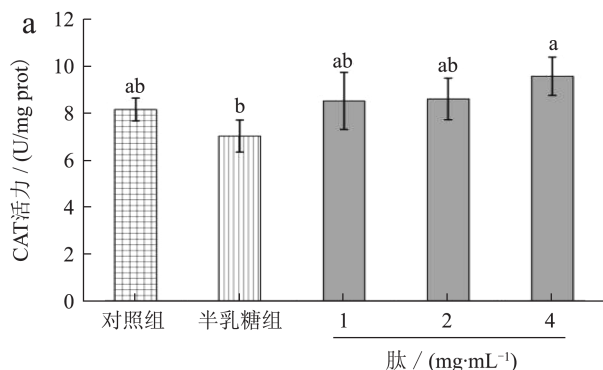


图 4 珍珠贝肽对果蝇中 CAT 活力的影响

Fig.4 Effects on CAT activity of pearl shell peptides in *Drosophila melanogaster*

注: (a) 雌性果蝇; (b) 雄性果蝇。

已有报道指出, 生物活性肽可通过改善果蝇抗氧化防御系统, 起到抗氧化应激和抗衰老作用^[20], 显而易见, 本实验结果与报道结果相似, 珍珠贝肽在一定程度上能够保护果蝇抵抗氧化损伤, 从而改善 D-半乳糖导致的氧化衰老果蝇体内抗氧化酶活力的降低。由此可得, 珍珠贝肽在 D-半乳糖致果蝇氧化衰老模型中表现出了很好的抗氧化活性。

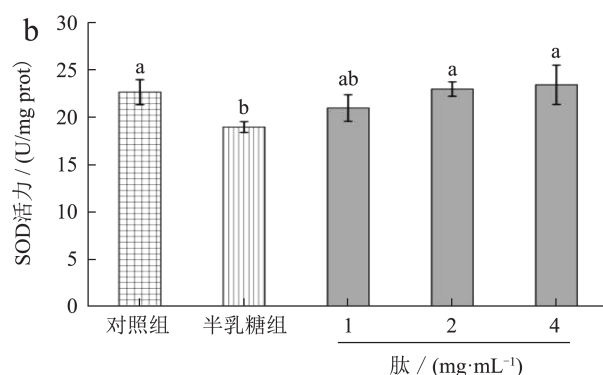
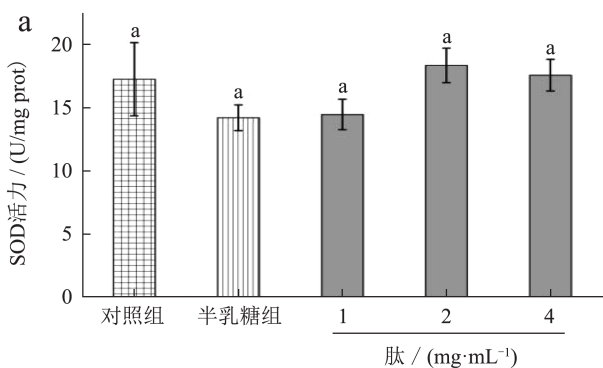


图 5 珍珠贝肽对果蝇中 SOD 活力的影响

Fig.5 Effects on SOD activity of pearl shell peptides in *Drosophila melanogaster*

注: (a) 雌性果蝇; (b) 雄性果蝇。

2.2.2 对MDA含量的影响

D-半乳糖在氧化酶作用下生成超氧阴离子自由基, 引发脂质过氧化反应产生过氧化脂质。这些过氧化产物与蛋白质结合后, 在酸性环境中降解形成丙二醛 (MDA), 并最终转化为脂褐素^[25]。由于 MDA 是这一氧化链式反应的关键中间体, 其含量变化可直接表征机体的脂质过氧化程度^[26]。

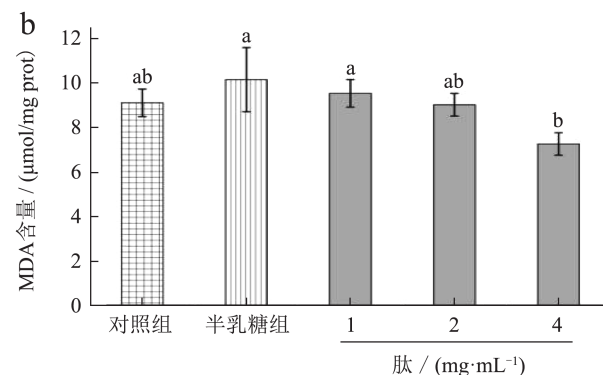
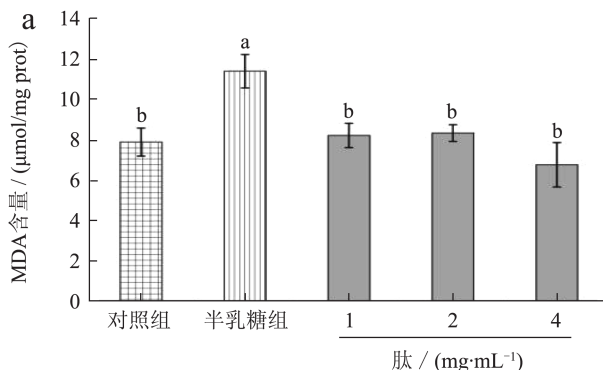


图 6 珍珠贝肽对果蝇中 MDA 含量的影响

Fig.6 Effects on MDA content of pearl shell peptides in *Drosophila melanogaster*

注: (a) 雌性果蝇; (b) 雄性果蝇。

如图6所示,与空白组相比,半乳糖组的雌雄果蝇体内所含的MDA均上升,说明喂养D-半乳糖的果蝇体内的脂质过氧化水平提高,建模成功。在图6a中,质量浓度为1、2和4 mg·mL⁻¹的珍珠贝肽处理后,雌性果蝇中MDA含量均显著低于半乳糖组($P < 0.05$),与之相比分别降低了27.93%、26.89%和40.68%,并且其含量与空白对照组无显著性差异($P > 0.05$)。

如图6b所示,雄性果蝇中MDA含量均低于半乳糖组,其中在质量浓度为4 mg·mL⁻¹珍珠贝肽的处理下,雄性果蝇中MDA含量比半乳糖组显著降低了28.50% ($P < 0.05$)。结果表明,珍珠贝肽能够有效降低D-半乳糖导致氧化衰老果蝇体内的MDA含量,说明在一定程度上珍珠贝肽具有降低动物体内脂质过氧化水平的潜力。

2.3 基于B16F10细胞研究珍珠贝肽对美白活性

2.3.1 细胞毒性测定

本研究采用MTT比色法评价不同质量浓度珍珠贝肽对B16F10细胞存活率的影响。如图7所示,珍珠贝肽处理组的B16F10细胞存活率与空白组没有显著差异($P > 0.05$),表明在0.025~1 mg·mL⁻¹的质量浓度范围内,珍珠贝肽对B16F10细胞的无毒害作用。

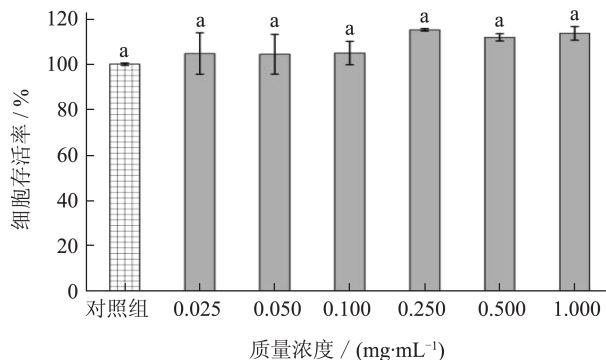


图7 珍珠贝肽对B16F10细胞存活率的影响

Fig.7 Effect on the survival rate of B16F10 cells of pearl shell peptides

2.3.2 珍珠贝肽对B16F10细胞黑色素含量的影响

收集经过珍珠贝肽处理后的B16F10细胞,破碎细胞体后溶解黑色素,测定其黑色素含量。如图8所示,珍珠贝肽对B16F10细胞黑色素含量具有显著降低效果($P < 0.05$),其中质量浓度为10、25和50 μg·mL⁻¹的珍珠贝肽处理下,B16F10细胞黑色素含量分别比对照组降低了18.96%、24.78%和26.47%,其中10和25 μg·mL⁻¹的珍珠贝肽对黑色素含量的降低效果优于阳性对照。结果表明,珍珠贝肽具有良好的细胞抗黑色素作用,具有潜在的美白效果。

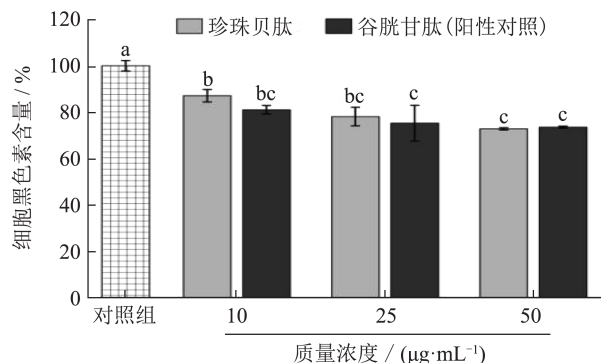


图8 珍珠贝肽对细胞黑色素含量的影响

Fig.8 Effect on cellular melanin content of pearl shell peptides

2.3.3 珍珠贝肽对B16F10细胞酪氨酸酶活力的影响

前期研究发现珍珠贝肽表现出良好的体外酪氨酸酶抑制活性^[14],因此进一步研究其对细胞内酪氨酸酶的影响。酪氨酸酶的活力是黑色素生成的关键,通过酶活力测定可初步评估活性物是否影响生成黑色素的酶促反应^[27]。如图9所示,珍珠贝肽显著抑制细胞酪氨酸酶活性($P < 0.05$),且呈浓度依赖性。在质量浓度为10、25和50 μg·mL⁻¹珍珠贝肽处理下,细胞内酪氨酸酶活性分别显著降低了12.32%、21.23%和29.79% ($P < 0.05$),这说明珍珠贝肽具有良好的细胞酪氨酸酶抑制活性。结合2.3.2的结果,珍珠贝肽处理过的细胞酪氨酸酶抑制活性略低于阳性对照GSH,但其抗黑色素活性与阳性对照GSH无显著性差异($P > 0.05$),其可能原因是,珍珠贝肽的抗黑色素作用不仅是通过直接抑制酪氨酸酶活力以减少黑色素合成,而且可能同时具备还原部分黑色素成为无色前体物质的能力。

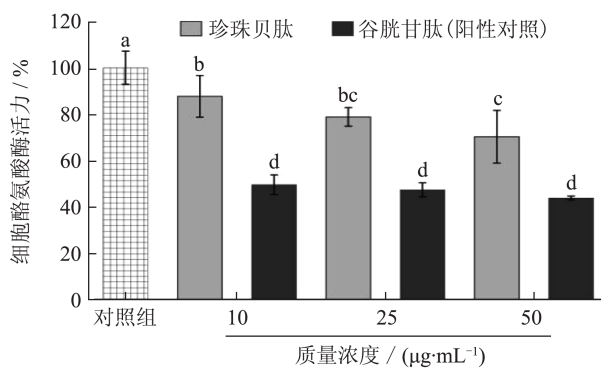


图9 珍珠贝肽对细胞酪氨酸酶活力的影响

Fig.9 Effect on cellular tyrosinase activity of pearl shell peptides

2.4 基于斑马鱼研究珍珠贝肽的美白活性

2.4.1 斑马鱼毒性测定

斑马鱼胚胎敏感性高,正式实验前将不同质量浓度的珍珠贝肽处理斑马鱼胚胎以确定珍珠贝肽的安全

性。如图 10 所示,在 $25\sim 250\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内,珍珠贝肽处理组的斑马鱼均全部存活,生理状态正常。部分斑马鱼胚胎在质量浓度 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品处理下发育迟缓,存活率为 80%。因此,选用安全质量浓度 ($25\sim 250\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的珍珠贝肽进行斑马鱼美白活性研究。

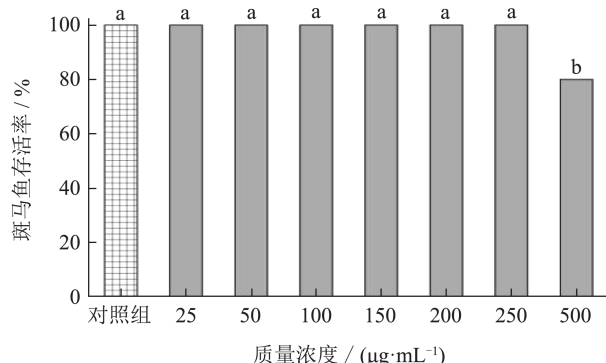


图 10 珍珠贝肽对斑马鱼细胞存活率的影响

Fig.10 Effect on the survival rate of zebrafish of pearl shell peptides

2.4.2 对斑马鱼黑色素含量的影响

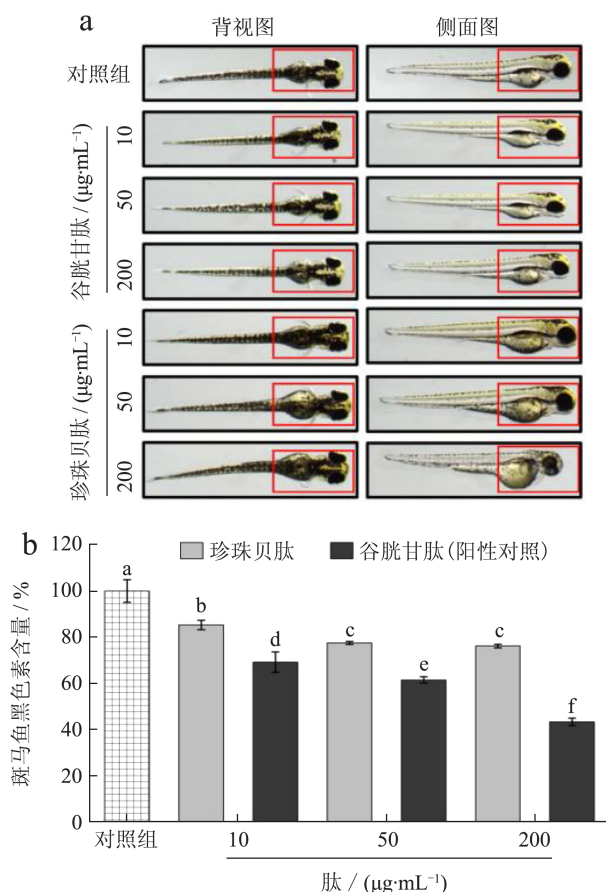


图 11 珍珠贝肽对斑马鱼黑色素含量的影响

Fig.11 Effect on melanin content of zebrafish of pearl shell peptides

注: (a) 斑马鱼体表斑点情况; (b) 斑马鱼体内黑色素含量。

斑马鱼体表的黑色素分布如图 11a 所示。对照组的斑马鱼头部呈现黑色“V”字型连续斑点,腹部黑色斑点明显,而在珍珠贝肽和还原型谷胱甘肽处理下,头部和腹部的黑色斑点减淡,尤其是高质量浓度下,斑点区域较为透明,说明珍珠贝肽一定程度上可减轻斑马鱼的黑色素沉着。进一步将斑马鱼破碎后测定其黑色素含量,结果如图 11b 所示。在无毒浓度范围下珍珠贝肽对斑马鱼黑色素含量具有显著降低效果,在质量浓度为 10 、 50 和 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 珍珠贝肽处理下,斑马鱼黑色素含量分别比空白组显著降低了 30.86%、38.56% 和 56.72% ($P<0.05$),同时分别比阳性对照显著降低了 16.12%、16.05 和 32.88% ($P<0.05$),其作用效果优于还原型谷胱甘肽,说明珍珠贝肽具有良好的斑马鱼黑色素抑制能力。

2.4.3 对斑马鱼酪氨酸酶活力的影响

通过测定斑马鱼体内酪氨酸酶活性评估珍珠贝肽对斑马鱼体内黑色素生成反应的影响^[28]。如图 12 所示,珍珠贝肽显著抑制斑马鱼酪氨酸酶活性 ($P<0.05$)。在质量浓度为 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 珍珠贝肽处理下,斑马鱼酪氨酸酶活性分别比对照组降低了 28.23% 和 32.33%,与阳性对照 GSH 无显著性差异 ($P>0.05$)。这说明珍珠贝肽具有良好的斑马鱼酪氨酸酶抑制活性。

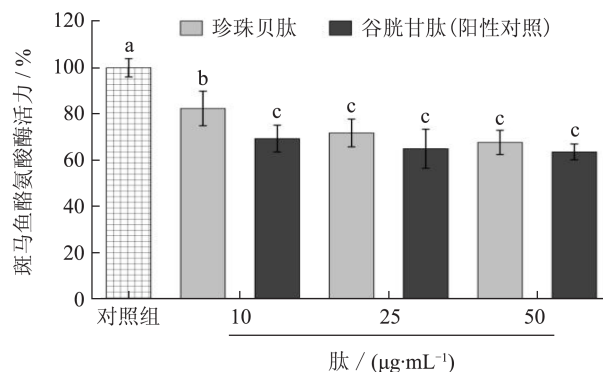


图 12 珍珠贝肽对斑马鱼酪氨酸酶活性的影响

Fig.12 Effect on tyrosinase activity of zebrafish of pearl shell peptides

2.5 珍珠贝肽的结构鉴定

据报道,肽的抗氧化和美白活性与分子质量大小、肽链长度有一定的关系,大部分情况下,小分子量的短肽其抗氧化和美白活性会大于大分子量的长肽^[29,30],并且小分子量的短肽由于其结构简单和分子量低,更易于被人体吸收。此外,肽段所表达的活性与氨基酸组成也密不可分,相关研究表明,疏水性氨基酸包含丙氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、脯氨酸、缬氨酸和甘氨酸,是活性肽清除自由基的关键

因素^[31],这直接决定了活性肽的抗氧化活性;与此同时,亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、和半胱氨酸这8种氨基酸的存在能够帮助活性肽有效的抑制酪氨酸酶活性,从而展现美白活性^[32]。

通过对珍珠贝肽进行结构鉴定可知,共鉴定出1 810个肽段,其分子量大小位于229.106 2~3 026.367 7 u之间。根据图13可知,珍珠贝肽中,小分子肽(分子量<1 000 u)和短肽(氨基酸数量<10)的比例分别高达93.20%和94.31%,包含8种具有酪氨酸酶抑制活性的氨基酸的潜在美白肽在珍珠贝活性肽中的占比为92.93%,而包含疏水性氨基酸的潜在抗氧化肽的占比也高达97.35%。综上所述,珍珠贝肽在组成成分方面展现出了一定的抗氧化活性和美白活性的潜力,这一结果也应证了此研究中珍珠贝肽在细胞和动物模型上所展现的高抗氧化活性和美白活性,同时,高含量的小分子肽有助于珍珠贝肽在体内的吸收,为其开发成兼具兼具抗氧化和美白活性的保健品或护肤品奠定了理论基础。

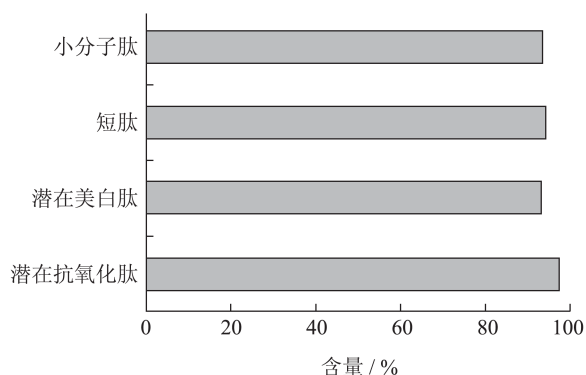


图13 珍珠贝肽质谱鉴定统计分析

Fig.13 Statistical analysis of pearl shell peptides identification by mass spectrometry

3 结论

前期研究中已证明珍珠贝肽具有良好的体外抗氧化和体外酪氨酸酶抑制作用,本研究则进一步探究了珍珠贝肽在细胞和动物模型中的抗氧化和美白活性。由研究结果可得,珍珠贝肽具有良好的细胞抗氧化能力和氧化损伤细胞的恢复能力,并且,在D-半乳糖致果蝇氧化衰老模型中,珍珠贝肽能够提高果蝇体内抗氧化酶的活力,减少机体的脂质过氧化水平。同时,珍珠贝肽能够显著降低B16F10细胞和斑马鱼中黑色素的含量,并显著抑制其酪氨酸酶活性。由此可知,珍珠贝肽在细胞和动物层面均表现出良好的抗氧化和美白能力。最后,为了探究珍珠贝肽抗氧化和美白活性机制,对其进行了质谱鉴定,结果可知,珍珠贝肽在

组成成分上就展现出了很好的抗氧化和美白活性的潜力,与本研究活性评价结果一致。综上所述,本研究为珍珠贝肽作为一种具有抗氧化和美白多重活性原料应用于功能食品、生物医药或化妆品提供了更坚实的理论依据,有望开发成兼具口服和外用的抗氧化剂或美白剂,实现其高值化利用。

然而,同一物质表现出的多种活性之间往往存在着千丝万缕的联系,在斑马鱼珍珠贝肽的美白活性研究中,珍珠贝肽对酪氨酸酶活性的抑制能力弱于阳性对照,但是其抗黑色素能力却优于阳性对照。因此可推断,珍珠贝肽的美白活性不完全由抑制酪氨酸酶活性这一途径所贡献,可能其自身所表现的抗氧化能力也间接影响了黑色素的生成和代谢。因此,珍珠贝肽所表现的抗氧化和美白活性之间的深层联系还需进一步研究。

参考文献

- [1] SHEN Z W, WANG Y J, GUO Z, et al. Novel tyrosinase inhibitory peptide with free radical scavenging ability [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2019, 34(1): 1633-1640.
- [2] 宿文昱.辽冀本经皮促透作用及美白机制的研究[D].长春:吉林大学,2022.
- [3] ZHAO X C, ZHANG X J, LIU D Y. Collagen peptides and the related synthetic peptides: A review on improving skin health [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 86: 104680.
- [4] WEN C T, ZHANG J X, ZHANG H H, et al. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105(1): 308-322.
- [5] WESCHAWALIT S, THONGTHIP S, PHUTRAKOOL P, et al. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects [J]. Volume, 2017, 10: 147-153.
- [6] KUBGLOMSONG S, THEERAKULKAIT C, REED R L, et al. Isolation and identification of tyrosinase-inhibitory and copper-chelating peptides from hydrolyzed rice-bran-derived albumin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(31): 8346-8354.
- [7] CHEN Y P, WU H F, WANG G H, et al. Improvement of skin condition on skin moisture and anti-melanogenesis by collagen peptides from milkfish (*Chanos chanos*) scales [J]. Materials Science and Engineering, 2018, 382(2): 0220267.
- [8] 涂宗财,罗晓慧,王辉,等.多指标优化珠蚌抗氧化肽制备工艺[J].食品工业科技,2012,33(13):213-216.
- [9] 李家乐,王德芬,白志毅,等.中国淡水珍珠养殖产业发展报告[J].中国水产,2019,3:23-29.
- [10] 蒲月华,邓旗,杨萍,等.珍珠贝多肽体外抗氧化活性的研究[J].食品科技,2016,41(11):124-128.
- [11] LIU P R, XIONG D L, YASEEN M, et al. Purification, characterization and evaluation of inhibitory mechanism of ACE inhibitory peptides from pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*)

- meat protein hydrolysate [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(8): 463.
- [12] YANG F, QIN X M, ZHANG T, et al. Effect of oral administration of active peptides of *Pinctada martensii* on the repair of skin wounds [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(12): 697.
- [13] 沈金鹏,王珂雯,黄潘钊,等.珍珠贝水解肽的制备、氨基酸组成及抗炎活性[J].食品与机械,2023,39(2):132-139,206.
- [14] 黄潘钊,陈冰冰,沈金鹏,等.珍珠贝肉抗氧化肽制备工艺优化及其对酪氨酸酶的抑制活性[J].现代食品科技,2022,38(4):52-61.
- [15] XIA Z, MIAO J Y, CHEN B B, et al. Purification, identification, and antioxidative mechanism of three novel selenium-enriched oyster antioxidant peptides [J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111359.
- [16] WOLFE K L, LIU R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(22): 8896-8907.
- [17] HUANG P T, MIAO J Y, LI J L, et al. Novel antioxidant peptides from pearl shell meat hydrolysate and their antioxidant activity mechanism [J]. *Molecules*, 2023, 28(2): 864.
- [18] 许扬,吴涛,顾佳黎,等.D-半乳糖诱导衰老动物模型研究进展[J].中国老年学杂志,2009,29(13):1710-1713.
- [19] WU D M, LU J, ZHENG Y L, et al. Purple sweet potato color repairs d-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins [J]. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2008, 90(1): 19-27.
- [20] CAI X X, CHEN S Y, LIANG J P, et al. Protective effects of crimson snapper scales peptides against oxidative stress on *Drosophila melanogaster* and the action mechanism [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 148: 111965.
- [21] CHEN S Y, YANG Q, CHEN X, et al. Bioactive peptides derived from crimson snapper and *in vivo* anti-aging effects on fat diet-induced high fat *Drosophila melanogaster* [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 524-533.
- [22] 邱现创,赵宁,李晨,等.铁皮石斛多糖提取工艺优化及对果蝇抗氧化能力的影响[J].食品科学,2018,39(2):273-280.
- [23] JEON H, KIM K, KIM C, et al. Molecular mechanisms of anti-melanogenic gedunin derived from neem tree (*Azadirachta indica*) using B16F10 mouse melanoma cells and early-stage zebrafish [J]. *Plants*, 2021, 10(2): 330.
- [24] ZHANG X G, NOISA P, YONGSAWATDIGUL J. Chemical and cellular antioxidant activities of *in vitro* digesta of tilapia protein and its hydrolysates [J]. *Foods*, 2020, 9(6): 833.
- [25] LIN L Z, YANG K, ZHENG L, et al. Anti-aging effect of sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) hydrolysate on fruit flies and d-galactose-induced aging mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 47: 11-18.
- [26] MA C, YANG K, WANG Y, et al. Anti-aging effect of agar oligosaccharide on male *Drosophila melanogaster* and its preliminary mechanism [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(11):632.
- [27] KO R K, KIM G, HYUN C, et al. Compounds with tyrosinase inhibition, elastase inhibition and DPPH radical scavenging activities from the branches of *Distylium racemosum* sieb. et zucc [J]. *Phytotherapy Research*, 2011, 25(10):1451-1456.
- [28] HU Z Z, SHA X M, ZHANG L, et al. From fish scale gelatin to tyrosinase inhibitor: A novel peptides screening approach application [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 853442.
- [29] WANG L Y, MA M T, YU Z P, et al. Preparation and identification of antioxidant peptides from cottonseed proteins [J]. *Food Chemistry*, 2021, 352: 129399.
- [30] MENG J H, LIU J, LU J, et al. Isolation, identification, and preparation of tyrosinase inhibitory peptides from *Pinctada martensii* meat [J]. *Biotechnology Letters*, 2023, 45(11): 1495-1511.
- [31] NWACHUKWU I D, ALUKO R E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(1): e12761.
- [32] PRAKOT P, CHAITANAWISUTI N, SANGTANOO P, et al. Inhibitory activities of protein hydrolysates from spotted Babylon snails on tyrosinase and melanogenesis [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2018, 27(7): 811-829.