

甲鱼肽的分离纯化及对小鼠氧化损伤的改善作用

周琬蕊, 应阳杰, 周晋宇, 王静雯, 王倩倩*

(浙江农林大学森林食物资源挖掘与利用全国重点实验室, 食品与健康学院, 浙江杭州 31130)

摘要: 为了探究甲鱼肽对小鼠氧化损伤的改善作用, 该研究首先以 DPPH 自由基清除率为评价指标, 通过离子交换树脂法优化甲鱼肽 (Soft-Shelled Turtle Peptides, STP) 的分离纯化工艺获得高活性甲鱼抗氧化肽。随后建立 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 诱导的小鼠氧化损伤模型, 采用试剂盒检测小鼠各组织的超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione Peroxidase, GSH-Px) 和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量。结果表明, 凝胶型阳离子交换树脂 (Gel Cation Ion Exchange Resin, GC) 分离纯化甲鱼抗氧化肽效果最佳, 其静态吸附 pH 值为 1.0 和解吸附溶液乙醇体积分数为 50% 时, DPPH 自由基清除率提高了 34.42% ($P<0.001$)。与模型组相比, GC 纯化后甲鱼抗氧化肽 (Purified of STP with GC, GC-STP) 组肝脏和胸腺组织的 SOD 活性分别显著增加 62.28% ($P<0.05$) 和 59.18% ($P<0.01$); 肝脏、脾脏和胸腺组织的 GSH-Px 活性分别显著增加 32.52% ($P<0.05$)、7.50% ($P<0.05$) 和 178.96% ($P<0.01$); 肝脏组织的 MDA 含量显著降低 28.28% ($P<0.05$)。综上所述, GP-STP 改善 D-gal 诱导小鼠肝脏组织氧化损伤。该研究可为 GP-STP 改善组织氧化氧化损伤提供理论基础。

关键词: 甲鱼肽; 抗氧化; 树脂吸附; 氧化损伤

文章编号: 1673-9078(2026)07-30-38

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.7.0456

Separation and Purification of Soft-shell Turtle Peptides and Their Ameliorative Effects Against Oxidative Damage in Mice

ZHOU Wanrui, YING Yangjie, ZHOU Jinyu, WANG Jingwen, WANG Qianqian*

(National Key Laboratory for Development and Utilization of Forest Food Resources, College of Food and Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China)

Abstract: The ameliorative effect of soft-shell turtle peptides (STP) on oxidative damage in mice was evaluated. DPPH radical scavenging rate was used as the evaluation indicator to optimize the separation and purification process using the ion-exchange resin method to obtain high-activity antioxidant STP. A D-galactose (D-gal)-induced oxidative damage model was established in mice, and assay kits were used to measure superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities and malondialdehyde (MDA) content. The results showed that the gel cation-exchange resin (GC) was the best for the separation and purification of antioxidant peptides. When the static adsorption pH was 1.0 and ethanol volume fraction of the desorption solution was 50%, the DPPH radical scavenging rate of GC increased by 34.42% ($P<0.001$) compared with that of unpurified STP. Compared to the model group, in the GC-purified STP (GC-STP) group, the SOD activity in the liver and thymus tissues significantly increased by 62.28% ($P<0.05$) and 59.18% ($P<0.01$), respectively; the GSH-Px activity in the liver, spleen and thymus tissues significantly increased

引文格式:

周琬蕊,应阳杰,周晋宇,等.甲鱼肽的分离纯化及对小鼠氧化损伤的改善作用[J].现代食品科技,2026,42(7):30-38.

ZHOU Wanrui, YING Yangjie, ZHOU Jinyu, et al. Separation and purification of soft-shell turtle peptides and their ameliorative effects against oxidative damage in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(7): 30-38.

收稿日期: 2025-03-31 ; 修回日期: 2025-08-19 ; 接受日期: 2025-08-27

基金项目: 浙江省大学生科技活动计划暨新苗人才计划资助项目 (2024R412A037)

作者简介: 周琬蕊 (2004-), 女, 本科生, 研究方向: 功能食品, E-mail : id_08061696@qq.com

通讯作者: 王倩倩 (1990-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 功能食品, E-mail : w5982234537@163.com

by 32.52% ($P<0.05$), 7.50% ($P<0.05$), and 178.96% ($P<0.01$), respectively; and the MDA content in the liver tissue significantly decreased by 28.28% ($P<0.05$). Therefore, GC-STP could effectively ameliorate D-gal-induced oxidative damage of liver tissue in mice. This study can serve as a theoretical foundation for improving oxidative damage using GC-STP.

Key words: soft-shell turtle peptides; antioxidant; resin adsorption; oxidative damage

活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 是一类在细胞正常代谢过程中产生的带有不成对电子的化学物质, 可被细胞内抗氧化防御系统猝灭。过多的 ROS 会打破 ROS 与细胞内抗氧化防御系统之间的平衡, 导致氧化应激的发生^[1]。氧化应激对人体细胞和器官的不良影响对人体健康构成重大威胁, 是各种慢性疾病如衰老、糖尿病、动脉粥样硬化甚至癌症发病的关键因素^[2-4]。在机体中, 主要的抗氧化剂是超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione Peroxidase, GSH-Px) 和过氧化氢酶。当机体不能产生足够的抗氧化剂来保护生物大分子时, 就有必要提高抗氧化剂水平以防止氧化损伤。因此, 利用外源性抗氧化策略预防或改善氧化应激至关重要。

生物活性肽通过清除自由基、螯合金属离子和抑制过氧化物等途径, 进而保护多种细胞和器官免受氧化损伤, 从而在机体抗氧化防御系统中发挥重要作用^[5]。生物活性肽的来源广泛 (海洋动物、海洋动物、哺乳动物和植物等)^[6], 其制备方法主要包括化学水解、酶水解和微生物发酵^[7]。甲鱼, 俗称鳖, 是我国传统药食两用的特色水产资源, 被证明具有多种生物活性。课题组前期研究发现, 甲鱼肽通过激活 Nrf2/Keap2 信号通路, 延长小鼠力竭游泳时间, 保护肌肉组织免受损伤, 并抑制机体的氧化应激, 进而发挥抗疲劳作用^[8]。此外, 甲鱼肽还可以通过调节雷帕霉素信号通路, 增强细胞自噬能力并抑制氧化应激, 进而延长果蝇的寿命^[9]。然而, 甲鱼肽中包含分子量各异的肽段, 其生物活性存在差异。为筛选出其中的高活性组分, 有必要对甲鱼肽进行进一步的分离与纯化。鉴于离子交换树脂具有选择性高、吸附量大、成本较低且易于规模化生产等优势, 其在肽类的分离纯化领域中具有广阔的应用前景^[10-12]。

该研究以甲鱼肽为研究对象, 以 DPPH 自由基清除率为评价指标, 考察离子交换树脂种类、吸附 pH 值和解吸附溶液乙醇体积分数对甲鱼肽 (Soft-Shelled Turtle Peptides, STP) 的纯化效果, 获得凝胶阳离子交换树脂 (Gel Cation Ion Exchange Resin, GC) 纯化后甲鱼肽 (Purified of Soft-Shelled Turtle Peptides with GC, GC-STP) 具有较好的 DPPH 自由基清除率。随后分析比较纯化前后甲鱼肽的相对分子量分布和氨基酸组成。

在此基础上, 以 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 诱导的氧化损伤小鼠为模式生物, 通过测定小鼠各个组织抗氧化酶超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性以及和脂质过氧化产物丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 水平, 评价 GC-STP 对氧化损伤小鼠的改善作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲鱼肽, 杭州康源食品科技有限公司; SPF 级雄性 ICR 小鼠 (4 周龄; 20 ± 2 g; 动物许可证编号: SCXK(沪)2022-0004), 上海斯莱克实验动物有限公司; 大孔阳离子交换树脂 D001FD (Macroporous Cation Ion Exchange Resin, MC)、凝胶阳离子交换树脂 001 $\times$ 10 (Gel Cation Ion Exchange Resin, GC)、大孔阴离子交换树脂 D202FD (Macroporous Anion Ion Exchange Resin, MA) 和凝胶阴离子交换树脂 201 $\times$ 7 (Gel Anion Ion Exchange Resin, GA), 宁波争光树脂有限公司; 总蛋白含量、SOD、GSH-Px 和 MDA 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 色谱级 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 上海阿拉丁生化科技有限公司; D-gal, 大连美仑生物技术有限公司; 其余试剂均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

BSA224S 分析天平和 PB-10 pH 计, 赛多利斯科学仪器有限公司; Infinite M200Pro 酶标仪, 瑞士帝肯集团公司; KQ-250DE 超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; THZ-82 水浴恒温振荡器, 常州金坛精达仪器制造有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; FD-1A-50+ 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; Ultimate3000 高效液相色谱仪, 赛默飞世尔科技有限公司; KZ-II 高速组织匀浆仪, 武汉塞维尔生物科技有限公司; HC-3018R 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 甲鱼肽的分离纯化

采用树脂吸附法分离甲鱼肽的组成成分^[13]。具体步骤如下: 称取 25 g 树脂置于锥形瓶中, 加入 100 mL 双蒸水。用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸和 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调

节至一定的 pH 值, 然后加入 15 g 甲鱼肽, 置于 25 ℃ 和 150 r·min⁻¹ 的摇床中吸附 12 h。取出已吸附 12 h 的树脂, 抽滤后弃去滤液。将树脂重新置于洁净锥形瓶内, 加入一定体积分数的乙醇进行解吸附, 置于摇床中解吸附 30 min。抽滤, 将滤液旋蒸至无醇味且较浓缩状态后冷冻干燥。

为了筛选出具有高效抗氧化活性的甲鱼肽组分, 该研究以 DPPH 自由基清除率为评价指标, 分别考察树脂种类 (MC、GC、MA 和 GA)、吸附 pH 值 (1.0、3.0 和 5.0) 和洗脱液乙醇体积分数 (30%、50% 和 70%) 对分离纯化组分抗氧化活性的影响。

1.2.2 DPPH 自由基清除测定

采用 DPPH 自由基清除率比较分离纯化后的甲鱼肽组分与甲鱼肽的抗氧化活性^[14]。在离心管中依次加入 80 μL 样品溶液 (20 mg·mL⁻¹) 和 100 μL DPPH 工作液 (0.05 mmol·L⁻¹), 混匀后置于室温下避光反应 30 min, 使用酶标仪在 517 nm 处测定其吸光值, 记录为 A 。同时做样品对照 A_0 和空白对照 A_1 , 其计算公式如下:

$$R = (1 - \frac{A - A_1}{A_0}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R ——DPPH 自由基清除率, %;

A ——样品组吸光值;

A_1 ——空白组吸光值;

A_0 ——对照组吸光值。

1.2.3 相对分子质量分布测定

采用凝胶过滤色谱法测定甲鱼肽的相对分子质量分布^[15]。称取 10 mg 样品溶解于流动相 B (10 mL) 后过 0.22 μm 微孔滤膜, 置于 4 ℃ 待测。色谱条件: TSKgel2000SWXL 色谱柱 (300 nm×7.8 mm); 流速 0.5 mL·min⁻¹; 检测波长 220 nm; 柱温 30 ℃; 流动相 A 为超纯水; 流动相 B 为乙腈: 水: 三氟乙酸 (450:550:1, V/V/V), 等度洗脱 40 min。选取甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸 (189 u)、甘氨酸-甘氨酸-色氨酸-精氨酸 (451 u)、杆菌肽 (1 450 u)、抑肽酶 (6 500 u) 和细胞色素 C (12 500 u) 作为标准品。结合各标准品的相对分子质量对数值绘制标准曲线, 计算甲鱼肽的相对分子质量分布。

1.2.4 氨基酸组成测定

采用异硫氰酸苯酯柱前衍生化反相 HPLC 测定甲鱼肽的氨基酸含量^[16]。称取 10~20 mg 样品置于消解瓶中, 加入 1 mL 盐酸 (6 mol·L⁻¹), 迅速吹入氮气排除空气并旋紧盖子。置于 150 ℃ 烘箱中消解 1.5 h。吸

取 6 μL 水解液于离心管中, 氮气吹干后加入再干燥液 (乙醇: 水: 三乙胺, 2:2:1, V/V/V), 再次吹干后加入 20 μL 衍生溶液 (异硫氰酸苯酯: 乙醇: 三乙胺: 水, 1:7:1:1, V/V/V/V), 混匀后在室温下静置反应 20 min。衍生完成后再次吹干, 加入流动相 B (50 μL) 和流动相 A (450 μL), 过膜后待测。色谱条件: Welch AQ-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 254 nm; 柱温 38 ℃; 流动相 A 为 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸钠溶液 (含体积分数 3% 乙腈和 0.1% 三乙胺), 流动相 B 为体积分数 80% 乙腈溶液。选取氨基酸混合标品制标曲, 计算甲鱼肽的氨基酸含量。

1.2.5 GC-STP 对 D-gal 诱导小鼠氧化应激损伤的改善作用

1.2.5.1 动物分组与处理

小鼠实验的所有程序经浙江中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理批准编号: 20211025-14)。将 36 只小鼠饲养在温度 (25±1) ℃, 湿度 50%~55%, 光周期 12 h/12 h 的饲养笼里, 并允许小鼠自由饮食和饮水, 适应环境 1 周后开始试验。将小鼠按照体重随机分为 3 组 (每组 12 只): 空白 (Normal Control, NC) 组, 模型 (Model Control, MC) 组和凝胶阳性树脂处理后的甲鱼肽 (GP-STP, 0.5 mg·g⁻¹) 组。NC 组每天皮下注射无菌生理盐水, 30 min 后灌胃无菌生理盐水; MC 组每天皮下注射 D-gal 溶液 (500 mg·kg⁻¹), 30 min 后灌胃无菌生理盐水; GP-STP 组每天皮下注射 D-gal 溶液 (500 mg·kg⁻¹), 30 min 后灌胃凝胶阳性树脂处理后的甲鱼肽。实验持续 8 周, 期间小鼠自由摄食和饮水。

1.2.5.2 血清及组织样本采集

最后一天灌胃结束后小鼠禁食不禁水过夜, 采用静脉取血, 室温静置 2 h 后于 3 500 r·min⁻¹ 下离心 10 min, 收集血清。随后将小鼠进行颈椎脱臼处死, 收集肝脏、肾脏、脾脏、胸腺、肌肉和睾丸等组织。准确称取适量肝脏、肾脏、脾脏、胸腺、肌肉及睾丸组织样本, 按照 1:9 (m/V) 比例加入预冷的 0.01 mol·L⁻¹ PBS 缓冲液, 置于高速组织匀浆仪中匀浆 1 min。随后, 在 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 条件下离心 20 min, 制备成 10% (m/V) 的组织匀浆液, 收集上清液, 并置于 -80 ℃ 低温冰箱中保存。

1.2.5.3 生化指标测定

按照试剂盒说明书检测血清和各组织的总蛋白含量、SOD 活力、GSH-Px 活力和 MDA 含量。

1.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 结果以均

值 ± 标准差表示, 单因素方差分析比较组间差异。与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

2 结果与讨论

2.1 树脂吸附法分离纯化甲鱼肽

树脂的孔隙、结构和吸附官能团等因素对树脂的吸附能力和选择性有显著影响^[17]。本实验选择不同种类树脂、吸附 pH 值和解吸附溶液乙醇体积分数三个因素进行比较。由图 1a 可知, 与 STP 相比, MC、GC、MA 和 GA 处理后的甲鱼肽组分对 DPPH 自由基清除率分别提高了 19.02% ($P < 0.001$)、28.77% ($P < 0.001$)、-16.70% ($P < 0.05$) 和 9.27% ($P < 0.05$)。在该研究中凝胶型树脂处理后的 STP 组分优于大孔吸附树脂, 这是由于大孔结构的树脂孔隙度较大, 而凝胶型树脂的孔隙度较小, 适用于分子量较小的甲鱼肽的分离。此外, 无论是凝胶还是大孔阳离子交换树脂组均优于对应的阴离子交换树脂组, 表明在阳离子树脂条件下获得了更多的 STP 的抗氧化活性组分。Zhuang 等^[18]比较四种大孔吸附树脂 (SP-825、HP-20、XAD-16 和 HP-2MGL) 从酱油中分离纯化鲜味肽, XAD-16 树脂纯化后酱油中肽类和氨基酸含量最高。

环境 pH 值影响着树脂吸附基团的电离情况和吸附能力, 同时活性肽在不同 pH 值环境中所带电荷情况随解离程度而改变, 而电荷的变化显著地影响着其与树脂吸附基团形成氢键的能力^[19]。由图 1b 可知, 与 STP 相比, 环境 pH 值分别为 1、3 和 5 处理后的甲鱼肽组分对 DPPH 自由基清除率分别提高了 36.00% ($P < 0.001$)、31.33% ($P < 0.001$) 和 17.05% ($P < 0.001$)。结果表明分离后甲鱼肽组分的 DPPH 自由基清除率随 pH 值减小逐步提升, 表明所吸附的活性组分在 pH 值减小时与树脂结合力增强, 因此获得更多活性组分。

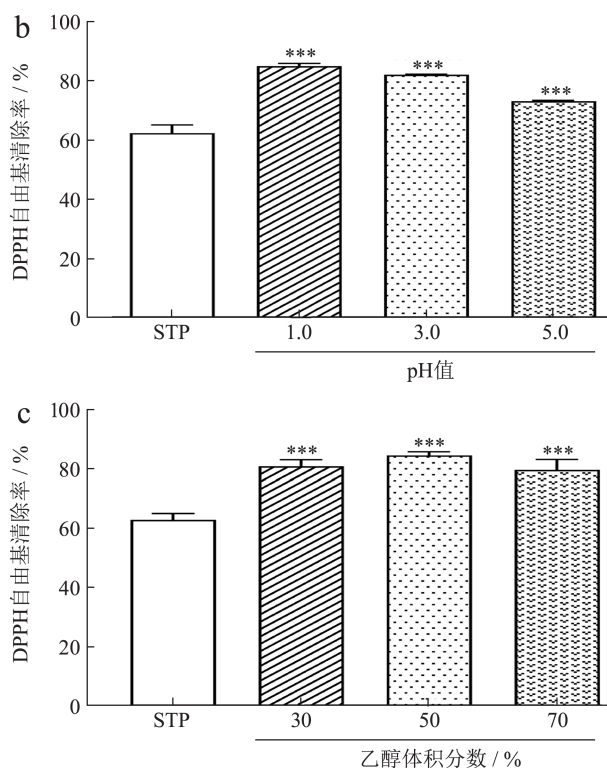
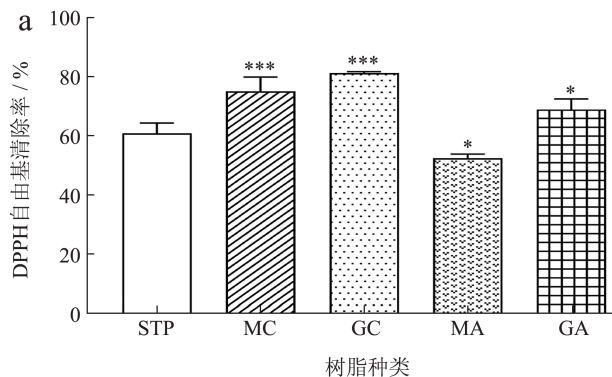


图 1 树脂吸附法分离纯化甲鱼肽

Fig.1 Separation and purification of STP by resin adsorption method

注: (a) 树脂种类; (b) pH 值; (c) 洗脱液乙醇体积分数。

解吸附液的组分差异影响着其极性强弱, 进而影响体系内氢键的形成。乙醇能破坏两性分子表面的水化膜, 减少氢键形成, 进而将吸附树脂上的物质洗脱。而过高浓度的乙醇可能对活性肽的功能产生影响, 甚至出现醇析现象。由图 1c 可知, 与 STP 相比, 乙醇体积分数分别为 30%、50% 和 70% 处理后的甲鱼肽组分对 DPPH 自由基清除率分别提高了 28.63% ($P < 0.001$)、34.42% ($P < 0.001$) 和 26.66% ($P < 0.001$), 表明乙醇体积分数为 50% 时其抗氧化活性最高。张迎阳等^[20]利用大孔吸附树脂分离干腌牛肉抗氧化肽, 当洗脱剂乙醇体积分数为 75% 时, 干腌牛肉抗氧化肽对 DPPH 自由基清除率最高。崔婷婷等^[21]研究发现乙醇体积分数为 70% 时, 海蜇肽的血管紧张素转化酶抑制率最高。综合以上分析, 凝胶阳性树脂 GC 是对甲鱼肽分离纯化出抗氧化强组分的最适方式, 其最优静态吸附 pH 值为 1.0, 解吸附溶液乙醇体积分数为 50%。

2.2 甲鱼肽相对分子量分布和氨基酸组成分析

2.2.1 相对分子量分布

由表 1 可知, STP 相对分子量主要分布在 5 000 u 以下, GC-STP 的主要分布在 2 000 u 以下。与 STP 相比,

GC-STP 在 500~5 000 u 占比减少 30.51%，180~500 u 占比增加 10.68%，<180 u 占比增加 19.86%。生物活性肽的抗氧化活性与其相对分子量关系紧密，抗氧化活性与相对分子量存在显著负相关性^[22]。因此，树脂吸附分离纯化甲鱼肽可能是通过吸附小分子寡肽并去除大分子多肽，从而降低样品的平均分子量，最终提升其抗氧化活性。

表 1 甲鱼肽的相对分子量分布

Table 1 The molecular weight distribution of STP and GC-STP		
相对分子量分布/u	STP/%	GC-STP/%
>5 000	0.04	0
3 000~5 000	0.71	0
2 000~3 000	1.55	0
1 000~2 000	8.81	0.19
500~1 000	22.32	2.69
180~500	53.28	63.96
<180	13.29	33.15
500~5 000	33.39	2.88

2.2.2 氨基酸组成分析

由表 2 可知，与 STP 相比，GC-STP 中的天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、丙氨酸、脯氨酸和赖氨酸含量降低。精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸含量升高。苯丙氨酸的侧链苯环和酪氨酸中酚基能很好地容纳单电子，从而稳定自由基^[5]。非极性氨基酸缬氨酸能够在界面处促进肽与自由基的接触，从而提升自由基淬灭的速度，其含量与抗氧化活性的表现息息相关^[5]。然而，该研究由于亮氨酸与异亮氨酸色谱峰融合，无法分别计算出具体含量与占比；也未检出半胱氨酸，可能是消解过程未排净空气进而导致半胱氨酸氧化而未能测出。

表 2 甲鱼肽的氨基酸含量

Table 2 The amino acid content of STP and GC-STP					
氨基酸	含量/(mg·g ⁻¹)		氨基酸	含量/(mg·g ⁻¹)	
	STP	GC-STP		STP	GC-STP
天冬氨酸	72.99	31.54	脯氨酸	137.02	60.09
谷氨酸	143.75	109.01	酪氨酸	18.58	50.87
丝氨酸	38.79	20.67	缬氨酸	32.31	38.68
甘氨酸	162.63	85.46	甲硫氨酸	22.70	28.22
组氨酸	7.50	3.08	苯丙氨酸	52.87	93.48
精氨酸	74.03	77.54	赖氨酸	54.04	2.55
苏氨酸	40.89	97.10			
丙氨酸	84.51	32.05	总和	942.61	730.34

2.3 GC-STP对D-gal诱导小鼠组织氧化损伤的改善作用

2.3.1 GC-STP对小鼠体质量和食物摄入量的影响

D-gal 是一种天然营养成分，天然存在于生物体内和许多食物中。在正常情况下，D-gal 在半乳糖激酶和 1-磷酸半乳糖尿苷转移酶的作用生成 1-磷酸葡萄糖进入三羧酸循环，为机体提供能量。然而，当体内积累了过量的 D-gal 时，D-gal 就会在半乳糖氧化酶的作用下可转化为醛糖和氢过氧化物，导致形成超氧阴离子和氧衍生自由基，从而在体内形成晚期糖基化终末产物^[23]。过量的晚期糖基化终末产物会加速细胞的 ROS 的产生并导致氧化应激的积累。因此，D-gal 已广泛应用于抗衰老和器官损伤的研究中^[24,25]。

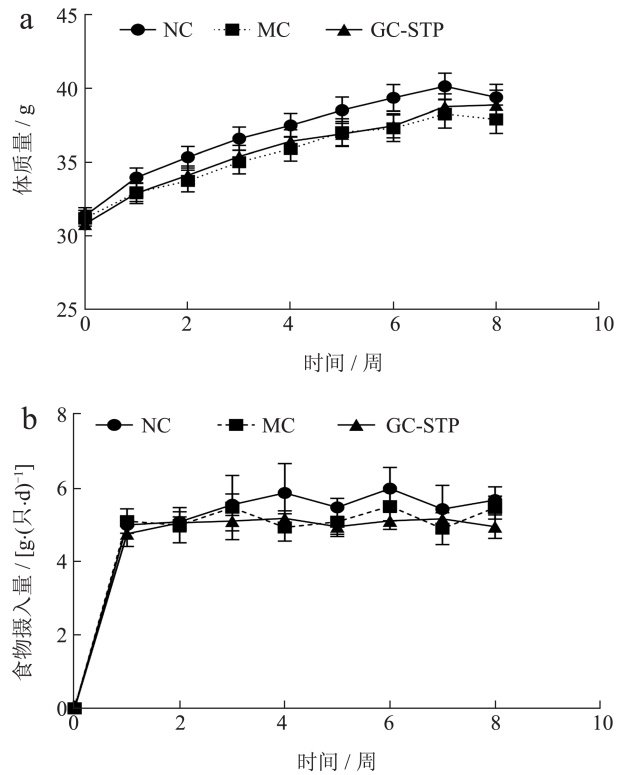


图 2 GC-STP 对小鼠体质量和食物摄入量的影响
Fig.2 Impact of GC-STP administration on body weight and dietary food intake in mice

为了分析 GC-STP 对 D-gal 诱导氧化损伤小鼠生长状况的影响，该研究记录小鼠的体质量和摄食量的动态变化，结果如图 2 所示。在 8 周干预期间内，与 NC 组相比，MC 组和 GC-STP 组的小鼠体质量均低于空白组，但无显著性差异 ($P>0.05$)。此外，MC 组和 GC-STP 组的摄食量与 NC 组也无显著性差异 ($P>0.05$)。以上结果表明，GC-STP 干预对氧化损伤小鼠的体质量和摄食量无明显影响。

2.3.2 GC-STP对小鼠组织SOD活性的影响

在氧化应激条件下, SOD 通过催化超氧化物分解成 O_2 和 H_2O_2 为对抗 ROS 提供了第一道防线, 随后 GSH-Px 将 H_2O_2 转化为 H_2O 和 O_2 [26]。MDA 作为 ROS 诱导的脂质过氧化产物被认为是细胞膜氧化损伤的关键标志物 [27]。近年来, 越来越多的研究证明, 生物活性肽具有强大的氧自由基清除能力, 能够保护各种类型的细胞和器官免受氧化损伤 [28,29]。因此该研究测定 GC-STP 对小鼠各组织 SOD 活性、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响。由图 3 可知, 与 NC 组相比, MC 组各个脏器的 SOD 活性分别降低 49.54% (肝脏, $P < 0.01$)、20.75% (肾脏, $P = 0.2465$)、19.51% (脾脏, $P = 0.2005$)、32.40% (肌肉, $P < 0.01$)、-0.68%

(睾丸, $P = 0.9990$) 和 1.18% (胸腺, $P = 0.9970$), 表明 D-gal 诱导的氧化损伤对小鼠肝脏的 SOD 活性影响最大, 其次为肌肉、肾脏和脾脏, 对睾丸和胸腺的影响最小。与 MC 组相比, GC-STP 组各个脏器的 SOD 活性分别增加 62.28% (肝脏, $P < 0.05$)、31.85% (肾脏, $P = 0.1375$)、33.95% (脾脏, $P = 0.0574$)、5.79% (肌肉, $P = 0.8728$)、-19.34% (睾丸, $P = 0.4525$) 和 59.18% (胸腺, $P < 0.01$), 表明 GC-STP 可显著提高 D-gal 诱导小鼠氧化损伤肝脏、胸腺和脾脏组织的 SOD 活性。在过氧化氢诱导的人肝癌细胞 HepG2 氧化损伤模型中, 经凝胶层析分离的甲鱼肽抗氧化活性组分降低 HepG2 细胞内活性氧的累积水平, 同时显著增加 HepG2 细胞内的 SOD 活性 [30]。

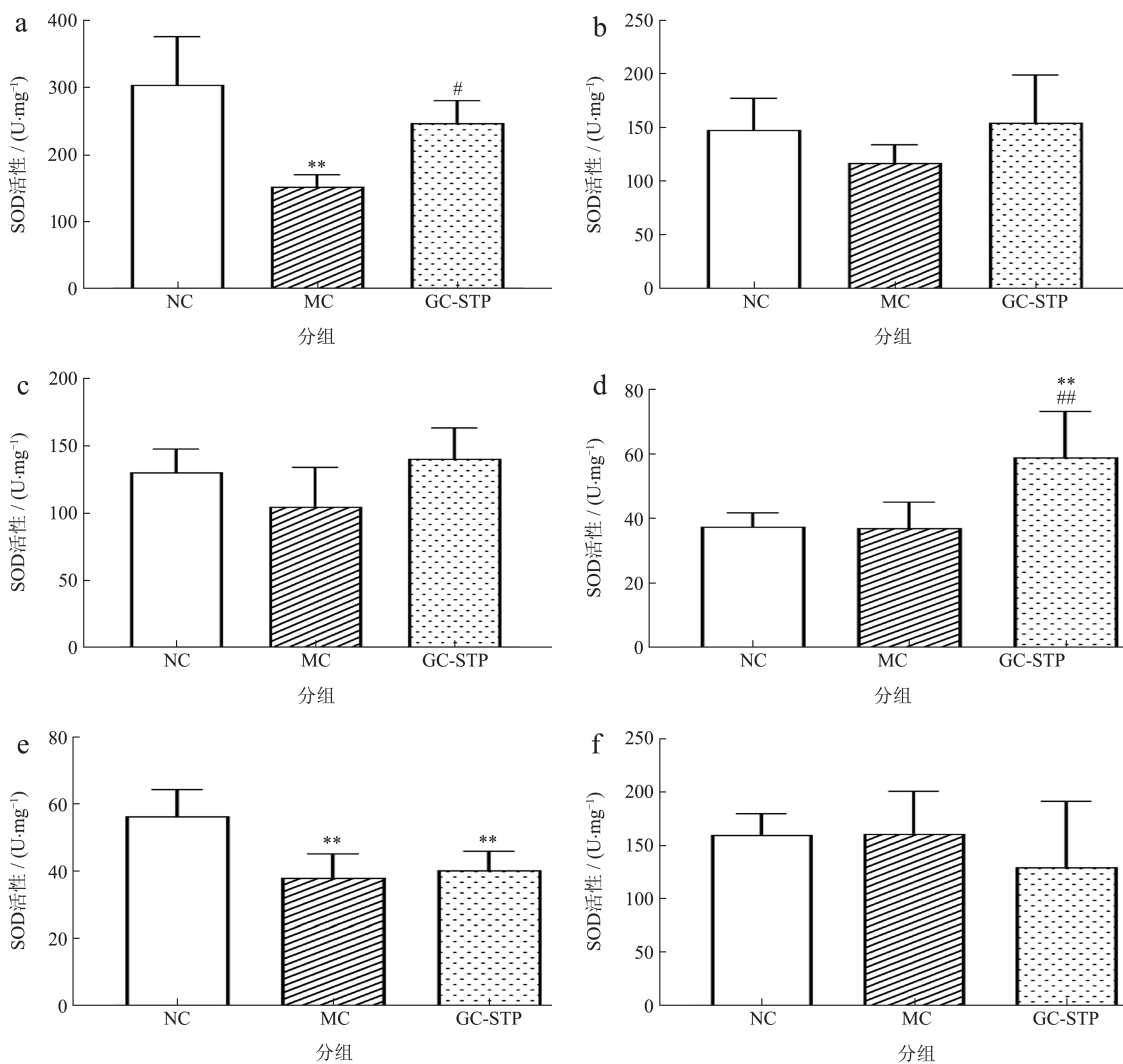


图 3 GP-STP 对小鼠各脏器 SOD 活性的影响

Fig.3 Impact of GP-STP administration on SOD activity of organs in mice

注: (a) 肝脏; (b) 肾脏; (c) 脾脏; (d) 胸腺; (e) 肌肉; (f) 睾丸。下同。

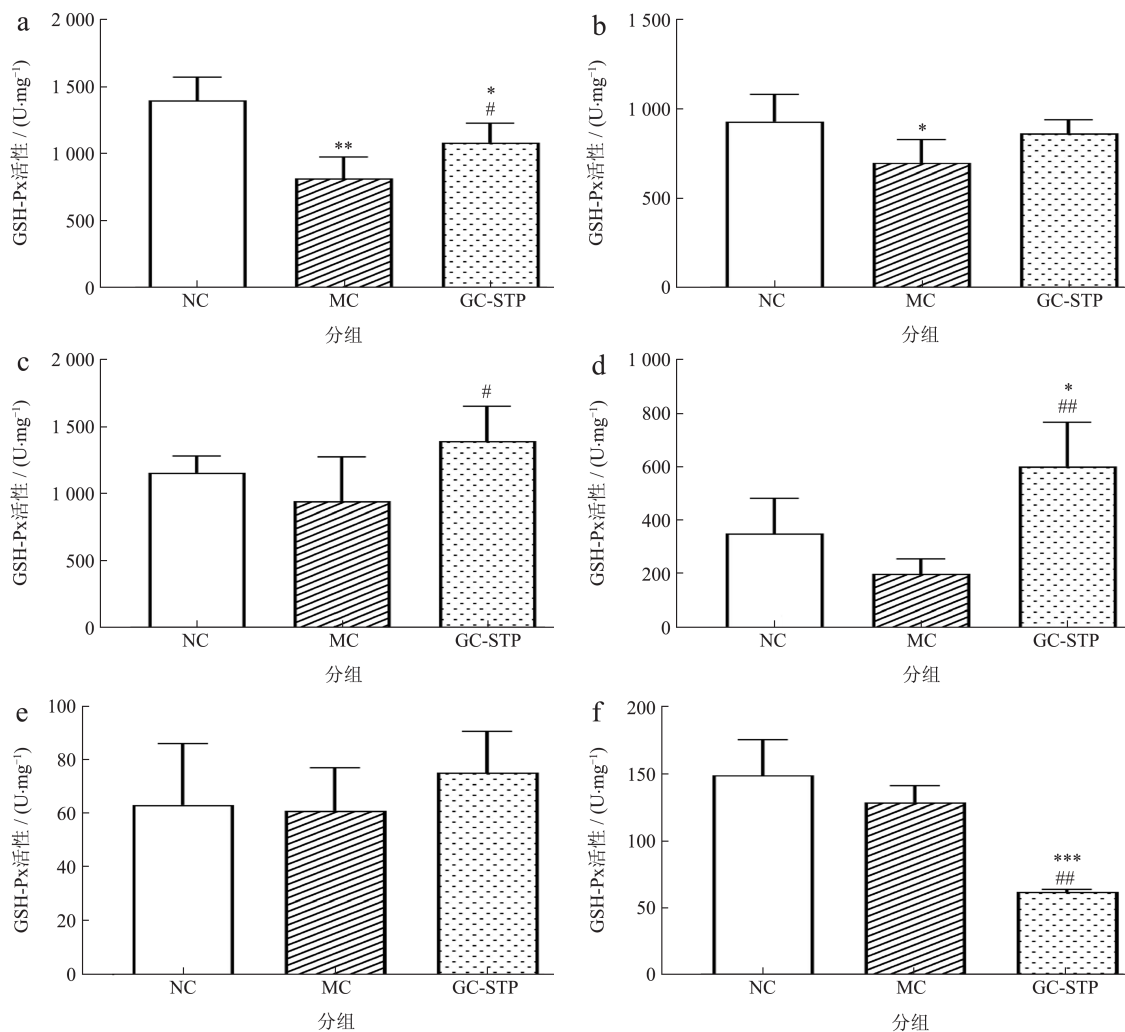


图4 GC-STP 对小鼠各脏器 GSH-Px 活性的影响

Fig.4 Impact of GC-STP administration on GSH-Px activity of organs in mice

2.3.3 GC-STP对小鼠组织GSH-Px活性的影响

由图4可知,与NC组相比,MC组各个脏器的GSH-Px活性分别降低41.54%(肝脏, $P < 0.001$)、24.84%(肾脏, $P < 0.05$)、18.29%(脾脏, $P = 0.3609$)、3.40%(肌肉, $P = 0.9875$)、13.57%(睾丸, $P = 0.3901$)和38.33%(胸腺, $P = 0.3118$),表明D-gal诱导的氧化损伤对小鼠肝脏的GSH-Px活性影响最大,其次为胸腺、肾脏、脾脏和睾丸,对肌肉的影响最小。与MC组相比,GC-STP组各个脏器的GSH-Px活性分别增加32.52%(肝脏, $P < 0.05$)、23.51%(肾脏, $P = 0.1172$)、47.50%(脾脏, $P < 0.05$)、23.20%(肌肉, $P = 0.6007$)、-51.82%(睾丸, $P < 0.01$)和178.96%(胸腺, $P < 0.01$),表明GC-STP可显著提高D-gal诱导小鼠氧化损伤肝脏、脾脏和胸腺组织的GSH-Px活性。凝胶层析分离获得的甲鱼肽抗氧化活性组分细胞内的GSH-Px活性显著降低了69.70%^[30]。

2.3.4 GC-STP对小鼠组织MDA含量的影响

由图5可知,与NC组相比,MC组各个脏器

的MDA含量分别增加20.05%(肝脏, $P = 0.2989$)、91.96%(肾脏, $P < 0.05$)、28.94%(脾脏, $P = 0.4585$)、71.69%(肌肉, $P = 0.2384$)、49.92%(睾丸, $P = 0.4946$)和10.12%(胸腺, $P = 0.9531$),表明D-gal诱导的氧化损伤对小鼠肾脏的MDA含量影响最大,其次为肌肉、睾丸、脾脏、肝脏和胸腺。与MC组相比,GC-STP组各个脏器MDA含量分别降低28.28%(肝脏, $P < 0.05$)、15.43%(肾脏, $P = 0.6381$)、5.09%(脾脏, $P = 0.9621$)、63.77%(肌肉, $P = 0.0504$)、-0.89%(睾丸, $P = 0.9995$)和-45.79%(胸腺, $P = 0.3314$),表明GC-STP可显著降低D-gal诱导小鼠氧化损伤肝脏和肌肉组织的MDA含量。该研究发现D-gal对小鼠肝脏损伤最为严重,这是由于D-gal主要在肝脏中代谢,其在体内过量会对肝脏产生重大影响^[31,32]。综合以上数据可知,GC-STP改善了D-gal诱导小鼠肝脏组织氧化损伤。甲鱼肽通过调节Keap/Nrf2通路增加小鼠和果蝇的SOD和GSH-Px活性以及降低MDA含量,进而抑制疲劳小鼠的氧化应激损伤和延长果蝇寿命和健康寿命^[8,9]。

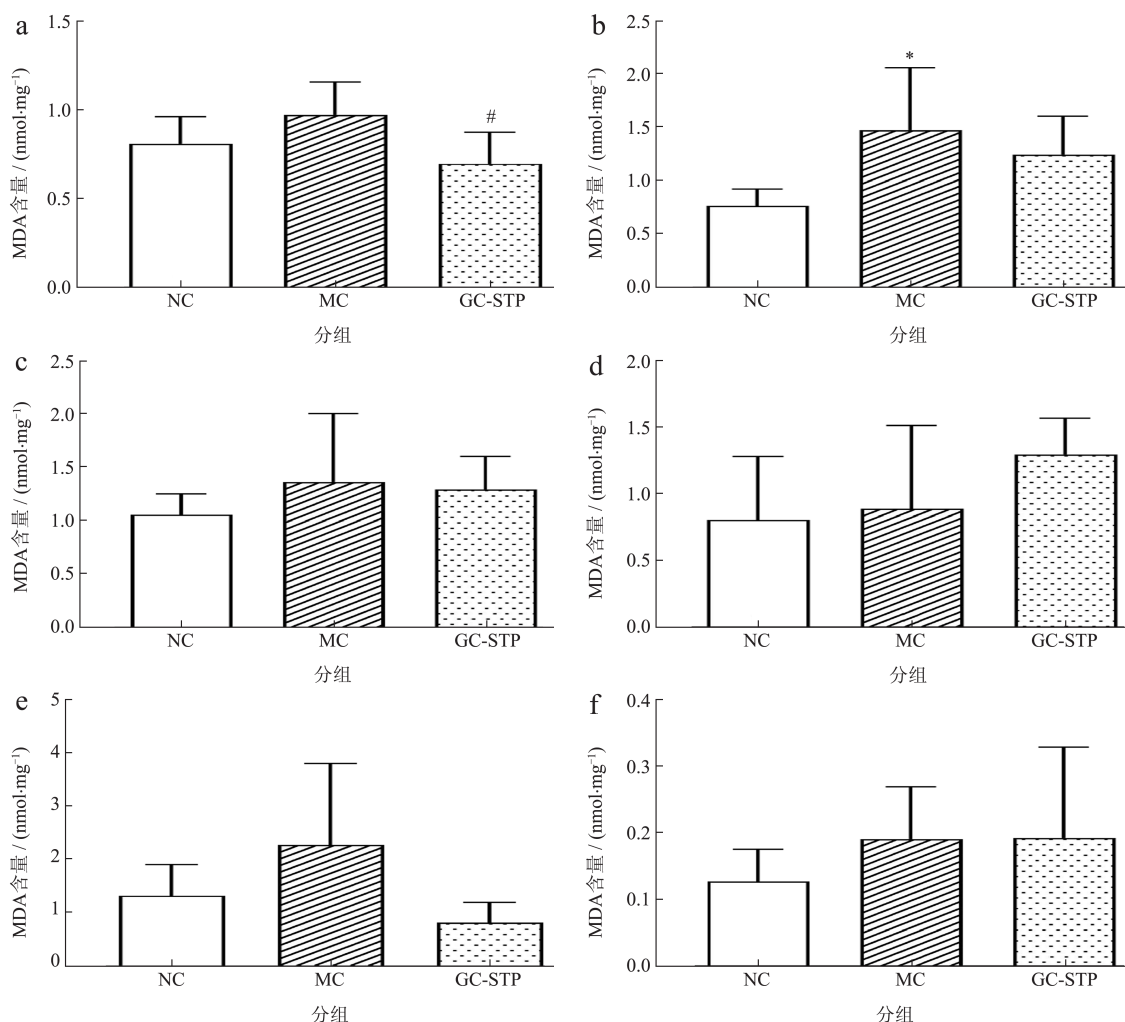


图5 GC-STP 对小鼠各脏器 MDA 含量的影响

Fig.5 Impact of GC-STP administration on MDA content of organs in mice

3 结论

该研究以 DPPH 自由基清除率为评价指标,优化树脂吸附法分离纯化甲鱼肽工艺条件。随后通过测定氧化损伤小鼠各组织的氧化应激相关指标,系统评价纯化后甲鱼抗氧化肽对各脏器氧化损伤的改善作用。结果表明,凝胶型阳离子交换树脂分离纯化甲鱼抗氧化肽效果最佳,其静态吸附 pH 值为 1.0 和解吸附溶液乙醇体积分数为 50% 时, DPPH 自由基清除率显著提高。该研究中 D-gal 对小鼠肝脏损伤最为严重。与模型组相比, GC-STP 可显著提高 D-gal 诱导小鼠氧化损伤肝脏、胸腺和脾脏组织的 SOD 活性,显著提高肝脏、脾脏和胸腺组织的 GSH-Px 活性,同时显著降低肝脏和肌肉组织的 MDA 含量。GC-STP 改善了 D-gal 诱导小鼠肝脏组织氧化损伤。

参考文献

[1] VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, et al. Free radicals

and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84.

[2] LEYANE TS, JERE SW, HOURELD NN. Oxidative stress in ageing and chronic degenerative pathologies: Molecular mechanisms involved in counteracting oxidative stress and chronic inflammation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(13): 7273.

[3] CORREIA AS, CARDOSO A, VALE N. Oxidative stress in depression: The link with the stress response, neuroinflammation, serotonin, neurogenesis and synaptic plasticity [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(2): 470.

[4] VEKIC J, STROMENES K, MAZZALAI S, et al. Oxidative stress, atherogenic dyslipidemia, and cardiovascular risk [J]. Biomedicines, 2023, 11(11): 2897.

[5] WEN CT, ZHANG JX, ZHANG HH, 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: 308-322.

[6] ZHU Y, LAO F, PAN X, et al. Food protein-derived antioxidant peptides: Molecular mechanism, stability and bioavailability [J].

- Biomolecules, 2022, 12(11): 1622.
- [7] MARDANI M, BADAKE K, FARMANI J, et al. Antioxidant peptides: Overview of production, properties, and applications in food systems [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(1): 46-106.
- [8] ZHONG H, SHI J, ZHANG J, et al. Soft-shelled turtle peptide supplementation modifies energy metabolism and oxidative stress, enhances exercise endurance, and decreases physical fatigue in mice [J]. Foods, 2022, 11(4): 600.
- [9] WANG Q, ZHANG J, ZHUANG J, et al. Soft-shelled turtle peptides extend lifespan and healthspan in *Drosophila* [J]. Nutrients, 2022, 14(24): 5205.
- [10] XU Z, MAO TM, HUANG L, et al. Purification and identification immunomodulatory peptide from rice protein hydrolysates [J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 150-162.
- [11] 汪清美,刘小雨,陈庆森,等.离子交换树脂法规模化生产乳源酪蛋白糖巨肽及其对流感病毒的血凝抑制活性[J].食品与机械, 2024,40(5):194-202.
- [12] 张迎阳,陈文涛,徐莹,等.AB-8大孔树脂-C18柱联用分离干腌牛肉抗氧化肽的研究[J].食品与发酵工业,2024,50(5):171-179.
- [13] 骆贤亮.海参肽对性激素的调控作用及机制研究[D].杭州:浙江大学,2023.
- [14] ZHENG L, SU G, REN J, et al. Isolation and characterization of an oxygen radical absorbance activity peptide from defatted peanut meal hydrolysate and its antioxidant properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 5431-5437.
- [15] 丁树慧,齐曼婷,齐斌,等.低值海洋鱼低聚肽抗氧化和抗疲劳活性[J].食品科学,2019,40(1):163-169.
- [16] 吕艳.酶解小麦蛋白制取谷氨酰胺活性肽的研究[D].杭州:浙江大学,2005.
- [17] 吕红,卢建中,张璐,等.大孔吸附树脂在生物活性肽分离纯化中的应用[J].亚太传统医药,2012,8(1):160-161.
- [18] ZHUANG M, ZHAO M, LIN L, et al. Macroporous resin purification of peptides with umami taste from soy sauce [J]. Food Chemistry, 2016, 190: 338-344.
- [19] 王晓娅,苏建青,褚秀玲.大孔树脂分离纯化黄酮类化合物的研究进展[J].食品科技,2021,46(8):208-212.
- [20] 张迎阳,陈文涛,徐莹,等.AB-8大孔树脂-C18柱联用分离干腌牛肉抗氧化肽的研究[J].食品与发酵工业,2024,50(5):171-179.
- [21] 崔婷婷,贾爱荣,张绵松,等.大孔吸附树脂分离纯化海蜇ACE抑制肽的工艺研究[J].食品工业科技,2022,43(10):216-222.
- [22] PAN M, LIU K, YANG J, et al. Advances on food-derived peptidic antioxidants-a review [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(9): 799.
- [23] GAO J, ZHOU R, YOU X, et al. Salidroside suppresses inflammation in a D-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease via SIRT1/NF- κ B pathway [J]. Metabolic Brain Disease, 2016, 31(4): 771-778.
- [24] SHEN L, FAN L, LUO H, et al. Cow placenta extract ameliorates d-galactose-induced liver damage by regulating BAX/CASP3 and p53/p21/p16 pathways [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 323: 117685.
- [25] WANG Q, ZHANG J, WU Y, et al. Upregulation of cAMP/PKA/CREB signaling mediated by GABABR might contribute to the amelioration effects of sea cucumber peptides (*Acaudina leucoprocta*) on cognitive dysfunction in mice [J]. Food Bioscience, 2025, 63: 105632.
- [26] IGHODARO OM, AKINLOYE OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid [J]. Alexandria Journal of Medicine, 2018, 54(4): 287-293.
- [27] SINGH S, PANDEY KB, RIZVI SI. Erythrocyte senescence and membrane transporters in young and old rats [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016, 122(4): 228-234.
- [28] WANG Y, PEI H, CHEN W, et al. Deer blood hydrolysate protects against D-galactose-Induced premature ovarian failure in mice by inhibiting oxidative stress and apoptosis [J]. Nutrients, 2024, 16(20): 3473.
- [29] CAI B, WAN P, CHEN H, et al. Purification and identification of novel myeloperoxidase inhibitory antioxidant peptides from tuna (*Thunnus albacares*) protein hydrolysates [J]. Molecules, 2022, 27(9): 2681.
- [30] 孔晓越.甲鱼源抗氧化肽筛选及构效关系研究[D].杭州:浙江农林大学,2024.
- [31] WANG X, JIA Q, YAO X, et al. Analysis of Forsythia suspensa fruit and leaf extracts using UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap/MS: *In vivo* antioxidant activity on D-galactose-induced aging mice [J]. Food Chemistry, 2025, 462: 141002.
- [32] SAAFAN SM, MOHAMED SA, NORELDIN AE, et al. Rutin attenuates D-galactose-induced oxidative stress in rats' brain and liver: molecular docking and experimental approaches [J]. Food & Function, 2023, 14(12): 5728-5751.