

抗氧化性丝素蛋白水解产物的生产工艺及其改善过氧化氢所致 HepG2 细胞损伤机制

朱震¹, 王小娟¹, 邓晗依¹, 李春春¹, 银华², 安艳^{1*}

(1. 苏州大学医学部, 江苏苏州 215123; 2. 苏州大学纺织与服装工程学院, 江苏苏州 215123)

[摘要] 目的: 抗氧化性丝素蛋白(SF)胰酶水解工艺的优化。研究水解物对过氧化氢(H₂O₂)造成人肝癌 HepG2 细胞损伤的改善作用, 对其机制进行初步探讨。方法: 以超氧自由基清除率为指标, 设计正交试验考察丝素蛋白胰酶水解过程中反应时间、pH、温度、底物浓度、酶浓度对水解工艺的影响。测定水解产物的分子量分布及其对羟基自由基清除率和 H₂O₂ 诱导的红细胞氧化溶血抑制率。用不同浓度 H₂O₂ 处理细胞 24 h, 测定细胞活性, 选择合适浓度的 H₂O₂ 损伤细胞。然后再将细胞分为空白组(不加药物处理), H₂O₂ 损伤组, H₂O₂ 损伤 + 5 mmol·L⁻¹ N-乙酰半胱氨酸(NAC)治疗组, H₂O₂ 损伤 + 10, 20, 30, 50 g·L⁻¹ SF 治疗组。观察细胞活性, 丙二醛(MDA)含量, 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量, 超氧化物歧化酶(SOD)活性, 过氧化氢酶(CAT)活性和总抗氧化能力(T-AOC)的变化。结果: 最佳水解工艺是酶浓度 6%, 反应时间 160 min, 底物质量浓度 20 g·L⁻¹, pH 8, 温度 38 ℃, 此水解条件下所得水解液对超氧自由基清除率为 72.73%, 水解物分子量在 10 kDa 以下, 对羟基自由基清除率和红细胞氧化溶血抑制率均提高。H₂O₂ 损伤细胞后细胞活性降低并且细胞中 MDA 含量增加(P < 0.05)。与 H₂O₂ 损伤组比较 SF 治疗组中细胞活性升高, MDA 的含量也降低(P < 0.05)。H₂O₂ 损伤细胞后, TNF-α 含量上升, SOD, CAT 的活性和 T-AOC 能力均下降(P < 0.05), SF 治疗能降低 TNF-α 含量, 提高 SOD, CAT 分泌量和增强 T-AOC 能力(P < 0.05)。结论: 抗氧化性丝素蛋白水解物对过氧化氢致 HepG2 细胞损伤有改善作用, 机制是通过降低 TNF-α 含量, 提高细胞活力和增加细胞中抗氧化酶活性。

[关键词] 丝素蛋白; 水解; 细胞活性; 脂质过氧化; 抗氧化酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0115-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080115

Production Process of Hydrolytic Product of Antioxidant Silk Fibroin Protein and Its Ameliorative Effects on H₂O₂-induced HepG2 Cell Injury

ZHU Zhen¹, WANG Xiao-juan¹, DENG Han-yi¹, LI Chun-chun¹, YIN Hua², AN Yan^{1*}

(1. Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China;

2. College of Textile and Clothing Engineering, Soochow University, Suzhou 215123, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the hydrolytic process of antioxidant silk fibroin (SF) by pancreatin, and investigate the effects and mechanism of the resulting hydrolysates on H₂O₂-induced HepG2 cell injuries. **Method:** With the superoxide radical scavenging rate as index, the effects of reaction time, pH, temperature, substrate concentration and enzyme concentration on silk fibroin hydrolytic process were investigated by orthogonal tests. The molecular weight distribution of resulting hydrolysates, the scavenging rate of hydroxyl radicals and the inhibition rate of H₂O₂-induced erythrocyte hemolysis were determined. Cells were treated with different concentrations of H₂O₂ for 24 h, and then the optimal H₂O₂ concentration was selected to determine cell activity. Then cells were divided into blank group (without drug treatment), H₂O₂-induced group, H₂O₂

[收稿日期] 20150910(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573173); 高等学校博士学科点专项科研基金-博导类项目(20123201110012)

[第一作者] 朱震, 在读硕士, 从事材料毒理学研究, Tel:15850121090, E-mail:1205994852@qq.com

[通讯作者] * 安艳, 博士, 博士生导师, 从事材料毒理学研究, Tel:0512-65880910, E-mail:dranyan@126.com

pretreatment + 5 mmol · L⁻¹ N-acetyl cysteine (NAC) treatment as positive control group, H₂O₂ pretreatment + 10, 20, 30, 50 g · L⁻¹ SF treatment groups. Changes in cells activity, malondialdehyde (MDA) content, tumor necrosis factor- α (TNF- α) content, superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity and total antioxidant capacity (T-AOC) were observed. **Result:** Optimal conditions for SF hydrolysis in the study were as follows: enzyme concentration of 6%, reaction time of 160 min, substrate concentration of 20 g · L⁻¹, pH of 8, and temperature 38 °C. Under this hydrolysis process, the hydrolyzate's superoxide radical scavenging rate was 72.73%, and the molecular weight of hydrolyzate was below 10 kDa, with greatly increased hydroxyl radical scavenging rate and inhibition rate of H₂O₂-induced erythrocyte hemolysis. Cell activity was decreased and MDA content was increased after H₂O₂ induced cells injury ($P < 0.05$). Cell activity was increased and MDA content was decreased in SF treatment group as compared with the H₂O₂-induced injury group ($P < 0.05$). The TNF- α content was increased and the levels of SOD, CAT, and T-AOC capacity were decreased after H₂O₂ induced injury ($P < 0.05$). SF treatment could reduce TNF- α content, increase SOD, CAT secretion and the T-AOC capacity ($P < 0.05$). **Conclusion:** Study demonstrated that SF could improve H₂O₂-induced injury of HepG2 cells, and its mechanism may be associated with lowering TNF- α content and increasing antioxidant enzyme activities in cells.

[**Key words**] silk fibroin; pancreatin hydrolysis; cell activity; lipid peroxidation; antioxidant enzymes

丝素蛋白是一类高分子蛋白质,其水解产物由多种氨基酸及多肽组成。小分子丝素蛋白水解物能很好被人吸收,具有食用价值还有药用价值。我国古代中药方剂里就有丝煎食治疗糖尿病,现代药理研究表明丝素蛋白水解物能降血压、降血糖、抗氧化、促进酒精代谢、保肝、抑菌^[1-3]。丝素蛋白水解物在医药生产和功能性食品开发等领域有较好的应用前景,但是丝素蛋白的水解工艺一直很粗糙,导致丝素蛋白水解物不能充分用作制造药物的原料。

中国传统医学在抗衰老方面积累了丰富的经验,而衰老的自由基学说逐步发展为自由基-氧化应激学说。大量基础和临床研究证明,氧化应激引起肝损伤并且诱发肝病,包括肝癌^[4],肝硬化^[5-6],肝炎^[7]等,因此抗氧化剂可用来辅助治疗肝病。中药里含有较多的抗氧化成分,如蛋白质、黄酮类化合物、维生素、植物多糖等,研究发现这些中药提取物对高氧导致的肝损伤有改善作用。丝素蛋白水解物有较好的抗氧化性^[8],对二苯代苦味酰基(DPPH·)和超氧自由基(O₂⁻·)有较好的清除作用。中药中蛋白质水解物的抗氧化活性是多种活性成分共同作用的结果,不同水解工艺下丝素蛋白水解物的抗氧化性也不同。本课题旨在用现代中药分析化学技术与方法,优化丝素蛋白的酶水解工艺,水解出对自由基清除率较大的功能性多肽。然后用过氧化氢损伤 HepG2 细胞,探究丝素蛋白水解物能否改善这种高氧损伤,并初步探究其可能机制。为丝素蛋白作为天然抗氧化剂的药用食品开发提供重要的理论依据。

1 材料

1.1 仪器 756 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),415 R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),-80 °C 低温冰箱(美国 Thermo 公司),311 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司),BioTek_Synergy2 型多功能酶标仪(美国 Bio TEK 公司)。

1.2 试剂 丝素由苏州大学纺织学院提供。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 H052),噻唑蓝(MTT)细胞增殖及毒性检测试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒和活性和总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒均购自碧云天生物技术研究所,批号依次是 C0009, P0010, S0101, S0051, S0119。其他试剂为分析纯。

2 方法

2.1 邻苯三酚法检测超氧自由基清除率 取 pH 8 磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液 4.5 mL 置于 25 °C 水浴中加热 20 min,加入试样 1 mL 和 25 mmol · L⁻¹ 邻苯三酚溶液 0.4 mL,混匀后于 25 °C 水浴中反应 5 min,加入 80 mmol · L⁻¹ HCl 1 mL 终止反应 3 min,在波长 420 nm 处用紫外分光光度计测定吸光度 A,实验重复 3 次。

2.2 水解物分子量分布检测 用 SDS-PAGE 凝胶电泳法测定,按说明书配凝胶板,然后上样电泳,把电流控制在 15 mA,样品进入分离胶后改为 30 mA,待蓝色染料迁移至下端停止电泳。将胶取出加入固

定液固定 2 h,之后染色 1 h。染色完毕后加入脱色液脱色直至背景清晰。

2.3 羟基自由基清除率检测 采用 Fenton 反应体系建立·OH 模型,选择水杨酸显色法测定提取物清除·OH 的能力。先在离心管中加入水杨酸-无水乙醇和硫酸亚铁各 1 mL 后,加入不同浓度的水提液 1 mL,最后加 6 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 1 mL,置 37 °C 水浴中反应 30 min,在 510 nm 处用紫外分光光度计测定 A,实验重复 3 次。

2.4 H₂O₂ 诱导的红细胞氧化溶血抑制率检测 取大鼠动脉血离心得红细胞,生理盐水洗涤制成 0.5% 悬液。取红细胞悬液于试管中,加入水解液 20 μL,生理盐水定容至 1.25 mL。最后加入 H₂O₂ 0.25 mL 启动反应,置 37 °C 水浴中反应 60 min,用生理盐水 4.5 mL 稀释,6 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,在 415 nm 处用紫外分光光度计测定 A。

2.5 细胞培养 人肝癌 HepG2 细胞株(苏州大学公共卫生学院提供),复苏后培养于 DMEM 高糖培养液中,其中含 10% 小牛血清,青霉素(100 mg·L⁻¹)和链霉素(100 mg·L⁻¹),37 °C 5% CO₂ 培养箱中无菌培养。

2.6 细胞处理 用不同浓度(50,100,200,400,600,800,1 000 μmol·L⁻¹) H₂O₂ 处理 HepG2 细胞 24 h,测定细胞活性,选择合适浓度的 H₂O₂ 处理细胞。然后再将细胞分为空白组(不加药物处理),H₂O₂ 损伤组,H₂O₂ 损伤 24 h 再加 5 mmol·L⁻¹ N-乙酰半胱氨酸(NAC)孵育 24 h 设为 NAC 组,给药组为 H₂O₂ 损伤 24 h 再加 10,20,30,50 g·L⁻¹ SF 孵育 24 h。

2.7 指标测定 采用 MTT 比色法测细胞活性,硫代巴比妥酸(TBA)法检测 MDA 含量,ELISA 法检测细胞外液中 TNF-α 含量,总 SOD 活性检测试剂盒(WST)法检测 SOD 活性,总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS)法检测 T-AOC,测定标准曲线计算 CAT 活性。具体操作步骤严格按照说明书进行。每组设立 5 个平行样,独立实验重复 3 次。用 BCA 试剂盒测定不同组细胞蛋白含量校正 MDA, SOD, CAT, T-AOC 水平。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件,计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。用 GraphPad Prism 6 软件作图。

3 结果

3.1 正交试验确定抗氧化性丝素蛋白的胰酶水解

最佳工艺 用胰酶来水解抗氧化性丝素蛋白并对其工艺进行优化。选择时间、pH、温度、底物浓度、酶浓度 5 个因素做 L₁₆(4⁵) 正交试验。影响清除率的因素顺序:酶浓度 > 反应时间 > 底物浓度 > pH > 温度,方差分析表明酶浓度和反应时间对清除率有显著影响,确定最佳工艺组合是 E₄A₂D₃B₂C₃,即是酶浓度 6%,反应时间 160 min,底物浓度 20 g·L⁻¹,pH 8,温度 38 °C。进行验证,在此条件下重复实验 3 次所得水解液对超氧自由基清除率为 72.73%,说明此水解工艺稳定可靠。见表 1,2。

表 1 抗氧化丝素蛋白水解工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal experiment of antioxidant silk fibroin hydrolysis process

No.	A 时间 /min	B pH	C 温度 /°C	D 底物浓度 /g·L ⁻¹	E 酶浓度 /%	清除率 /%
1	140	7.6	34	10	1	56.98
2	140	8	36	15	2	64.48
3	140	8.4	38	20	4	69.18
4	140	8.8	40	25	6	64.50
5	160	7.6	36	20	6	70.56
6	160	8	34	25	4	71.89
7	160	8.4	40	10	2	66.47
8	160	8.8	38	15	1	67.93
9	180	7.6	38	25	2	63.50
10	180	8	40	20	1	65.60
11	180	8.4	34	15	6	67.07
12	180	8.8	36	10	4	67.42
13	200	7.6	40	15	4	65.56
14	200	8	38	10	6	66.53
15	200	8.4	36	25	1	59.10
16	200	8.8	34	20	2	63.23

表 2 抗氧化丝素蛋白水解工艺方差分析

Table 2 ANOVA of antioxidant silk fibroin hydrolysis process

方差来源	SS	MS	F	P
A	81.642	27.214	9.708	<0.05
B	17.902	5.967	2.129	>0.05
C(误差)	8.410	2.803	1.000	-
D	20.407	6.802	2.427	>0.05
E	90.183	30.061	10.723	<0.05

3.2 水解产物分子量分布和抗氧化性评价 未水解分子量在 25 kDa 以上,水解后分子量分布在 10 kDa 以下,表明在胰酶水解下丝素蛋白分解成小分子肽段,一些抗氧化氨基酸残基暴露出来,并且分

子量更小的肽段更易进入细胞发挥作用。见图 1。水解物对羟基自由基清除率增加了 12.81%，对 H_2O_2 诱导的红细胞氧化溶血抑制率增加了 12.54%，可见丝素蛋白水解液对其他自由基也有较好清除作用，它的抗氧化能力比未水解的丝素蛋白溶液高。见表 3。

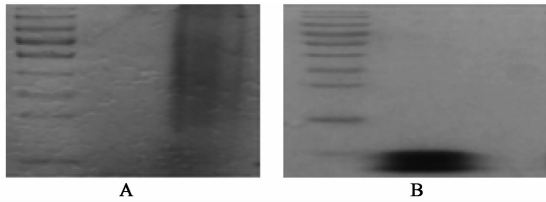


图 1 水解前 (A) 和水解后 (B) 丝素蛋白分子量分布
Fig.1 Molecular weight distribution of silk fibroin before (A) and after (B) hydrolysis

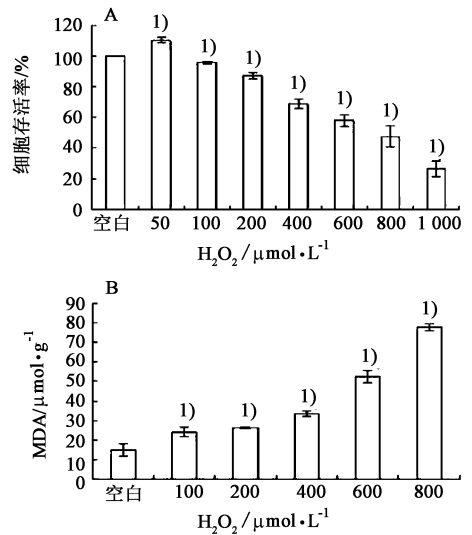
表 3 水解产物抗氧化评价 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

时间	羟基自由基清除率	氧化溶血抑制率
未水解	34.43 ± 0.37	11.76 ± 1.25
水解后	47.24 ± 0.78	24.30 ± 0.98

3.3 H_2O_2 处理细胞浓度的选择 与空白组比较不同浓度 H_2O_2 处理细胞后， H_2O_2 的浓度在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时细胞活性呈现明显下降 ($P < 0.05$)，MDA 含量增加 ($P < 0.05$)。当 H_2O_2 浓度达到 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞存活率达到 $(47.54 \pm 6.92)\%$ ($P < 0.05$)，而且细胞中 MDA 含量增加到 $(77.89 \pm 1.98) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$)，所以选择 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 刺激细胞产生损伤。见图 2。

3.4 H_2O_2 损伤后加入 SF 治疗对细胞活性和 MDA 含量影响 $10, 20, 30, 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SF 对细胞活性没影响，表明这些浓度 SF 对细胞无毒害作用，但 NAC 能促进细胞增殖 ($P < 0.05$)。 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ 损伤细胞后发现与空白组比较，细胞活性降低，MDA 含量升高 ($P < 0.05$)。高氧损伤后用 $10, 20, 30, 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SF 治疗 24 h，能浓度依赖性的提高细胞活性并降低细胞中 MDA 含量 ($P < 0.05$)， $30, 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SF 能降低 MDA 含量至正常细胞水平 ($P < 0.05$)。NAC 也能提高细胞活性并且降低细胞中 MDA 含量，但是降低 MDA 含量效果不及 $30, 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SF。见图 3。

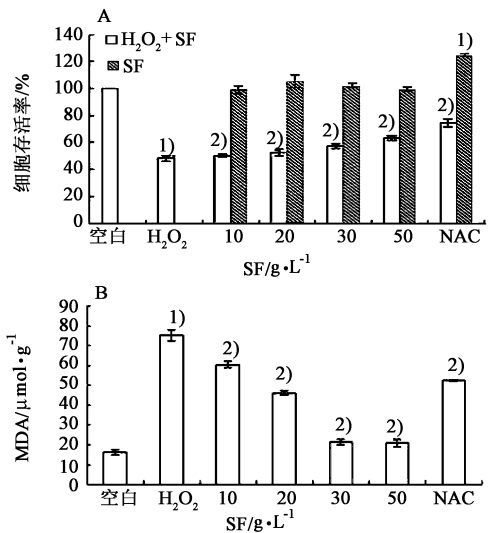
3.5 H_2O_2 损伤后加入 SF 治疗对 $TNF-\alpha, SOD, CAT, T-AOC$ 影响 H_2O_2 组中 $TNF-\alpha$ 含量升高，加入 SF 治疗 $TNF-\alpha$ 含量呈现下降趋势。与空白组比较 H_2O_2 组中 SOD, CAT, T-AOC 下降 ($P < 0.05$)，与 H_2O_2 组比较，SF 和抗氧化剂 NAC 均能提高 SOD, CAT,



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 2 不同浓度 H_2O_2 对细胞活性 (A) 和 MDA (B) 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig.2 Effect on cell activity (A) and MDA content (B) after induction by different concentrations of H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n=5$)



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ ，与 H_2O_2 组比较²⁾ $P < 0.05$

图 3 H_2O_2 损伤后加入 SF 治疗对细胞活性 (A) 和 MDA (B) 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig.3 Effect of SF treatment on cell activity (A) and MDA content (B) after H_2O_2 induced injury ($\bar{x} \pm s, n=5$)

T-AOC 的含量 ($P < 0.05$)。SF 浓度越高效果越好，尤其当 SF 质量浓度为 $30, 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时提高 SOD, CAT 活性的能力比 NAC 好。见表 4。

4 讨论

衰老的自由基学说已逐步发展为自由基-氧化应激学说。延缓衰老中药的研究主要以抗氧化、清除自由基为主流，运用现代中药分析化学技术与方法，

表 4 各组 TNF- α , SOD, CAT, T-AOC 的含量变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of SF on content of TNF- α , SOD, CAT and T-AOC in different groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	TNF- α / $ng \cdot L^{-1}$	SOD/ $U \cdot mg^{-1}$	CAT/ $U \cdot mg^{-1}$	T-AOC/ $mmol \cdot g^{-1}$
空白	-	169.64 \pm 4.23	23.72 \pm 1.39	56.65 \pm 3.06	9.34 \pm 0.37
H ₂ O ₂	-	368.59 \pm 5.26 ¹⁾	14.22 \pm 0.69 ¹⁾	10.15 \pm 0.99 ¹⁾	3.21 \pm 0.25 ¹⁾
H ₂ O ₂ + SF	10	359.42 \pm 6.75 ²⁾	19.07 \pm 0.51 ²⁾	16.59 \pm 2.09 ²⁾	5.15 \pm 0.11 ²⁾
	20	338.23 \pm 5.99 ²⁾	28.09 \pm 1.78 ²⁾	26.59 \pm 2.09 ²⁾	6.01 \pm 0.12 ²⁾
	30	268.23 \pm 7.62 ²⁾	33.47 \pm 1.58 ²⁾	39.31 \pm 1.73 ²⁾	10.55 \pm 0.66 ²⁾
	50	226.46 \pm 4.91 ²⁾	37.85 \pm 1.72 ²⁾	43.37 \pm 1.01 ²⁾	10.99 \pm 0.45 ²⁾
H ₂ O ₂ + NAC	5 mmol·L ⁻¹	179.47 \pm 7.29 ²⁾	27.91 \pm 1.59 ²⁾	23.09 \pm 1.62 ²⁾	15.76 \pm 0.47 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$,与 H₂O₂ 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

旨在找到安全、有效的抗氧化中药。活性氧包括羟自由基($\cdot OH$),超氧自由基($O_2^- \cdot$),H₂O₂等强氧化物质,当活性氧(ROS)产生多于清除,活性氧大量聚积就会发生氧化应激引起肝损伤。进入肝内的O₂通过呼吸链在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶和黄嘌呤氧化酶等催化下生成O₂⁻·,而O₂⁻·在含锰超氧化物歧化酶(Mn SOD)和含铜锌超氧化物歧化酶(CuZn SOD)催化下生成H₂O₂,H₂O₂和O₂⁻·都可以通过芬顿反应生成氧化作用更强和毒性作用更大的羟基自由基,造成细胞内脂质过氧化,蛋白质变性和DNA损伤,使肝细胞功能丧失甚至死亡^[9-10]。因为O₂⁻·与其他活性氧物质产生息息相关,本实验以O₂⁻·清除率为指标设计正交试验,结果表明最佳反应条件是酶浓度6%,反应时间160 min,底物浓度20 g·L⁻¹,pH 8,温度38℃,在此条件下重复3次实验所得水解液对超氧自由基清除率是72.73%,说明此水解工艺稳定可靠。水解后产物分子量在10 kDa以下,但具体肽段组成还有待进一步研究。对此水解液抗氧化性做一个综合评价,测得发现对羟基自由基清除率为47.24%,H₂O₂诱导的红细胞氧化溶血抑制率为24.30%。表明此条件下水解液具有很好抗氧化效果。

高氧诱导的细胞损伤能够降低抗氧化酶激活,而人工合成抗氧化剂能改善由活性氧导致肝损伤,但是效果不是很好,尤其对抗氧化酶活性的恢复不如中药抗氧化成分。丝素蛋白抗氧化作用的氨基酸(如甲硫氨酸和半胱氨酸)含量丰富,丝素蛋白水解肽能提高氧化损伤大鼠模型超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活力,且本研究发现丝素蛋白水解物有较好清除超氧自由基和羟基自由基效果。H₂O₂是生成其他活性氧物质的中介物质,很容易转化为最具破坏性羟基自由基,由于H₂O₂易于获得且性质相对稳定,所

以本研究用H₂O₂损伤细胞^[11-12]。结果发现H₂O₂浓度在100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 以上时细胞活性降低,当H₂O₂浓度到800 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 时细胞活性降低最明显,所以选择800 $\mu mol \cdot L^{-1}$ H₂O₂损伤细胞。MDA是自由基引发多不饱和脂肪酸氧化分解的最终产物,是经常测量的一种氧化应激生物标志物^[13]。H₂O₂损伤细胞后细胞内MDA含量升高,表明细胞内发生氧化应激导致脂质过氧化物生成。在体外细胞实验中,随着加入药物浓度的升高药物会在细胞中积累,进行不良代谢反应,对细胞造成毒性,细胞毒性实验表明10,20,30,50 g·L⁻¹ SF对细胞无毒。H₂O₂损伤后加入SF治疗24 h,与H₂O₂组比较细胞活性升高并且MDA含量下降。结果表明NAC降低MDA效果不及30,50 g·L⁻¹ SF,且其能降低MDA含量至正常细胞水平。细胞暴露于高水平的外源性ROS会发生损伤,并且激活释放炎症因子TNF- α 导致细胞死亡^[14]。H₂O₂组中TNF- α 含量升高,与前面细胞活性降低相对应,加入SF治疗TNF- α 含量呈现下降趋势。细胞含有抗氧化酶系统包括SOD和CAT等能清除活性氧,SOD能阻止由O₂⁻·启动的歧化反应^[15],CAT能分解H₂O₂成水和氧气。H₂O₂损伤细胞后细胞中SOD,CAT,T-AOC均显著下降,有研究表明高氧能降低细胞内抗氧化酶活性,这与本实验结果相符。H₂O₂损伤细胞后加入SF治疗,细胞中SOD,CAT活性提高,T-AOC能力增强。尤其当SF浓度是30,50 g·L⁻¹时提高SOD,CAT活性的能力比NAC好。

综上所述,正交试验下所得水解产物具有较好抗氧化作用。细胞实验表明H₂O₂损伤HepG2细胞,细胞活性降低并且细胞中MDA含量增加。丝素蛋白水解物能够降低TNF- α 含量提高细胞活力和恢复细胞内抗氧化酶活性,改善高氧导致的肝细

胞损伤,本实验可为研究新型治疗高氧所致肝损伤中药材提供新思路。

[参考文献]

[1] 吴晖,罗美琪,唐语谦,等. 酶解丝素蛋白制备ACE抑制肽的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(12): 1461-1465.

[2] 张晓飞. 丝素降血糖小白鼠的效果观察[J]. 健康必读, 2013, 12(4):648.

[3] 付田霞,苏瑛. 化妆品添加柞蚕丝素粉后的抑菌能力[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(8):1670-1671.

[4] Gimenez C C, Urios A, Agustí A, et al. Is cognitive impairment in cirrhotic patients due to increased peroxynitrite and oxidative stress? [J]. Antioxid Redox Sig, 2015, 22(10):871-877.

[5] Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia N, Uribe M, et al. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(28): 4850-4860.

[6] Kim I H, Kim S W, Kim S H, et al. Parthenolide-induced apoptosis of hepatic stellate cells and anti-fibrotic effects in an *in vivo* rat model[J]. Exp Mol Med, 2012, 44(7):448-456.

[7] Zhu R, Wang Y, Zhang L, et al. Oxidative stress and liver disease[J]. Hepatol Res, 2012, 42(8):741-749.

[8] 孔繁东,谭晓慧,祖国仁,等. 丝素酶解工艺条件优化及抗氧化活性肽的研究[J]. 食品工业科技, 2010(7):265-268.

[9] Bae Y S, Oh H, Rhee S G, et al. Regulation of reactive

oxygen species generation in cell signaling [J]. Mol Cells, 2011, 32(6):491-509.

[10] Chen Y R, Zweier J L. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation[J]. Circ Res, 2014, 114(3):524-537.

[11] Yarnpakdee S, Benjakul S, Kristinsson H G, et al. Preventive effect of Nile tilapia hydrolysate against oxidative damage of HepG2 cells and DNA mediated by H₂O₂ and AAPH [J]. Food Sci Technol, 2015, 52(10):1-12.

[12] Cho B O, Ryu H W, Lee C W, et al. Protective effects of new blackberry cultivar MNU-32 extracts against H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells[J]. Food Sci Technol, 2015, 24(2):643-650.

[13] Malik U U, Siddiqui I A, Hashim Z, et al. Measurement of serum paraoxonase activity and MDA concentrations in patients suffering with oral squamous cell carcinoma[J]. Clin Chim Acta, 2014, 430(1): 38-42.

[14] Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, et al. Positive feedback between NF- κ B and TNF- α promotes leukemia-initiating cell capacity [J]. J Clin Invest, 2014, 124(2):528-542.

[15] Meng S L, Chen J Z, Xu P, et al. Hepatic antioxidant enzymes SOD and CAT of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to pesticide methomyl and recovery pattern[J]. B Environ Contam Tox, 2014, 92(4):388-392.

[责任编辑 张丰丰]