

# 菲律宾蛤仔寡肽体外抗氧化、抗肿瘤活性研究

李荣<sup>1</sup>, 李丽<sup>2</sup>, 王加斌<sup>3</sup>, 丁国芳<sup>1\*</sup>

- (1. 浙江海洋学院食品与药学学院和浙江省海洋生物医用制品重点工程技术研究中心, 浙江舟山 316004; 2. 浙江国际海运职业技术学院, 浙江舟山 316021; 3. 中国浙江海力生集团有限公司, 浙江舟山 316021)

**[摘要]** **目的:** 研究菲律宾蛤仔酶解寡肽的体外抗氧化、抗肿瘤活性。**方法:** 采用分光光度法测定寡肽对 2,2'-连氮基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、超氧阴离子 ( $O_2^{\cdot -}$ ), 羟自由基 ( $\cdot OH$ ) 的清除能力和寡肽的金属离子螯合能力, 及四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测寡肽对肿瘤细胞 DU-145 的增殖抑制效应。**结果:** 菲律宾蛤仔酶解寡肽有较显著的 ABTS 自由基 [半数有效浓度 ( $EC_{50}$ )  $0.204 g \cdot L^{-1}$ ]、羟自由基 ( $EC_{50}$   $0.815 g \cdot L^{-1}$ ) 和超氧阴离子自由基 ( $EC_{50}$   $0.066 g \cdot L^{-1}$ ) 清除能力和金属离子螯合能力 ( $EC_{50}$   $1.554 g \cdot L^{-1}$ ) 及有效的 DU-145 细胞增殖抑制活性 (半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ )  $5.202 g \cdot L^{-1}$ )。**结论:** 菲律宾蛤仔酶解寡肽具有较好的抗氧化及抗肿瘤活性, 可能与其低相对分子质量及蛋白酶酶解构成寡肽的结构相关。

**[关键词]** 菲律宾蛤仔; 寡肽; 抗氧化; 抗肿瘤; 自由基

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0238-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013110238

## Studies *in vitro* on the Antioxidant and Anticancer Activity of Oligopeptide Isolated from *Ruditapes philippinarum* Hydrolysate

LI Rong<sup>1</sup>, LI Li<sup>2</sup>, WANG Jia-bin<sup>3</sup>, DING Guo-fang<sup>1\*</sup>

- (1. Key Engineering Research Centers of Marineorganisms Medical Products, School of Food Science and Pharmacy of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China; 2. School of harbour management of Zhejiang International Maritime College, Zhoushan 316021, China; 3. Zhejiang Hailisheng Group, Zhoushan 316021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the antioxidant activity of oligopeptide isolated from Short-neck clam (*Ruditapes philippinarum*) muscle hydrolysate. **Method:** The antioxidant activities were evaluated by using 2, 2'-azinobis [3-ethylbeothiazoline-6-sulfonicacid]-diammonium salt (ABTS), hydroxyl, and superoxide anion radical scavenging assay, and  $Fe^{2+}$  chelation assay. The anti-prostatic cancer activity was evaluated by MTT assay. **Result:** *Ruditapes philippinarum* oligopeptide exhibited potent scavenging activity on ABTS radical ( $EC_{50}$   $0.204 g \cdot L^{-1}$ ), superoxide anion ( $EC_{50}$   $0.066 g \cdot L^{-1}$ ), and hydroxyl radical ( $EC_{50}$   $0.815 g \cdot L^{-1}$ ), and significant  $Fe^{2+}$  chelation ( $EC_{50}$   $1.554 g \cdot L^{-1}$ ) ability and proliferation inhibition ability ( $IC_{50}$   $5.202 g \cdot L^{-1}$ ) of DU-145 cells. **Conclusion:** The antioxidant and anti-prostatic cancer activities of oligopeptide were due to the small molecular weight and special oligopeptide sequence.

**[Key words]** *Ruditapes philippinarum*; oligopeptides; antioxidant activity; anticancer; free radicals

**[收稿日期]** 20121204(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81273429);浙江省科技厅重大专项(2010C13009,2011C02003);浙江省海洋生物技术产业重点科技创新团队(2010R50029);浙江省自然科学基金立项(Y205519,LY12C20005,LY12C20008)

**[第一作者]** 李荣,在读硕士研究生,从事海洋功能食品、海洋药物研究,Tel:0580-8181605,E-mail:saltrong917@126.com

**[通讯作者]** \*丁国芳,教授,硕士生导师,从事海洋功能食品、海洋药物研究,Tel:0580-8181605,E-mail:dingg2007@163.com

生物活性肽具有多种生物活性,在其研究中发现寡肽也具有显著的生物活性,且相对于蛋白及大分子量肽其更易于机体完整吸收<sup>[1]</sup>。海洋动物中蕴含丰富的蛋白及肽,由于海洋动物处于高盐、高压、低温缺氧、光照不足等特殊的生存环境中,使得来源于海洋动物的蛋白及肽具有独特的生物活性,目前已有的研究发现,海洋动物如红螺,马鲛鱼,乌贼墨,牡蛎,鲑鱼等中寡肽具有抗菌,抗氧化,抗肿瘤,抗高血压,降血糖,增强机体免疫力等方面活性<sup>[2-6]</sup>。菲律宾蛤仔属于软体动物门,是我国四大养殖贝类之一,其肌肉组织蕴含丰富的营养物质。研究表明,菲律宾蛤仔提取物具有提高免疫力、抗动脉粥样硬化、抗菌等作用<sup>[7-9]</sup>。本文将采用酶解法制备的菲律宾蛤仔寡肽进行体外抗氧化活性及抗肿瘤活性研究,为菲律宾蛤仔寡肽的生物活性研究提供实验理论依据。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum*,购于舟山北门菜市场,由浙江海洋学院赵盛龙教授进行种类鉴定,取蛤肉酶解制备寡肽,分离纯化后经高效液相检测为单一峰,氨基酸序列分析得其序列为 Gly-Asp-Gln-Gln-Lys。2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS),四甲基偶氮唑蓝 (MTT),二甲基亚砜 (DMSO),抗坏血酸 (VC) 购于美国 Sigma 公司;邻苯三酚,硫酸亚铁,过氧化氢,铁氰化钾,邻二氮菲等均为分析纯。

**1.2 细胞株** 人前列腺癌细胞 DU-145,人正常前列腺细胞 RWPE-1 均购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库。

**1.3 仪器与设备** CF16RXII 型高速冷冻离心机 (日本,日立公司),LGJ-18 冷冻干燥机 (北京松原华兴科技发展有限公司),SSW-420-2S 恒温水浴锅 (上海民仪电子有限公司),DS-1 组织捣碎机 (上海标本模型厂),Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司),超滤杯、膜等 (上海摩速科学器材有限公司),BSW-100-ZCD 自动部分收集器,BT1-100 恒流泵 (上海奇特分析仪器有限公司),PHS-250 PH 计 (上海理达仪器厂),1800 紫外分光光度计 (上海马普达仪器有限公司),酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 ABTS 自由基清除实验** 参照 Re 等<sup>[10]</sup>方法对寡肽的 ABTS 自由基清除能力进行检测。将一定量的  $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻

唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 溶液置于具塞试管中,加入等体积  $2.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  过硫酸钾溶液,在闭光,室温条件下反应 16 h,该反应产物为  $\text{ABTS}^+$ ,取  $1 \text{ mL}$   $\text{ABTS}^+$  溶液以  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 进行稀释,使  $\text{ABTS}^+$  溶液  $734 \text{ nm}$  下吸光度 ( $A$ ) 为  $0.70 \pm 0.02$ 。 $0.5 \text{ mL}$   $\text{ABTS}^+$  稀释液与  $0.5 \text{ mL}$  不同浓度的样品溶液充分混匀,反应 6 min 后于  $734 \text{ nm}$  处分别测量  $A_s$ ,蒸馏水代替样品测得吸光度为  $A_c$ ,以抗坏血酸代替样品作为阳性对照。 $\text{ABTS}^+$  清除率按以下公式计算:

$$\text{ABTS 自由基清除率} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

**2.2 超氧阴离子清除实验** 该寡肽的超氧阴离子清除能力通过参照 Liu 等<sup>[11]</sup>的研究方法稍作修改进行检测。在具塞试管中加入  $1 \text{ mL}$   $2.52 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化硝基四氮唑蓝 (NBT), $1 \text{ mL}$   $624 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NADH 和  $1 \text{ mL}$  不同浓度的样品,混匀后,加入  $1 \text{ mL}$   $120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 溶液开始反应, $25 \text{ }^\circ\text{C}$  反应 5 min 后, $560 \text{ nm}$  下测量各样品组  $A_s$ ,空白组以去离子水代替样品测得  $A_c$ ,以维生素 C (VC) 作为阳性对照,超氧阴离子清除率按以下公式计算:

$$\text{超氧阴离子清除率} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

**2.3 金属离子螯合能力测定** 以亚铁离子的螯合能力检测活性肽的金属离子螯合能力参照 Minotti 等<sup>[12]</sup>的方法。 $25 \mu\text{L}$  不同浓度的抗氧化肽, $168 \mu\text{L}$   $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7.4), $218 \mu\text{L}$   $0.9\%$  NaCl,及  $150 \mu\text{L}$  刚配制的  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4$  溶液,分别加入具塞试管中,混匀室温反应 5 min 后,加入  $13 \mu\text{L}$   $0.35\%$  的邻二氮菲溶液,于  $510 \text{ nm}$  处测各组波长  $A_s$ 。 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7.4) 代替样品测其波长为  $A_c$ 。同时以 EDTA 作为阳性对照。金属离子螯合能力可按以下公式计算:

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 螯合能力} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

**2.4 羟自由基清除能力测定** 参照金鸣等<sup>[13]</sup>的研究方法,取  $0.5 \text{ mL}$   $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  邻二氮菲的无水乙醇溶液,加入  $1 \text{ mL}$   $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4), $0.5 \text{ mL}$  样品,充分混匀后加入  $0.5 \text{ mL}$ , $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{FeSO}_4$ ,混匀加入  $0.5 \text{ mL}$   $0.01\%$  体积分数的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴 60 min 后,于  $536 \text{ nm}$  下分别测量各组  $A_s$ ,以去离子水代替样品测  $A_c$ ,分别以去离子水替代样品及  $\text{H}_2\text{O}_2$  测其  $A_0$ ,样品的羟自由基清除率按以下公式计算:

$$\text{羟自由基清除率} = \frac{A_s - A_c}{A_0 - A_c} \times 100\%$$

**2.5 细胞活力检测** 将 DU-145 和 RWPE-1 细胞, 分别接种至 96 孔板中, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 于  $\text{CO}_2$  培养箱中  $37^\circ\text{C}$  孵化 24 h, 吸去培养液, 加入不同浓度寡肽的营养液, 每个浓度设 3 个平行孔, 并设置不加寡肽的对照组, 再次置于  $\text{CO}_2$  培养箱中  $37^\circ\text{C}$  孵化 24 h, 孵化后, 吸去营养液, 加入 20  $\mu\text{L}$  的 MTT 和 180  $\mu\text{L}$  的 PBS 继续培养 4 h, 吸弃 96 孔板内液体, 加入 150  $\mu\text{L}$  的 DMSO, 震荡 10 min 后, 利用酶联免疫检测仪于 490 nm 处测吸光度得样品组吸光度  $A_s$ , 对照组吸光度  $A_o$  细胞增殖抑制指数 (IR), 按以下公式计算:

$$\text{IR} = \frac{A_o - A_s}{A_o} \times 100\%$$

**2.6 统计方法** 所有实验均进行 3 次平行实验 ( $n=3$ ), 使用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验。  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 ABTS 自由基清除能力** ABTS 自由基溶液呈蓝绿色在 734 nm 处有最大吸收, 在其与抗氧化物结合形成络合物后, 反应溶液褪色, 吸光度减小。如图 1 所示菲律宾蛤仔酶解寡肽对 ABTS 自由基具有一定的清除能力, 且呈现良好的剂量依赖关系, 在最高质量浓度  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时 ABTS 自由基清除率可达  $(99.62 \pm 0.60)\%$ , 并且与 VC 相当, 其清除 ABTS 自由基的  $\text{EC}_{50}$  为  $0.204 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

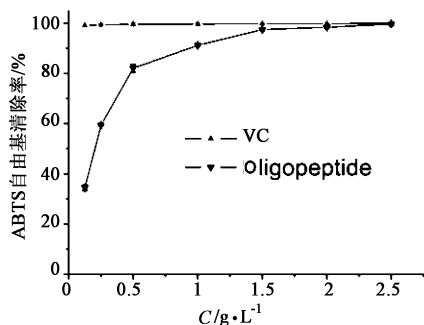
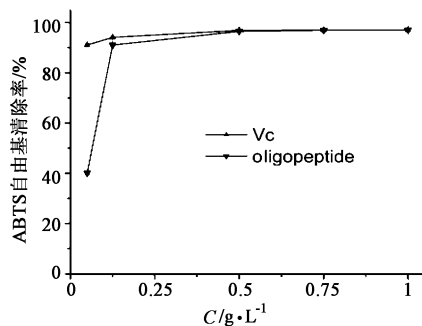


图 1 菲律宾蛤仔酶解寡肽对 ABTS 自由基的清除能力 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**3.2 超氧阴离子清除能力** 本实验中, 由 PMS 和 NADH 偶合反应产生  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , 而  $\text{O}_2^{\cdot-}$  可与 NBT 反应显蓝紫色, 在 560 nm 处有最大吸收峰, 若  $\text{O}_2^{\cdot-}$  与抗氧化物结合不作用于 NBT, 显色反应不发生。如图 2 所示, 寡肽具有显著的超氧阴离子清除能力, 在质量浓度为  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 清除率可达  $(96.84 \pm 0.04)\%$ , 且在  $0.5 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  寡肽清除能力与 VC 相当, 其对超氧阴离子清除力的  $\text{EC}_{50}$  为  $0.066 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.3 金属离子螯合能力** 金属离子在细胞中是一



种显著地自由基诱发剂, 可诱导体内羟自由基和超氧阴离子等活性氧的产生, 进而对机体造成氧化损伤, 抗氧化剂对金属离子的螯合能力与其抗氧化活性相关。如图 3 所示, 抗氧化寡肽具有  $\text{Fe}^{2+}$  的螯合能力, 并呈良好的剂量依赖关系, 在  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 螯合率可达  $(67.22 \pm 1.60)\%$ 。  $\text{Fe}^{2+}$  的螯合能力  $\text{EC}_{50}$   $1.554 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但其金属螯合能力与阳性对照 EDTA 相比较弱。

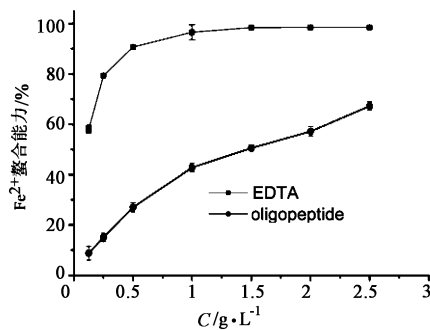


图 3 菲律宾蛤仔酶解寡肽对  $\text{Fe}^{2+}$  的螯合能力 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**3.4 羟自由基清除能力** 本实验中  $\cdot\text{OH}$  由 Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ ) 反应产生, 该寡肽对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力经考察如图 4 所示, 随着质量浓度的增加寡肽的  $\cdot\text{OH}$  清除能力也逐渐增强, 在质量浓度为  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,  $\cdot\text{OH}$  清除率可达  $(74.26 \pm 1.77)\%$ , 其对羟自由基清除力的  $\text{EC}_{50}$   $0.815 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 但与阳性对照 VC 相比较弱。

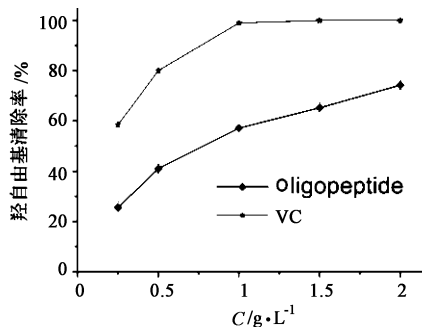


图 4 菲律宾蛤仔酶解寡肽对羟自由基的清除能力 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**3.5 前列腺癌 DU-145 细胞生长抑制活性** 如图 5 所示,寡肽对前列腺癌 DU-145 细胞具有明显的增殖抑制作用,并呈良好的量效关系。15 g·L<sup>-1</sup>时,抑制率可达 77.80% ± 2.00%,该寡肽对 DU-145 细胞增殖抑制的 IC<sub>50</sub> 约为 5.202 g·L<sup>-1</sup>。且人体正常前列腺细胞 RWPE-1 细胞毒性检测结果表明,寡肽对 RWPE-1 细胞无毒性。

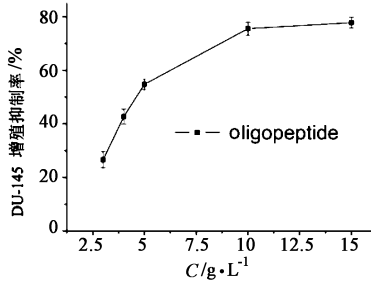


图 5 菲律宾蛤仔酶解寡肽对 DU-145 细胞增殖抑制能力  
( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

#### 4 讨论

活性氧(reactive oxygen species, ROS),是需氧细胞在代谢过程中产生的产物,包括 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO<sub>2</sub>·, ·OH 等氧自由基以及由它们衍生的单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和脂质过氧化物(RO·, ROO·与 ROOH)等。在某些病理状态下,ROS 与多种疾病和损伤有关,其直接或间接地参与了动脉粥样硬化、缺血性心脏病、高血压病等心血管疾病的病理过程,并且是引发的体内脂质过氧化,机体衰老和癌变的重要原因。ROS 可诱发多不饱和脂肪酸氧化,破坏生物膜的结构和功能,从而造成组织细胞及机体的病变和死亡<sup>[15-17]</sup>。

本实验得出菲律宾蛤仔酶解寡肽具有显著的自由基清除活性及金属离子螯合能力,并对前列腺癌细胞 DU-145 具有增殖抑制作用,其抗氧化、抗肿瘤活性可能与其氨基酸结构和低相对分子质量相关。另外,细胞毒性试验表明其对人体正常前列腺细胞 RWPE-1 细胞无毒性,故该寡肽安全性高,具有良好的应用价值及开发前景。

#### [参考文献]

- [1] 张宇昊,王强. 功能性短肽的研究进展[J]. 中国油脂, 2007, 2(2): 69.
- [2] Pavlina D, Veselam, Valika B, et al. Antimicrobial proline-rich peptides from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa* [J]. Peptides, 2011, 32(7): 1477.
- [3] Lee W S, Jeon J K, Byun H G. Characterization of a novel antioxidative peptide from the sand eel

*Hypoptychus dybowskii* [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(5): 1207.

- [4] Ding G F, Huang F F, Yang Z S, et al. Anticancer activity of hydrolysate of sepia ink prepared with trypsin [J]. 中国天然药物, 2011, 8(3): 92.
- [5] 柯珂,王一兵,何碧娟,等. 近江牡蛎活性物质的制备及其抗氧化活性的初步研究[J]. 食品科技, 2011, 32(1): 92.
- [6] Sampath Kumar N S, Nazeer R A, Jaiganesh R. Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein [J]. Peptides, 2011, 32(7): 1496.
- [7] 范秀萍,吴红棉,王娅楠,等. 菲律宾蛤仔糖胺聚糖的免疫活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 370.
- [8] Keisuke G T, Takuo K, Kiyokun I M. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the *Manila clam* lectin (MCL-4) from the plasma of the *Manila clam*, *Ruditapes philippinarum* [J]. Comp Biochem Physiol, 2008, 150: 45.
- [9] 张莉,刘万顺,韩宝芹,等. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) 蛋白聚糖的分离提取及其抗肿瘤活性的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(1): 62.
- [10] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9/10): 1231.
- [11] Liu F, Ooi V E, Chang S T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts [J]. Life Sci, 1997, 60(10): 763.
- [12] Minotti G, Aust S D. An investigation into the mechanism of citrate-Fe<sup>2+</sup>-dependent lipid peroxidation [J]. Free Radical Biol Med, 1987, 3(6): 379.
- [13] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等. 邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup> 氧化法检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553.
- [14] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 2004: 250.
- [15] 全吉华,金延华,尹学哲. 漏芦醇提取物的体外抗氧化作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 197.
- [16] 叶锦霞,梁日欣,王岚. 氧化应激与心血管疾病的关系研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(10): 68.
- [17] 姜微哲,渠凯,朱海波. 冬虫夏草提取物调血脂与抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 127.

[责任编辑 聂淑琴]