

文章编号:1001-6880(2016)6-0839-07

# 美国肉参胶原蛋白肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞的保护作用

赵 芹<sup>1\*</sup>,林 栋<sup>2</sup>,刘海梅<sup>1</sup>,李海燕<sup>1</sup><sup>1</sup>鲁东大学食品工程学院,烟台 264025;<sup>2</sup>滨州医学院药学院,烟台 264003

**摘要:**采用风味蛋白酶对美国肉参体壁进行酶解,经超滤制备不同分子量的美国肉参胶原蛋白肽 I<sub>1</sub> (6 kD < Mr < 10 kD) 和 I<sub>2</sub> (Mr < 6 kD)。利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞建立氧化损伤模型,比较 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 对氧化应激损伤的神经细胞的保护作用及机制。结果显示:不同浓度的 I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub> 均能显著提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 PC12 细胞的增殖活性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),降低细胞内 ROS 水平,减少 LDH 释放量和 MDA 含量 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),提高细胞的 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),抑制 caspase-3 酶活性的升高。表明美国肉参胶原蛋白肽具有良好的抗氧化活性,可以保护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的神经细胞损伤。其中,低分子量段的胶原蛋白肽组分保护效果更好。

**关键词:**美国肉参;胶原蛋白肽;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;PC12 细胞;活性氧;抗氧化酶

中图分类号:R285

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.6.005

## Protective Effects of Collagen Peptide from *Isostichopus badionotus* on PC12 Cells Injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ZHAO Qin<sup>1\*</sup>, LIN Dong<sup>2</sup>, LIU Hai-mei<sup>1</sup>, LI Hai-yan<sup>1</sup><sup>1</sup>School of Food Engineering, Lu Dong University, Yantai 264025, China;<sup>2</sup>School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

**Abstract:** The body wall of *Isostichopus badionotus* was hydrolyzed with flavourzyme. Two fractions with different molecular weights I<sub>1</sub> (6kD < Mr < 10kD) and I<sub>2</sub> (Mr < 6kD) were obtained by ultrafiltration. The protective effects of I<sub>1</sub> and I<sub>2</sub> on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced damage in PC12 cells were investigated. Results showed that all doses of I<sub>1</sub> and I<sub>2</sub> can promote the growth of PC12 injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obviously ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The intracellular ROS, LDH release and the content of MDA decreased significantly ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The activities of SOD, CAT and GSH-Px were stimulated remarkably ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The caspase-3 activities decreased significantly ( $P < 0.01$ ). The collagen peptide with low molecular weight showed a better cytoprotective activity. These results demonstrated that collagen polypeptides from *I. badionotus* had remarkable antioxidant activity and can play a neuroprotective role in PC12 cells oxidative damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Key words:** *Isostichopus badionotus*; collagen peptides; hydrogen peroxide; PC12 cells; reactive oxygen species; antioxidant

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种老年高发的渐进性神经退行性疾病,严重危害老年人的身心健康。大量研究显示,其发病机制与氧化应激及其引起的损伤密切相关<sup>[1-3]</sup>。氧化应激产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可诱导神经细胞的凋亡,损伤脂质和蛋白质,降低抗氧化酶的活性,损伤 AD 相关的突触等<sup>[4]</sup>。抗氧化剂可以延缓或者抑制自由基链式反应,减轻 ROS 对机体的损

伤。近年来,寻找具有清除自由基活性的天然生物活性物质用于保护神经细胞免受氧化损伤备受关注。现已发现活性肽类<sup>[5]</sup>、多糖类<sup>[6]</sup>和皂苷类<sup>[7]</sup>等在 AD 的预防和治疗中均有一定的效果。

海参是一种优良的药食同源食品,体内富含多种天然活性物质。海参胶原蛋白是海参体壁中重要的生物活性物质之一,由其酶解制备的海参胶原蛋白肽具有保护血管内皮细胞<sup>[8]</sup>、减少黑色素生成<sup>[9]</sup>、保护皮肤<sup>[10]</sup>等生理活性,而其显著的抗氧化活性<sup>[11,12]</sup>更是引起广泛的关注。本实验采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞建立氧化应激损伤神经元的模型,比较不同分子量的美国肉参 (*Isostichopus badiono-*

收稿日期:2016-02-03 接受日期:2016-04-15

基金项目:山东省自然基金(ZR2015PC002);鲁东大学人才引进基金(LY2012011)

\*通讯作者 Tel:86-535-6913985;E-mail:candyffff@163.com

tus) 胶原蛋白肽对神经细胞的保护作用,为深入挖掘海参胶原蛋白肽的药用功能,推动海参生物活性物质的合理开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与试剂

市售干品美国肉参(*I. badionotus*),由中国科学院海洋研究所廖玉麟研究员对样品进行种属鉴定。参照文献<sup>[9]</sup>,采用乙醇连续浸提脱除皂苷后,以 novo nordisk 公司生产的复合风味酶(活力单位为 500 LAPU/g)酶解,最适反应条件为:时间 4 h,酶与底物比为 1:4,pH 6.5、温度 45 ℃。采用截留分子量为 6 kD 和 10 kD 的超滤膜处理,得到不同分子量的酶解液。分别于 40 ℃ 旋蒸浓缩,真空冻干,得粉末状美国肉参胶原蛋白肽 I<sub>1</sub>(6 kD < Mr < 10 kD) 和 I<sub>2</sub>(Mr < 6 kD)。

DMEM 培养基、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS),购自美国 Gibco 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT),购自美国 Amresco 公司;ROS 试剂盒和 caspase-3 试剂盒,购自海门市碧云天生物技术研究所;乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2 细胞株

PC12 细胞株,由中国科学院上海生化与细胞研究所提供。用含 10% FBS、1(10<sup>5</sup> U/L 青/链霉素)的高糖 DMEM 培养基,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱内培养,每 2 d 以 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。取对数生长期的细胞进行实验。

### 1.3 仪器与设备

835-50 型氨基酸自动分析仪和 F-2500 型荧光分光光度计,日本 HITACHI 公司产品;TS-100 型倒置生物显微镜,日本 Nikon 公司产品;680 型酶标仪,美国 BIO-RAD 公司产品。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 美国肉参体壁氨基酸组成分析

采用盐酸水解法处理美国肉参(*I. badionotus*)体壁后,使用氨基酸自动分析仪测定其主要氨基酸含量。羟脯氨酸含量采用氯胺 T 分光光度法测定。

#### 1.4.2 细胞增殖活性测定

收集对数生长期的 PC12 细胞并调整密度至 2 × 10<sup>4</sup> 个/mL,以 200 μL/孔接种于 96 孔培养板。培

养 24 h 后,分别给予以完全培养基配置的 I<sub>1</sub> 或 I<sub>2</sub>(0、12.5、25、50、100 μg/mL),每组 4 个复孔。培养 24、48 和 72 h 后采用 MTT 法测定吸光度 OD<sub>570</sub> 值,以实验组 OD<sub>570</sub> 值/对照组 OD<sub>570</sub> 值表示细胞增殖活性。

#### 1.4.3 海参胶原蛋白肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞存活率的测定

收集对数生长期的 PC12 细胞并调整密度至 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL,以 100 μL/孔接种于 96 孔培养板。培养 24 h 后,分别加入 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 预处理 12 h(样品浓度为 0、6.25、12.5、25、50 和 100 μg/mL),每孔 200 μL,每组 4 个复孔。换液,洗涤后正常对照组加入无血清 DMEM 培养基,其它各组加入含有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(80 μmol/L) 的无血清 DMEM 培养基孵育 4 h,以 MTT 法测定吸光度 OD<sub>570</sub> 值,并计算细胞增殖活性。

#### 1.4.4 细胞内 ROS 水平测定

收集对数生长期的 PC12 细胞并调整密度至 5 × 10<sup>5</sup> 个/mL,以 2 mL/孔接种于 6 孔培养板。培养 24 h 后,分别加入 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 预处理 12 h(样品的浓度为 0、50 和 100 μg/mL),每孔 2 mL,每组 4 个复孔。换液,洗涤后正常对照组加入无血清 DMEM 培养基,其它各组加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(200 μmol/L) 处理 4 h 后,收集细胞。参照文献<sup>[13]</sup>,加入 DCFH-DA(10 μmol/L) 探针孵育 20 min,以无血清培养基洗涤细胞 3 次。用荧光分光光度计测定细胞内荧光强度,激发波长为 488 nm,发射波长为 521 nm,以细胞悬液的平均荧光强度表示细胞总的 ROS 水平。

#### 1.4.5 LDH 释放量、细胞内 MDA 含量和抗氧化酶活性的测定

细胞处理及培养条件同 1.4.4,样品的浓度为 25、50 和 100 μg/mL。实验结束时收集培养上清液和细胞,参照试剂盒操作说明,分别以比色法测定上清液中 LDH 释放量,TBA 法测定细胞内 MDA 含量、羟胺法测定 PC12 细胞内 SOD 活力,比色法测定细胞内 GSH-Px 活性,钼酸铵比色法测定 CAT 活性。细胞蛋白浓度以 Folin-酚法测定。

#### 1.4.6 caspase-3 酶活性的测定

细胞分组、处理及培养条件同 1.4.4,实验结束时收集细胞,加裂解液,冰浴中裂解 15 min 后,于 4 ℃,20000 × g 离心 10 min。取上清,按照试剂盒说明,加入底物 Ac-DEVD-pNA,测定 caspase-3 的酶活性,细胞蛋白浓度以 Bradford 法测定。

### 1.4.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,同时进行 LSD 和 SNK 组间比较,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 美国内参体壁中主要氨基酸的组成

由表 1 可见,美国内参体壁中具有抗氧化活性

的氨基酸含量十分丰富,尤其是在还原性氨基酸上,美国内参的含量高达  $29.69 \text{ mg}/100\text{mg}$ ,占总氨基酸含量的 48.33%。疏水性氨基酸和酸性氨基酸已被证实和肽类化合物的抗氧化活性密切相关<sup>[14]</sup>。美国内参体壁中疏水性氨基酸的含量占到总氨基酸含量的 32.98%,而作为酸性氨基酸 Asp 和 Glu 两种氨基酸就占到总氨基酸的 23.42%,提示由美国内参体壁酶解得到的肽类化合物具有良好的抗氧化潜力。

表 1 美国内参体壁中的主要活性氨基酸组成

Table 1 Active amino acid composition of the protein in body wall of *I. badionotus*

活性氨基酸 Active amino acid	氨基酸种类 Amino acid	含量 Content (mg/100 mg)
还原性氨基酸总量 Total reducing amino acids	Glu、Gly、Ala、Tyr、Lys、Arg	29.69
疏水性氨基酸总量 Total hydrophobic amino acids	Ala、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Pro	20.26
酸性氨基酸总量 Total acidic amino acids	Asp、Glu	14.39
必需氨基酸总量 Total essential amino acids	Lys、Trp、Phe、Met、Thr、Ile、Leu、Val	15.94
总氨基酸量 Total amino acids	All	61.43

### 2.2 对正常 PC12 细胞增殖活力的影响

由图 1 可知,美国内参胶原蛋白肽 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 对

PC12 细胞的生长均无显著性影响 ( $P > 0.05$ ),表明其对正常 PC12 细胞均无细胞毒作用。

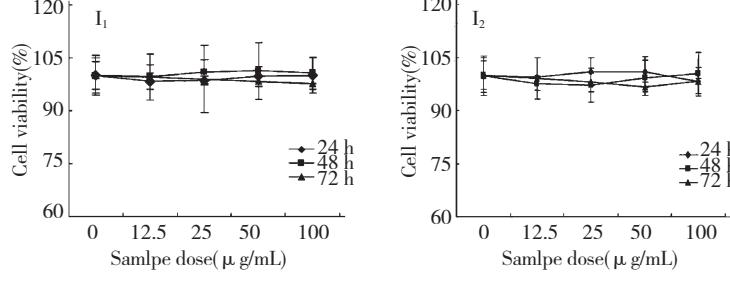


图 1 I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub> 对 PC12 细胞增殖的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 1 Effects of I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> on PC12 cells proliferation ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

### 2.3 对 $H_2O_2$ 损伤 PC12 细胞存活率的影响

由图 2 可见,经  $H_2O_2$  诱导损伤后,PC12 的生长受到显著抑制 ( $P < 0.01$ ),与正常细胞相比,其存活率下降为 56.8%。经 I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub> 预处理后,细胞的增殖活性呈现升高趋势,当剂量达到  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞存活率的升高具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。提示美国内参胶原蛋白肽对  $H_2O_2$  引诱导的 PC12 细胞损伤均具有显著的保护作用,且呈现出显著的剂量-效应关系。经统计学分析,当剂量达到  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,I<sub>2</sub> 的保护效果较 I<sub>1</sub> 更显著。

### 2.4 对 $H_2O_2$ 损伤 PC12 细胞内 ROS 水平的影响

DCFH-DA 可被细胞内的 ROS 氧化成为一种高度荧光的物质 DCF,可直接通过检测 DCF 荧光强度来反映细胞内 ROS 水平。经  $200 \mu\text{mol}/\text{L}$  的  $H_2O_2$  处理 4 h 后,PC12 细胞内 ROS 水平较正常组细胞升高了 1.74 倍 ( $P < 0.01$ )。由图 3 可见,I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 各剂量组均有效降低了细胞内的 ROS 水平,且呈现剂量依赖效应,其中高剂量组 ROS 水平分别下降了 23.86% 和 31.11%。表明 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 能显著降低氧化应激损伤 PC12 细胞的 ROS 水平,且 I<sub>2</sub> 的效果优于 I<sub>1</sub>。

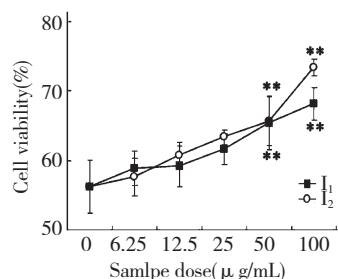


图 2 I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞的保护作用 ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 2 Protective effects of I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> on PC12 cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与模型对照组比较

Note: \*  $P < 0.05$ . \*\*  $P < 0.01$  vs model control

## 2.5 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞 LDH 漏出量和 MDA 含量的影响

LDH 是一种可溶性胞质酶, 当细胞膜结构及其完整性被破坏时, 大量释放到培养上清液中, 因此上清液中 LDH 增加与细胞的损伤或死亡程度成正比<sup>[15]</sup>。由表 2 可见, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能显著损伤 PC12 细胞, 与正常对照组相比, 模型组 LDH 释放量显著增加了 2.04 倍。而美国肉参 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 均能有效降低细胞 LDH 的释放量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且呈现出显著的量效关系。与模型组相比, I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 的高剂量组 (100 μg/mL) LDH 的释放量, 分别为减少了

表 2 I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞的 LDH 释放量和 MDA 含量的影响 ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> on LDH release and MDA content ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	乳酸脱氢酶 LDH (U/L)	丙二醛 MDA (nmol/mgprot)
正常对照组 Normal control group	$80.64 \pm 6.37$	$1.30 \pm 0.13$
模型对照组 Model control group	$164.44 \pm 7.82^{##}$	$2.83 \pm 0.16^{##}$
I <sub>1</sub> (25 μg/mL) 组 I <sub>1</sub> (25 μg/mL) group	$141.72 \pm 9.01^*$	$2.68 \pm 0.05^*$
I <sub>1</sub> (50 μg/mL) 组 I <sub>1</sub> (50 μg/mL) group	$114.31 \pm 6.42^{**}$	$2.27 \pm 0.11^{**}$
I <sub>1</sub> (100 μg/mL) 组 I <sub>1</sub> (100 μg/mL) group	$92.31 \pm 11.58^{**}$	$1.88 \pm 0.06^{**}$
I <sub>2</sub> (25 μg/mL) 组 I <sub>2</sub> (25 μg/mL) group	$138.60 \pm 7.46^{**}$	$2.65 \pm 0.10^*$
I <sub>2</sub> (50 μg/mL) 组 I <sub>2</sub> (50 μg/mL) group	$97.841 \pm 16.41^{**}$	$2.14 \pm 0.06^{**}$
I <sub>2</sub> (100 μg/mL) 组 I <sub>2</sub> (100 μg/mL) group	$88.32 \pm 6.17^{**}$	$1.77 \pm 0.04^{**}$

注: ##  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与模型对照组比较。

Note: ##  $P < 0.01$  vs normal control; \*  $P < 0.05$ . \*\*  $P < 0.01$  vs model control.

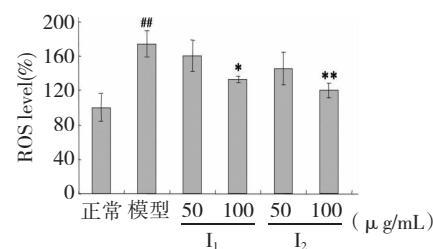


图 3 I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞内 ROS 的影响 ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 3 Effects of I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> on intracellular ROS in PC12 cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

注: ##  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与模型对照组比较

Note: ##  $P < 0.01$  vs normal control; \*  $P < 0.05$ . \*\*  $P < 0.01$  vs model control

43.86% 和 46.29%, I<sub>2</sub> 各剂量组的效果均优于 I<sub>1</sub>, 体现出了较好的保护作用。

MDA 是脂质过氧化的最终产物, 可直接反映机体内自由基含量的变化和受自由基攻击的程度。经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤后, PC12 细胞内 MDA 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ), 经 I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub> 预处理后, 细胞内 MDA 含量平均下降了 19.55% 和 22.73% (见表 2), 表明 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 均可有效拮抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的脂质过氧化反应, 保护生物大分子和膜结构。

## 2.6 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性的影响

由表 3 可见, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 损伤后, 抗氧化酶活性均发生了显著性降低。不同剂量的 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 均能显著提高 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型对照组相比, I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 预处理后, 细胞的 SOD 活性呈剂量依赖性升高, 其中高剂量组

SOD 活性分别增加了 1.16 倍和 1.31 倍。对 CAT 和 GSH-Px 来说, I<sub>2</sub> 各组的酶活平均提高了 32.96% 和 11.90%, 均优于 I<sub>1</sub> 组。实验结果表明, I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 抗氧化酶活性的下降具有显著的保护作用, 其中 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 中、高剂量组 GSH-Px 的活性均高于正常对照组, 提示其可能具有激活神经细胞内 GSH-Px 的作用。

表 3 I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞抗氧化酶活性的影响 ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> on antioxidantase in PC12 cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	超氧化物歧化酶 SOD (U/mgprot)	过氧化氢酶 CAT (U/mgprot)	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px (U/mgprot)
正常对照组 Normal control group	179.70 ± 5.81	9.12 ± 0.78	68.79 ± 1.87
模型对照组 Model control group	133.60 ± 16.15 <sup>##</sup>	6.63 ± 1.01 <sup>##</sup>	56.74 ± 4.70 <sup>##</sup>
I <sub>1</sub> (25 μg/mL) 组 I <sub>1</sub> (25 μg/mL) group	139.07 ± 4.78	7.03 ± 1.29	66.94 ± 2.21 <sup>*</sup>
I <sub>1</sub> (50 μg/mL) 组 I <sub>1</sub> (50 μg/mL) group	152.15 ± 2.51 <sup>*</sup>	7.68 ± 0.96 <sup>*</sup>	75.18 ± 4.72 <sup>* * *</sup>
I <sub>1</sub> (100 μg/mL) 组 I <sub>1</sub> (100 μg/mL) group	154.57 ± 6.36 <sup>*</sup>	8.14 ± 1.05 <sup>* *</sup>	75.56 ± 5.62 <sup>* *</sup>
I <sub>2</sub> (25 μg/mL) 组 I <sub>2</sub> (25 μg/mL) group	131.38 ± 8.82	7.56 ± 1.28 <sup>*</sup>	69.59 ± 3.46 <sup>*</sup>
I <sub>2</sub> (50 μg/mL) 组 I <sub>2</sub> (50 μg/mL) group	170.14 ± 7.70 <sup>* *</sup>	7.85 ± 1.16 <sup>* *</sup>	76.13 ± 3.28 <sup>* *</sup>
I <sub>2</sub> (100 μg/mL) 组 I <sub>2</sub> (100 μg/mL) group	175.56 ± 2.55 <sup>* *</sup>	8.25 ± 0.94 <sup>* *</sup>	80.61 ± 3.95 <sup>* *</sup>

注: <sup>##</sup> $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\* \*</sup> $P < 0.01$ , 与模型对照组比较。

Note: <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs normal control; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\* \*</sup> $P < 0.01$  vs model control.

## 2.7 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞中 caspase-3 酶活性的影响

caspase-3 是细胞凋亡发生的标志性因子。如图 4 所示, 与正常对照组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导后 PC12 细

胞的 caspase-3 酶活性显著上升 ( $P < 0.01$ )。与模型对照组比较, 添加不同浓度的 I<sub>1</sub> 和 I<sub>2</sub> 后, caspase-3 酶活性均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 各剂量组平均酶活分别下降了 34.12% 和 45.57%。经 SNK 分析, I<sub>2</sub> 抑制 caspase-3 酶活性升高的效果优于 I<sub>1</sub>。

## 3 结论与讨论

PC12 细胞株源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤, 该细胞株可高分化为交感神经样细胞, 且同时具有神经分泌细胞和神经元的性质, 已被广泛用于神经细胞保护活性的研究<sup>[16]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为重要的 ROS 成分之一, 在细胞培养体系中可分解为氧自由基和羟基自由基, 引起神经细胞的氧化应激损伤, 由其诱导损伤的 PC12 细胞模型广泛用于神经细胞损伤的机制研究<sup>[17]</sup>。研究证实, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导细胞功能损伤具有浓度和时间依赖效应<sup>[18]</sup>。本实验发现, 不同的细胞接种浓度下, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的损伤效果不同。在 96 孔板中

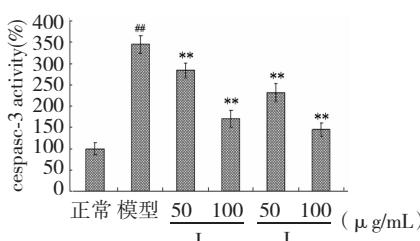


图 4 I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞 caspase-3 酶活性的影响 ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 4 Effects of I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> on caspase-3 activity in PC12 cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

注: <sup>##</sup> $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\* \*</sup> $P < 0.01$ , 与模型对照组比较。

Note: <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs normal control; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\* \*</sup> $P < 0.01$  vs model control.

PC12 细胞接种密度为  $1 \times 10^5$  个/mL 时, 80  $\mu\text{mol/L}$  浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 4 h, 可使细胞存活率降至 56.8%; 在 6 孔板中 PC12 细胞接种密度至  $5 \times 10^5$  个/mL 时, 200  $\mu\text{mol/L}$  浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 4 h, 可使细胞存活率降至 60% 左右。因此, 本实验采用以上两种浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导神经细胞氧化损伤模型。

ROS 是指一类化学活性分子家族, 主要包括  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、单线态氧( $\text{O}_2^\cdot$ )、羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )和超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )等。其中, 在机体神经系统异常代谢过程如多巴胺氧化、 $\beta$  淀粉样蛋白聚集和脑缺血再灌注等均会伴随大量的  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生, 而  $\text{H}_2\text{O}_2$  还可转化为毒性更大的  $\cdot\text{OH}$ , 并进一步通过引起神经细胞膜中的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化, 导致生物膜结构和功能的改变, 同时还通过损伤 DNA、RNA 和蛋白质等诱导神经细胞凋亡<sup>[19,20]</sup>。本实验中, 美国内参胶原蛋白肽  $I_1$  和  $I_2$  均能显著降低  $\text{H}_2\text{O}_2$  所致的 PC12 细胞的 ROS 水平、LDH 释放和 MDA 的产生, 提示不同分子量的美国内参胶原蛋白多肽, 可以通过清除细胞内 ROS, 抑制 ROS 引发的脂质过氧化反应, 减少脂质过氧化产物的产生, 保护神经细胞膜的完整性和受损神经细胞的正常生理功能。

正常生理条件下, 细胞内氧化系统与抗氧化系统处于动态平衡。SOD 是抵抗氧化应激的第一道防线, 可催化歧化超氧阴离子分解成  $\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。CAT 可进一步催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  转换为水和分子氧。GSH-Px 是依赖还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)代谢  $\text{H}_2\text{O}_2$  的另一种酶, 可催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成  $\text{H}_2\text{O}$ , 在清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  方面发挥重要的作用。目前采用外源性小分子抗氧化剂治疗 AD 仅取得了有限的治疗效果, 所以通过激活内源性抗氧化酶来降低 ROS 引起的神经系统的损害已经成为研究者关注的焦点<sup>[1]</sup>。王奕等研究发现日本刺参胶原蛋白多肽可显著提高光老化模型小鼠血清和皮肤中 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性<sup>[10]</sup>。与其结果类似, 本实验中,  $I_1$  和  $I_2$  均可显著提高  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导损伤的神经细胞中 SOD、CAT 和 GSH-Px, 提示美国内参胶原蛋白肽不仅通过清除 ROS 保护神经细胞, 还可以通过提高自身抗氧化酶活性从而增强神经细胞抵御氧化应激损伤的能力。

caspases 是一组在细胞凋亡过程中发挥重要的作用的半胱氨酸蛋白酶。其中 caspase-3 是细胞凋亡程序中的终末执行酶, 可水解底物 PARP, 促进细胞骨架降解和 DNA 片段化, 最终导致细胞凋亡<sup>[21]</sup>。

本实验中,  $I_1$  和  $I_2$  均可以显著抑制氧化损伤条件下 PC12 细胞 caspase-3 酶活性的升高, 此作用可能是其抑制神经细胞凋亡的分子机制中重要的一个靶点, 对其抑制 caspase-3 活化的信号通路仍需进一步探索验证。

水产品胶原蛋白肽已被证实具有广泛的抗氧化活性, 且其抗氧化活性与肽链的氨基酸组成和分子量大小关系密切<sup>[22]</sup>。目前报道的抗氧化肽分子质量大多分布在 3 kD 以下, 而发挥抗氧化能力的氨基酸主要有还原性氨基酸、疏水性氨基酸和酸性氨基酸等<sup>[14]</sup>。美国内参胶原蛋白肽中富含以上具有抗氧化活性的氨基酸, 其中还原性氨基酸的含量高达 29.69 mg/100mg, 疏水性氨基酸和酸性氨基酸的含量分别占总氨基酸含量的 32.98% 和 23.42%, 显示良好的抗氧化潜力。彭新颜等<sup>[23]</sup>研究发现, 经超滤后分子量在 1~4 kD 的蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽段  $\cdot\text{OH}$  清除率高达 55.1%, 显著优于超滤前水解物。与以往报道类似, 本实验中分子量 < 6 kD 的  $I_2$  具有更好的抗氧化活性, 但是在  $I_2$  组分中发挥抗氧化能力的肽的化学组成及空间结构仍需进一步探讨。

综上所述, 不同分子量的美国内参胶原蛋白肽均可通过降低细胞内氧化应激水平和提高自身抗氧化酶活性两条途径来抑制神经细胞的凋亡, 且低分子量的胶原蛋白肽抗氧化活性更优。

## 参考文献

- Zhao CY (赵春阳), Wang XL (王晓良), Peng Y (彭英). Role of Nrf2 in neurodegenerative diseases and recent progress of its activators. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2015, 50:375-384.
- Zhao Y, Zhao BL. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013:1-10.
- Kamat PK, Kalani A, Rai S, et al. Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease; understanding the therapeutics strategies. *Mol Neurobiol*, 2014, 53:1-14.
- Ansari MA, Scheff SW. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J Neuropath Exp Neur*, 2010, 69:155-167.
- Lu LJ, Chen L, Meng XT, et al. Biological effect of velvet antler polypeptides on neural stem cells from embryonic rat brain. *Chin Med J*, 2005, 118:38-42.
- Liu Q (刘琴), Song K (宋坤), Guo J (郭杰), et al. Protective effects of polysaccharide from seed watermelon on the

- oxidative damage of PC12 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:338-343.
- 7 Liu YM, Li ZY, Hu H, et al. Tenuifolin, a secondary saponin from hydrolysates of polygalasaponins, counteracts the neurotoxicity induced by A $\beta$ <sub>25-35</sub> peptides *in vitro* and *in vivo*. *Pharmacol Biochem Be*, 2015, 128:14-22.
- 8 Wang JF (王静凤), Pang L (逢龙), Xue Y (薛勇), et al. Protective effects of polysaccharides, triterpene glycosides and collagen polypeptides from *Apostichopus japonicus* on vascular endothelial cells. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2008, 24:227-232.
- 9 Wang Y (王奕), Wang JF (王静凤), Zhang J (张瑾), et al. Effect of collagen polypeptides from *Apostichopus japonicus* on melanogenesis in B16 melanoma cells. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2007, 29:401-404.
- 10 Wang Y (王奕), Wang JF (王静凤), Gao S (高森), et al. Protective effect of collagen polypeptides from *Apostichopus japonicus* on the skin of photoaging-model mice induced by ultraviolet irradiation. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2007, 39:64-67.
- 11 Chen HH (陈卉卉), Yu P (于平), Li JR (励建荣). The preparation of collagen polypeptide with free radical scavenging ability purified from *Acaudina molpadoides* Semper. *J Chin Inst Food Sci Tech* (中国食品学报), 2010, 10:19-25.
- 12 Liu ZY (刘尊英), Su YC, Zeng MY (曾名湧), et al. Antioxidant properties of low molecular weights collagen hydrolysates obtained from giant red sea cucumber. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31:75-78.
- 13 Sun J (孙杰), Sun WJ (孙文佳), Chen BD (陈北冬), et al. Effect of resveratrol on ROS production and PECAM-1 expression in ox-LDL-stimulated platelets. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2015, 31:1608-1614.
- 14 Wang JR (王嘉榕), Teng D (滕达), Tian ZG (田子罡), et al. Preparation and mechanism of functional antioxidant peptides. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20:371-375.
- 15 Wang G, Zhang J, Dewilde AH, et al. Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial LDH cytotoxicity assay. *Toxicology*, 2012, 299:99-111.
- 16 Zhang SH, Ye JL, Dong GX. Neuroprotective effect of baicalin on hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunction in PC12 Cells. *J Mol Neurosci*, 2010, 40:311-320.
- 17 Wu JL, Wang HY, Cheng YL, et al. Neuroprotective effects of torularhodin against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury and apoptosis in PC12 cells. *Pharmazie*, 2015, 70:17-23.
- 18 Green DR, Reed JC. Mitochondrial and apoptosis. *Science*, 1998, 281:1309-1312.
- 19 Hao CY (郝春艳). Study on the protective effect of Cordyceps composite nutrient solution in hydrogen peroxide-induced PC12 cell injury. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2014, 34:50-52.
- 20 Yang YC, Li CK, Lin AH, et al. Induction of glutathione synthesis and heme oxygenase 1 by the flavonoids butein and phloretin is mediated through the ERK/Nrf2 pathway and protects against oxidative stress. *Free Radical Bio Med*, 2011, 51:2073-2081.
- 21 Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM. Signaling path-ways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res*, 2003, 63:8037-8050.
- 22 Zheng ZJ (郑召君), Wu RJ (武如娟), Zhang RJ (张日俊). Biological functions of animal-derived antioxidative peptides and its relationship with the peptides structure. *Chin J Anim Nutr* (动物营养学报), 2015, 27:1034-1040.
- 23 Peng XY (彭新颜), Meng WJ (孟婉静), Zhou XR (周夕冉), et al. Antioxidant peptides of *Scomberomorus niphonius* skin and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of cooked patties. *J Fish China* (水产学报), 2015, 39:1730-1741.