

基于体外化学与细胞模型评价鲍内脏肽粉的抗氧化活性

吴靖娜^{1,2}, 潘南¹, 苏捷¹, 蔡水淋¹, 路海霞¹, 位绍红¹, 刘智禹¹

(1. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建厦门 361013) (2. 华侨大学生物化工学院, 福建厦门 361021)

摘要: 本文考察了鲍内脏肽粉对二苯基苦基苯肼自由基 (DPPH·)、羟自由基 (·OH)、超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 的清除能力, 结果发现, 鲍内脏肽粉对 DPPH·、·OH 和 $O_2^{\cdot-}$ 自由基具有一定的清除能力, 其 IC_{50} 值分别为 0.87 mg/mL、7.53 mg/mL 和 19.41 mg/mL。采用 H_2O_2 建立体外培养人肝癌细胞 (HepG2) 氧化应激损伤模型, 将细胞分为正常对照组, 模型组、 H_2O_2 加低 (1.6 mg/mL)、中 (3.2 mg/mL)、高 (6.4 mg/mL) 剂量组, 检测各组细胞存活率、总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、丙二醛 (MDA) 含量。结果发现, 1.6 mg/mL、3.2 mg/mL 和 6.4 mg/mL 3 个剂量水平的鲍内脏肽粉能显著提高 HepG2 细胞的存活率、T-AOC 和 SOD 活力, 显著抑制细胞的 MDA 含量, 且剂量-效应关系明显, 对 H_2O_2 氧化损伤 HepG2 细胞均具有一定的修复作用。结果表明, 鲍内脏肽粉具有较好的抗氧化活性。

关键词: 鲍内脏肽粉; 自由基; 细胞模型; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2015)12-26-31

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.005

Evaluation of Antioxidant Activity of Polypeptides from *Abalone* Viscera Using *In vitro* Chemistry and Cell Culture Model

WU Jing-na^{1,2}, PAN Nan¹, SU Jie¹, CAI Shui-lin¹, LU Hai-xia¹, WEI Shao-hong¹, LIU Zhi-yu¹

(1. Fisheries Research Institute of Fujian, Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361013, China) (2. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The scavenging activity of abalone visceral polypeptide (AVPP) against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH·), hydroxyl radical (·OH), and superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) was determined in this study. The results showed that AVPP exhibited certain free radical scavenging activity against DPPH·, ·OH, and $O_2^{\cdot-}$, with IC_{50} values of 0.87, 7.53, and 19.41 mg/mL, respectively. An oxidative stress injury model was established by human hepatoma cells (HepG2) treated with H_2O_2 . HepG2 cells were cultured *in vitro* and divided into five groups: control, model, low-dose AVPP (1.6 mg/mL), medium-dose AVPP (3.2 mg/mL), and high-dose AVPP (6.4 mg/mL). Cell viability, total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) activity, and malondialdehyde (MDA) levels in each group were measured. The results showed that the AVPP significantly increased HepG2 cell viability at doses of 1.6 mg/mL, 3.2 mg/mL, and 6.4 mg/mL. Additionally, the AVPP increased T-AOC and SOD activity and markedly reduced the MDA levels in a positive dose-response pattern. Thus, the results indicate that AVPP possesses excellent antioxidant capability.

Key words: abalone visceral polypeptide (AVPP); free radical; cell culture model; antioxidant activity

氧化应激指机体受到有害刺激, 体内产生过多的

收稿日期: 2015-03-16

基金项目: 国家海洋公益性科研专项 (201405016); 福建省科技重大专项 (2014NZ0001-1); 福建省海洋高新产业发展专项 ([2013] 011)

作者简介: 吴靖娜 (1984-), 女, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向: 水产品加工与综合利用研究

通讯作者: 刘智禹 (1972-), 男, 博士, 教授级高工, 研究方向: 水产品加工与综合利用研究

自由基而引起组织器官的损伤。人体内产生的自由基种类很多, 其中活性氧 (ROS) 与氧化应激密切相关, 其是生物有氧代谢过程中产生的一类化学性质活泼的含氧代谢物, ROS 的积累会破坏生物大分子的结构和功能, 从而引起一系列的病理过程^[1]。随着人们生活水平的提高, 抗氧化问题越来越受到人们的关注, 目前临床证实有效且应用较多的外源性抗氧化活性物质有维生素 C、维生素 E、D-甘露醇等。近年来, 随着

海洋生物资源开发研究的不断深入,通过补充海洋生物来源的抗氧化活性因子调整自由基的平衡,已成为机体氧化损伤修复的研究热点^[2~3]。鲍内脏含有丰富的蛋白质、维生素等营养成分及一些生物活性物质,我们前期工作中已对鲍内脏肽粉(AVPP)的制备工艺进行了研究,初步验证了其具有一定的抗氧化功效,因此,本文以期采用体外化学与细胞模型评价鲍内脏肽粉的抗氧化活性。

自由基清除、脂质过氧化抑制及还原能力等化学方法广泛地应用于评价物质的抗氧化活性,然而这些方法不能真实地模拟或反映机体的生理环境,未充分考虑生物药效和新陈代谢问题,说服力存在不足^[4]。同时,相对于整体动物模型和人体临床实验来说,细胞模型评价物质的抗氧化活性不仅花费较低、周期较短,还可以模拟人体的动态生理体系,建立与人体较为相似的模型^[5]。因此,从细胞水平评价物质的生物活性得到了广泛应用,如 Kim S Y^[6]等采用了 H₂O₂ 诱导的人胚肺细胞氧化损伤模型探讨了鳕鱼多肽的抗氧化功效,刘安军等^[7]研究了胶原蛋白多肽铬(CPCC)对四氧嘧啶损伤肝细胞 HL-7702 的保护作用,并探讨其作用机理。

建立成功可靠的氧化应激模型,对于研究和筛选抗氧化药物和功能食品具有重要意义。肝脏含有丰富的线粒体,是 ROS 攻击的主要器官,氧化应激是肝细胞损伤的共同途径^[8]。HepG2 细胞来源于人肝胚细胞瘤,其所含有的生物代谢酶与正常肝细胞具有同源性,分化程度较高,被广泛用于构建体外细胞氧化应激模型^[9]。H₂O₂ 是一种氧化作用很强的活性氧,极易透过细胞膜并与细胞内铁离子通过 Fenton 发生反应形成高活性的自由基,从而导致一系列反应^[10],利用 H₂O₂ 氧化损伤细胞已成为研究各类细胞氧化损伤的重要工具。因此,本实验在开展 AVPP 清除自由基活性研究的基础上,进一步采用 H₂O₂ 诱导人肝癌细胞(HepG2)氧化损伤模型对其抗氧化活性进行评价,以期天然产物中肽类的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲍内脏肽粉(AVPP):福建省水产研究所研制, HepG2 (人肝癌细胞 human hepatoma cells):上海美轩生物科技有限公司。

主要药品和试剂:还原型谷胱甘肽(GSH)、维生素 C (Vc)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH):上海晶纯生化科技股份有限公司;羟自由基(·OH)测

试盒、超氧阴离子自由基(O₂·)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、总抗氧化能力(T-AOC)测试盒:南京建成生物工程研究所;胰蛋白酶、胎牛血清:美国 Gibco 公司;DMEM 培养基:美国 Corning 公司;青霉素、链霉素、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒:碧云天生物技术。

1.2 仪器和设备

HH-6 恒温水浴锅:国华电器有限公司;UV-3200 紫外-可见分光光度计:上海美谱达;170-3930 冷冻离心机:美国 BIO-RAD 公司;5810R 台式高速大容量冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司;311CO₂ 培养箱、MultiSkan3 酶标仪:美国 Thermo 公司;164-5050 超净工作台:苏州净化设备有限公司;37XB 倒置显微镜:上海光学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 AVPP 体外化学抗氧化活性测定

DPPH·清除能力参考文献^[11]。样品溶液的配制:将 AVPP 分别配成浓度为 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mg/mL 的工作液;GSH 和 Vc 对照溶液的配制:将 GSH 和 Vc 分别配成浓度为 0.04、0.05、0.06、0.08、0.10 mg/mL 的工作液。

·OH 清除能力参照检测试剂盒的操作说明。样品溶液的配制:将 AVPP 分别配成浓度为 2.00、4.00、8.00、16.00、32.00 mg/mL 的工作液;GSH 和 Vc 对照溶液的配制:将 GSH 和 Vc 分别配成浓度为 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mg/mL 的工作液。

O₂·清除能力参照检测试剂盒的操作说明。样品溶液的配制:将 AVPP 分别配成浓度为 1.00、4.00、8.00、16.00、32.00 mg/mL 的工作液;GSH 对照溶液的配制:将 GSH 分别配成浓度为 1.00、4.00、8.00、16.00、32.00 mg/mL 的工作液;Vc 对照溶液的配制:将 Vc 分别配成浓度为 0.20、0.40、0.50、1.00、2.00 mg/mL 的工作液。

半数抑制浓度 IC₅₀ 值是抑制率为 50%时抗氧化剂所对应的浓度值。分别以 AVPP、Vc 和 GSH 质量浓度对 DPPH·、·OH 和 O₂·清除能力作图并进行线性拟合,计算 IC₅₀ 值。

1.3.2 HepG2 细胞模型评价 AVPP 抗氧化活性

1.3.2.1 细胞(HepG2)的复苏与培养

参考文献^[12],将 HepG2 细胞从液氮中取出,置 37 °C 温水迅速融化,2000 r/min 离心 3 min,弃液体,用 PBS 液洗涤细胞,离心后,将 HepG2 细胞按 5×10⁵

个/mL 接种到含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、10 mmol/L Hepes 缓冲液(pH 7.2)、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。细胞为多角形贴壁生长, 每 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3.2.2 噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活率

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{样品OD值}}{\text{对照OD值}} \times 100$$

用 DMEM 培养基配制抗氧化肽浓度至 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6。取状态良好的 HepG2 细胞进行消化, 按照 5×10^3 个/mL 密度接种于 96 孔板上, 每孔 50 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 至细胞贴壁。吸去培养基, PBS 清洗 2 遍, 加入含有不同浓度抗氧化肽的 DMEM 培养基, 每个浓度设置 6 个平行, 同时设置正常对照组 (DMEM 培养基), 继续培养细胞 24 h。然后每孔加入 10 μ L 5 mg/mL 的 MTT, 孵育 4 h, 每孔加入 100 μ L Formazan 溶解液, 在细胞培养箱内继续孵育, 至普通光学显微镜下观察 formazan 全部溶解。用酶标仪测定各孔在波长 570 nm

处的吸光度。

1.3.2.3 HepG2 细胞氧化应激模型的构建

参照文献^[12], 取对数生长的 HepG2 细胞, 以 5×10^3 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 每孔 50 μ L, 待细胞生长达到 80%融合时弃去细胞培养液, 除正常对照组细胞外, 均加入 100 μ mol/L 的 H₂O₂ 溶液, 置于细胞培养箱损伤约 4 h。

1.3.2.4 AVPP 对 HepG2 细胞氧化损伤的修复作用

在 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化应激模型中, 除正常对照组、模型组外, 细胞分别经低 (1.6 mg/mL)、中 (3.2 mg/mL)、高剂量 (6.4 mg/mL) AVPP 处理之后, 培养 12 h, 进行 MTT、MDA、T-AOC、T-SOD 的检测。

1.3.2.5 总蛋白浓度、MDA、SOD、T-AOC 的测定

总蛋白浓度: 参照检测试剂盒的操作说明, 以 OD 值为 x, 以牛血清蛋白 (BSA) 标准品浓度为 y (mg/mL), 得到回归方程为 $y = 2.612x - 0.302$, $R^2 = 0.992$ 。

MDA 参照测试盒的操作说明,

$$\text{MDA含量(nmol/mgprot)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度(10nmol/mL)} \div \text{待测样品蛋白浓度(mgprot/mL)}$$

SOD 参照测试盒的操作说明,

$$\text{SOD活力(U/mgprot)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{对照OD值}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量(mL)}} \div \text{待测样品蛋白浓度(mgprot/mL)}$$

T-AOC 参照测试盒的操作说明,

$$\text{T-AOC能力} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{0.01 \times 30} \times \frac{\text{反应液体积}}{\text{取样量}} \times \text{样品测定前稀释倍数} \div \text{待测样品蛋白浓度(mgprot/mL)}$$

1.3.3 数据分析

采用 SPSS 16.0 软件对数据进行处理, 用单因子方差分析 (One-way ANOVN, Duncan) 进行差异显著性分析, 数据以均值 $\pm$ 标准差(X $\pm$ SD)表示。

2 结果与讨论

2.1 AVPP 的体外化学抗氧化活性

以常见的抗氧化剂 GSH 和 Vc 作为对照, AVPP 的 DPPH $\cdot$ 、 $\cdot$ OH 和 O₂ $\cdot^-$ 自由基清除能力测定结果见表 1。由表可发现, AVPP 的 DPPH $\cdot$ 、 $\cdot$ OH 和 O₂ $\cdot^-$ 清除能力的 IC₅₀ 值分别为 0.87、7.53 和 19.41 mg/mL; 与 GSH 相比, 分别高出了 0.80、7.18 和 2.50 mg/mL, 与 Vc 相比, 分别高出了 0.79、7.32 和 18.52 mg/mL。ROS 是需氧细胞在代谢过程中产生的一系列活性氧簇, 其包括过氧化氢 (H₂O₂)、羟自由基 ($\cdot$ OH) 和一氧化氮自由基 (NO $\cdot$) 等。在病理条件下, ROS 产生过多会引起氧化应激, 导致动脉粥样硬化、糖尿病等多种疾

病的产生。因此, 清除自由基和 ROS 成为防御各种疾病的有效方式之一。DPPH $\cdot$ 是一种稳定的自由基, 易与具有氢键供体的化合物发生电子转移反应; $\cdot$ OH 具有很高的电子还原电势, 能与生物体内所有物质发生反应, 对生物大分子产生最强的氧化破坏效应; O₂ $\cdot^-$ 在生物体内可长时间攻击靶向目标, 对细胞有较强的氧化毒性, 对 DPPH $\cdot$ 、 $\cdot$ OH 和 O₂ $\cdot^-$ 自由基清除能力的测定已成为评价天然产物抗氧化活性的重要组成部分^[13]。实验结果显示, AVPP 能有效地清除 DPPH $\cdot$ 、 $\cdot$ OH 和 O₂ $\cdot^-$ 3 种自由基, 其中 DPPH $\cdot$ 清除能力优于 $\cdot$ OH、O₂ $\cdot^-$ 清除能力, O₂ $\cdot^-$ 清除能力与 GSH 的 O₂ $\cdot^-$ 清除能力相近; 欧柳舒等^[14]采用木瓜蛋白酶与中性蛋白酶复合酶解获得鮑性腺小肽, 其 DPPH 的 IC₅₀ 值为 6.8 mg/mL; 赵强忠^[15]等采用胰酶对秋刀鱼蛋白进行酶解制备抗氧化肽, 其清除 DPPH $\cdot$ 的 IC₅₀ 为 3.32 mg/mL, 清除 O₂ $\cdot^-$ 的 IC₅₀ 为 5.08 mg/mL, 虽然与传统的抗氧化剂 Vc 和 GSH 相比, 其清除能力还是较弱, 但与其他

水产动物蛋白相比, 仍是显现出一定的抗氧化活性。

表1 AVPP、GSH 和 V_C 的 DPPH·、·OH 和 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力的 IC_{50} 值

Table 1 IC_{50} values of the scavenging activity against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, hydroxyl, and superoxide radicals

组别	$IC_{50}/(mg/mL)$		
	DPPH·	·OH	$O_2^{\cdot-}$
AVPP	0.87	7.53	19.41
GSH	0.07	0.35	16.91
V_C	0.06	0.21	0.89

2.2 AVPP 对 HepG2 细胞存活率的影响

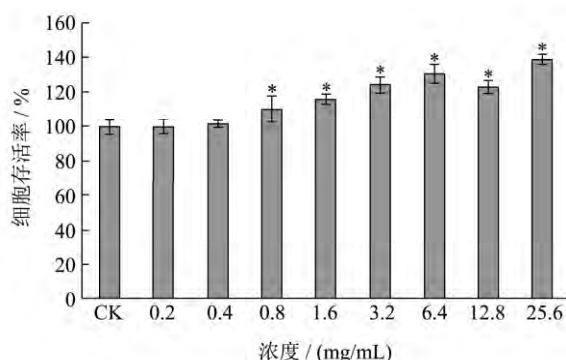


图1 AVPP 对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of AVPP on the viability of HepG2 cells

注: * $p < 0.01$, 相对于空白组有差异。

由图 1 可知, 当浓度 < 0.4 mg/mL 时, AVPP 对 HepG2 细胞的增殖没有显著影响, 当浓度 > 0.8 mg/mL 时, AVPP 对 HepG2 细胞有显著的增殖作用, 且浓度越高, 促进效果越明显。本实验的受试样品为淡黄色, 当浓度太高时会干扰 OD 值的吸收, 使得细胞存活率偏高。实际经光学显微镜检验发现 12.8、25.6 mg/mL 2 个浓度的细胞数量相对于其他浓度有所减少, 这可能是由于高浓度的 AVPP 造成细胞膜受损, 对细胞有一定的毒性作用, 因此选择 1.6、3.2 和 6.4 mg/mL 3 个浓度进行后续氧化损伤修复实验。

2.3 AVPP 对 HepG2 细胞氧化损伤的修复作用

由图 2 可知, H_2O_2 能抑制 HepG2 细胞生长, 与正常对照组相比, 模型组的细胞存活率降低了 4.87%, 但未达到显著水平 ($P > 0.01$); H_2O_2 损伤 HepG2 细胞经低剂量 (1.6 mg/mL)、中剂量 (3.2 mg/mL)、高剂量 (6.4 mg/mL) 的 AVPP 处理后, 细胞存活率分别提高了 43.24%、66.11% 和 79.37% ($P < 0.01$), 不同剂量组的 AVPP 对 H_2O_2 损伤的 HepG2 细胞均具有显著的修复作用, 而且其保护作用随着浓度的增加而显著提高 ($P < 0.01$), 剂量-效应关系明显。

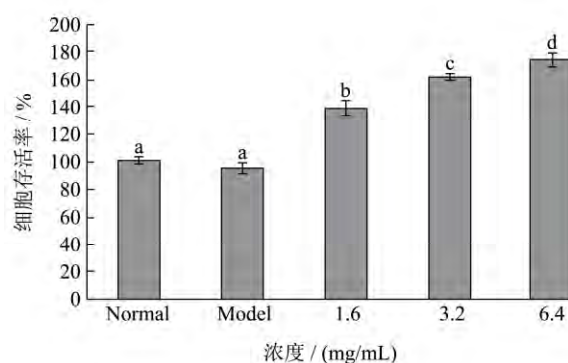


图2 AVPP 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.2 Effects of AVPP on the viability of HepG2 cells under H_2O_2 -induced oxidative stress

注: 同列数值中标注不同字母表示对应组间差异显著 ($P < 0.05$); 反之, 标注相同字母表示对应组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

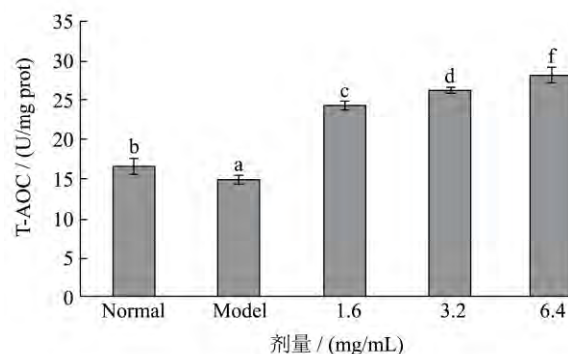
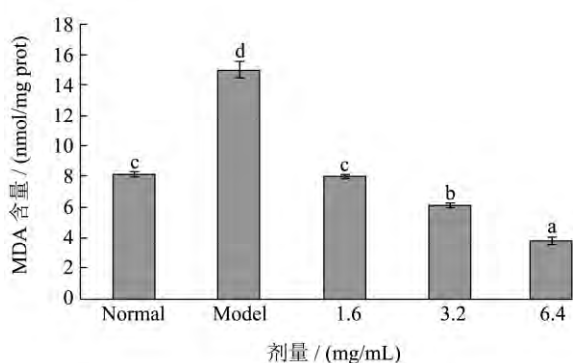
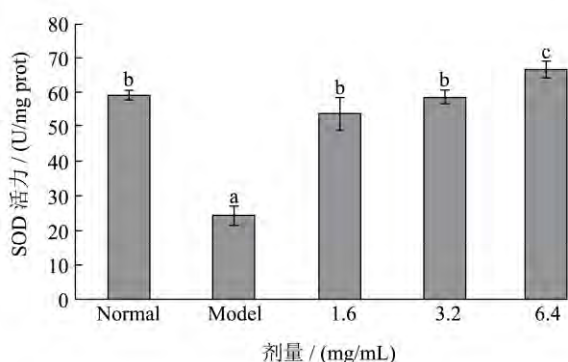


图3 AVPP 对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞的 T-AOC 的影响

Fig.3 Effect of AVPP on the total antioxidant capacity of HepG2 cells under H_2O_2 -induced oxidative stress

由图 3 可知, HepG2 细胞经 H_2O_2 处理后, T-AOC 显著低于正常对照组 ($P < 0.01$), T-AOC 降低了 1.76 U/mg prot; 与 H_2O_2 模型组相比, 低、中、高 AVPP 剂量组的 T-AOC 分别升高了 9.31、11.19 和 13.09 U/mg prot ($P < 0.01$), 不同剂量组的 AVPP 均能够上调 H_2O_2 损伤的 HepG2 细胞的 T-AOC 水平, 且呈现出显著的量效关系。

由图 4 可知, H_2O_2 导致 HepG2 细胞发生了显著的过氧化反应 ($P < 0.01$), 其 MDA 含量较正常对照组细胞高出了 6.80 nmol/mg prot; AVPP 处理组 MDA 含量显著低于模型组 ($P < 0.01$), 与模型组相比, 低、中、高 AVPP 剂量组细胞的 MDA 含量分别下降了 6.96、8.84 和 11.14 nmol/mg prot, 表明 AVPP 能显著抑制 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞过氧化损伤, 而且其拮抗氧化作用随浓度的提高而显著增强 ($p < 0.01$), 具有明显的剂量-效应关系。

图4 AVPP对H₂O₂诱导HepG2细胞的MDA的影响Fig.4 Effect of AVPP on the malondialdehyde level of HepG2 cells under H₂O₂-induced oxidative stress图5 AVPP对H₂O₂诱导HepG2细胞的SOD的影响Fig.5 Effect of AVPP on the superoxide dismutase activity of HepG2 cells under H₂O₂-induced oxidative stress

由图5可知, H₂O₂破坏了HepG2细胞的正常生理功能, 表现为细胞的SOD活力显著下降($P < 0.01$), 较正常对照组降低了34.59 U/mg prot; 细胞经低、中、高AVPP剂量组处理后, 细胞的SOD活力均显著提高, 与H₂O₂模型组相比, SOD活力分别提高了29.13、33.92和42.10 U/mg prot, 且剂效关系明显。

从试验结果显示, 当H₂O₂作用HepG2细胞浓度为100 μ mol/L, 作用时间为4 h时, 细胞存活率没有显著降低, 而细胞T-AOC活力、MDA含量、SOD活性都发生了显著变化, 说明在此浓度下, HepG2细胞内的脂质和酶系都发生了显著变化, 但是这种损伤不会造成细胞死亡, Scolastici等^[16]也报道100 μ mol/L H₂O₂作用HepG2细胞DNA也出现显著性损伤, 然而细胞存活率没有产生变化。这些结果表明, 100 μ mol/L H₂O₂导致HepG2细胞氧化抗氧化失衡, 处于氧化应激状态。

本研究低、中、高剂量的AVPP均对细胞有一定的增殖作用, 且剂量-效应关系明显, 魏彬彬^[17]研究发现对虾肽的美拉德产物对HepG2细胞的增殖有显著的促进作用, 且浓度越高, 细胞增殖的促进效果越明显, Zhang X^[18]等研究表明羟基酪醇能促进丙烯酰胺

氧化损伤的HepG2细胞的增殖; 同时, 结果表明低、中、高剂量的AVPP能有效地降低细胞的MDA含量, 对细胞的氧化损伤具有一定的保护作用; 另一方面, 还能上调细胞内抗氧化酶的活性从而增强细胞抵御氧化损伤的能力; 因此推测, AVPP对H₂O₂诱导的HepG2细胞损伤有一定的保护作用, 而关于其具体是通过哪条信号通路来发挥其抗氧化作用, 仍须进一步深入研究。

3 结论

经体外化学与细胞模型研究鲍内脏多肽的抗氧化活性, 试验结果表明, AVPP可有效地清除DPPH·、·OH和O₂·⁻自由基, 可促进氧化损伤的HepG2细胞增殖, 显著提高细胞的T-AOC和SOD活性, 降低细胞的MDA含量, 对氧化损伤细胞具有显著的保护作用, AVPP具有一定的抗氧化活性。

参考文献

- [1] Roberts C K, Sindhu K K. Oxidative stress and metabolic syndrome [J]. Life Sciences, 2009, 84(21): 705-712
- [2] Gimenez B, Aleman A, Montero P, et al. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid [J]. Food Chemistry, 2009, 114(3): 976-983
- [3] Bougateg A, Nedjar-Arroume N, Manni L, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinella (*Sardinella aurita*) by-products proteins [J]. Food Chemistry, 2010, 118(3): 559-565
- [4] Liu R H, Finley J. Potential cell culture models for antioxidant research [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(10): 4311-4314
- [5] 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
- [6] Kim S Y, Je J Y, Kim S K. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(1): 31-38
- [7] 刘安军, 陈影, 张国蓉. 胶原蛋白多肽铬对四氧嘧啶损伤肝细胞的保护作用[J]. 现代食品科技, 2008, 24(2): 101-104

LIU An-jun, CHEN Ying, ZHANG Guo-rong. Protective Effect of collagen polypeptide-chromium chelate in alloxan-treated HL 7702 hepatocytes [J]. Modern Food

- Science and Technology, 2008, 24(2): 101-104
- [8] Tribble D L, Aw T Y, Jones D P. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury [J]. Hepatology, 2005, 7(2): 377-386
- [9] Queguineur B, Goya L, Ramos S, et al. Phloroglucinol: antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(8): 2886-2893
- [10] Park W H. H₂O₂ inhibits the growth of human pulmonary fibroblast cells by inducing cell death, GSH depletion and G1 phase arrest [J]. Molecular Medicine Reports, 2013, 7(4): 1235-1240
- [11] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity [J]. Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2): 211-219
- [12] 韩飞, 周孟良. 过氧化氢诱导 HepG2 细胞产生氧化应激细胞模型的建立 [J]. 食品科学, 2011, 32(5): 55-57
- HAN Fei, ZHOU Meng-liang. An experimental HepG2 Cell model of hydrogen peroxide induced DNA oxidative injury [J]. Food Science, 2011, 32(5): 55-57
- [13] 曾维才, 石碧. 天然产物抗氧化活性的常见评价方法 [J]. 化工进展, 2013, 32(6): 1205-1213
- ZENG Wei-cai, SHI Bi. Common methods of antioxidant activity evaluation for natural products A review [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2013, 32(6): 1205-1213
- [14] 欧柳舒, 沈建东, 翁凌, 等. 鲍鱼性腺小肽的制备及抗氧化活性的初步研究 [J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2014, 19(1): 13-19
- OU Liu-shu, SHEN Jian-dong, WENG Ling, et al. Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from pacific abalone (*haliotis discus hannai*) gonads [J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2014, 19(1): 13-19
- [15] 赵强忠, 刘丹. 秋刀鱼抗氧化肽制备及其抗氧化活性的研究 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(10): 165-171
- ZHAO Qiang-zhong, LIU Dan. Preparation of antioxidant peptides from pacific saury and characterization of their antioxidant activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(10): 165-171
- [16] Scolastici C, de Lima R O A, Barbisan L F, et al. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test [J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22(2): 510-514
- [17] 魏彬彬. 对虾肽美拉德反应产物及其分离组分的理化特性与抗氧化活性研究 [D]. 中国海洋大学, 2013
- WEI Bin-bin. Study on the physicochemical characterization, antioxidative capacity and isolation of Maillard reaction products from shrimp peptides [D]. Ocean University of China, 2013
- [18] Zhang X, Cao J, Jiang L, et al. Protective effect of hydroxytyrosol against acrylamide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells [J]. Mutat. Res., 2009, 664(1-2): 64-68

(上接第 25 页)

- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Chemistry, 1976, 72: 248-254
- [21] Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acid [J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54: 484-489
- [22] Therho T T, Hartiala K. Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans [J]. Analytical Biochemistry, 1971, 41: 471-476
- [23] Thomas A Good, Samuel P Bessman. Determination of glucosamine and galactosamine using borate buffers for modification of the Elson-Morgan and Morgan-Elson reactions [J]. Analytical Biochem, 1964, 9(3): 253-262
- [24] Ibrahim W, Lee C C, Yeh J, et al. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: Effects of dietary lipid, vitamin E and iron [J]. Journal of Nutrition, 1997, 127: 1401-1406
- [25] Rico CW, Shin J H, Um I C, et al. Cholesterol-lowering action and antioxidative effects of microbial gum in C57BL/6N mice fed a high fat diet [J]. Biotech. and Bioprocess Engineering, 2011, 16: 167-172
- [26] Cardozo M G, Medeiros N, Lacerda D D, et al. Effect of chronic treatment with conventional and organic purple grape juices (*Vitis labrusca*) on rats fed with high-fat diet [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2013, 33(8): 1123-1133