

花生多肽的制备及其对氧化损伤模型小鼠抗氧化作用的研究

陈贵堂¹, 赵立艳², 丛涛³, 赵霖³, 鲍善芬³

(1. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009 2. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095

3. 中国人民解放军总医院营养科微量元素研究室, 北京 100853)

摘要: 采用 Alcalase 蛋白酶水解花生蛋白制备花生多肽, 将 40 只昆明小鼠随机分为四组(对照组、模型组、高低剂量多肽组), 除对照组外, 其余三组每日分别皮下注射 400mg/kg bw D-半乳糖建立过氧化损伤模型; 多肽组分别用花生多肽水溶液灌胃(400、800mg/kg bw), 实验周期 32d。实验结束, 处死动物, 取脾脏及胸腺称重, 计算脏器指数; 测定血清及肝脏中丙二醛(MDA)含量, 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果表明, 花生多肽使小鼠胸腺指数和脾脏指数升高, 血清 MDA 含量明显下降, GSH-Px 活力显著提高; 并且使肝组织中 MDA 含量明显下降, SOD 与 GSH-Px 活力明显提高, 提示花生多肽具有较强的抗氧化作用。

关键词: 花生多肽; D-半乳糖; 小鼠; 抗氧化

Preparation of Peanut Polypeptide and It's Antioxidative Effects in D-galactose Induced Oxidative Injury Mice

CHEN Gui-tang¹, ZHAO Li-yan², CONG Tao³, ZHAO Lin³, BAO Shan-fen³

(1. College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

3. Nutrition Department of Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: To study the preparation and the effect of peanut polypeptide on antioxidative system of mice with oxidative injury model induced by D-galactose, forty Kunming mice were divided into four groups, namely control group, oxidative injury model group, low or high dosage of peanut polypeptide treatment group. Except the control group, all other groups were subcutaneously injected with D-galactose solution (40mg/ml, 0.1ml/10g bw) daily for successive 32 days. At the same time, mice in the peanut polypeptide treatment groups were orally given peanut polypeptide in the dosage of 400mg/kg bw and 800mg/kg bw, respectively. Then the malondialdehyde (MDA) contents, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in serum and in liver were assayed respectively. In addition, the spleen and thymus gland were also separated to determine their indices. The results showed that thymus index and spleen index significantly decreases. While MDA content significantly increases and the activity of GSH-Px significantly decreases both in serum and in liver of oxidative injury mouse model. Both 400mg/kg and 800mg/kg peanut polypeptide administrations have made thymus index and spleen index significantly increase, MDA content significantly decreased and GSH-Px activity significantly increase in serum and in liver. The dosage of 800mg/kg also significantly increased the liver SOD activity. It showed that polypeptide has significantly antioxidative activity with the mechanism probably connected with rising immunity, oxygen free radicals elimination and anti-lipid peroxidation.

Key words peanut polypeptide; D-galactose; mice; antioxidative effect

中图分类号: Q516

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0324-04

近年研究发现, 食物蛋白质的酶解产物中存在一些具有广泛生理调节作用的短肽, 如促钙吸收的酪蛋白磷酸肽、阿片样肽、抗血栓肽、降血压肽、抗氧化肽、免疫促进肽等, 这些生物活性肽的功能引起了高度关

注, 特别是具有减轻过氧化损伤作用的抗氧化肽已成为当前生物活性肽领域引人注目的研究方向之一。

从食品蛋白质中制取的生物活性肽大都安全可靠, 无副作用, 因此对其作用机理以及结构的深入研究可以

收稿日期: 2006-03-31

作者简介: 陈贵堂(1977-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品营养与功能食品。

为新功能性食品的开发寻找新的途径。本文选用资源丰富的花生蛋白,通过酶解制备花生多肽,并观察其对D-半乳糖诱导的氧化损伤模型小鼠免疫器官及抗氧化系统的影响,为花生多肽作为功能性营养强化剂的可行性分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

花生蛋白 山东济宁春秋植物蛋白有限公司。

雄性昆明种小鼠,40只,体重20~25g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

蛋白酶Alcalase2.4L(丹麦NOVO公司),武汉肽类物质研究所;D-半乳糖中国医药集团上海化学试剂公司;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒 南京建成生物工程研究所。细胞色素C、胰岛素、乙氨酰-乙氨酰-酪氨酰-精氨酸 Sigma公司;杆菌肽 Fluka公司。

1.2 方法

1.2.1 花生多肽的制备

定量花生蛋白溶解于蒸馏水中,使之浓度为8%,90℃水浴加热20min后调至55℃,用1.0N NaOH溶液调节pH值为7.5,加入蛋白酶Alcalase2.4L进行酶解,酶添加量3%(E/S)。在酶解过程中不断加入1.0N NaOH溶液使pH值保持恒定,6h后将酶解液置于沸水浴中加热3min使酶失活,立即冷却过滤,滤液经真空干燥后备用。

1.2.2 花生多肽分子量测定

采用Agilent 1100 高效液相色谱仪,配紫外检测器和配有GPC 数据处理软件的色谱工作站。工作条件:色谱柱TSK-Gel G2000SWXL(7.8×300mm);流动相为乙腈:水:三氟乙酸=20:80:0.1;检测波长220nm;柱温25℃;流速0.5ml/min;检测时间30min。样品用流动相溶解,过孔径0.45μm有机膜后上样,上样量为5μl。

将分子量标准品(细胞色素C, MW12384;胰岛素, MW5733;杆菌肽, MW1422;乙氨酰-乙氨酰-酪氨酰-精氨酸, MW451)溶液在上述色谱条件下进行分析。然后用GPC 数据处理软件,将样品的色谱图数据代入标准品校正曲线进行计算,即可得到样品的分子量及其分布范围,用峰面积归一法可计得不同分子量范围肽的相对百分比。

1.2.3 动物分组及饲养

雄性昆明小鼠40只,体重20~25g,随机分为四组,即正常对照组、D-半乳糖致氧化损伤模型组,花生多肽低剂量组和花生多肽高剂量组。除正常对照组外,其余各组小鼠每天皮下注射D-半乳糖400mg/kg bw,

持续32d,对照组小鼠则每d皮下注射等量生理盐水,花生多肽低剂量和高剂量组每天分别按400、800mg/kg bw的剂量灌胃,正常对照组及模型组用等量蒸馏水灌胃,每3d称重1次。

1.2.4 样品制备及检测

在第32d注射D-半乳糖和灌胃花生多肽2h后,自眼眶取血,4000r/min离心15min、分离血清,在24h内检测血清SOD、GSH-Px活性及MDA含量。解剖小鼠,迅速取出肝、肾、脾及胸腺,生理盐水冲洗后用滤纸吸去水分,称重后计算脏器指数。取0.2g肝组织,剪碎后置于玻璃匀浆器中,加9倍体积冷生理盐水,制成10%(W/V)的肝组织匀浆,3000r/min离心10min,取上清液进行肝细胞SOD、GSH-Px活性及MDA含量的测定。

脏器指数的计算采用以下公式:脏器指数(mg/g)=脏器重量/小鼠体重。血清和肝脏MDA含量采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[1]测定;SOD采用黄嘌呤氧化酶法^[2]测定;GSH-Px活性采用DTNB法^[3]测定;肝脏匀浆中蛋白质含量用福林-酚法^[4]测定。

1.3 统计分析

实验数据以平均值±标准误表示,用SPSS11.0软件包进行单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。

2 结果与分析

2.1 花生多肽的分子量范围

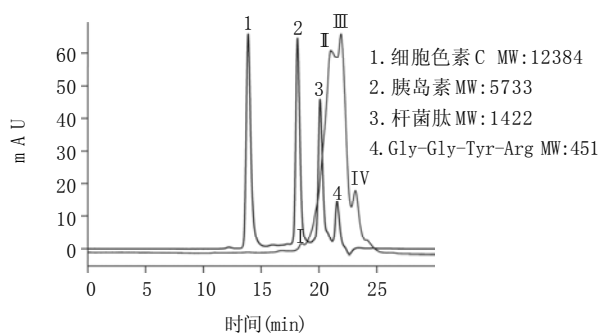


图1 花生多肽的分子量测定(波长为220nm)

Fig.1 Determination of molecular weight of peanut polypeptide ($\lambda=220\text{nm}$)

表1 花生多肽的分子量范围
Table 1 Molecular weight of peanut polypeptide

| 峰号 | 保留时间(min) | 峰面积 | 分子量 | 百分比(%) |
|-----|-----------|--------|------|--------|
| I | 18.506 | 39.8 | 2523 | 1.49 |
| II | 21.039 | 1404.9 | 884 | 52.59 |
| III | 21.912 | 939.9 | 612 | 35.19 |
| IV | 23.154 | 286.6 | 366 | 10.73 |

花生多肽的分子量范围如图1和表1所示。可见,花生蛋白经蛋白酶Alcalase水解的产物是多种小肽的混

表2 花生多肽对小鼠体重及脾和胸腺指数的影响

Table 2 Effects of peanut polypeptide on body weight gain and indices of spleen and thymus gland of mice

| 组别 | 对照组 | 氧化损伤模型组 | 低剂量多肽组 | 高剂量多肽组 |
|---------------|-------------|---------------|--------------|--------------|
| 初始体重(g) | 27.2±0.4 | 27.2±0.5 | 27.2±0.5 | 27.3±0.4 |
| 终体重(g) | 34.4±0.6 | 30.5±0.7** | 32.2±1.0 | 33.0±1.0 |
| 体重增长量(g/32d) | 7.2±0.6 | 3.3±0.5** | 5.0±0.9 | 5.8±1.0* |
| 脾脏重量(g) | 0.142±0.004 | 0.101±0.004** | 0.124±0.005* | 0.129±0.007* |
| 脾脏指数(mg/g bw) | 4.15±0.13 | 3.30±0.12** | 3.87±0.19* | 3.90±0.16* |
| 胸腺重量(g) | 0.075±0.005 | 0.044±0.003** | 0.064±0.006* | 0.067±0.003* |
| 胸腺指数(mg/g bw) | 2.20±0.16 | 1.44±0.12** | 2.00±0.18* | 2.06±0.14* |

注: * 与对照组相比 $p < 0.05$, ** 与对照组相比 $p < 0.01$; * 与衰老模型组相比 $p < 0.05$, ** 与衰老模型组相比 $p < 0.01$ 。

合物,其分子量基本在300~2600范围内,其中分子量在1000以下的约占98.5%,这部分组份由8肽以下的小肽组成,许多功能性小肽多集中在这部分。

2.2 花生多肽对小鼠体重及脾、胸腺指数的影响

由表2可见,与正常对照组相比,氧化损伤模型小鼠最终体重以及脾脏指数和胸腺指数非常显著降低($p < 0.01$),而肝脏指数与肾脏指数无显著差异($p > 0.05$)。与模型对照组相比,两个剂量花生多肽处理组小鼠最终体重及脾脏指数和胸腺指数显著增高($p < 0.05$)。

2.3 血清MDA含量及SOD和GSH-Px活性

表3 花生多肽对小鼠血清MDA含量及血清SOD、GSH-Px活性的影响

Table 3 Effects of peanut polypeptide on serum MDA content and SOD, GSH-Px activity

| 组别 | 对照组 | 氧化损伤模型组 | 低剂量多肽组 | 高剂量多肽组 |
|------------------|----------|------------|----------|-----------|
| MDA (nmol/ml) | 4.0±0.34 | 5.6±0.3b** | 4.8±0.3 | 4.2±0.3** |
| SOD (U/ml) | 266±42 | 236±52 | 300±43 | 231±139 |
| GSH-Px (U/0.1ml) | 1123±53 | 570±74** | 798±35** | 847±56** |

注: ** 与对照组比较 $p < 0.01$; ** 与衰老模型组比较 $p < 0.01$ 。

如表3所示,D-半乳糖致氧化损伤模型小鼠血清中MDA浓度极显著高于对照,花生多肽特别是高剂量组花生多肽处理组小鼠血清MDA浓度显著低于模型组。各组小鼠血清SOD活性差别很大,但并无统计学差异。衰老模型组小鼠血清GSH-Px活性显著低于对照组,两个花生多肽处理组小鼠血清GSH-Px活性均明显高于模型组。

2.4 肝脏MDA含量及SOD、GSH-Px活性

由表4可以看出,与对照组相比,氧化损伤模型组小鼠肝脏MDA含量极显著增加,SOD活性和GSH-Px活性极显著下降。而与模型组相比,两个花生多肽组小鼠肝脏MDA含量显著降低,GSH-Px活性显著升高,另外,高剂量花生多肽组SOD活性极显著升高。

3 讨论

多种动物给予D-半乳糖后均可以导致氧化损伤,研究证明,D-半乳糖致氧化损伤模型动物的多种组织病

表4 花生多肽对小鼠肝脏MDA含量及血清SOD、GSH-Px活性的影响

Table 4 Effects of peanut polypeptide on liver MDA content and SOD, GSH-Px activity

| 组别 | 对照组模型组 | 氧化损伤多肽组 | 低剂量多肽组 | 高剂量多肽组 |
|-----------------------------|----------|------------|-----------|-----------|
| MDA ($\mu\text{mol/g}$ 蛋白) | 14.8±1.2 | 22.7±1.4** | 18.6±1.2* | 19.4±0.8* |
| SOD (U/mg 蛋白) | 514±27 | 450±14* | 486±13 | 548±19** |
| GSH-Px (U/mg 蛋白) | 618±40 | 421±43** | 577±21* | 587±32* |

注: * 与对照组比较 $p < 0.05$, ** 与对照组比较, $p < 0.01$; * 与衰老模型组比较 $p < 0.05$, ** 与衰老模型组比较 $p < 0.01$ 。

理变化符合自然衰老时出现的症状^[1]。目前D-半乳糖诱导的动物模型已成为抗氧化、延缓衰老药物及保健食品筛选工作中经常选用的实验动物模型^[5]。本研究给25~30g的昆明种雄性小白鼠连续颈背部皮下注射D-半乳糖1个月后,模型组小鼠的血清及肝脏MDA含量明显高于对照组,同时血清GSH-Px活性及肝组织SOD、GSH-Px的活性显著降低,说明本实验动物模型是成功的。

GSH-Px和SOD是体内重要的抗氧化酶,是机体抗氧化系统的重要组成部分,而MDA是一种脂质过氧化物,测定MDA的含量可反映出细胞受损伤的程度。抗氧化剂可直接清除体内过剩的自由基,或通过增强体内抗氧化系统发挥其抗氧化作用^[6]。实验结果表明,高、低剂量花生多肽灌胃均可明显提高血清GSH-Px及肝脏SOD、GSH-Px的活性,并显著降低血清和肝脏MDA的含量,提示花生多肽作为外源性的抗氧化物质,能够提高机体内源性抗氧化酶活性,清除自由基,抑制脂质过氧化损伤。

另外,本项研究结果还显示,D-半乳糖诱发的氧化损伤模型小鼠胸腺指数和脾脏指数显著下降,但经过花生多肽灌胃处理后的小鼠,其胸腺指数和脾脏指数却有不同程度的升高,显示花生多肽能明显对抗免疫器官的退化、萎缩,提高免疫功能。

前人研究表明,二肽和三肽可以由不同于氨基酸的转运系统转运、吸收^[7],近年来又发现,不仅小肽(二肽和三肽),膳食中的多肽(10肽至51肽)也可以被小肠完整地吸收并产生生物效应^[8]。本研究中花生多肽分子

大豆异黄酮对糖尿病大鼠抗氧化能力的影响

葛丽霞, 陈 静*

(暨南大学医学院, 广东 广州 510632)

摘 要: 目的: 观察大豆异黄酮(soybean isoflavone, SIF)对糖尿病大鼠抗氧化能力的影响。方法: 以四氧嘧啶(ALX)为诱导剂建立糖尿病动物模型, 正常对照组(N)和糖尿病对照组(DC)以蒸馏水灌胃, 大豆异黄酮组(SI)每日以100mg/kg·d的SIF溶液灌胃。实验6周后, 分别测血清及肝脏中总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和黄嘌呤氧化酶(XOD)活性及丙二醛(MDA)含量。结果 SI组实验后血糖较实验前和DC组明显降低($p < 0.05$), DC组实验前血糖较实验后则明显升高($p < 0.05$)。与DC组相比, SI组血清和肝脏GSH-Px和SOD抗氧化酶活性明显增强($p < 0.05$)接近和超过正常水平, 肝脏T-AOC能力明显高于DC和N组($p < 0.05$), 而血清及肝脏MDA含量均低于DC组($p < 0.05$), 血清XOD活性较DC组略有降低。结论: 大豆异黄酮具有降血糖和增强机体抗氧化能力, 其降糖机理与阻止胰腺 β 细胞和肝脏表面胰岛素受体进一步氧化损伤, 修复其功能有关。

关键词: 大豆异黄酮; 糖尿病大鼠; 抗氧化

Effects of Soybean Isoflavone on Antioxidative Ability of Diabetic Rats

GE Li-xia, CHEN Jing*

(College of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Objective: The effects of soybean isoflavone (SIF) on antioxidative ability in diabetic rats were studied in this assay. Methods: Twenty-six healthy male rats were assigned to three groups: normal control group (N), diabetic control group (DC), and soybean isoflavone-treated group (SI). 100 mg/kg·d isoflavone was given to SI group by gavage. After 6 weeks, T-AOC, SOD, GSH-Px, XOD and MDA in serum and liver were tested. Results: Fasting blood glucose level in SI group was significantly lower before given than those in DC group ($p < 0.05$). The fasting blood glucose level in DC group was remarkably higher than before ($p < 0.05$). Comparing with DC group, GSH-Px and SOD activities of serum and liver in SI group were higher remarkably ($p < 0.05$); T-AOC level in liver was also much higher ($p < 0.05$); MDA level in serum and liver in SI group were much lower than those

收稿日期 2006-02-08

*通讯作者

作者简介: 葛丽霞(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与慢性疾病。

量大都在1000D以下, 由二肽至八肽组成, 由此可以推断, 花生多肽经灌胃给予小鼠后, 可以被小肠完整吸收并转运至血液循环而发挥其抗氧化作用。可见, 花生多肽的健康功能使之有望成为具有抗氧化功能的保健食品, 因此不失为国内花生蛋白资源开发利用的重要途径之一。

参考文献:

- [1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 937-943.
- [2] MIZUNO Y. Changes in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities and thiobarbituric acid reactive product levels in early stages of development in dystrophic chickens[J]. Experimental Neurology, 1984, 84(1): 58.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 529-531; 549-554.
- [4] LOWRY O H, ROSENBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275.
- [5] 陈勤. 抗衰老研究实验方法[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996, 46-47.
- [6] 杨惠玲. 自由基与肿瘤[M]//杨惠玲, 潘景轩, 吴伟康. 高级病理生理学. 北京: 科学出版社, 1998: 433-451.
- [7] SILK D B, HEGARTY J E, FAIRCLOUGH P D, et al. Characterization and nutritional significance of peptide transport in man[J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 1982, 26: 337-352.
- [8] ROBERTS P R, BURNEY J D, BLACK K W, et al. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract[J]. Digestion, 1999, 60: 332-337.