

# 模拟胃肠消化提高蛹虫草蛋白的体外抗氧化活性

陈梦霏<sup>1,2</sup>, 周娟娟<sup>1</sup>, 吴书建<sup>1,2</sup>, 谢意珍<sup>2</sup>, 吴清平<sup>2</sup>, 丁郁<sup>1,2</sup>

(1. 暨南大学食品科学与工程系, 食品安全与营养研究院, 广东广州 510632)

(2. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州 510070)

**摘要:** 探究模拟胃肠消化对蛹虫草蛋白质理化性质及抗氧化活性的影响。分别采用 SDS-PAGE 和酸水解法分析模拟胃肠消化前后的蛋白质分子量分布及氨基酸组成。通过体外化学评价方法, 测定模拟胃肠消化前后蛹虫草蛋白质及其消化产物的抗氧化活性。构建 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导氧化损伤的 PC12 细胞模型, 使用 CCK-8 试剂盒测定经蛹虫草蛋白质消化产物处理后细胞模型中的细胞活力。结果表明, 经模拟胃肠消化后, 蛋白质分子量的主要分布范围由 10~120 ku 变为 8~15 ku; 模拟胃肠消化前后 DPPH 自由基清除力的 IC<sub>50</sub> 值分别为 1.55 mg/mL 和 1.06 mg/mL, Fe<sup>2+</sup> 螯合力的 IC<sub>50</sub> 值分别为 1.32 mg/mL 和 0.18 mg/mL, 0.3 mg/mL 样品的 ORAC 值分别为 467.27±46.53 μmol TE/g 和 948.80±24.02 μmol TE/g; 100 μg/mL 消化产物预保护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 PC12 细胞后, 细胞活力显著提高 ( $p < 0.05$ )。蛹虫草蛋白质模拟胃肠消化前后均具有较强的抗脂质过氧化能力及较低的 Fe<sup>3+</sup> 还原能力。蛹虫草蛋白质经模拟胃肠消化后产生了更多小分子量多肽, 抗氧化活性显著提高, 因此可对消化产物中的抗氧化肽进行进一步的研究和开发。

**关键词:** 蛹虫草; 蛋白质; 模拟胃肠消化; 抗氧化; PC12 细胞

文章编号: 1673-9078(2020)02-70-77

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.2.011

## Simulated Gastrointestinal Digestion Increase the *in Vitro* Antioxidant Activity of *Cordyceps militaris* Proteins

CHEN Meng-fei<sup>1,2</sup>, ZHOU Juan-juan<sup>1</sup>, WU Shu-jian<sup>1,2</sup>, XIE Yi-zhen<sup>2</sup>, WU Qing-ping<sup>2</sup>, DING Yu<sup>1,2</sup>

(1. Department of Food Science and Engineering, Institute of Food Safety and Nutrition, Jinan University, Guangzhou 510632, China) (2. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** Physicochemical properties and antioxidant activity of *Cordyceps militaris* proteins and their simulated gastrointestinal digestive products were investigated. Molecular weight distribution and amino acid composition of the proteins and digestive products were measured by SDS-PAGE and acid hydrolysis method, respectively. Antioxidant activity of *Cordyceps militaris* proteins and their simulated gastrointestinal digestive products was evaluated by *in vitro* chemical methods. Oxidative damaged PC12 cell model induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was established. After treatment with the digestive products, cell viability was measured by CCK-8. The results showed that after digestion, the molecular weight distribution shifted from 10~120 ku to 8~15 ku; the IC<sub>50</sub> values of DPPH clearance rate of *Cordyceps militaris* proteins and their digestive products were 1.55 and 1.06 mg/mL, respectively. The IC<sub>50</sub> values of Fe<sup>2+</sup> chelating power were 1.32 and 0.18 mg/mL, respectively. The ORAC values were 467.27±46.53 and 948.80±24.02 μmol TE/g respectively when the sample concentration was at 0.3 mg/mL. The cell viability of PC12 cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was significant improved ( $p < 0.05$ ) after pre-treated with 100 μg/mL digestive products. Both of *Cordyceps militaris* proteins and their digestive products possess high lipid per-oxidation inhibition ability and low ferric reducing power. Thus, more peptides with lower molecular weight were generated after simulating gastrointestinal digestion of *Cordyceps militaris* proteins. Of note, the antioxidant activity improved significantly. It is therefore plausible to further purify and characterize the antioxidant peptides in simulated gastrointestinal digestive products of *Cordyceps militaris* proteins.

收稿日期: 2019-08-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31701195); 广州市科技计划项目 (201604016068); 暨南大学 111 引智计划项目 (50403053)

作者简介: 陈梦霏 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与健康

通讯作者: 丁郁 (1980-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全与健康

**Key words:** *Cordyceps militaris*; protein; simulated gastrointestinal digestion; antioxidant; PC12 cells

氧化应激 (oxidative stress, OS) 是活性氧自由基水平升高与抗氧化机能活性降低的失衡状态, OS 的增加可引起细胞结构的损伤, 甚至导致组织破坏, 与癌症、神经退行性疾病、糖尿病等疾病的发生息息相关<sup>[1]</sup>。开发抗氧化活性物质是解决体内氧化应激的有效手段之一。天然食品来源的抗氧化活性物质具有低毒的优点, 相对于合成的抗氧化物质更为安全。蛹虫草 (蛹虫草子实体) 属于食用真菌的一种, 富含虫草素、虫草酸、虫草多糖、蛋白质、维生素等营养物质<sup>[2]</sup>, 在 2009 年被批准为我国新资源食品<sup>[3]</sup> (2014 年改称为新食品资源<sup>[4]</sup>), 具有多种生理活性, 其抗氧化活性成分的研究主要集中在虫草素<sup>[5]</sup>与虫草多糖<sup>[6]</sup>。目前, 已有学者对蛹虫草蛋白及酶解多肽抗氧化活性进行了相关研究。徐鸿雁等制备了具有一定清除自由基、抗脂质过氧化能力的蛹虫草多肽<sup>[7]</sup>。宗静采用双酶酶解分离得到具有还原能力、可清除羟基自由基和超氧阴离子的蛹虫草子实体活性多肽<sup>[8]</sup>。食物进入人体经过胃肠道消化后, 能产生更多利于吸收的抗氧化活性成分<sup>[9]</sup>。但蛹虫草蛋白质经模拟胃肠消化后, 其抗氧化活性变化的研究还鲜见报道。因此, 本文采用双酶分步酶解法体外模拟胃肠消化, 制备蛹虫草蛋白质消化产物。对蛹虫草蛋白质及其消化产物的 DPPH 自由基清除力、Fe<sup>2+</sup>螯合力、ORAC、还原力以及抗脂质过氧化能力进行测定。建立了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导氧化损伤的 PC12 细胞模型, 测定了蛹虫草消化产物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导氧化损伤 PC12 细胞的预保护作用。本研究旨在获得经胃肠消化后抗氧化活性显著提高的多肽, 为蛹虫草抗氧化多肽的分离纯化及功能作用研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

蛹虫草由广东省微生物研究所提供。新鲜蛹虫草清洗干净, 风扇吹干表面水分后放于 60 °C 电热鼓风干燥箱烘干, 粉碎后的蛹虫草干粉用干燥瓶密封保存, 置于干燥器中备用。

过氧化氢、硫氰酸铵、荧光素钠、AAPH、1,10-菲咯啉、菲罗嗪、氯化铁、L-还原型谷胱甘肽 (GSH)、DPPH、水溶性维生素 E (Trolox)、亚油酸、胃蛋白酶, 均购自 Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司; 胰酶购自上海源叶生物技术有限公司; 2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT)、三氯乙酸, 购自国药集团化学试剂有限公司; 铁氰化钾购自广州化学试剂厂; 氯化亚铁,

购自上海麦克林生化科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 购自碧云天生物技术有限公司; PC12 大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤分化细胞株 (高分化), 购自中科院上海细胞库; DMEM 细胞培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、0.05% 胰酶-EDTA、PBS 缓冲液, 购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司 Life-Technologies 试剂部; CCK-8 试剂盒, 购自上海翊圣生物科技有限公司。

### 1.2 主要仪器设备

DHG-9076 电热鼓风恒温干燥箱, 广东环凯微生物科技有限公司; HCl-8D 恒温磁力搅拌水浴锅, 常州高德仪器制造有限公司; YB-2000A 高速多功能粉碎机, 浙江永康市速锋工贸有限公司; 1658001 小型垂直电泳装置, 美国 Bio-Rad 公司; 160i 细胞培养箱, 美国赛默飞世尔科技公司; BSC-1300 II A2 生物安全柜, 苏州安泰空气技术有限公司; Epoch2 微孔板酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; LBC7670071 真空冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司; L-8900 氨基酸分析仪, 日本株式会社日立制作所。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 蛹虫草蛋白及消化产物的制备

蛹虫草蛋白质及消化产物的制备参考文献<sup>[9,10]</sup>中的制备方法, 稍作修改。

称取 40 g 蛹虫草干粉, 加入 600 mL 提取液 (5% 乙酸, 0.1% β-巯基乙醇), 4 °C 磁力搅拌 3 h 提取蛹虫草蛋白; 10,000 r/min, 4 °C 离心 15 min 收集上清液; 向上清液中缓慢加硫酸铵至饱和度为 75%, 4 °C 静置过夜; 12,000 r/min, 4 °C 离心 20 min, 收集蛋白沉淀。蛋白沉淀加少量蒸馏水复溶, 用截留分子量为 1 ku 的透析袋透析 24 h, 每 4 h 更换一次蒸馏水, 透析好的蛋白液真空冷冻干燥后即得蛹虫草蛋白质干粉 (*Cordyceps militaris* proteins, CMP), 置于 -20 °C 密封保存。

称取蛹虫草蛋白质干粉, 加入一定量的蒸馏水, 配置成 3% 的蛋白溶液。1 mol/L HCl 调节 pH 到 2.0 后加入胃蛋白酶 (4%, 与 CMP 的质量比), 37 °C 水浴磁力搅拌水解 2 h。胃蛋白酶酶解结束后用 0.9 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 到 5.3, 随后用 1 mol/L NaOH 调 pH 到 7.5, 加入胰酶 (4%, 与 CMP 的质量比), 37 °C 水浴磁力搅拌水解 2 h; 酶解结束后沸水浴灭酶 10 min, 冷却至室温后 10,000 r/min 离心 15 min, 收集上清液,

即为模拟胃肠消化的蛹虫草消化产物 (gastrointestinal digestion products of *Cordyceps militaris* proteins, GI)。

CMP 和 GI 溶液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 利用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

### 1.3.2 水解度的测定

水解度的测定参考文献<sup>[11]</sup>中的方法, 稍作修改。

TCA 的终浓度为 10%, 蛋白浓度用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行测定。

### 1.3.3 SDS-PAGE 和 Tricine-SDS-PAGE

SDS-PAGE 和 Tricine SDS-PAGE 参考文献<sup>[10,12]</sup>中的方法, 稍作修改。

SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%, Tricine SDS-PAGE 的分离胶浓度为 16% 6 mol/L 尿素。

### 1.3.4 氨基酸组成分析

氨基酸组成分析参考国标 GB 5009.124-2016 方法进行测定, 稍作修改。

将复溶后的蛋白质上清液及模拟胃肠消化后的消化液统一浓度为 3 mg/mL, 取 1 mL 液体样品与 1 mL 浓盐酸 (12 mol/L) 于水解管中, 115  $^{\circ}\text{C}$  消化 22 h 结束后定容到 10 mL。过滤后取 1 mL 于 80  $^{\circ}\text{C}$  水浴干燥, 蒸干后再加 1 mL 水再次蒸干, 最后加 1 mL 0.02 mol/L 盐酸溶解, 过 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜后用氨基酸分析仪进行测定。

### 1.3.5 体外抗氧化活性评价

#### 1.3.5.1 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 自由基清除力测定参照参考文献<sup>[13]</sup>中的方法, 稍作修改。

DPPH 浓度为 0.20 mmol/L, 分别取 500  $\mu\text{L}$  样品与 500  $\mu\text{L}$  DPPH 进行反应。

#### 1.3.5.2 氧自由基吸收能力 (ORAC) 的测定

ORAC 参照参考文献<sup>[14]</sup>中的方法进行测定, 稍作修改。

荧光素钠 (80 nmol/L) 的反应量为每孔 120  $\mu\text{L}$ ; AAPH (150 mmol/L) 的反应量为每孔 60  $\mu\text{L}$ ; 每隔 2 min 测定一次荧光值, 连续测定 2 h。标准曲线用 0~480  $\mu\text{mol/L}$  的 Trolox 进行绘制。样品稀释及试剂配置均用 75 mmol/L pH 7.4 的磷酸钾缓冲液, GSH 作为阳性对照。

#### 1.3.5.3 金属离子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 螯合力的测定

$\text{Fe}^{2+}$  螯合力参照参考文献<sup>[10]</sup>中的方法进行测定。

#### 1.3.5.4 还原力的测定

还原力测定参照参考文献<sup>[10]</sup>中的方法进行。

#### 1.3.5.5 抗脂质过氧化能力的测定

抗脂质过氧化能力测定参考参考文献<sup>[15]</sup>中的方法, 样品制备方法稍作修改。

1 mL 样品 (10 mg/mL) 加 9 mL pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L) 稀释; 称取 10 mg BHT 作为阳性对照, 加入 1 mL 蒸馏水和 9 mL 上述缓冲液; 空白组为 1 mL 蒸馏水和 9 mL 缓冲液。

### 1.3.6 蛹虫草消化产物预保护 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导氧化损伤的 PC12 细胞能力

#### 1.3.6.1 细胞培养及实验分组

用含有 10% 胎牛血清、2% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 细胞培养基培养 PC12 细胞, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中, 2~3 d 更换一次培养基, 3~4 d 进行传代。以  $1 \times 10^4$  个/孔为接种密度, 将 PC12 细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 细胞生长进入对数期, 实验组将原培养液换成含有不同浓度 (100、200、300  $\mu\text{g/mL}$ ) 的样品培养基, 孵育 12 h 后, 吸弃旧培养液, 并用 PBS 洗一遍, 对照组更换成新鲜培养基, 损伤组及实验组加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 1 h 后用于后续测定。

#### 1.3.6.2 CCK-8 测定 PC12 细胞活力

PC12 细胞经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后, PBS 清洗一遍, 用 DMEM 将 CCK-8 稀释 10 倍, 每个孔加入 100  $\mu\text{L}$  稀释好的 CCK-8 溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后在 450 nm 的波长下测定吸光值, 根据以下公式计算细胞活力:

$$\text{细胞活力}\% = (\text{A}_{\text{样品}} - \text{A}_{\text{空白}}) \times 100 / (\text{A}_{\text{对照}} - \text{A}_{\text{空白}}) \quad (1)$$

其中:  $\text{A}_{\text{样品}}$  为添加样品预保护的吸光值,  $\text{A}_{\text{对照}}$  为未加样品和  $\text{H}_2\text{O}_2$  孵育的吸光值,  $\text{A}_{\text{空白}}$  为未接种细胞, 只有 CCK-8 试剂的吸光值。

#### 1.3.6.3 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导氧化损伤 $\text{IC}_{50}$ 值的测定

将 PC12 细胞接种于 96 孔板中, 接种密度为  $1 \times 10^4$  个/孔, 培养 24 h, 使细胞生长进入对数期, 吸弃旧培养基, 加入新鲜的培养基, 培养 12 h 后加不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.07、0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L) 孵育 1 h。  $\text{H}_2\text{O}_2$  孵育结束后用 PBS 洗 1 次, 按照 1.3.6.2 的方法测定细胞活力。

#### 1.3.7 数据处理与分析

化学分析测定均做 3 次平行实验, 细胞试验做 3 次独立重复试验, 采用 SPSS 软件进行单因素方差分析 ( $p < 0.05$ ), 结果均用均值  $\pm$  标准差表示, 并采用 OriginLab 公司的 OriginPro 9.0.0 软件进行绘图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 模拟胃肠消化后水解度、氨基酸组成及蛋白质分子量分布变化

蛋白质的水解度是衡量酶解效率的一项指标。TCA 是蛋白质沉淀剂, 能将大分子蛋白沉淀, 而小分

子多肽,尤其是小于7个氨基酸残基组成的多肽能够溶于10%的TCA中<sup>[16]</sup>,因此可以根据多肽指数(TCA-SN%)来表示水解的程度。本实验中用胃蛋白酶及胰酶模拟胃肠消化酶解蛹虫草蛋白的水解度为45.19%,与徐鸿雁<sup>[17]</sup>用双酶酶解的多肽指数47.02%接近。本实验测得的蛋白质分子量的分布如图1所示。大分子胶中(图1a),CMP分子量主要分布在17~120 ku,且有8条较清晰的条带,而经模拟胃肠消化后的GI未见明显条带。小分子胶中(图1b),CMP仍呈现多条分子量较大(>20 ku)的条带,在10 ku附近条带比较清晰,与大分子胶结果较一致。而小分子胶中GI主要分布在8~20 ku,在8、10及15 ku附近条带清晰。以上结果表明,经过模拟胃肠消化后,CMP分子量大于20 ku的蛋白质均被酶解成为了小分子量的多肽。

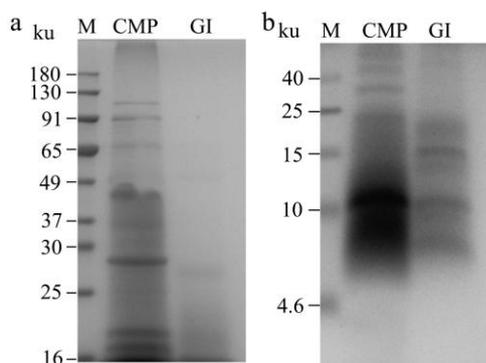


图1 蛹虫草蛋白质及其胃肠消化产物的电泳图

Fig.1 Gel electrophoretogram of CMP (*Cordyceps militaris* proteins) and GI (Gastrointestinal digestion products of *Cordyceps militaris* proteins)

注: a 为大分子胶,表示蛋白质和多肽在分子量16~180 ku 范围内分布情况; b 为小分子胶,表示蛋白质和多肽在分子量4.6~40 ku 范围内分布情况。

多肽的抗氧化活性与多肽链的氨基酸组成、排列顺序、暴露的氨基酸残基相关<sup>[18]</sup>。本研究中蛹虫草蛋白质及其消化产物的氨基酸组成如表1所示。在CMP中,Glu含量最高,为28.91 mg/100 mL,其次分别是Asp、Arg、Pro、Ser、Thr;在GI中,Asp含量最高,为41.54 mg/100 mL,其次分别是Glu、Pro、Thr、Arg、Ala。疏水性氨基酸由于疏水作用力相互作用,易进入细胞内与自由基反应,从而具有较好的抗氧化活性<sup>[19]</sup>。同浓度下CMP和GI的疏水性氨基酸含量分别为98.76 mg/100 mL和140.16 mg/100 mL;芳香族氨基酸能提供质子,稳定缺失电子的自由基,同时通过共振

结构保持其自身的稳定性,从而增强自由基清除活性的效力<sup>[18]</sup>。同浓度下CMP和GI的芳香族氨基酸含量分别为31.02 mg/100 mL和43.15 mg/100 mL,此外,消化产物中必需氨基酸含量丰富,含量为140.44 mg/100 mL。

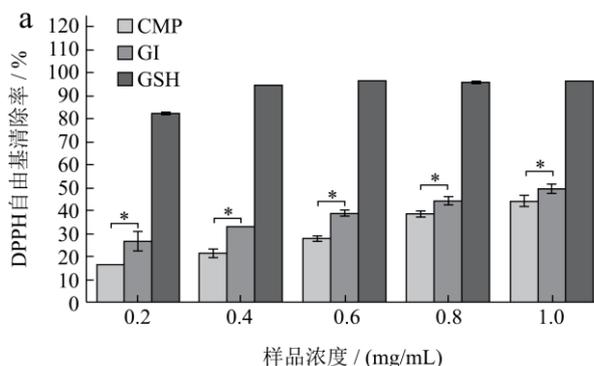
表1 蛹虫草蛋白质及其消化产物的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of the proteins and digestive products of *Cordyceps militaris*

氨基酸种类	氨基酸含量/(mg/100 mL)	
	CMP	GI
Asp	28.68±0.97	41.54±2.73
Thr	20.34±0.64	28.37±1.87
Ser	20.76±0.47	24.66±3.87
Glu	28.91±0.82	37.17±3.89
Gly	19.31±0.67	25.83±1.23
Ala	17.87±0.62	26.18±0.79
Cys	16.55±1.10	16.89±0.39
Val	16.80±0.65	23.49±1.07
Met	3.92±0.58	5.82±1.05
Ile	10.32±0.44	15.35±0.74
Leu	17.62±0.74	25.77±1.00
Tyr	16.65±0.79	22.90±0.95
Phe	14.36±0.74	20.25±0.67
Lys	13.82±0.59	21.39±0.77
His	7.17±0.23	10.25±0.41
Arg	23.49±0.85	27.76±1.12
Pro	21.80±0.98	29.11±0.58
疏水性氨基酸	98.76±3.93	140.16±4.71
芳香族氨基酸	31.02±1.51	43.15±1.61
必需氨基酸	97.18±3.97	140.44±6.89

## 2.2 模拟胃肠消化前后化学抗氧化活性的比较

### 2.2.1 DPPH 自由基清除活性



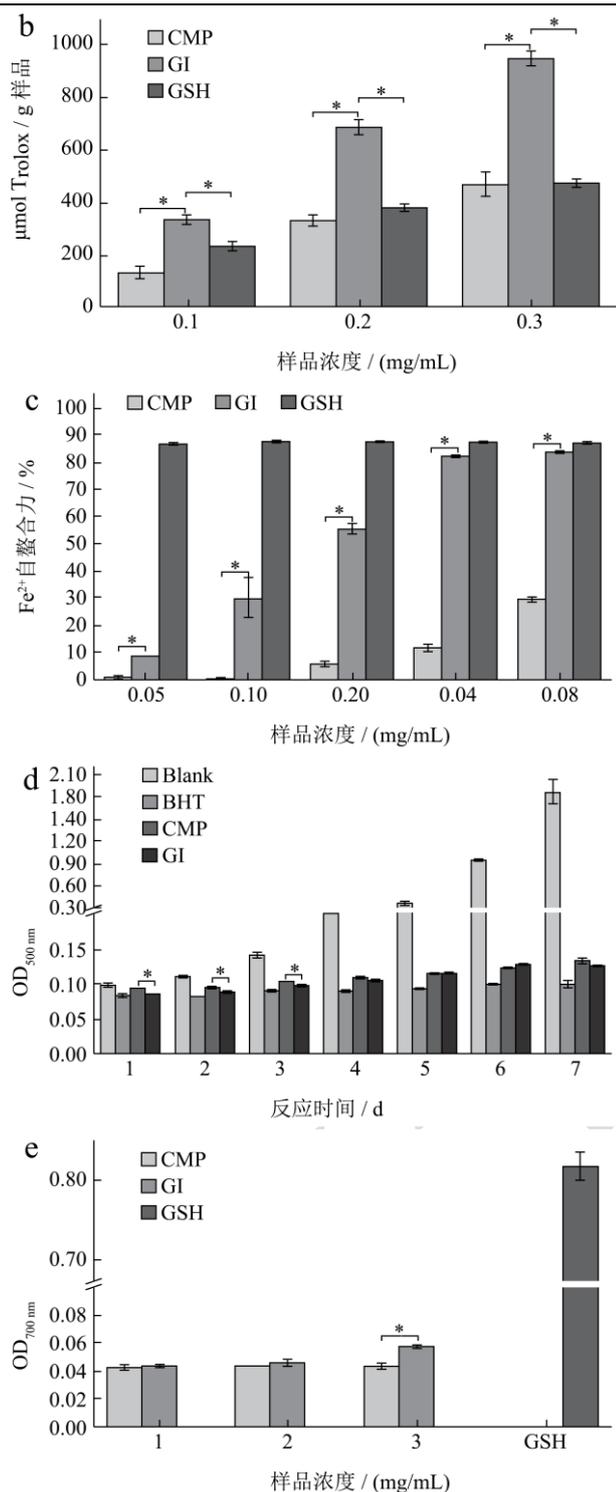


图2 蛹虫草蛋白质及其消化产物的抗氧化活性 (a) DPPH 自由基清除率; (b) ORAC; (c)  $\text{Fe}^{2+}$  螯合力; (d) 抗脂质过氧化能力; (e) 还原力

Fig.2 Antioxidant activity of CMP and GI (a) DPPH radical scavenging activity; (b) ORAC; (c)  $\text{Fe}^{2+}$  chelating activity; (d) inhibition of lipid peroxidation; (e) reducing power; (n=3, \*p<0.05)

实验测定了样品在 0~1 mg/mL 浓度范围下的 DPPH 自由基清除能力, 测定结果如图 2a 所示, 随着

样品浓度的增加, DPPH 自由基清除能力增强。CMP 和 GI 的 DPPH 自由基清除力  $\text{IC}_{50}$  值分别为 1.55 mg/mL 和 1.06 mg/mL。DPPH 自由基清除反应中, 空间位阻决定了反应倾向, 小分子化合物由于更易接近自由基而拥有相对较高的抗氧化能力。此外, DPPH 为脂溶性自由基<sup>[20]</sup>, 疏水性氨基酸含量越多的多肽, 越容易与 DPPH 自由基发生反应, 表现出更高的 DPPH 自由基清除力。同浓度下, GI 比 CMP 含有更多小分子多肽, 且疏水性氨基酸含量更高。因此, GI 具有更强的 DPPH 自由基清除能力。

### 2.2.2 ORAC

ORAC 表示的是氧自由基吸收能力, 能够有效地测定抗氧化剂抗氧化的延滞期, 初始速率及总抑制程度<sup>[21]</sup>。以 Trolox 为定量标准计算 ORAC 值, ORAC 值越高则说明抗氧化活性越好。由图 2-B 可知, 样品浓度与 ORAC 值成正比, 当浓度为 0.3 mg/mL 时, GI 的 ORAC 值为  $948.80 \pm 24.02 \mu\text{mol TE/g}$ , 显著高于 CMP ( $467.2 \pm 46.53 \mu\text{mol TE/g}$ ), 模拟胃肠消化后抗氧化活性得到了显著的提升。与阳性对照 GSH 相比, GI 的 ORAC 值显著高于同等浓度下的 GSH, 而 CMP 的 ORAC 值与 GSH 并无显著差异。分子量越小, 抗氧化肽的 ORAC 值越高<sup>[21]</sup>。经模拟胃肠消化后, Chen 等<sup>[22]</sup>测定 <1 ku 多肽的 ORAC 值最高。本实验中 CMP 经模拟胃肠消化后, 产生了更多小分子量多肽, 因此 GI 的 ORAC 值显著高于 CMP。此外, 经模拟胃肠消化后, GI 暴露了更多的疏水性氨基酸, 使得氧自由基更容易被捕获而表现出较高的 ORAC 值<sup>[23]</sup>。GSH 由亲水性氨基酸组成, 与其他由疏水性氨基酸组成的小分子多肽相比, 捕获氧自由基的能力更弱, 因此 ORAC 值比 GI 低。

### 2.2.3 $\text{Fe}^{2+}$ 螯合力

铁对于维持正常细胞功能至关重要, 并且是许多铁金属酶的辅助因子, 而过量的游离铁可引起 Fenton 反应产生活性氧, 进而造成毒性氧化物的产生和生物膜的破坏<sup>[24]</sup>。 $\text{Fe}^{2+}$  是各种金属离子中最强的促氧化剂, 因此  $\text{Fe}^{2+}$  的螯合力与抗氧化活性有密切联系<sup>[25]</sup>。样品对  $\text{Fe}^{2+}$  的螯合能力如图 2c 所示, 随样品浓度升高,  $\text{Fe}^{2+}$  螯合能力升高, CMP 和 GI 的  $\text{Fe}^{2+}$  螯合力的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 1.32 mg/mL 和 0.18 mg/mL。与 CMP 相比, GI 的  $\text{Fe}^{2+}$  螯合能力显著提高 ( $p < 0.05$ )。GI 浓度为 0.4 mg/mL 时,  $\text{Fe}^{2+}$  螯合率达到了 82.12%, 与阳性对照 EDTA 的螯合率 (87.43%) 接近。氨基酸侧链的残基可对多肽螯合金属离子的能力产生影响。在多肽链中, 酸性与碱性氨基酸残基均能促进其螯合  $\text{Fe}^{2+}$  的能力<sup>[26]</sup>。由此推测, GI 较 CMP 可能暴露了更多的酸性氨

基酸残基与碱性氨基酸残基,进而获得更强的 $\text{Fe}^{2+}$ 螯合能力。

### 2.2.4 抗脂质过氧化活性

脂质过氧化是指脂类的多不饱和脂肪酸与自由基反应,通过一系列链式反应形成脂质过氧化自由基的反应过程。除了造成食物酸败,脂质过氧化还可造成细胞膜功能及结构的损伤。抗脂质过氧化测定结果如图 2-D 所示,实验空白组在 500 nm 处的吸光值随着实验天数的增加逐渐上升,并最终达到 1.85,说明在未加入抗氧化剂时体系中的亚油酸发生了氧化反应。随着氧化反应的进行,CMP 和 GI 处理组的吸光值均处于较低的水平,说明不同处理组均能显著抑制亚油酸的氧化反应。实验前 3 d,GI 的抑制率显著高于 CMP ( $p<0.05$ ),随后两者的抑制率无显著差异。实验进行到第 7 d,CMP 和 GI 的抑制率分别为 93.19% 和 92.77%,接近阳性对照 BHT 的抑制率 94.58%,因此,CMP 和 GI 均具有良好的抗脂质过氧化活性。

### 2.2.5 还原力

本研究测定了浓度在 1~3 mg/mL 范围内 CMP 和 GI 的还原力。由图 2-E 还原力测定结果可知,还原能力随样品浓度的增加而增强,3 mg/mL 时,CMP 和 GI 在 700 nm 处的吸光值分别为 0.04 和 0.06。还原力测定反映抗氧化剂的电子转移能力,本实验的测定结果说明 CMP 和 GI 几乎没有电子转移能力。结合 DPPH 自由基清除能力与 ORAC 的测定结果,GI 中抗氧化多肽的主要作用方式应为氢转移而非电子转移。

### 2.3 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导氧化损伤的 $\text{IC}_{50}$ 值

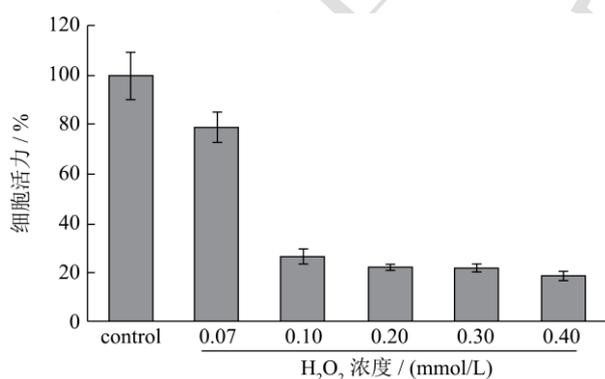


图 3 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 PC12 细胞活力的影响

Fig.3 Effects of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at different concentration on the cell viability of PC12 cells

通过  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导氧化损伤 PC12 来建立离体氧化损伤细胞模型,其  $\text{IC}_{50}$  结果如图 3 所示。 $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 0.07 mmol/L 时的细胞活力为 78.35%,浓度增加到 0.10 mmol/L 时的细胞活力为 26.26%,说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  的半致死剂量 ( $\text{IC}_{50}$ ) 在 0.07~0.10 mmol/L 内。进一步的实验

证明, $\text{H}_2\text{O}_2$  的  $\text{IC}_{50}$  为 0.085 mmol/L,此时的细胞活力为 45.66%,故后续损伤使用的  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 0.085 mmol/L。

### 2.4 细胞毒性实验

进行样品预保护活性测定前先对样品的细胞毒性进行测定。测定结果如图 4 所示,当 CMP 的浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞活力显著下降 ( $p<0.05$ ),细胞活力与对照组相比为 49.89%,浓度增加到 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞活力为 8.57%,说明 CMP 本身对 PC12 细胞的生长有显著的抑制作用,而 100、200、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GI 处理 12 h 后的细胞活力分别为 90.28%、93.80%、92.79%,对 PC12 细胞的生长均无显著影响。故选用 GI 进行下一步预保护活性测定。凝集素是一类非免疫起源、非酶的、可促使细胞凝集的简单蛋白或糖蛋白,具有抑制肿瘤细胞生长的活性<sup>[27]</sup>。近年来研究人员从不同的食用菌中分离出多种具有抑制肿瘤细胞增殖活性的凝集素<sup>[28]</sup>。本实验中 CMP 的蛋白纯度为  $63.40\%\pm 0.45\%$ ,其中可能存在功能类似凝集素的蛋白质,表现出抑制肿瘤细胞 (PC12 细胞) 增殖的活性。经模拟胃肠消化后,蛋白质的活性结构被破坏而丧失原有抑制肿瘤细胞增殖的功能。

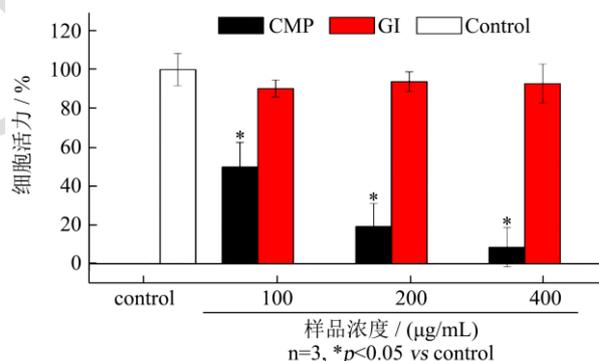


图 4 不同浓度 CMP 和 GI 对 PC12 细胞活力的影响

Fig.4 Effects of CMP and GI at different concentration on the cell viability of PC12 cells

### 2.5 蛹虫草蛋白质消化产物对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导氧化

#### 损伤的 PC12 细胞的预保护能力

PC12 是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤,表达神经生长因子 (NGF) 受体,已被广泛用于神经细胞生理机制的研究<sup>[29,30]</sup>。 $\text{H}_2\text{O}_2$  属于活性氧自由基的一种,在机体内能诱导氧化损伤。在 PC12 细胞中, $\text{H}_2\text{O}_2$  能诱导细胞内 ROS 水平的升高,从而造成氧化损伤,最终导致细胞凋亡。不同浓度 GI 预保护后进行  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导氧化损伤的 PC12 细胞活力如图 5 所示, $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组细胞活

力为44%；100、200、300  $\mu\text{g/mL}$  的样品孵育12 h，再进行  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化损伤的细胞活力分别83%、91%、96%。样品处理组的细胞活力与  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组相比显著提高 ( $p < 0.05$ )，说明 GI 预保护可显著降低  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 PC12 细胞的损伤作用。

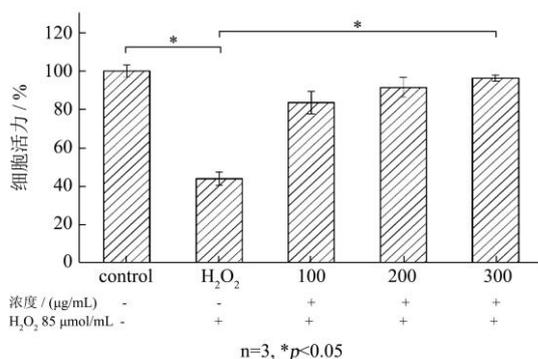


图5 不同浓度 GI 预保护后  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤的 PC12 细胞活力  
Fig.5 Cell viability of PC12 cells injured by  $\text{H}_2\text{O}_2$  after pre-protected by GI at different concentration

### 3 结论

蛹虫草蛋白质经模拟胃肠消化后 DPPH 自由基清除力、 $\text{Fe}^{2+}$  螯合力及 ORAC 显著提高 ( $p < 0.05$ )；100~300  $\mu\text{g/mL}$  蛹虫草蛋白消化液孵育12 h后对 PC12 细胞的生长均无显著的抑制作用。100  $\mu\text{g/mL}$  蛹虫草蛋白质消化产物孵育12 h后，显著提高了  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导氧化损伤的 PC12 细胞活力 ( $p < 0.05$ )，说明蛹虫草蛋白质消化产物对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导氧化损伤的 PC12 细胞具有显著的预保护作用。由于蛹虫草蛋白质消化产物是一个混合组分，目前的研究并不能阐明其中具体的活性组分及其作用机制，因此有必要对其进行进一步的分离纯化，获得抗氧化活性多肽单体，对其抗氧化及其机制进行进一步探讨。

### 参考文献

- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017
- 谢丽娜. 虫草花与冬虫夏草的区别[J]. 海峡药学, 2010, 22(7): 54-55  
XIE Li-na. The difference between *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2010, 22(7): 54-55
- 卫生部. 中华人民共和国卫生部公告(2009年第3号)[J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2009, 5: 21-22  
Ministry of Health. Announcement of Ministry of Health of the People's Republic (No. 3 of 2009) [J]. Gazette of the Ministry of Health of People's Republic of China, 2009, 5: 21-22
- 国家卫生和计划生育委员会. 关于批准塔格糖等6种新食品原料的公告(2014年第10号)[J]. 中国食品添加剂, 2014, 5: 202-204  
National Health and Family Planning Commission. Announcement on approval of 6 new foods raw materials including taggart sugar (No.10 of 2014) [J]. Chinese Food Additives, 2014, 5: 202-204
- Park E S, Kang D H, Yang M K, et al. Cordycepin, 3'-deoxyadenosine, prevents rat hearts from ischemia/reperfusion injury via activation of Akt/GSK-3 $\beta$ /p70S6K signaling pathway and HO-1 expression [J]. Cardiovascular Toxicology, 2014, 14(1): 1-9
- 徐蕾蕾, 王静凤, 唐筱, 等. 蛹虫草降血糖作用及其机制研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(9): 1331-1332  
XU Lei-lei, WANG Jing-feng, TANG Xiao, et al. Hypoglycemia effect and the mechanism of *Cordyceps militaris* [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2011, 27(9): 1331-1332
- 徐鸿雁, 孟胜楠, 张疏雨, 等. 蛹虫草HWM剩余物蛋白酶解工艺研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(4): 127-135  
XU Hong-yan, MENG Sheng-nan, ZHANG Shu-yu, et al. Study on the technology of protein degradation of *Cordyceps militaris* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(4): 127-135
- 宗静. 蛹虫草子实体活性多肽的提取分离方法及其部分生物活性的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012  
ZONG Jing. Studies on extraction and separation and some biological activities of peptides from fruiting bodies of *Cordyceps militaris* [D]. Chongqing: Southwest University, 2012
- You L, Zhao M, Regenstein J M, et al. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion [J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 810-816
- Kimatu B M, Zhao L, Biao Y, et al. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions [J]. Food Chemistry, 2017, 230: 58-67
- Zhao R, Huo C, Qian Y, et al. Ultra-high-pressure processing improves proteolysis and release of bioactive peptides with activation activities on alcohol metabolic enzymes *in vitro* from mushroom foot protein [J]. Food Chemistry, 2017, 231: 25-32

- [12] Schagger H. Tricine-SDS-PAGE [J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 16-22
- [13] Li Y, Jiang B, Zhang T, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH) [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 444-450
- [14] Girgih A T, He R, Hasan F M, et al. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 652-659
- [15] Chi C, Wang B, Wang Y, et al. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 12: 1-10
- [16] Yvon M, Chabanet C, Pelissier J P. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. Hypothesis on the precipitation mechanism [J]. International Journal of Peptide and Protein Research, 1989, 34(3): 166-176
- [17] 徐鸿雁. 蛹虫草多肽的制备及分离[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2013
- XU Hong-yan. Preparation and separation of *Cordyceps militaris* polypeptides [D]. Xianyang: Northwest Agriculture and Forestry University, 2013
- [18] Sarmadi B H, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review [J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949-1956
- [19] Wu R, Wu C, Liu D, et al. Overview of antioxidant peptides derived from marine resources: the sources, characteristic, purification, and evaluation methods [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(7): 1815-1833
- [20] Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo* [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2010, 49(4): 503-515
- [21] Zou T B, He T P, Li H B, et al. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins [J]. Molecules, 2016, 21(1): 72-86
- [22] Chen M, Li B. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2012, 16: 341-348
- [23] 顾敏, 赵谋明, 王茜, 等. 青养蛋白抗氧化肽的制备及其胃肠道消化性的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(23): 196-200
- GU Min, ZHAO Mou-ming, WANG Qian, et al. Research of frog antioxidant peptide and the activity of gastrointestinal digestion [J]. Science & Technology of Food Industry, 2013, 34(23): 196-200
- [24] Halliwell B, Gutteridge J M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease [J]. The Biochemical Journal, 1984, 219(1): 1-14
- [25] 姜宁, 刘晓鹏, 陈芳, 等. 厚朴多糖提取工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 12-17
- JIANG Ning, LIU Xiao-peng, CHEN Fang, et al. Extraction and antioxidant activities of polysaccharides from *Magnolia officinalis* Rehd Wils. Barks [J]. Food Science, 2015, 36(6): 12-17
- [26] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(12): 3661-3667
- [27] Wang H X, Tzi B N, Vincent E C. Lectins from mushrooms [J]. Mycological Research, 1998, 102(8): 897-906
- [28] 方芳. 杏鲍菇和云柚菇中抗病毒蛋白的分离纯化、理化性质及其生物活性[D]. 福州: 福建农林大学, 2003
- FANG Fang. Purification, characteristics and bioactivity of antiviral protein from the *Pleurotus eryngii* and *Agrocybe sp* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2003
- [29] Liu J, Zhang L, Zhang J, et al. *Curcuma kwangsiensis* extracts produced antioxidant effects against injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on PC12 cells [J]. Records of Natural Products, 2019, 13(3): 254-267
- [30] Wang S, Su G, Zhang Q, et al. Walnut (*Juglans regia*) peptides reverse sleep deprivation-induced memory impairment in rat *via* alleviating oxidative stress [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(40): 10617-10627

---

(上接第 165 页)

- [32] Bramley P M. Is lycopene beneficial to human health? [J]. Phytochemistry, 2000, 54(3): 233-236
- [33] Rodríguezcarpena J G, Morcuende D, Estévez M. Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage [J]. Meat Science, 2011, 89(2): 166-173
- [34] Faustman C, Sun Q, Mancini R, et al. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control [J]. Meat Science, 2010, 86(1): 86-94
- [35] Mahieddine B, Amina B, Faouzi S M, et al. Effects of microwave heating on the antioxidant activities of tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Annals of Agricultural Sciences, 2018, 63(2): 135-139