

鱿鱼墨黑色素的自由基清除活性研究[△]

陈士国, 薛长湖^{*}, 薛勇, 李兆杰, 高昕, 马琴

(中国海洋大学食品科学与食品工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要:目的 比较鱿鱼墨黑色素和黑色素铁的自由基清除活性。方法 采用高速离心法从北太平洋鱿鱼 (*Ommastrephes bartrami*) 墨中提取黑色素, 并通过黑色素与 FeCl_3 整合制备了 Fe(III) 含量为 5.6% (W/W) 的黑色素铁。采用鲁米诺发光系统测定了黑色素和黑色素铁对羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 与超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 清除活性。结果 鱿鱼墨黑色素清除超氧阴离子自由基和羟自由基的 IC_{50} 值分别为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.015 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 远低于肌肽的 $0.53 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而黑色素铁清除超氧阴离子自由基和羟自由基的 IC_{50} 值分别为 $0.58 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.83 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 鱿鱼墨黑色素是一种活性较高的天然自由基清除剂, 而黑色素铁的自由基清除活性较黑色素低。

关键词: 鱿鱼墨黑色素; 鱿鱼墨黑色素铁; 超氧阴离子自由基; 羟自由基

中图分类号: Q959.216; R979.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3461(2007)01-0024-04

Studies on the free radical scavenging activities of melanin from squid ink

CHEN Shi-guo, XUE Chang-hu^{*}, XUE Yong, LI Zhao-jie, GAO Xin, MA Qin

(Department of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: **Objective** Comparing the free radical scavenging activities between melanin and melanin- Fe(III) . **Methods** Squid melanin was extracted from ink of *Ommastrephes bartrami* by high-speed centrifugation. By exposing squid melanin to aqueous solutions of FeCl_3 , the content of bound Fe(III) was 5.6% (W/W) of melanin. The activities of melanin to scavenge superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) were determined by Luminol photochemical reaction system. **Results** The IC_{50} of melanin to scavenge superoxide anion radical and hydroxyl free radical were $0.015 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, lower than carnosine's $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $0.53 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. However, Melanin- Fe(III) lost the capacity of scavenging radical, whose IC_{50} values of scavenging $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\cdot\text{OH}$ were $0.58 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $0.83 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. **Conclusion** Squid melanin can remarkably scavenge superoxide anion radical and hydroxyl free radical. However, free radical scavenging activity of melanin- Fe(III) is lower than that of Squid melanin.

Key words: squid melanin; squid melanin- Fe(III) ; superoxide anion radical; hydroxyl free radical

据《本草拾遗》所述, 乌贼墨性凉, 味涩, 具有入心经, 活血化淤, 凉血止血等功能^[1]。现代科学研究发现乌贼墨中有许多活性物

质, 如黑色素、多肽片段^[2]、酸性多糖^[3,4]等。最近科学家又从乌贼墨中分离纯化出有抗癌活性的酪氨酸酶^[5]。黑色素 (melanin) 是一

[△] 基金项目: 国家“863”项目重要海洋鱼类加工高新技术研究 (2005AA625010)

作者简介: 陈士国, 男, 硕士研究生 * 通讯作者: Tel: 0532-82032168; E-mail: xuech@ouc.edu.cn

种生物多聚体,广泛存在于人和动物皮肤、毛发和眼睛中,有着重要的防御、保护等生物功能。黑色素是一种良好的自由基清除剂,能够有效清除羟自由基、氧自由基等自由基^[6]。研究发现,黑色素可螯合三价铁离子生成一种特殊的黑色素复合物即黑色素铁^[7],但目前其特殊的生物学性质研究尚未有相关的文献报道。

本文研究了从鲑鱼墨囊中提取制备黑色素及黑色素与铁的螯合物,观察了其对于 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 这两种不同性质自由基的清除作用,并且比较了黑色素、黑色素铁与肌肤的抗氧化活性,旨在为黑色素及其复合物在医药、农业、保健防护等领域的实际应用提供理论依据。

1 材料和仪器

北太平洋鲑鱼 (*Onimastrephe bartrami*) 墨囊,鲑鱼远洋捕捞后,取出墨囊, $-20^\circ C$ 保藏;鲁米诺 (Luminol) (Merck 公司);肌肤 (carnosine) (Wako 公司);维生素 C (Vc) 分析纯, (淄博化学试剂厂);连苯三酚 (焦性没食子酸) (贵州遵义市第二化工厂)。其他试剂均为分析纯。WDD-2 型电脑发光测试仪 (北京瑞利分析仪器公司);石墨炉原子分光光度计 (北京化工学院);AtoScan Advantage 型电感耦合等离子体原子发射光谱仪 (美国 Thermo Elemental 公司);实验中所用水均为超纯水。

2 方法

2.1 黑色素的制备

采用高速离心法^[8]

鲑鱼墨囊 $0^\circ C$ 解冻,挤压去表皮膜和内部网状膜可以获得墨,用 $0\sim 4^\circ C$ 等体积的水浸泡过夜, $10000r \cdot min^{-1}$ 离心 20min,弃上清液,沉淀部分取少量加 20 倍体积的水,然后再次 $10000r \cdot min^{-1}$ 离心 20min,重复 4~6 次。所得沉淀用水冲洗下来后冻干,即得

黑色素样品。

2.2 蛋白含量测定 OPA 法 (邻苯二甲醛法)^[9]。

2.3 灰分测定

称量样品 7g,经炭化后,将样品放入马弗炉中灼烧 3h,称量前后的重量差计算灰分含量^[10]。

2.4 金属元素的测定

采用 ICP-MS 法测定^[11]。样品处理采用浓度 4:1 的硝酸和高氯酸消化,定容至一定体积。

2.5 黑色素铁的制备

按文献^[8]配制一定浓度 $Fe(III)$ 溶液,分别取 50mL 放入三角瓶中,再分别加入 0.2g 黑色素, $0.1 mol \cdot L^{-1}$ HCl 或 $2 mol \cdot L^{-1}$ NaOH 都调成 pH 为 4 左右,冲入氮气保护,每 2h 振摇 1 次,24h 后混匀离心,去上清液,沉淀真空冷冻干燥后加入硝酸和高氯酸 (4:1) 进行消化,消化至无色,再用超纯水定容,稀释一定倍数测重金属含量。原子分光光度法于 248.3nm 测定黑色素中铁的含量为 $56000 \mu g \cdot g^{-1}$ 。

2.6 黑色素对超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 的清除作用^[11]。

塑料小管中加入一定量的黑色素和黑色素铁,用 PBS ($0.05 mol \cdot L^{-1}$, pH 7.8) 补足到 400 μL ,加入连苯三酚 ($0.625 \mu mol \cdot L^{-1}$) 50 μL ,电脑发光测试仪中测本底。开盖加入 550 μL 鲁米诺 ($1 mmol \cdot L^{-1}$, 用 $0.1 mol \cdot L^{-1}$ Na_2CO_3 配制),上盖后开始测鲁米诺化学发光值 C 。抑制率 (%) = $(C_0 - C) / C_0 \times 100\%$ (C_0 为未加抗氧化剂的空白的发光值, C 为加入抗氧化剂后的发光值)。重复 3 次取平均值。根据浓度与抑制率的关系曲线得 IC_{50} 。

2.7 黑色素和黑色素铁对羟自由基 ($\cdot OH$) 的清除作用^[11]

10mL 玻璃试管中加入 0.2 mL 抗坏血酸 ($2 mmol \cdot L^{-1}$), 0.4 mL $CuSO_4$ ($2 mmol \cdot L^{-1}$), 50 μL 鲁米诺 ($0.1 mmol \cdot L^{-1}$), 用

0.1 mol · L⁻¹ Na₂CO₃ 配制), 0.2 mL 酵母悬浮液 (75 mg · mL⁻¹), 加入样品, 用 PBS (pH 7.8, 0.05 mol · L⁻¹) 补足到 550 μL, 混匀后温育 30 min 测本底。加入 H₂O₂ 0.6 mL (6.8 mmol · L⁻¹) 启动反应, 开始测鲁米诺化学发光值 C。根据 2.6 节方法得抑制率和 IC₅₀。

3 结果

3.1 黑色素的基本成分

高速离心法制备的黑色素中蛋白质的含

表 1 鱿鱼墨黑色素中金属元素分析 (μg · g⁻¹)

金属元素	Na	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Cd	Pb
含量	2186	1546	41600	9860	156	15.3	0.208	2.98

3.2 黑色素和黑色素铁的自由基清除活性

3.2.1 黑色素和黑色素铁的超氧自由基 (O₂^{·-}) 清除活性

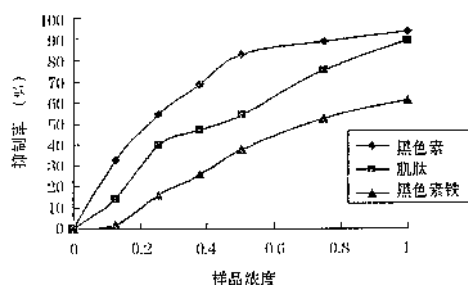


图 1 鱿鱼黑色素及黑色素铁对超氧阴离子自由基的清除效果

黑色素和黑色素铁对 O₂^{·-} 的化学发光的抑制作用如图 1 所示。从图中可以看出, 黑色素具有较好的 O₂^{·-} 清除效果, 并且随着浓度的增加而增大。在 0~0.5 mg · mL⁻¹ 的范围内, 自由基的清除率随着浓度的增加而呈线性上升关系, 在浓度达到 0.5 mg · mL⁻¹ 以后, 其抑制率趋于平缓, 其清除 O₂^{·-} 的 IC₅₀ 为 0.2 mg · mL⁻¹, 远低于商品用抗氧化剂肌肽的 IC₅₀ 值 0.54 mg · mL⁻¹。而黑色素铁清除 O₂^{·-} 活性要比黑色素弱很多, 其 IC₅₀ 为 0.83 mg · mL⁻¹。

3.2.2 黑色素和黑色素铁对羟自由基 (·OH) 清除作用: 抗坏血酸-酵母悬浮液-鲁

米诺-H₂O₂ 体系量较低, 为 7.3%, 且黑色素的提取率较高为 19.2%, 因此是一种较好的黑色素的分离方法。样品中的蛋白质主要是一些与黑色素牢固结合的蛋白成分, 是黑色素体的重要成分之一, 目前认为这就是一种纯的黑色素样品^[12]。而灰分含量为 7.1%, 主要是一些与乌贼墨黑色素结合的金属离子, 其主要是钙和镁, 及少量的钠盐, 钾盐以及其他微量的金属离子, 其含量如表 1 所示。此外, 还有少量的脂质 (<0.3%), 剩余的成分即为主要成分黑色素。

米诺-H₂O₂ 体系

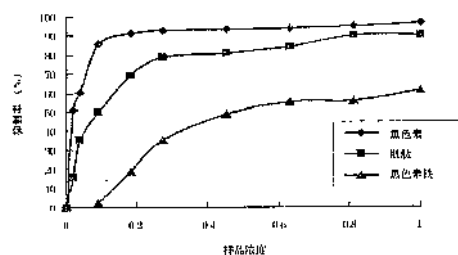


图 2 鱿鱼墨黑色素和黑色素铁对羟自由基的清除效果

黑色素和黑色素铁对 ·OH 的化学发光的抑制作用如图 2 所示。图中结果表明, 超高速离心法提取的黑色素对 ·OH 也有较好的清除效果, 并随浓度增大而增大。黑色素在浓度为 0~0.05 mg · mL⁻¹ 范围内, 其抑制率随着浓度的增加呈线性增加, 在浓度达到 0.05 mg · mL⁻¹ 以后, 其抑制率增加趋于平缓, 1 mg · mL⁻¹ 时其抑制率为 96.5%。黑色素清除 ·OH 的 IC₅₀ 值为 0.015 mg · mL⁻¹, 低于肌肽的 IC₅₀ 值 0.1 mg · mL⁻¹。黑色素铁的抑制作用比黑色素相对要弱。而在 0~0.5 mg · mL⁻¹, 黑色素铁的清除率随着浓度的增加而增加, 此后趋于平缓。黑色素铁 IC₅₀ 为 0.58 mg · mL⁻¹。

4 讨论

黑色素具有抵抗光氧化危害的重要功能,其机理是黑色素中的单体 DHI(5,6-二羟吲哚)和 DHICA(5,6-二羟吲哚-2 羧)在对二苯酚/苯醌结构之间转换失去两个电子而发生氧化还原反应。DHI 和 DHICA 在此过程中起着类似超氧化物歧化酶的作用,能够催化 $O_2^{\cdot -}$ 转变为 H_2O_2 和 O_2 , 从而起到抵抗光氧化的作用。研究表明黑色素能有效地提高试验动物(如果蝇)在辐射条件下的存活率^[13]。Gorzata^[14]发现,黑色素能保护生物大分子如 DNA 免受氧化损伤,可能与其清除自由基活性有关。目前,黑色素已被用于保护苏云金芽孢杆菌[Bacillus thuringiensis, Bt]生物杀虫剂,使其免受阳光紫外线的损害,延长其杀虫时效^[15]。本文的研究结果表明,来源于海洋动物的太平洋鲑鱼黑色素也具有显著的清除自由基活性。

人脑神经元黑色素是一个三价铁离子储存库。正常的人脑细胞中神经元黑色素与铁离子的螯合量少于最大螯合量的一半,剩余未与铁离子螯合的神经黑色素起到人脑细胞抵抗铁离子的毒害的作用^[16]。不正常的铁离子代谢可以导致神经黑色素吸收过多的铁离子^[17],导致生理功能紊乱,帕金森病就与黑色素铁的代谢密切相关。因此,研究黑色素与三价铁离子的结合作用及螯合物的自由基清除活性,定量测定在氧化还原反应中,三价铁离子对于黑色素的影响,是非常有意义的。在本文的研究中,黑色素与铁螯合以后,其抗氧化活性明显下降,这可能是黑色素与三价铁螯合时对二苯酚/苯醌结构转换而失去电子,降低了其清除自由基的活性,但进一步的研究仍有待进行。

本研究通过超速离心法从鲑鱼墨中提取了黑色素,并制备黑色素铁。发现鲑鱼黑色素具有显著的自由基清除活性,并且明显优于肌肽,与铁螯合后其清除活性降低。鲑鱼墨黑色素是一种天然的新型自由基清除剂,具有较强开发潜力。

- [1] 吕昌龙,李宇和,钟建国,等. 乌贼墨中微量元素含量的测定[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(9): 555.
- [2] Agnis Kim SY, Kim SH, Song KB, et al. Partial purification and characterization of an angiotensin-converting enzyme inhibitor from squid ink[J]. *Agricultural Chemistry and biotechnology*, 2003, 46(3): 9.
- [3] Takaya Y. Biological activities of natural resource around us are now in the limelight[J]. *Yakugaku Zasshi*, 2000, 120(11): 1075.
- [4] Takaya Y, Uchisawa H. An investigation of the anti-tumor peptidoglycan fraction from squid ink[J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(6): 846.
- [5] Tetsushi N, Hidemitsu U. Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argenteus*[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 1026.
- [6] Ritade CR, Goncalves and Sandra R. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biol J. Pharm Bul*, 2005, 28(6): 1129.
- [7] 王玉洁,符坚,沈萍,等. 彭珍荣重要的生物资源黑色素及其功能的机理[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(1): 12.
- [8] Liu Y, Simon JD. The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis*[J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16: 72.
- [9] Elena P, Guadalupe P, Rosario G, et al. High pressure and the enzymic hydrolysis of soybean whey proteins[J]. *Food Chemistry*, 2004, 85: 641.
- [10] 林维宣,纪淑娟,马若松,等. 食品分析[M]. 北京:轻工业出版社, 1989: 90.
- [11] 林金明. 活性氧的化学发光测定法[J]. 环境科学学报, 2003, 23(2): 230.
- [12] Yan Liu, Simon JD. Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy[J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16: 606.
- [13] Xu Xing-liao, Zhuang Su, Chen Bo-xiang, et al. The effect of melanin from white silky fowl on antiageing in *Drosophila melanogaster*[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1999, 22(2): 105.
- [14] Ma Gorzata R, Tadeusz S, Edward J, et al. Free Radical Scavenging Properties of Melanin Interaction of Eu and Pheo-Melanin Models with reducing and oxidation Radicals[J]. *Free Radicat Biology and Medicine*, 1999, 26(5-6): 518.
- [15] Patel K R, Wymann J A, Patel K, et al. A Mutant of *Bacillus Thuringiensis* Producing a Dark-brown Pigment With Increased UV Resistance and Insecticidal Activity[J]. *Invertebr Pathol*, 1996, 67(2): 120.
- [16] Jellinger KA. The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease[J]. *Drug s Aging*, 1999, 14: 115.
- [17] Berg D, Gerlach M, Youdim MBH, et al. Iron pathways and their relevance to Parkinson's disease[J]. *Neurochem*, 2001, 79: 225.

(收稿日期: 2006-07-28)

· 海洋功能食品 ·

鱿鱼皮胶原蛋白水解肽抗氧化活性研究[△]

林琳, 李八方*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘 要:目的 探讨秘鲁鱿鱼(*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup)皮胶原蛋白多肽组分对自由基的清除作用以及水解产物的体内抗氧化作用,为鱿鱼加工废弃物的高值化利用探索一条新途径。方法 采用化学发光法研究胶原蛋白活性多肽体外对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($\cdot OH$)的清除作用,并筛选出体外清除自由基活性最好的组分;灌胃于 D-半乳糖致衰老的模型小鼠,测定小鼠血液及皮肤中的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力和丙二醛(MDA)及羟脯氨酸(Hyp)含量。结果与结论 鱿鱼皮胶原蛋白多肽分子量小于 2000D 组分对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 具有较好的清除效果,该活性多肽组分可以提高小鼠血液及皮肤中 SOD 和 GSH-Px 的活力,降低 MDA 含量,并能提高小鼠皮肤组织中 Hyp 的含量。

关键词:鱿鱼皮;胶原蛋白;多肽;抗氧化

中图分类号:R931.74;R979.19 文献标识码:A 文章编号:1002-3461(2006)04-0048-04

Studies on the antioxidation activity of squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin hydrolysate

LIN Lin, LI Ba-fang

(The Faculty of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the free radical scavenging effects and antioxidation activity of squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin hydrolysate. **Methods** The free radical scavenging effects of the hydrolysate on superoxide and hydroxyl free radicals were assessed by chemiluminescence analysis method. The activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and content of malondialdehyde (MDA), hydroxyprolyne (Hyp) in blood serum and skin tissue in galactose treated mice were analyzed after 42 days of hydrolysate feeding. **Results and Conclusion** The fraction with relative molecule weight less than 2000 D of the hydrolysate had the highest free radical scavenging effects on superoxide and hydroxyl free radicals, and the activities of SOD, GSH-Px were enhanced, the quantity of MDA in blood serum and skin tissue of the mice was decreased and the quantity of Hyp in skin tissue of mice was increased after the hydrolysate administration.

Key words: squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin; gelatin; polypeptide; antioxidation

随着我国渔业的发展,水产品的综合利用也越来越引起人们的重视。目前,已从多种水产品中分离得到具有各种活性功能的寡聚肽^[1,2]。从水产品加工废弃物中获取胶原蛋白并制备活性肽,既可以减少环境污染,又

能够充分利用现有资源,提高企业的经济效益。

在美国、德国、日本等国家,许多高档化妆品中添加有胶原蛋白。美国 CTFA 化妆品原料手册录用的天然物质和《功能性化妆

[△]基金项目:青岛市重点攻关课题(03-1-HH-12)

作者简介:林琳,女,博士研究生 Tel: (0532) 82031662; E-mail: linlin7805@163.com * 通讯作者:李八方,男,博士生导师

品原料》中,都有胶原蛋白或其水解产物^[3,4]。有文献报道^[5,6],胶原蛋白及其水解产物可以给皮肤提供必需的养分,并具有改善皮肤细胞的生存环境和促进皮肤组织的新陈代谢,改善表皮和真皮的结构等作用。

我国鱿鱼加工主要分布在浙江和山东,鱿鱼年加工量为 30~40 万吨,其中鱿鱼皮占加工量的 8%~10%,鱿鱼皮干物质中 80% 左右是胶原蛋白,本文以秘鲁鱿鱼皮(*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup)为原料提取胶原蛋白,酶解制备具有抗氧化活性的寡聚肽产品,并采用 D-半乳糖诱导的小鼠皮肤衰老模型,研究其对小鼠血液及皮肤中抗氧化系统的影响,为鱿鱼加工废弃物的综合利用探索一条新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料和仪器设备

秘鲁鱿鱼皮,由喀秋莎国际贸易有限公司提供;清洗后于 -20℃ 冻藏;碱性蛋白酶 properase E(无锡酶制剂厂);肌肽(常熟市富士莱医药化工有限公司);SOD 试剂盒、GSH-Px 试剂盒及 MDA 试剂盒(南京建成生物工程有限公司)。

雄性昆明种小白鼠,体重(20±2)g,青岛市实验动物和动物实验中心提供。

BR4i 型冷冻离心机(Jouan, France);UV-2102 PC 型紫外分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);WDD-2 型电脑发光测试仪(北京瑞利分析仪器公司);SCM-300 型杯式超滤器(中科院上海应用物理研究所)。

1.2 鱼皮胶原蛋白的提取及寡聚肽的制备

称取一定量的鱼皮,剪成小块,加 0.05 mol · L⁻¹ NaOH 溶液(W:V=1:6)浸泡 30 min,水洗至中性。再加 0.2% 硫酸溶液(W:V=1:6)浸泡 30 min,水洗至中性,最后用热水抽提过夜,4000 r · min⁻¹ 离心 20 min,弃去沉淀不溶物,得到粗胶制品,粗胶旋转蒸发浓缩后,于冷冻干燥机中冻干^[7]。

称取制备的胶原蛋白,用缓冲液(pH 9.0, 0.02 mol · L⁻¹) 100 mL 溶解制成 1% 的胶原溶液。以酶与底物比为 1:50 的比例加碱性蛋白酶 properase E,在 45℃ 水浴中水解 3h 后,沸水浴中灭活酶 5 min, 4000 r · min⁻¹ 离心 15 min。

取上清液依次用截留值分子量为 10000D, 6000D, 2000D 的超滤膜超滤处理,得到不同组分多肽,分子量(Mr)范围分别为:UC-10, Mr>10000D; UC-6, 6000D<Mr<10000D, UC-2, 2000D<Mr<6000D, UF-2, Mr<2000D, 以上几种产物分别测定其体外对羟自由基(·OH)和超氧阴离子自由基(O₂⁻)的清除活性。

1.3 体外清除自由基活性的测定^[8]

羟基自由基(·OH)体系:抗坏血酸-硫酸铜-酵母-H₂O₂ 体系;超氧阴离子自由基(O₂⁻)体系:焦性没食子酸-鲁米诺体系。

1.4 动物的分组及衰老模型的建立^[9,10]

昆明种小白鼠 40 只,雄性,按体重随机分为正常组、模型组、阳性对照组(采用肌肽作为阳性对照)和给药组。模型组每天颈背部皮下注射 D-半乳糖 1000 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,同时灌胃 2 mL(10 mL · kg⁻¹ · d⁻¹)生理盐水。给药组每天颈背部皮下注射 D-半乳糖,并灌胃从鱿鱼皮胶原蛋白水解液中分离的寡聚肽组分,剂量为 100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹。阳性对照组每天皮下注射 D-半乳糖同时灌胃肌肽,剂量为 40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹。

1.5 标本取材方法

小鼠饲养 42d 后,停止注射、灌胃,停食一天,摘眼球取血,分离血清。背部皮肤取下后冰冻保存,拟作皮肤组织匀浆及测定皮肤羟脯氨酸含量之用。

1.6 10%皮肤组织匀浆液的制备

取背部脱毛皮肤组织块 0.5 g 左右,经预冷生理盐水漂洗,除去皮下脂肪和其它结缔组织,滤纸拭干,称重,量取该组织块 9 倍重量预冷生理盐水,用内切式组织匀浆机在

冰水条件下制成 10% 的组织匀浆, 然后反复冻融 3 次, 使其完全破碎, 细胞内容物完全游离在液相中, 最后 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 制成皮肤组织匀浆液。

1.7 血清和皮肤组织匀浆液中各项指标的测定

血清与皮肤组织匀浆液中 SOD, GSH-Px 活力, MDA 含量的测定按照南京建成生物工程有限公司 SOD 试剂盒, GSH-Px 试剂盒及 MDA 试剂盒的说明进行。

皮肤组织匀浆液中羟脯氨酸含量, 按照 Reddy 等^[11]的方法测定。

1.8 数据处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 组间比较采用 t 检验。

2 试验结果

2.1 鱿鱼皮胶原蛋白寡聚肽的制备及体外清除自由基活性

通过以上的的方法, 制备得到不同相对分子质量范围的鱿鱼皮胶原蛋白寡聚肽产物, UC-10, UC-6, UC-2 和 UF-2 组分蛋白质含量分别为 43.0%, 19.9%, 16.2% 和 20.9%, 换算成相同的蛋白质含量后, 分别测定其体外对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除活性, 结果见图 1。

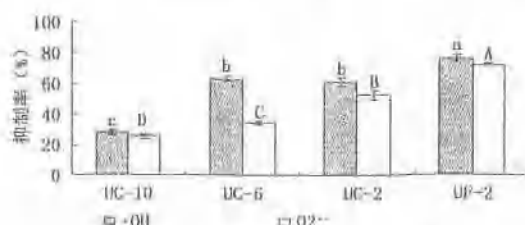


图 1 从鱿鱼皮中提取的不同多肽组分对自由基发光抑制活性的比较(相同的蛋白质含量)
a, 不同的字母代表各组分对 $\cdot\text{OH}$ 清除效果的差异显著 ($P < 0.05$); A, 不同的字母代表各组分对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除效果的差异显著 ($P < 0.05$)。

从图 1 可以看出, 不同相对分子质量的产物对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 发光的抑制活性不同, 水解产物清除自由基的活性随着相对分子质量的降低而显著的提高, 相对分子质量小于 2000 (UF-2) 组分对两种自由基都有很好的清除作用。

2.2 鱿鱼皮胶原蛋白寡聚肽的体内抗氧化活性

选择清除自由基能力强的 UF-2 组分进行动物试验, 结果见表 1 和表 2。由表 1 和表 2 可以看出, 给予 D-半乳糖后使动物体内自由基增多, 同时 SOD 和 GSH-Px 的活力降低, 抗氧化酶体系造成严重的破坏, MDA

表 1 小鼠血清中各生化指标的检测结果 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD 活力 (U · mL ⁻¹)	MDA 含量 (nmol · mL ⁻¹)	GSH-Px 活力 (U)
空白对照组	295.90 ± 61.31	3.39 ± 0.70	1096.99 ± 72.46
模型组	136.40 ± 29.86*	5.90 ± 0.40*	698.49 ± 68.45*
阳性对照组	223.98 ± 45.07 [△]	3.49 ± 0.44 [△]	817.19 ± 33.49 [△]
给药组	237.47 ± 31.67 [△]	3.76 ± 0.34 [△]	1026.46 ± 143.71 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.01$

表 2 小鼠皮肤组织匀浆液中生化指标的检测结果 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD 活力 (U · mg protein ⁻¹)	MDA 含量 (nmol · mg protein ⁻¹)	GSH-Px 活力 (U)	羟脯氨酸 (μg · g ⁻¹ 皮肤)
空白对照组	44.14 ± 2.48	0.59 ± 0.18	49.54 ± 7.53	2.84 ± 0.36
模型组	32.02 ± 5.96*	1.30 ± 0.35*	35.13 ± 4.50*	1.69 ± 0.30*
阳性对照组	46.46 ± 2.09 [△]	0.69 ± 0.15 [△]	53.39 ± 6.09 [△]	2.65 ± 0.22 [△]
给药组	45.66 ± 2.73 [△]	0.71 ± 0.16 [△]	53.68 ± 9.57 [△]	2.50 ± 0.36 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.01$

水平升高,说明用 D-半乳糖建立衰老模型成功。给药组动物血清中的 SOD 和 GSH-Px 的活性均显著高于模型组,而血清中 MDA 含量也显著低于模型组,与正常组的动物血清中 MDA 含量相近;与正常组相比,注射 D-半乳糖的模型组小鼠皮肤组织匀浆液中 SOD 和 GSH-Px 的活性显著降低,MDA 含量显著增高、皮肤羟脯氨酸含量较正常组减少,给药组和阳性对照组小鼠皮肤组织匀浆液中 SOD、GSH-Px 的活性显著高于模型组。

3 讨论

近年来,自由基学说认为人体衰老的主要原因是人体细胞代谢过程中不断产生的自由基,使生物膜结构中的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,引起膜结构和生理功能的紊乱^[12]。正常机体存在一套健全的抗氧化系统如 SOD、GSH-Px 等,它们在体内具有清除有害过氧化物、减轻和阻断脂质过氧化连锁反应等作用。

王红丽等^[10]在 D-半乳糖致衰老模型的研究中发现,在一定时间内连续给动物注射 D-半乳糖,在醛糖还原酶的催化下,半乳糖被还原成半乳糖醇,导致代谢紊乱,破坏并消耗机体抗氧化防御系统,同时,在半乳糖还原成半乳糖醇的过程中又产生活性氧自由基,使机体出现衰老。

本研究中发现,每天注射 $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 D-半乳糖,可以使小鼠的血清和皮肤中的 SOD 和 GSH-Px 活性的下降,使得体内大量积累的自由基无法清除,而给动物灌胃鲑鱼皮中提取的 $Mr < 2000$ D 的多肽组分 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 能够保护动物血清和皮肤中的 SOD 和 GSH-Px 的活性,使动物血液和皮肤中的 MDA 含量显著降低,并能提高试验动物皮肤中羟脯氨酸的含量。说明通过给药,可以防止自由基对血液和皮肤中的脂质的氧化和细胞膜的破坏,从而抑制 D-半乳糖所致的衰老,有效地清除体内堆积的自

由基,使体内自由基防护体系的功能有所恢复。同时,给药后皮肤中羟脯氨酸含量显著提高,表明鲑鱼皮胶原蛋白多肽对皮肤组织中的胶原蛋白含量有提高作用,间接表明该多肽组分可能对皮肤细胞的生长和代谢具有一定的促进作用。

肌肤是一种具有抗氧化作用的二肽,它的抗氧化机理主要是因为它是一种很强的还原剂,可以抑制体内的一些氧化反应的发生,并能够螯合金属离子,清除自由基^[13]。本研究的试验结果表明,鲑鱼皮胶原蛋白水解肽在试验动物体内同样具有的抗氧化作用,推测其抗氧化机理应该与肌肤类似,同时,鲑鱼皮胶原蛋白水解肽来源于日常食用的水产品中,所以可以以此为基础,开发一种天然抗氧化剂应用于食品、药品及化妆品领域。

参考文献:

- [1] 陈胜军,曾名勇,董士远.水产胶原蛋白及其活性肽的研究进展[J].水产科学,2004,23(6):44.
- [2] 曾名勇,李八方,陈胜军,等.红非鲫(*Oreochromis niloticus*)鱼皮胶原蛋白降解条件的研究[J].中国海洋药物,2005,24(5):24.
- [3] 张铭让,林炜.胶原蛋白在化妆品与蛋白饮料中的应用[J].北京皮革,2000,(10):42.
- [4] 裴炳毅.化妆品化学与工艺技术大全[M].北京:中国轻工业出版社,1997:197.
- [5] 陈冬英.胶原蛋白与化妆品[J].香料香精化妆品,2001,(6):18.
- [6] 裴炳毅.生物技术制剂及其在化妆品中的应用[J].日用化学工业,1996,(1):52.
- [7] Grossman S, Bergman M. Process for the production of gelatin from fish skins [P]. US Patent, 5093474. 1992.
- [8] 薛长湖,徐强,赵雪,等.琼胶低聚糖清除自由基的活性[J].水产学报,2003,23(3):283.
- [9] 王少康,孙桂菊,张建新,等.亚急性衰老动物模型的建立及评价[J].东南大学学报,2002,21(3):218.
- [10] 王红丽,吴铁,钱聚标,等. D-半乳糖致衰老模型小鼠皮肤衰老的观察[J].中老年杂志,2004,23(8):566.
- [11] Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues [J]. Clin Biochem, 1996,29(3):225.
- [12] 张学武,刘超,张树力.珍珠梅提取物抗衰老作用的研究[J].四川中医,2004,22(8):9.
- [13] 韩建娜,裴娟萍.肌肤的抗氧化性及其在医药上的应用[J].科技通报,2005,21(1):99.

(收稿日期:2006-01-17)