

海参肽的抗氧化稳定性及对细胞氧化损伤的保护作用

王倩倩¹, 杜 鹃², 冯凤琴^{1*}

¹ 浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310058

² 杭州康源食品科技有限公司 杭州 310003

摘要 目的:探究不同水解度海参肽(低水解度为 SCP-L 和高水解度为 SCP-H)的抗氧化稳定性及对 H₂O₂ 诱导的 L929 细胞氧化应激损伤的保护作用。方法:首先以羟自由基清除率($\cdot\text{OH}$)为评价指标,考察温度、pH、食品配料、金属离子和模拟胃肠环境对海参肽抗氧化稳定性的影响。然后,利用 H₂O₂ 诱导 L929 细胞建立氧化应激损伤模型,测定细胞的存活率及细胞水平的抗氧化指标。结果:在 20~100 °C 范围,SCP-L 和 SCP-H 均具有良好的热稳定性;在氯化钠、Cu²⁺、Zn²⁺、碱性和模拟胃液环境下降低了其抗氧化稳定性;模拟胃肠消化,提高了 SCP-L 和 SCP-H 的抗氧化活性。SCP-L 和 SCP-H 质量浓度在 0.2~0.8 mg/mL 时,显著提高了氧化损伤 L929 细胞的存活率;与模型组相比,SCP-L 和 SCP-H 质量浓度为 0.6 mg/mL 时,乳酸脱氢酶(LDH)活力分别显著下降了 20.67%和 25.91%,丙二醛(MDA)含量分别显著下降了 26.39%和 44.36%,超氧化物歧化酶(SOD)活力分别显著提高了 89.63%和 130.17%,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力分别显著提高了 26.22%和 40.41%。结论:海参肽在储存过程中应尽量避免与碱性、含氯化钠、Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 等环境因素接触。SCP-L 和 SCP-H 均能有效阻止 H₂O₂ 诱导的 L929 细胞氧化应激损伤,且 SCP-H 效果优于 SCP-L。

关键词 海参肽; 水解度; 稳定性; 氧化损伤

文章编号 1009-7848(2023)10-0023-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.10.003

一般情况下,体内的自由基(细胞代谢的中间产物)是不断产生的,以维持活性氧正常的代谢平衡^[1-2]。然而,过多的自由基会攻击细胞的不饱和脂肪酸和蛋白质,引起脂质、蛋白质和 DNA 等大分子的氧化,从而诱导细胞凋亡。大量研究表明:癌症、阿尔茨海默症、2 型糖尿病和心血管疾病等慢性疾病都与体内活性氧含量的增加有关^[3-4]。因此,有必要寻求能够维持体内自由基代谢平衡的外源性抗氧化剂来改善人体生理机能,从而达到预防慢性疾病的目的。目前,通过蛋白水解从食物蛋白制备的生物活性肽包括谷物类^[5]、蔬菜类^[6]、蛋类^[7]、坚果类^[8]、奶类^[9]、鱼类^[10]等被证明具有显著的抗氧化活性。与化学合成的抗氧化化合物相比,食物来源的抗氧化肽无不良副作用。另外,抗氧化肽不仅在体外和细胞模型中具有清除自由基和脂质氧化抑制的活性,而且还可改善活性氧介导的包括小鼠和果蝇在内的氧化应激损伤^[11-12]。

海参(*Holothurians*),棘皮动物门海参纲动物,

可能早在寒武纪时期就出现了。在世界范围内已知约有 50 种海参可被食用,其中以海参、刺参和梅花参为主要属。自古以来,海参因具有抗氧化、抗癌、抗炎、抗凝血、抗疲劳和抗衰老等促进健康的功效而用于医药行业^[13-14]。海参体壁中含有丰富的蛋白质(约 80%~90%),是制作海参肽的良好来源,且已被证明具有良好的体外和体内抗氧化活性^[15-16]。目前关于海参肽的研究主要集中在制备工艺、分离纯化及生物活性等方面,而有关加工、储藏条件对其活性的影响研究较少^[17-18]。本文通过研究不同水解度海参肽(SCP-L 和 SCP-H)在不同环境因素(温度、pH、食品配料、金属离子、模拟胃液消化)条件下对海参肽抗氧化稳定性的影响,评估其对 H₂O₂ 诱导 L929 细胞氧化应激损伤的保护作用,以为海参肽的实际应用提供一定的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

不同水解度的海参肽(低水解度 DH=27.73%, SCP-L; 高水解度 DH=33.57%, SCP-H)由杭州康源食品科技有限公司提供。

收稿日期: 2022-10-25

基金项目: 宁波市科技创新 2025 重大专项(2019B10060)

第一作者: 王倩倩,女,博士生

通信作者: 冯凤琴 E-mail: feng_fengqin@hotmail.com

小鼠成纤维细胞 L929 购于中科院上海细胞库,培养基为含有胎牛血清(10%)和双抗(1%)的 RPMI1640,培养条件为 37 °C,5%CO₂。

胎牛血清,浙江天杭生物科技股份有限公司; RPMI1640 培养基、双抗、0.25%胰酶,上海源培生物科技股份有限公司;LDH、SOD、GSH-Px 和 MDA 试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

BSA224S 电子分析天平、PB-10 pH 计,赛多利斯科学仪器有限公司;HH-6 数显恒温水浴锅,常州澳华仪器有限公司;Infinite M200 Pro 酶标仪,瑞士帝肯集团公司;超净工作台,苏州净化设备有限公司;HC-3018R 高速冷冻离心机,安徽中佳科学仪器有限公司;MCO-170AICUVDL-PC CO₂ 细胞培养箱,日本松下电器产业株式会社。

1.3 试验方法

1.3.1 体外抗氧化活性

1) DPPH 自由基清除率^[19] 在离心管中依次加入 200 μL 海参肽溶液 (5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/mL) 和 400 μL DPPH 溶液 (0.05 mmol/L), 混匀后置于室温下避光反应 0.5 h, 于 517 nm 波长处测定其吸光值。同时做样品对照和空白对照, 并通过公式(1)计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100 \quad (1)$$

2) 羟自由基清除率^[20] 在离心管中依次加入 200 μL 硫酸亚铁溶液 (9 mmol/L)、200 μL 水杨酸-乙醇溶液 (9 mmol/L)、200 μL 海参肽溶液 (5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/mL) 和 200 μL H₂O₂ (0.03%), 混匀后置于 37 °C 水浴锅中反应 0.5 h, 于 510 nm 波长处测定其吸光值。同时做样品对照和空白对照, 并通过公式(2)计算:

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100 \quad (2)$$

3) ABTS 自由基清除率^[21] 0.5 mL ABTS 溶液 (7 mmol/L) 与 0.5 mL K₂S₂O₈ (2.45 mmol/L) 混合均匀, 室温避光保存 16 h 后使用。然后用蒸馏水稀释至 734 nm 波长处吸光度为 0.7±0.02。取 100 μL 的海参肽溶液 (5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/mL) 与 100 μL 的 ABTS 工作液混匀, 避光反应 10 min, 于

734 nm 波长处测定吸光度。同时做空白对照, 并通过公式(3)计算:

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100 \quad (3)$$

1.3.2 环境稳定性

1) 温度 将海参肽溶液 (15 mg/mL) 分别置于 20, 40, 60, 80, 100 °C 的水浴锅中水浴 1 h, 冷却至室温后, 测定其·OH 清除率。

2) pH 分别用盐酸和氢氧化钠将海参肽溶液 (15 mg/mL) 的 pH 值调节至 3, 5, 7, 9, 11, 在室温下放置 1 h, 测定其·OH 清除率。

3) 食品配料 在海参肽溶液 (15 mg/mL) 中分别添加 5% 的氯化钠、葡萄糖、淀粉、蔗糖、乳糖, 在室温下放置 1 h, 测定其·OH 清除率。

4) 金属离子 在海参肽溶液 (15 mg/mL) 中分别添加 500 μg/mL 的 KCl, CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂ 和 CuCl₂, 在室温下放置 1 h, 测定其·OH 清除率。

5) 胃肠道蛋白酶^[22] 胃消化阶段: 将海参肽按照 1:10(g/mL) 的比例加入到胃蛋白酶液中, 置于 37 °C 水浴锅中模拟胃消化 1 h。灭酶后冷冻干燥以获得模拟胃消化阶段的海参肽。胃肠消化阶段: 将胃消化阶段的海参肽灭酶后, 用 NaHCO₃ (0.9 mol/L) 溶液将 pH 值提高到 5.3, 并进一步用氢氧化钠 (1 mol/L) 将 pH 值调节至 6.8, 然后同样按照 1:10(g/mL) 的比例加入到胰蛋白酶液中, 并将混合物置于 37 °C 中模拟肠消化 2 h。消化完成后将混合液置于沸水浴中加热 10 min 以灭酶活, 然后将其冷冻干燥以获得模拟胃肠消化的海参肽。最后将获得胃和胃肠消化阶段的海参肽配制成质量浓度为 15 mg/mL 的溶液, 分别测定其·OH 清除率。

1.3.3 海参肽对 L929 细胞损伤的保护作用

1.3.3.1 海参肽对 L929 细胞生长的影响 参照王倩倩等^[23]的方法培养 L929 细胞, 并计算细胞的存活率。其中海参肽的质量浓度分别为 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/mL。

1.3.3.2 海参肽对 L929 细胞损伤的保护作用 参照王倩倩等^[23]的方法培养 L929 细胞, 构建 H₂O₂ 诱导细胞氧化损伤模型, 并计算细胞的存活率。其中海参肽的质量浓度分别为 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8

mg/mL。

1.3.3.3 抗氧化指标测定 将细胞按照 1×10^5 个/孔的密度接种到 6 孔板中,然后按照 1.3.3.2 节描述的步骤处理后,收集细胞和培养液。分别测定上清液中 LDH 活力和细胞内 SOD 活力、GSH-Px 活力和 MDA 含量。

1.4 数据处理

数据采用 SPSS 26.0 进行统计学处理,结果表示为“平均值 \pm 标准差”。

2 结果与分析

2.1 抗氧化稳定性

2.1.1 体外抗氧化方法和海参肽浓度筛选 为了筛选出海参肽的体外抗氧化效果最优的评价方法和最佳质量浓度,比较了 3 种体外化学评价方法,分析了不同质量浓度的影响。由图 1 可知,当质量浓度在 5~30 mg/mL 范围内时,SCP-L 和 SCP-H 的上述 3 种体外抗氧化能力均随着质量浓度的增加而增加。在 3 种体外抗氧化评价方法中,SCP-L 的半抑制质量浓度分别为 56.48, 19.58, 11.58 mg/mL, SCP-H 的半抑制质量浓度分别为 46.97, 18.40, 9.89 mg/mL, 得出海参肽对羟自由基清除能力效果最好,故选择该试验方法作为后续评价不同环境因素对海参肽氧化稳定性影响的评价指标。就该方法而言,海参肽质量浓度在 5~15 mg/mL 范围内时,羟自由基清除率有较大变化,在 15 mg/mL 时,分别达到了 67.83% 和 74.05%,此后随

着质量浓度的增加,清除率逐渐增加,而增加不显著。因此,选择海参肽质量浓度 15 mg/mL 进行后续试验。

值得注意的是,在上述 3 种体外抗氧化评价方法中,当两种海参肽的质量浓度相同时,SCP-H 的体外抗氧化活性均高于 SCP-L。分子质量较小的生物活性肽可以更有效地与自由基相互作用,更容易通过肠道屏障,从而在体内发挥抗氧化活性^[24]。根据前期研究结果,SCP-H 分子质量在 2 000 u 以下的肽段含量为 98.39% (< 1 000 u 的部分占 90.12%),而 SCP-L 的为 87.89% (< 1 000 u 的部分占 68.13%)。另外,生物活性肽中的一些氨基酸如极性氨基酸(半胱氨酸、组氨酸和酪氨酸)和疏水性氨基酸(蛋氨酸和色氨酸)可以作为氢供体或受体以形成不同强度的氢键,发挥一定的抗氧化活性^[25]。酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸和组氨酸等氨基酸可作为氢供体;天冬氨酸和谷氨酸等酸性氨基酸能螯合金属离子;丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸等疏水氨基酸可能有助于改善肽在脂质相的溶解度,促进肽与脂质自由基的相互作用,从而提高抗氧化活性^[26]。研究发现在与抗氧化相关的氨基酸组成上,两者是没有任何区别的(SCP-L 的极性氨基酸和疏水性氨基酸为 60.42%,SCP-H 的极性氨基酸和疏水性氨基酸为 60.46%)。因此,SCP-H 的体外抗氧化效果优于 SCP-L,可能是由于其分子质量不同导致的。

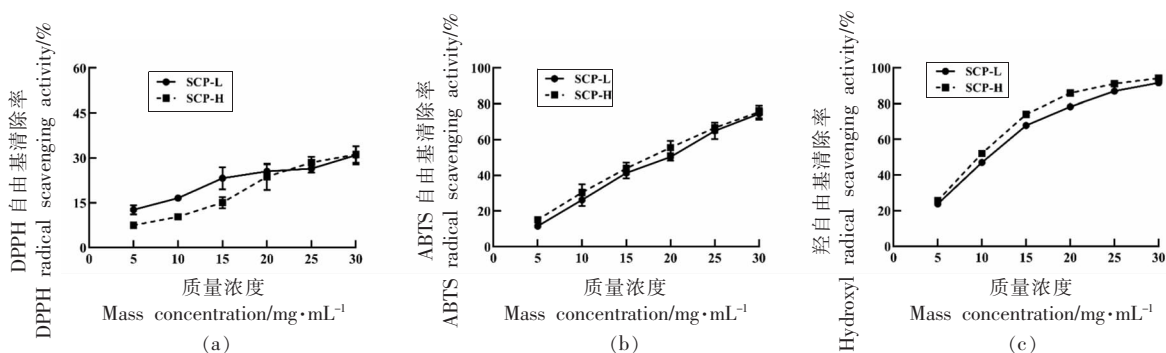


图 1 不同水解度海参肽的体外抗氧化活性

Fig.1 The antioxidant activity *in vitro* of SCP-L and SCP-H

2.1.2 不同环境条件对海参肽抗氧化稳定性的影响 由图 2a 可知,在 20~100 °C 范围内,加热 1 h

后 SCP-L 和 SCP-H 的羟自由基清除率几乎没有变化,这与姚秩俊等^[27]的研究结果相反。姚秩俊

等^[27]研究发现,当温度超过 60 ℃时,菜籽肽的 DPPH 自由基清除率急剧下降,温度为 100 ℃时,其亚铁离子螯合能力仅有 30%左右(室温时为 85%左右)。然而,吴兴美等^[28]的研究结果与本研究类似,他们发现蚕丝素蛋白肽在 90 ℃下放置 2 h 后,仍然具有较高的抗氧化活性(保留原来的 90%~93%)。综合以上研究结果发现海参肽具有良好的热稳定性。

由图 2b 可知,与正常条件下的海参肽溶液的清除率相比,在 pH 值为 5 时,SCP-L 和 SCP-H 的羟自由基清除率也无明显变化,pH 值为 3 和 7 时,自由基清除率 SCP-L 分别下降了 34.67%,18.69%,SCP-H 分别下降了 17.65%,6.86%。在碱性条件下(pH 值为 9 和 12),SCP-L 和 SCP-H 的羟自由基清除能力均完全丧失。出现这种情况可能有两方面的原因,一方面可能是由于强碱环境使得肽分子结构发生消旋作用,肽链构象发生了改变,从而影响了其生物活性的表达^[29],另外一方面可能是因为在碱性环境下作为肽清除自由基的氢供体上的氢被消耗,从而导致其抗氧化活性降低^[30]。综合以上研究结果发现海参肽适用于制

造偏酸性的产品,应尽量避免在碱性强的环境下加工使用。

由图 2c 可知,分别在 SCP-L 和 SCP-H 中添加 5% 的不同食品配料,发现葡萄糖、淀粉、乳糖和蔗糖对其羟自由基清除能力均无明显变化,而添加氯化钠后,其羟自由基清除率显著降低了 13.02% 和 12.12%,这与刘丹^[31]的研究结果相一致。综合以上研究结果发现海参肽应尽量避免在含有氯化钠的环境下。

由图 2d 可知,分别在 SCP-L 和 SCP-H 中添加 500 μg/mL 的金属离子发现,K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺对 SCP-L 和 SCP-H 的羟自由基清除率无明显影响。当添加 Cu²⁺后,羟自由基清除率分别下降了 7.32% 和 11.64%。同样地,Zn²⁺的加入也使得羟自由基清除率下降了 28.12% 和 29.86%,表明海参肽对 Cu²⁺和 Zn²⁺较敏感,这两种金属离子可能与海参肽之间存在特殊的化学力作用,进而使得其抗氧化活性降低,这与裴云成等^[32]的研究结果一致。综合以上研究结果发现海参肽应尽量避免在含有 Cu²⁺和 Zn²⁺的环境。

由图 2e 可知,经模拟胃液消化后的 SCP-L

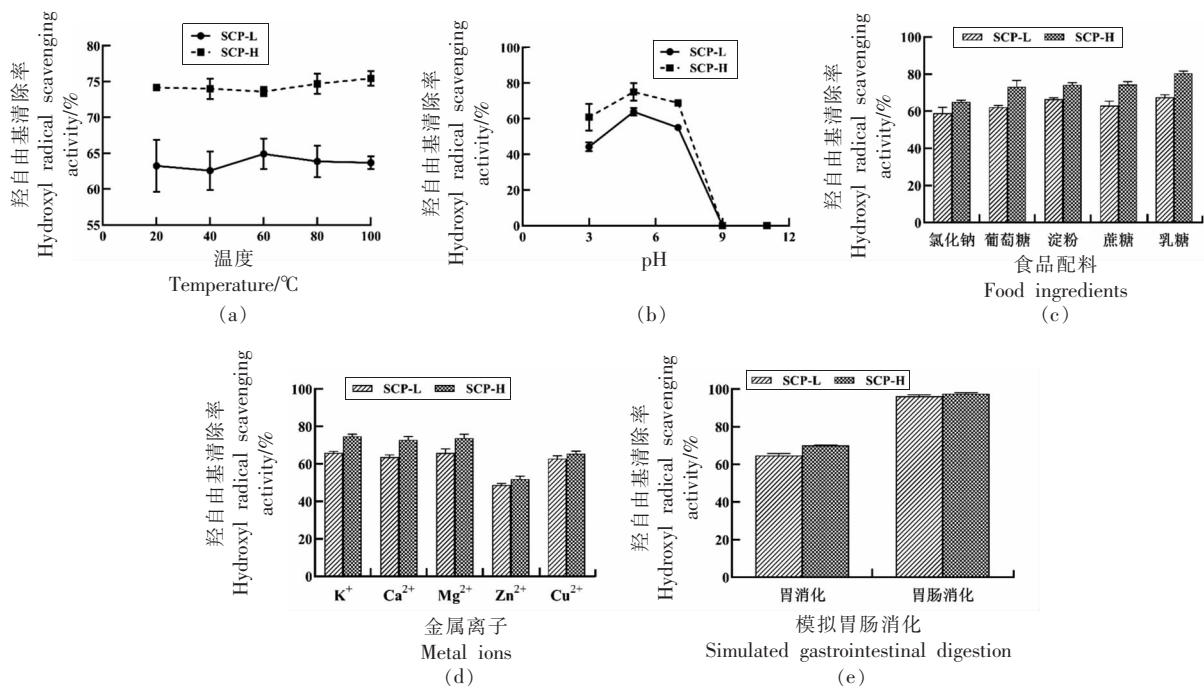


图 2 温度、pH、食品配料、金属离子和胃肠消化对海参肽抗氧化稳定性的影响

Fig.2 Effect of temperature, pH, food ingredients, and metal ions on the antioxidant stability of SCP-L and SCP-H

和 SCP-H 对羟自由基清除活性分别降低了 4.58% 和 5.340%，而经过模拟胃肠液消化后的清除率分别显著增加了 41.88% 和 31.80%。这可能是由于海参肽在经过胃蛋白的作用后，使得原来具有抗氧化活性的部分肽段水解成了单个的氨基酸残基，进而导致其抗氧化能力丧失。但经过胰蛋白的作用后又使得具有抗氧化活性的基因被释放出来。因此，海参肽在模拟胃肠液消化条件下的抗氧化稳定性大于模拟胃液，可适用于制成口服的功能性食品中。

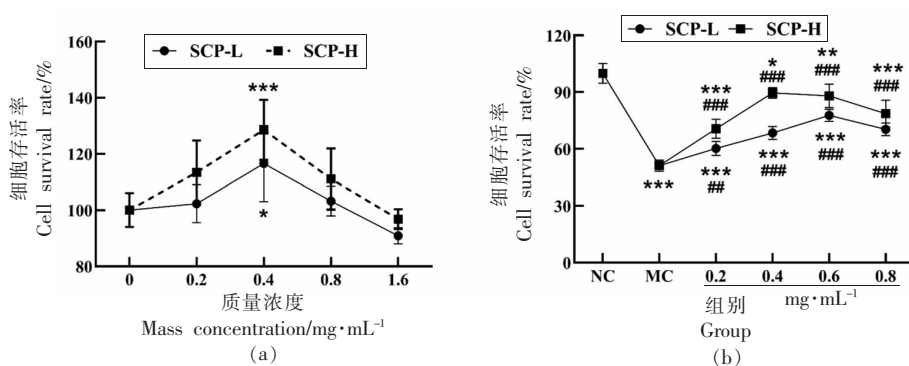
2.2 海参肽对 H₂O₂ 诱导 L929 细胞氧化损伤的保护作用

2.2.1 海参肽对 L929 细胞的毒性作用及其对 H₂O₂ 诱导的细胞损伤的保护作用

基于体外的化学评价方法得知 SCP-L 和 SCP-H 均具有较强的清除自由基能力。而氧化应激是由于过量的自由基积累而导致的一种应激反应，它会使得健康的细胞发生损伤和凋亡。因此，接下来测定了细胞水平上的抗氧化活性。为了确定海参肽作用于 L929 细胞的安全浓度范围，将不同浓度的 SCP-L 和 SCP-H 分别加入到细胞培养基中，培养 24 h 来检测其对 L929 细胞存活率的影响。由图 3a 可知，与正常组相比，无论是 SCP-L 还是 SCP-H，在 0.2~

0.8 mg/mL 时能够促进细胞增殖，SCP-L 细胞存活率分别达到了 102.31%、116.57%、103.25%，SCP-H 细胞存活率达到了 113.47%、128.60%、111.12%。当质量浓度为 1.6 mg/mL 时，抑制了细胞的增殖，存活率分别为 90.88% 和 96.84%，表明海参肽质量浓度为 1.6 mg/mL 时，显示出对 L929 细胞的毒性作用。结果表明，0.2~0.8 mg/mL 的 SCP-L 和 SCP-H 对 L929 细胞均无毒性，且 SCP-H 的效果优于 SCP-L。因此，选取 0.2~0.8 mg/mL 的两种海参肽进行后续试验。

由图 3b 可知，与模型组相比，在 0.2~0.8 mg/mL 质量浓度范围内的 SCP-L 均能显著提高细胞存活率；与模型组相比，0.6 mg/mL 时的两种海参肽组的细胞存活率提高了 52.10% ($P < 0.001$)；SCP-H 与 SCP-L 对细胞的氧化损伤的保护作用的结果相似，然而当质量浓度为 0.4 mg/mL 时，对细胞的保护作用最显著（显著提高了 75.32%）。综合以上结果表明 SCP-L 和 SCP-H 质量浓度为 0.2~0.6 mg/mL 时，对 L929 细胞的氧化损伤的保护作用均较好，且 SCP-H 的效果优于 SCP-L，因此选取 0.2、0.4、0.6 mg/mL 的两种海参肽进行后续试验。



注：与对照组 (NC) 相比，* 代表差异显著， $P < 0.05$ ，** 代表差异极显著， $P < 0.01$ ，*** 代表差异极显著， $P < 0.001$ ；与模型组 (MC) 相比，## 代表差异极显著， $P < 0.01$ ，### 代表差异极显著， $P < 0.001$ ，图 4 同。

图 3 海参肽对 L929 细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of SCP-L and SCP-H on the viability of L929 cells

2.2.2 海参肽对 L929 细胞损伤的抗氧化能力的影响

LDH 广泛存在于各个组织的胞浆内，当细胞受损时便会由细胞内渗透至细胞外^[33]。由图 4a 可知，与模型组相比，SCP-L 的质量浓度为 0.2~

0.6 mg/mL 时，LDH 活力分别减少了 6.19%、17.87%、20.67% ($P < 0.05$)；同样地，SCP-H 的 LDH 活力相应减少了 13.22%、22.61%、25.91% ($P < 0.01$)。当机体处于臭氧、氮氧化物、高氧等环境

时,可能会促使生物膜的多不饱和脂肪酸脂质发生过氧化,进而促进MDA等脂质过氧化物的产生^[34]。由图4b可知,0.2,0.4,0.6 mg/mL的SCP-L使得细胞内的MDA含量降低0.24%,16.37% ($P < 0.05$)和26.39% ($P < 0.01$),同时,SCP-H使得MDA含量分别降低了21.65% ($P < 0.01$),41.14%和44.36% ($P < 0.001$)。

SOD作为各种器官组织中自由基的“头号杀手”,能够将超氧自由基转化为 H_2O_2 。GSH-Px能够将有毒的过氧化物还原为无毒的羟基化合物,同时促进 H_2O_2 分解成 H_2O 和 O_2 ,保护细胞形态^[35]。由图4c可知,与模型组相比,SCP-L质量浓

度为0.2,0.4,0.6 mg/mL时,SOD活力分别提高了30.62%,73.86%,89.63% ($P < 0.01$);同时SCP-H使得SOD活力分别显著提高了65.02%,122.58% ($P < 0.01$)和130.17% ($P < 0.001$)。类似地,SCP-L的GSH-Px活力相应提高了10.37%,35.37% ($P < 0.05$)和26.22%,SCP-H的GSH-Px活力也相应提高了23.76%,41.94%,40.14% ($P < 0.05$)。

综合以上试验结果发现SCP-L和SCP-H均可以通过降低细胞膜的通透性和细胞的脂质过氧化程度,以及提高细胞的抗氧化酶活力,在一定程度上减弱 H_2O_2 诱导的L929细胞氧化损伤,且SCP-H的效果优于SCP-L。

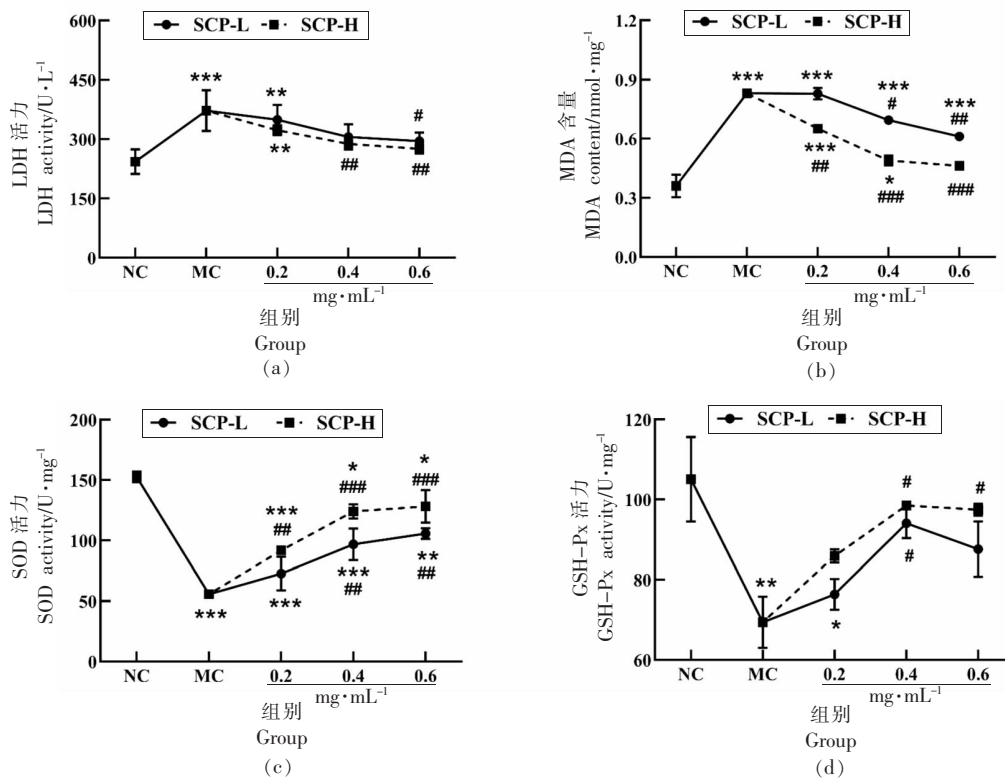


图4 海参肽对 H_2O_2 诱导L929细胞抗氧化活性的影响

Fig.4 Effect of SCP-L and SCP-H on the antioxidant activity in L929 cells induced by H_2O_2

3 结论

抗氧化稳定性研究表明SCP-L和SCP-H均具有良好的热稳定性,当在海参肽中添加葡萄糖、淀粉、蔗糖、乳糖、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对其抗氧化活性均无显著影响;当添加氯化钠、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 以及在碱性环境下显著降低了其抗氧化稳定性;模拟胃液会降低其抗氧化活性,而模拟胃肠液则明显提高了

其抗氧化活性。因此,海参肽在储存过程中应尽量避免与强酸、强碱、含氯化钠、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等环境因素接触。海参肽对 H_2O_2 诱导L929细胞氧化损伤的保护作用结果表明,SCP-L和SCP-H通过降低上清液中LDH活力、细胞内MDA含量以及提高SOD和GSH-Px活力,实现对氧化应激损伤L929细胞起到良好的保护作用,且SCP-H的效果优于

SCP-L。本研究可为海参肽在后期的实际应用提供一定的理论基础。

参 考 文 献

- [1] TAO G, SONG G H, QIN S C. Molecular hydrogen: Current knowledge on mechanism in alleviating free radical damage and diseases[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2019, 51(12): 1189–1197.
- [2] POLJSAK B, SUPUT D, MILISAV I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants[J]. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*, 2013, 2013: 956792.
- [3] POPRAC P, JOMOVA K, SIMUNKOVA M, et al. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2017, 38(7): 592–607.
- [4] RUAN J P, CHEN J D, ZENG J, et al. The protective effects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale collagen hydrolysate against oxidative stress induced by tributyltin in HepG2 cells[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(4): 3612–3620.
- [5] ESFANDI R, WALTERS M E, TSOPMO A. Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals[J]. *Heliyon*, 2019, 5(4): e01538.
- [6] SILVA DO NASCIMENTO E, ANAYA K, MARIANO CAJU DE OLIVEIRA J, et al. Identification of bioactive peptides released from *in vitro* gastrointestinal digestion of yam proteins (*Dioscorea cayenensis*) [J]. *Food Research International*, 2021, 143: 110286.
- [7] NIMALARATNE C, BANDARA N, WU J P. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white[J]. *Food Chemistry*, 2015, 188: 467–472.
- [8] WANG S G, ZHENG L, ZHAO T T, et al. Inhibitory effects of walnut (*Juglans regia*) peptides on neuroinflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-induced cognitive impairment mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(8): 2381–2392.
- [9] CUI Q, SUN Y X, CHENG J J, et al. Effect of two-step enzymatic hydrolysis on the antioxidant properties and proteomics of hydrolysates of milk protein concentrate[J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130711.
- [10] HU X, YANG X Q, WANG T T, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 135: 110882.
- [11] HU Y M, LU S Z, LI Y S, et al. Protective effect of antioxidant peptides from grass carp scale gelatin on the H₂O₂-mediated oxidative injured HepG2 cells [J]. *Food Chemistry*, 2022, 373(Pt B): 131539.
- [12] CAI X X, CHEN S Y, LIANG J P, et al. Protective effects of crimson snapper scales peptides against oxidative stress on *Drosophila melanogaster* and the action mechanism [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 148: 111965.
- [13] KHOTIMCHENKO Y. Pharmacological potential of sea cucumbers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(5): 1342.
- [14] XUE Z, LI H, WANG X L, et al. A review of the immune molecules in the sea cucumber[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 1–11.
- [15] LIN L Z, YANG K, ZHENG L, et al. Anti-aging effect of sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) hydrolysate on fruit flies and d-galactose-induced aging mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 47: 11–18.
- [16] GONG P X, WANG B K, WU Y C, et al. Release of antidiabetic peptides from *Stichopus japonicus* by simulated gastrointestinal digestion [J]. *Food Chemistry*, 2020, 315: 126273.
- [17] YU Y H, WU G Q, JIANG Y G, et al. Sea cucumber peptides improved the mitochondrial capacity of mice: A potential mechanism to enhance gluconeogenesis and fat catabolism during exercise for improved antifatigue property[J]. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*, 2020, 2020: 4604387.
- [18] WAN H T, HAN J J, TANG S S, et al. Comparisons of protective effects between two sea cucumber hydrolysates against diet induced hyperuricemia and renal inflammation in mice [J]. *Food & Function*, 2020, 11(1): 1074–1086.
- [19] ZHENG L, SU G W, REN J Y, et al. Isolation and characterization of an oxygen radical absorbance

- activity peptide from defatted peanut meal hydrolysate and its antioxidant properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(21): 5431–5437.
- [20] ARISE A K, ALASHI A M, NWACHUKWU I D, et al. Antioxidant activities of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) protein hydrolysates and their membrane ultrafiltration fractions[J]. *Food & Function*, 2016, 7(5): 2431–2437.
- [21] SILVEIRA COELHO M, DE ARAUJO AQUINO S, MACHADO LATORRES J, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant capacity of chia protein hydrolysates and peptides[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 91: 19–25.
- [22] LIN X L, YAO M J, LU J H, et al. Identification of novel oligopeptides from the simulated digestion of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) to alleviate A β aggregation progression[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 60: 103412.
- [23] 王倩倩, 杜鹃, 陈鸣, 等. 小麦肽的抗氧化与抗疲劳作用的研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(17): 357–365.
- WANG Q Q, DU J, CHEN M, et al. Study on the antioxidant and anti-fatigue effect of wheat peptides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(17): 357–365.
- [24] SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: A review[J]. *Peptides*, 2010, 31(10): 1949–1956.
- [25] MATSUI R, HONDA R, KANOME M, et al. Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains[J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 750–755.
- [26] WEN C T, ZHANG J X, ZHANG H H, et al. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 105: 308–322.
- [27] 姚秩俊, 张晶, 鞠兴荣, 等. 菜籽抗氧化肽 WD-HHAPQLR 的环境稳定性研究[J]. *中国粮油学报*, 2019, 34(8): 54–60.
- YAO Y J, ZHANG J, JU X R, et al. Environmental stability of rapeseed antioxidant peptide WD-HHAPQLR[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2019, 34(8): 54–60.
- [28] 吴兴美, 毛雨婷, 季炯汛, 等. 家蚕丝素蛋白抗氧化肽的制备及其稳定性研究[J]. *蚕业科学*, 2021, 47(2): 171–178.
- WU X M, MAO Y T, JI J X, et al. Study on preparation and stability of antioxidant peptides from *Bombyx mori* silk fibroin[J]. *Science of Sericulture*, 2021, 47(2): 171–178.
- [29] LIU P, ZHAO M M, CAO Y L, et al. Purification and identification of anti-oxidant soybean peptides by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. *Rejuvenation Research*, 2014, 17(2): 209–211.
- [30] 赵谋明, 何婷, 赵强忠, 等. 蓝园鲮抗氧化肽抗氧化稳定性研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(1): 128–130.
- ZHAO M M, HE T, ZHAO Q Z, et al. Antioxidant stability of peptide from *Decapterus maruadsi* protein[J]. *Food Science*, 2009, 30(1): 128–130.
- [31] 刘丹. 大豆抗氧化活性肽的生物制备技术及稳定性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- LIU D. The research on biological preparation technology and stability of antioxidant peptide from soybean[D]. Changchun: Jinlin University, 2014.
- [32] 裴云成, 朱丹, 崔采莲, 等. 杏鲍菇柄抗氧化肽的制备及其稳定性初步分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(4): 146–152, 160.
- PEI Y C, ZHU D, CUI C L, et al. Preparation of antioxidant peptides from *Pleurotus eryngii* stalk and its stability preliminary analysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(4): 146–152, 160.
- [33] 付晶, 林桐, 陈艾玲, 等. 茶多酚对过氧化氢诱导鹅小肠上皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. *东北农业大学学报*, 2020, 51(4): 61–69.
- FU J, LIN T, CHEN A L, et al. Protective effect of tea polyphenols on H₂O₂-induced oxidative stress in intestinal epithelial cells of goose embryo[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2020, 51(4): 61–69.
- [34] 梁曾恩妮, 汪秋安, 张菊华, 等. 圣草次苷的合成及其对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2021, 42(15): 159–166.
- LIANG Z E N, WANG Q A, ZHANG J H, et al. Synthesis of eriocitrin and its protective effect on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Food Science*, 2021, 42(15): 159–166.
- [35] LUO C H, XU X R, WEI X C, et al. Natural

medicines for the treatment of fatigue; Bioactive macological Research, 2019, 148: 104409.
components, pharmacology, and mechanisms[J]. Phar-

The Antioxidant Stability of Sea Cucumber Peptides and Its Protective Activity against Cellular Oxidative Damage

Wang Qianqian¹, Du Juan², Feng Fengqin^{1*}

¹College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058

²Hangzhou Kangyuan Food Science & Technology Co., Ltd., Hangzhou 310003)

Abstract Objective: To investigate the antioxidant stability and protective effect on L929 from H₂O₂-induced oxidative damage of low hydrolysis degree (SCP-L) and high hydrolysis degree (SCP-H). Methods: The hydroxyl radical scavenging rate was used as the evaluation indicator for exploring the influence of temperature, pH, food ingredients, metal ions, simulated gastrointestinal environment on the antioxidant stability of sea cucumber peptides. The oxidative stress model of L929 cells induced by H₂O₂ was established, and then the cell survival rate, antioxidant indicators at the cellular level were measured. Results: In the range of 20–100 °C, both SCP-L and SCP-H have good thermal stability. The antioxidant activity was decreased in the presence of NaCl, Cu²⁺, Zn²⁺, alkali, and simulated gastric environment, while increased in simulated gastrointestinal environment. Additionally, SCP-L and SCP-H in the mass concentration range from 0.2 to 0.8 mg/mL significantly promoted the survival of L929 cells suffering from oxidative stress. Compared to the model group, the LDH activity of SCP-L and SCP-H at 0.6 mg/mL was significantly decreased by 20.67% and 25.91%, the MDA content was significantly decreased by 26.39% and 44.36%, the SOD activity was significantly increased by 89.63% and 130.17%, and the GSH-Px activity increased by 26.22% and 40.41%. Conclusion: Sea cucumber peptides should avoid contact with NaCl, Cu²⁺ and Zn²⁺ and alkali environment during storage process. Both SCP-L and SCP-H can effectively prevent H₂O₂-induced oxidative damage to L929 cells, and SCP-H treatment showed better antioxidant effect than that of SCP-L.

Keywords sea cucumber peptides; degree of hydrolysis; stability; oxidative damage