

## 荞麦多肽对 RAW 264.7 细胞氧化损伤的保护作用

周柳莎, 周青青, 胡香莲, 俞瑜媛, 徐海星, 施永清\*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

**摘要** 为提高荞麦蛋白生物利用度,利用 Sephadex G-25 凝胶层析和反向高效液相色谱(RP-HPLC)分离制备荞麦抗氧化多肽(BAPs),对其结构进行表征。通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞建立氧化应激模型,评价 BAPs 对细胞氧化损伤的保护作用。结果表明:经分离纯化得到的 BAPs 纯度达 96.25%,其分子质量为 5.8 ku。BAPs 对 DPPH·、ABTS<sup>+</sup>·、·OH 清除能力及 BAPs 的还原力以 VC 当量抗氧化能力(VCEAC)分别表示为(12.12±0.27),(153.82±5.04),(901.95±39.30),(109.23±1.18) μg/mg。在细胞试验中,BAPs 质量浓度达 200 μg/mL 时,相较于模型组,对所有测定抗氧化指标均产生显著性(P<0.05)影响,细胞存活率显著提高 13.80%,细胞内活性氧(ROS)水平下降 40.63%,丙二醛(MDA)含量下降 11.92 nmol/mg prog,超氧化物歧化酶(SOD)活力和过氧化氢酶(CAT)活力分别提高 23.48 U/mg prot 15.71 U/mg prot。BAPs 能有效抵抗 RAW 264.7 细胞产生的氧化应激反应,为开发荞麦多肽为天然抗氧化剂提供理论依据。

**关键词** 荞麦多肽; 分离纯化; 结构表征; RAW 264.7 巨噬细胞; 抗氧化

**文章编号** 1009-7848(2024)09-0080-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.008

自由基是正常细胞的代谢产物,在活细胞中持续产生,最常见的即超氧阴离子自由基、羟基自由基和过氧化自由基等活性氧自由基。自由基在低浓度时可以在生命系统中发挥积极作用,例如预防感染性病原体的入侵。当自由基浓度过高时,使生物体中促氧化剂/抗氧化剂反应平衡状态被打破,从而发生氧化应激反应,损害细胞脂质、蛋白质和 DNA<sup>[1-2]</sup>。过量自由基的存在还可引起 β 胰岛细胞的氧化损伤,诱导 II 型糖尿病的发生<sup>[3]</sup>。与此同时,自由基还与衰老、炎症、心脑血管疾病、癌症等疾病的发生密切相关<sup>[4]</sup>。生命体细胞中内源性抗氧化剂主要有还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、SOD 和 CAT 等酶类物质<sup>[5]</sup>,也可摄入外源性抗氧化物质以抵抗氧化损伤,由于合成抗氧化剂往往具有潜在毒性,因此人们致力于寻求天然抗氧化剂,例如,多酚类物质<sup>[6]</sup>、植物和动物蛋白水解肽类<sup>[7-8]</sup>及多糖类<sup>[9]</sup>物质的开发应用。其中,抗氧化肽是所有天然生物活性肽的重要分支,也是抗氧化剂探索的热潮领域,不仅具有易吸收、较稳定、不引起免疫反应的特点,还能有效提高蛋白生物利用度,解决蛋白溶解特性限制问题,满足不同食品、药品工业的应用需求<sup>[10-11]</sup>。一些文献报道

了有关各类谷物蛋白水解肽的抗氧化活性,如糯米抗氧化肽<sup>[12]</sup>、小麦胚芽肽<sup>[13]</sup>、玉米肽<sup>[14]</sup>等,不同多肽发挥抗氧化活性作用与其自身的氨基酸组成和序列密切相关。

荞麦是蓼科荞麦属的成员,在亚洲、欧洲、北美等地广泛种植,其种类繁多,以普通荞麦的种植最为普遍<sup>[15]</sup>。荞麦籽粒含有丰富的维生素 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub>、赖氨酸、蛋白质、黄酮类、植物甾醇、荞麦醇和硫胺素等,被认为是一种高营养价值的无麸质谷物<sup>[16]</sup>。近年来,各国学者对荞麦中各类抗氧化活性物质进行了研究,例如, Gabr 等<sup>[17]</sup>研究发现荞麦中类黄酮含量增加与抗氧化活性提高呈正相关。Zhu 等<sup>[18]</sup>发现小荞麦中的游离酚较结合酚具有更强的自由基清除能力。刘瑶等<sup>[19]</sup>提取荞麦皮多糖,探究其对铁氰化钾的还原能力及羟基、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)的自由基清除能力。对荞麦蛋白的研究方面,有文献证实荞麦蛋白水解肽具有抗氧化能力(超氧阴离子、羟基自由基和 DPPH 自由基的清除)<sup>[20-21]</sup>。基于上述研究,荞麦多肽有可能成为天然抗氧化剂的重要来源。

本研究以植物乳杆菌和嗜热链球菌两种益生菌为发酵菌株,与荞麦发酵常用菌种<sup>[22-23]</sup>相比,乳酸菌能产生广谱蛋白水解酶,蛋白切割位点广泛,可产生功能性小分子活性肽<sup>[24]</sup>。以益生菌发酵法

收稿日期: 2023-09-25

第一作者: 周柳莎,女,硕士

通信作者: 施永清 E-mail: shiyq@zjsu.edu

制备得到的荞麦抗氧化多肽为对象,利用原料的物质多样性可为微生物生长代谢提供丰富营养源的特点,将蛋白在微生物发酵作用下生成小分子多肽,采用传统化学抗氧化评价方法,结合 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞建立氧化损伤模型,研究荞麦多肽在化学和细胞水平的抗氧化活性,为开发天然食品抗氧化剂提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

原料:荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench),产自山西省朔州市,由山西众恬农业科技有限公司提供。

菌株:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, CICC 20283)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, CICC 6220),中国工业微生物保藏中心。

试剂:超低分子质量标准蛋白 Marker,北京索莱宝科技有限公司;DPPH,上海宝曼生物科技有限公司;2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸),上海麦克林生化科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),杭州四季青生物工程有限公司;DMEM (dulbecco's modified Eagle's medium) 高糖培养基,吉诺生物医药技术有限公司;双抗(青霉素-链霉素)溶液,生工生物工程(上海)股份有限公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)细胞增殖-毒性检测试剂盒,兰杰柯科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ROS 测定试剂盒、SOD 测定试剂盒、MDA 测定试剂盒、CAT 测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;色谱级乙腈,西班牙萨劳有限公司;其它试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

HD-5 型电脑紫外检测仪,上海青浦沪西仪器厂;UV-2600 型紫外分光光度计,日本岛津公司;Waters-2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;Spectramax iD3 型多功能酶标仪,美谷分子仪器有限公司;Mini-PROTEAN 型电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;Nicolet 型傅里叶红外光谱仪,美国尼高力仪器公司;IX51 型倒置显微镜,日本 OLYMPUS 公司;IC-1000 型细胞计数仪,艾力特生命科学(上海)有限公司;TGL-16gR 型台式高速冷冻离心

机,上海安亭科学仪器厂。

### 1.3 方法

1.3.1 粗荞麦多肽的制备 荞麦于 4 ℃条件下浸泡 12 h,打浆,于 90 ℃条件下糊化 1 h 后 0.07 MPa 121 ℃条件下灭菌,制备无菌荞麦浆液。经前期试验,选择植物乳杆菌和嗜热链球菌作为发酵菌株,将菌株活化两次至对数生长期,将活化完成后的细菌 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清,菌体用无菌生理盐水洗涤 3 次后重悬,调整细菌菌量为 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> CFU/mL( $\lambda=600$  nm, OD=0.80)。两菌株按体积比 1:1,体积分数 3%的接种量接种于无菌荞麦浆中,在 37 ℃下发酵 3 d,发酵浆液以 8 000 r/min 离心 15 min,上清液减压浓缩后冷冻干燥得到粗荞麦多肽。

#### 1.3.2 分离纯化

1.3.2.1 Sephadex G-25 分离 利用葡聚糖凝胶柱分离小分子肽的方法<sup>[25]</sup>,将葡聚糖凝胶于 4 ℃条件下浸泡过夜,使其充分溶胀,取出后煮沸 30 min 以排尽凝胶孔隙中的气泡,冷却至室温,装柱(1.6 cm×60 cm),用超纯水平衡柱床至电脑检测端基线处于水平位置。粗荞麦多肽过 0.22  $\mu$ m 滤膜后上样,用超纯水洗脱,控制流速为 1.5 mL/min,紫外检测仪于 280 nm 波长处检测吸光值,利用自动收集装置收集样品。

1.3.2.2 RP-HPLC 纯化 将葡聚糖凝胶分离得到的活性组分进一步用 RP-HPLC 分离纯化。流动相:A 为含 0.1% TFA 的超纯水,B 为含 0.1% TFA 的乙腈;色谱柱:BioBasic-18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 300 Å, 5  $\mu$ m);进样量:50  $\mu$ L;检测波长:220 nm;洗脱条件:0~5 min,90% A;5~20 min,90%~70% A;20~30 min,70%~50% A;30~35 min,50%~10% A;35~40 min,10%~90% A。重复上样,收集活性组分,制备得到 BAPs。

1.3.3 分子质量测定 采用 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳测定多肽分子质量的方法<sup>[26-27]</sup>,并做适当修改。依次配制 20%T、10%T、4%T 的分离胶、夹层胶和浓缩胶。取 3.5 mL 分离胶于两玻璃板间,并用 1 mL 超纯水覆盖,使凝胶表面保持平整,当凝胶完全聚合后,用滤纸吸去上层水分,再迅速取 0.7 mL 夹层胶于分离胶上面,重复上述过程,最后加入浓缩胶至短玻璃板平齐,插入梳子,凝胶聚合

后拔出梳子,制胶完成。一定浓度的 BAPs 加入上样缓冲液后和标准蛋白 Marker 一起放入水浴锅内,沸水浴 10 min,取出后立即上样 10  $\mu\text{L}$ 。首先采用 40 V 的起始电压电泳至指示剂到达分离胶,随后升高电压至 110 V,指示剂到达分离胶底部后停止电泳,整个电泳过程持续时间约 5 h。

1.3.4 红外光谱分析 称取 10 mg 样品加入 1 g 干燥 KBr,研磨后压片,用红外光谱仪进行扫描,扫描波段为 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数 20 次,分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.3.5 体外抗氧化

1.3.5.1 DPPH·清除能力测定 参考 Aondona 等<sup>[28]</sup>测定 DPPH·清除率的方法,用无水乙醇配制 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液,取适宜浓度样品 1 mL 加入等体积 DPPH 溶液,摇匀,置于暗处反应 30 min,在 517 nm 处测定吸光值。分别配制浓度为 11.36,22.72,30.04,45.44,56.80  $\mu\text{mol/L}$  的 VC 溶液,按上述方法测定 DPPH·清除率,以 DPPH·清除率为纵坐标,VC 浓度为横坐标绘制标准曲线得到线性方程  $y=1.32x+16.39$ , $R^2=0.999$ 。通过比较半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ),计算样品的 VCEAC<sup>[29-30]</sup>,以单位  $\mu\text{g}/\text{mg}$  表示。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_0 - A_1}{A_2 - A_3}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中: $A_0$  为含样品和 DPPH 吸光值; $A_1$  为含样品无 DPPH 吸光值; $A_2$  为无样品含 DPPH 吸光值; $A_3$  为无样品和 DPPH 吸光值。

1.3.5.2 ABTS<sup>+</sup>·清除能力测定 参考 Chang 等<sup>[31]</sup>的测定方法,配制浓度分别为 7 mmol/L 的 ABTS 和 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液,按体积比 1:1 混合,混合溶液室温避光放置 12~16 h 形成 ABTS 储备溶液,用前用蒸馏水稀释,使其在 734 nm 处吸光值为  $0.70 \pm 0.02$ ,得到 ABTS 工作液。将 20  $\mu\text{L}$  的样品加入至 200  $\mu\text{L}$  ABTS 工作液中,避光孵育 10 min,在 734 nm 处测定吸光值。测定 VC 在浓度 56.80,113.56,170.34,227.12,283.90  $\mu\text{mol/L}$  时对 ABTS<sup>+</sup>·的清除能力,绘制线性曲线,线性方程为  $y=0.26x-6.77$ , $R^2=0.993$ ,通过  $\text{IC}_{50}$  计算样品 VCEAC。ABTS<sup>+</sup>·清除率计算公式同 1.3.5.1 节。

1.3.5.3  $\cdot\text{OH}$  清除能力测定 采用邢珂慧<sup>[32]</sup>的方

法,取浓度适宜的样品溶液 1 mL,向样品溶液中加入 1 mL 浓度为 6 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  溶液(现配现用),再加入体积分数为 3% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 1 mL,样品空白组用蒸馏水代替,随后加入 1 mL 浓度为 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液,再加入 1 mL 水,于 517 nm 处测定吸光值。测定 VC 浓度在 1.42,2.84,5.68,11.36,17.04 mmol/L 时对  $\cdot\text{OH}$  的清除率,得到线性方程  $y=5.08x+1.09$ , $R^2=0.999$ ,以  $\text{IC}_{50}$  为标准,计算 VCEAC。羟基自由基清除率计算公式同 1.3.5.1 节。

1.3.5.4 还原力测定 参考文献[33]中的方法,并做适当修改,0.5 mL 样品中加入 0.5 mL 质量分数为 1% 的铁氰化钾溶液和 0.2 mol/L (pH=6.6) 的磷酸盐缓冲液,50  $^\circ\text{C}$  水浴 20 min,冰水浴冷却,再加入 0.5 mL 质量分数为 10% 的三氯乙酸溶液,涡旋混匀,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL 加入 1 mL 质量分数为 1% 的三氯化铁溶液,空白组由水代替,于 700 nm 处测定吸光值,还原力由吸光值表示。测定 0.11,0.23,0.45,0.68,0.91 mmol/L 浓度下 VC 的还原力,得到标准曲线方程  $y=1.83x+0.24$ , $R^2=0.999$ ,以 1 mg/mL 质量浓度下样品的还原能力值计算 VCEAC<sup>[34]</sup>。

$$\text{还原力} = A_1 - A_0 \quad (2)$$

式中: $A_1$  为样品组吸光值; $A_0$  为样品空白组吸光值。

### 1.3.6 BAPs 抑制 $\text{H}_2\text{O}_2$ 致 RAW 264.7 细胞氧化损伤试验

1.3.6.1 细胞培养 RAW 264.7 细胞冻存管从液氮中取出后,至 37  $^\circ\text{C}$  水浴锅中迅速融化,细胞悬液转移至离心管中并加入 1 mL DMEM 高糖培养基(含体积分数为 10% 的 FBS、体积分数为 1% 的青霉素-链霉素双抗),小心摇匀后离心去上清,再加入 2 mL 完全培养基将细胞吹散均匀,置于含 8 mL 完全培养基的细胞培养皿中,于 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱中培养,每 48 h 更换新的细胞培养液,取连续传代 4~6 代后的细胞用于试验。

1.3.6.2 氧化应激模型的建立及 BAPs 安全剂量的确定 氧化应激模型的建立:将培养好的 RAW 264.7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,于 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱中培养 24 h 后吸弃培养基,加入含  $\text{H}_2\text{O}_2$  (终浓度为 100,

200,300,400,500,600  $\mu\text{mol/L}$ )的新鲜培养基处理 2 h,参考王晶波等<sup>[35]</sup>的方法,用 CCK-8 法测定细胞存活率,细胞存活率在 50%左右时可以认为细胞处于氧化应激状态,对应的  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为建立氧化应激模型的最适浓度。

荞麦对 RAW 264.7 细胞的毒性作用:接种于 96 孔板中的细胞培养 24 h 后,换用含荞麦多肽(终浓度为 50,100,200,400,800  $\mu\text{g/mL}$ )的无血清培养基继续培养细胞 24 h,CCK-8 法测定细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{试验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100 \quad (3)$$

式中: $A_{\text{试验组}}$ 为细胞经  $\text{H}_2\text{O}_2$  或药品处理后加 CCK-8 试剂测定的吸光度值; $A_{\text{对照组}}$ 为细胞未经任何处理正常培养状态下加 CCK-8 试剂测定的吸光度值; $A_{\text{空白组}}$ 空白组为没有细胞只加入 CCK-8 试剂测定的吸光度值。

1.3.6.3 BAPs 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的氧化损伤 RAW 264.7 细胞存活率的影响 参考 Qin 等<sup>[36]</sup>报道的试验方法并做适当修改。根据 1.3.4.2 节的方法对细胞进行接种培养及药物处理,吸弃培养基后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)小心洗涤 2 次,加入含 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的新鲜培养基继续处理 2 h 后测定细胞活力,考察药物对  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤的抑制作用。

1.3.6.4 细胞 ROS 水平、SOD、MDA 及 CAT 活力测定 细胞 ROS 水平测定:采用黑色 96 孔板培养细胞,细胞接种及药物处理方法同前所述。按照 ROS 测定试剂盒说明书的方法进行操作,将培养完成后的细胞弃上清液后用 PBS 清洗 1 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含 10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA 探针的无血清培养基,37  $^\circ\text{C}$  避光孵育 40 min。用 PBS 清洗 2 次以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA,洗净后重悬细胞,于激发光波长为 488 nm,发射光波长为 525 nm 处测定荧光强度。分别设定正常组(不加 BAPs、不经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理)、样品组(加 BAPs、经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理)、模型组(不加 BAPs、只经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理),设定正常组荧光强度为 100%,计算其他各组的相对荧光强度。

MDA 含量、SOD、CAT 活力测定:将浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,经

药物处理的细胞弃上清后用超声波细胞破碎仪破碎细胞<sup>[37]</sup>,超声波功率为 300 W,每 3~5 s 超声一次,间隔 3 次,细胞裂解液根据 BCA 蛋白定量测定试剂盒说明书加入各试剂后于 562 nm 处测定吸光值,计算细胞裂解液中的蛋白浓度,根据 MDA、SOD、CAT 试剂盒说明书分别测定各指标。

#### 1.4 数据处理

所有试验结果均用 3 次重复试验平均值 $\pm$ 标准差表示,采用软件 IBM SPSS Statistics 25 进行数据统计学分析,软件 Origin 2018 绘图,采用 ANOVA 和 LSD 多重比较法进行方差和显著性分析, $P < 0.05$  为数据差异显著; $P < 0.01$  为数据差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡聚糖凝胶分离

粗荞麦多肽经 Sephadex-G25 分离后于 280 nm 处检测到 3 个吸收峰,依次命名为 S1、S2、S3。收集各组分,减压浓缩后冷冻干燥,保存备用。

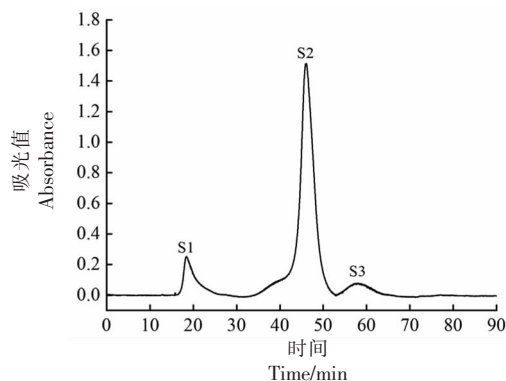


图 1 Sephadex-G25 层析分离图谱

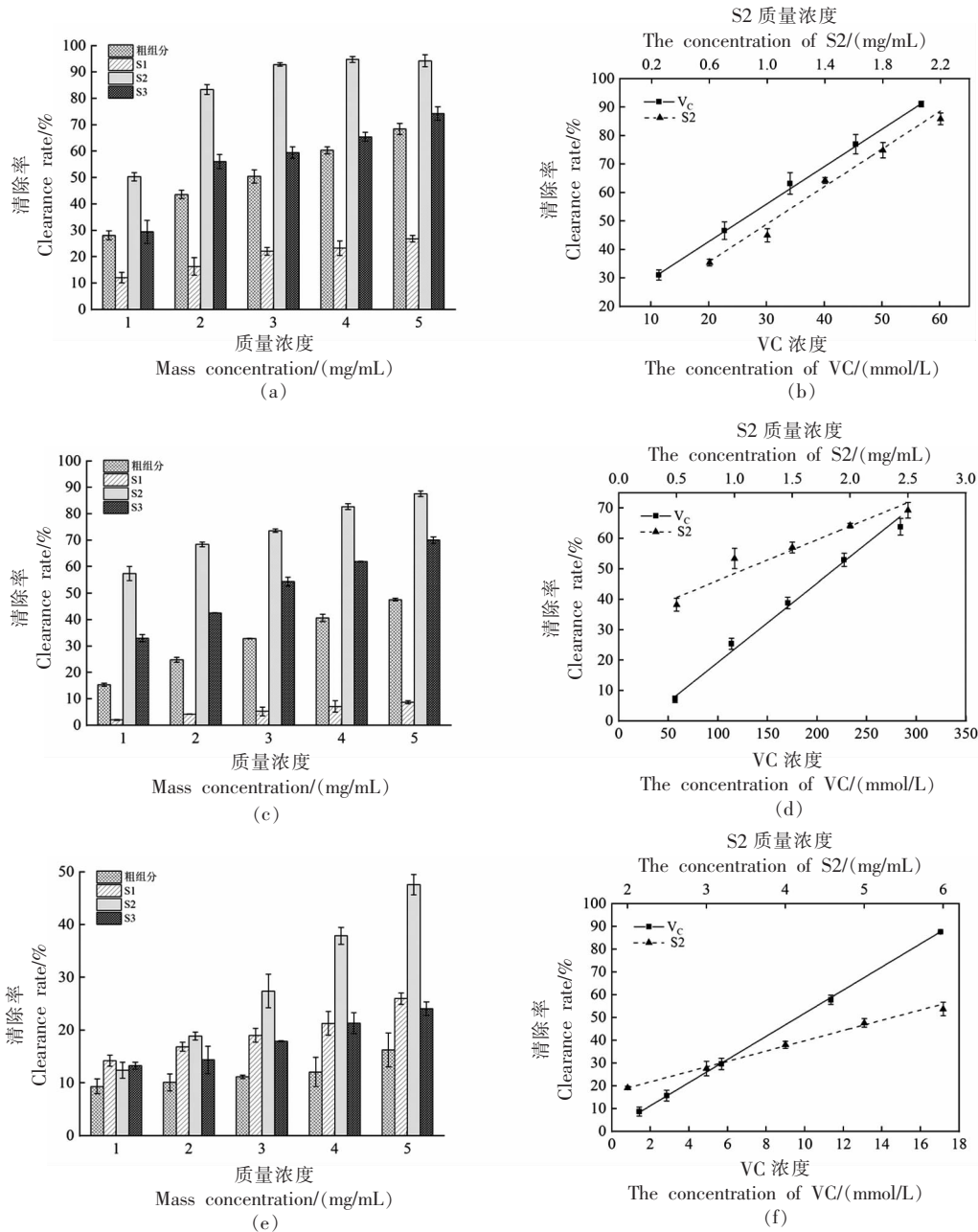
Fig.1 Sephadex-G25 chromatogram

### 2.2 葡聚糖凝胶粗提物的体外抗氧化活性测定

2.2.1 自由基清除作用 以自由基的清除能力为指标,对粗荞麦多肽和 Sephadex-G25 分离得到的 3 个组分 S1、S2、S3 的抗氧化能力进行评价,在对 DPPH·清除能力的测定结果中可以看出各组分均具有不同程度的自由基清除能力,且都呈现出剂量依赖,粗组分、S1、S2 和 S3 的  $\text{IC}_{50}$  分别为  $(2.98 \pm 0.16)$ ,  $(9.45 \pm 0.17)$ ,  $(1.06 \pm 0.04)$ ,  $(2.29 \pm 0.25)$  mg/mL, S2 的 DPPH·清除能力显著高于其它组分,

VCEAC 为  $(4.23 \pm 0.13) \mu\text{g}/\text{mg}$ 。在对  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  自由基清除测试中,粗组分、组分 S2 和 S3 对  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  具有明显清除作用,随浓度增加呈现梯度上升的趋势,而 S1 抗氧化效果极不明显,即使在质量浓度为  $5 \text{ mg}/\text{mL}$  时对  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  清除率也仅为  $(9.29 \pm 0.70)\%$  仍低于  $10\%$ ,认为几乎没有清除能力,其余三组分

的  $\text{IC}_{50}$  依次分别为  $(5.06 \pm 0.01)$ ,  $(0.85 \pm 0.13)$ ,  $(2.73 \pm 0.11) \text{ mg}/\text{mL}$ , 其中 S2 表现出极强的活性,  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  清除能力以 VCEAC 表示为  $(45.24 \pm 5.81) \mu\text{g}/\text{mg}$ 。不同组分在对  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  的清除效果上与  $\text{DPPH}^{\cdot}$  表现一致,为  $\text{S2} > \text{S3} > \text{粗组分} > \text{S1}$ 。然而,由上述试验结果可以看出,  $\text{ABTS}$  检测法与  $\text{DPPH}$  检



注:a, c, e 为不同组分对  $\text{DPPH}^{\cdot}$ 、 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 、 $\cdot\text{OH}$  的清除能力;b, d, f 为一定浓度范围内组分 S2 和 VC 对  $\text{DPPH}^{\cdot}$ 、 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 、 $\cdot\text{OH}$  清除率的线性关系。

图2 各组分对自由基的清除能力

Fig.2 Free radical scavenging ability of each component

测法评价同一抗氧化剂的抗氧化能力时具有一定差异,这一现象与诸多文献<sup>[38-39]</sup>中的试验结果一致,这是由于不同测定方法的原理和机理不同<sup>[40]</sup>,单一的抗氧化分析模型很难较为全面分析抗氧化剂的活性。在对各类物质的 VCEAC 测定过程中,果蔬被公认为具有较强的抗氧化活性,本试验中荞麦发酵粗组分 DPPH· 的 VCEAC 值 1.50 mg/g 略高于 Barroso 等<sup>[41]</sup>测得金草的 VCEAC 值 1.49 mg/g,显著高于其测定的橘皮、香蕉等果蔬抗氧化活性,但低于本研究中初步分离得到的组分 S2 的抗氧化活性,与 Zang 等<sup>[42]</sup>测定的 21 种水果对 DPPH· 的清除能力 (VCEAC 最高仅为 0.37 mg/g) 相比,具有明显抗氧化优势。以·OH 清除率作为抗氧化能力评价指标时,各组分的抗氧化活性较 DPPH、ABTS 自由基而言均有所下降,且随浓度增加不同组分间对羟基自由基的清除能力差别逐渐增大,当在质量浓度高于 3 mg/mL 时,S2 表现出

的抗氧化活性显著高于其它组分,IC<sub>50</sub> 为 (5.64±0.15)mg/mL,VCEAC 表示为 (300.65±6.54)μg/mg。活性组分 S2 在一定的质量浓度范围内,均与自由基的清除率呈正相关,在该浓度范围下,能较为直观地反应抗氧化剂的 VCEAC。

2.2.2 还原力 还原力与抗氧化活性关联密切,通常用于评估抗氧化剂提供电子或氢原子的潜力,是衡量总体抗氧化能力的指标,对荞麦发酵粗组分和 Sephadex-G25 分离组分进行还原能力测定,结果表明,在质量浓度为 1~5 mg/mL 时,各组分还原能力强弱表现为 S2>S3>粗组分>S1,其中 S1 组分还原力接近于 0,且随着浓度增加不呈现出还原力增大的趋势,其余组分均呈现出剂量依赖,随着浓度的提升,还原能力不断增强,S2 还原能力显著高于其余组分,用 VCEAC 表示为 (36.57±1.98)μg/mg。

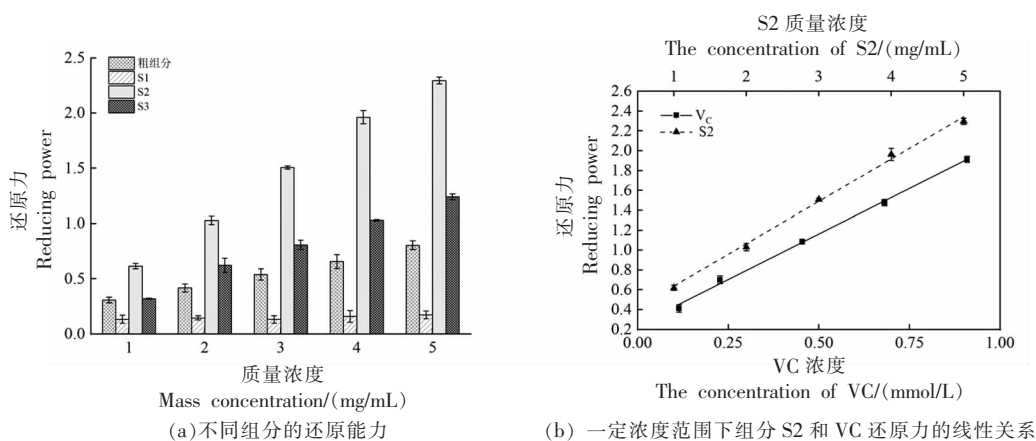


图 3 各组分的还原能力

Fig.3 The reduction ability of each component

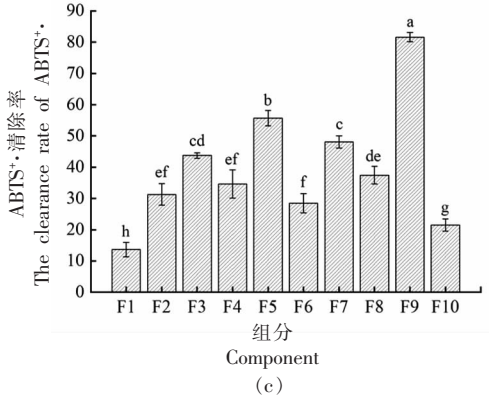
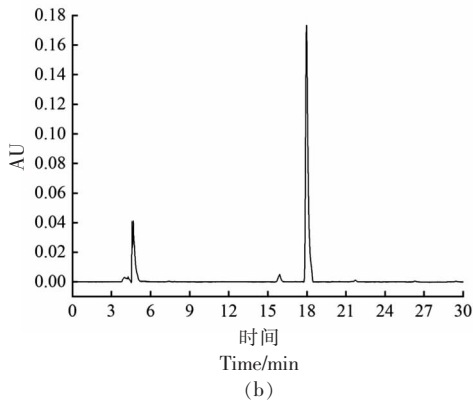
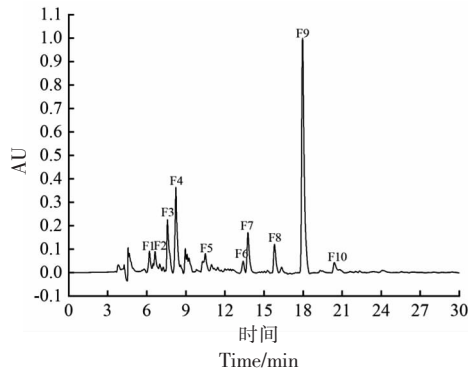
### 2.3 RP-HPLC 分离纯化

经体外抗氧化试验证实组分 S2 为主要活性成分,组分 S2 经 RP-HPLC 分离后得到液相色谱图如图 4a 所示,收集 10 个分离程度较好的分离峰,依次命名为 F1~F10。选择 ABTS<sup>+</sup>·清除率作为抗氧化活性指标,测定各分离峰的抗氧化活性,其中组分 F9 为清除 ABTS<sup>+</sup>·的主要活性组分,该分离峰在液相色谱中保留时间为 17.95 min,流动相中乙腈比例相对较高,呈现出具有较高疏水性的特点。对多次收集的活性组分 F9 进一步进行纯度

鉴定如图 4b,纯度达 96.25%,可认为分离纯化得到纯的抗氧化多肽 BAPs。经测定,BAPs 对 DPPH·、ABTS<sup>+</sup>·、·OH 清除率的 IC<sub>50</sub> 分别为 (0.37±0.01), (0.25±0.01), (1.88±0.10)mg/mL,VCEAC 分别为 (12.12±0.27), (153.82±5.04), (901.95±39.30) μg/mg,还原力用 VCEAC 表示为 (109.23±1.18)μg/mg。

### 2.4 Tricine-SDS-PAGE 电泳分子质量分析

BAPs 由于本身分子质量较小,只能通过标准小分子质量蛋白进行估计,推断其是否落入预测



注:字母不同表示具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

图4 组分S2的高效液相色谱图(a)、荞麦多肽的纯度分析图(b)和各分离组分对ABTS自由基清除率(c)

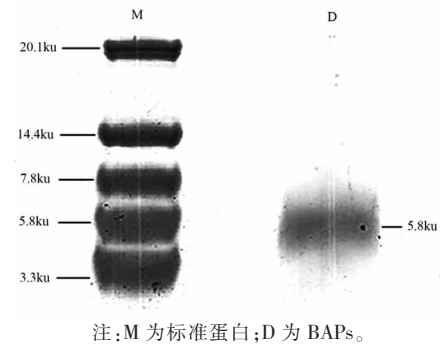
Fig.4 High performance liquid chromatography of component S2 (a), purity analysis of buckwheat peptides figure (b) and ABTS free radical clearance rate of each separated component (c)

的分子质量范围。BAPs在Tricine-SDS-PAGE电泳图谱中显示为单一条带,说明达到电泳级纯,其分子质量约为5.8ku。

## 2.5 BAPs傅里叶红外光谱分析

BAPs的特征峰符合一般蛋白/肽的特征吸收

峰。 $3400\text{ cm}^{-1}$ 左右的较宽的吸收峰主要由于O-H和N-H的伸缩振动。 $2900\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是由于 $-\text{CH}_2$ 和 $-\text{CH}_3$ 基团中C-H的伸缩振动。醛、酮、酸类物质以及酰胺中C=O的伸缩振动会引起 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 处的红外吸收峰,酰胺羰基引起的吸收峰往往具有更低的波数段<sup>[43]</sup>,波数在 $1617.73\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是蛋白质结构中酰胺一带的特征吸收峰。 $1440.49\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰主要是亚甲基面内弯曲振动产生。



注:M为标准蛋白;D为BAPs。

图5 BAPs的Tricine-SDS-PAGE电泳图谱

Fig.5 Tricine-SDS-PAGE electrophoretogram of BAPs

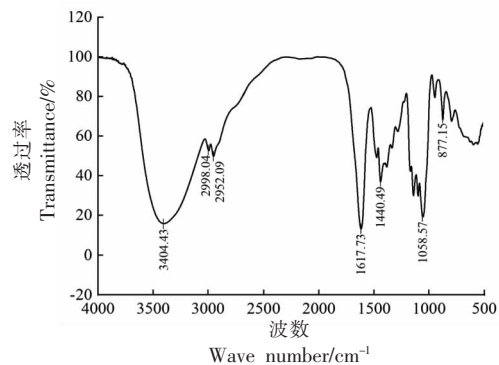


图6 BAPs的傅里叶红外光谱图

Fig.6 Fourier transform infrared spectrum of BAPs

## 2.6 BAPs抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>致RAW 264.7细胞氧化损伤试验

### 2.6.1 BAPs对RAW 264.7巨噬细胞活性的影响

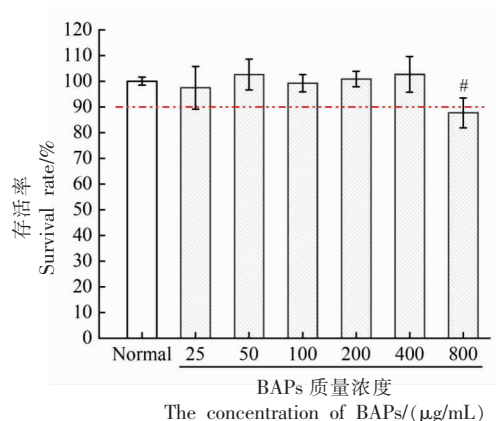
采用CCK-8试剂盒测定RAW 264.7巨噬细胞存活率,当多肽质量浓度在 $25\sim 400\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率均可达到90%以上,此时可认为药品对细胞不具有毒性,是药品可用于试验的安全剂量<sup>[44]</sup>。在该浓度范围内,相较于正常组细胞而言无显著性差异( $P > 0.05$ ),荞麦多肽不对细胞的活性产生

影响。当多肽质量浓度到达 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞存活率低于 90%,与正常组细胞相比,生长受到显著 ( $P<0.05$ ) 抑制,荞麦多肽对细胞产生一定的毒性作用,因此选择 50,100,200,400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  4 个浓度进行后续试验研究。

**2.6.2 不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度刺激对细胞活力影响** 过氧化自由基是活性氧的一种,在机体中容易分解产生羟基自由基或氧自由基,促使氧化防御系统失衡,引发氧化应激,并可直接氧化生物分子导致细胞过氧化损伤<sup>[45]</sup>,利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导细胞建立细胞氧化应激模型是用来检测糖类、肽类抗氧化活性的常用方法。过高的  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度造成细胞的不可逆损伤,过低浓度时细胞不处于氧化应激状态,因此,确定合适的  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度是氧化应激模型建立成功的关键。本试验选用浓度 100,200,300,400,500,600  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 RAW 264.7 细胞进行损伤诱导,细胞存活率对  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度呈现出剂量依赖。 $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 500  $\mu\text{mol}/\text{L}$  时,细胞存活率为 (51.49 $\pm$ 4.37)%,接近于 50%,细胞处于氧化应激状态,该浓度建立细胞氧化应激损伤模型的适宜浓度。

**2.6.3 BAPs 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导氧化损伤细胞存活率的影响** 与正常组细胞相比,经过浓度 500  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激后,细胞活力下降至 50%左右,BAPs 药物处理对  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤细胞具有一定的保护作用,与模型组相比,BAPs 质量浓度在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞活力显著 ( $P<0.05$ ) 增加,随着浓度提高,细胞活力进一步恢复,BAPs 具有提升 RAW 264.7 巨噬细胞抵抗氧化应激的能力。

**2.6.4 BAPs 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导氧化损伤细胞 ROS 水平、SOD 及 CAT 活力、MDA 含量的影响** 以 ROS 水平、SOD、CAT 活力及 MDA 含量为评价指标,探究荞麦多肽对氧化损伤细胞的保护作用。ROS 水平用于反应细胞氧化应激的程度,酶类物质 SOD 和 CAT 用于清除细胞中的自由基,防止细胞损伤,具有细胞保护作用,MDA 为脂质氧化的副产物,用于反应细胞氧化损伤的程度<sup>[46]</sup>。由图 10a 可知, $\text{H}_2\text{O}_2$  能显著引起正常 RAW 264.7 巨噬细胞中活性氧含量的增加,模型组较正常组而言,相对荧光强度增加了 (60.91 $\pm$ 7.44)%,经质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的药物 BAPs 处理后,ROS 水平能极显著



注:#表示与正常组相比具有显著性差异 ( $P<0.05$ )。

图 7 BAPs 对正常 RAW 264.7 细胞活力影响

Fig.7 Effect of BAPs on normal RAW 264.7 cell viability

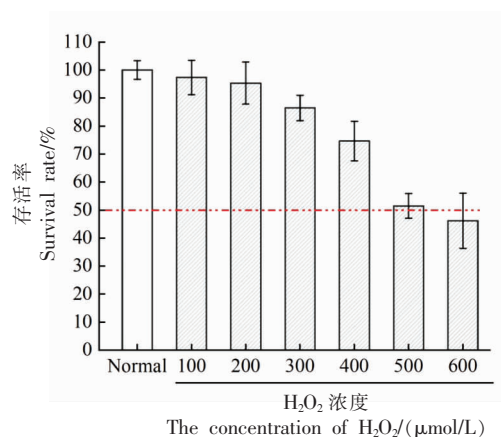
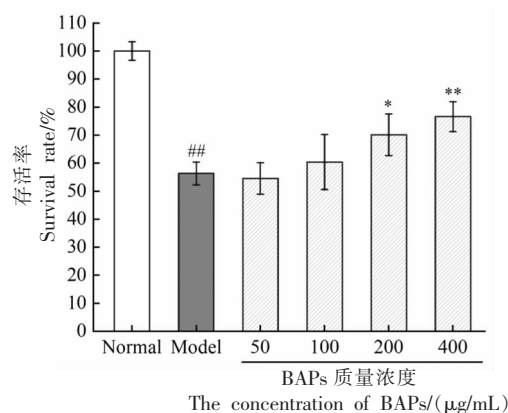


图 8 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 RAW 264.7 细胞存活率影响

Fig.8 Effects of different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the survival rate of RAW 264.7 cells



注:##表示与正常组相比差异极显著 ( $P<0.01$ );\*表示与模型组相比差异显著 ( $P<0.05$ );\*\*表示与模型组相比差异极显著 ( $P<0.01$ );下同。

图 9 BAPs 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导氧化损伤细胞存活率的影响

Fig.9 Effect of BAPs on the survival rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative damage cells



( $P<0.01$ )降低 26.50%; 当质量浓度达到 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, ROS 水平相对于损伤模型组极显著 ( $P<0.01$ )降低了 48.22%, 由此看出, BAPs 能够减少由外源性  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起的 RAW 264.7 细胞 ROS 异常增多的现象。由上述试验现象推测, BAPs 的抗氧化活性可能与多肽中肽类物质的氨基酸序列有关, 赵翊君<sup>[47]</sup>从鲈鱼鱼肉中分离出特定氨基酸序列的肽段, 能有效保护  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导氧化损伤的 HepG2 细胞, 使细胞中 ROS 含量较模型组降低 51.21%, 且增强了细胞中抗氧化酶的活力。由图 10b、10c 可知,  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤细胞中 SOD 和 CAT 活力较正常组细胞分别减少了 36.74 U/mg prot 和 36.44 U/mg prot; 与模型组相比, 最低质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 BAPs 溶液能显著 ( $P<0.05$ )提高细胞中 SOD 活力 13.57 U/mg prot; 当质量浓度达到 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$

时, 可以极显著提高 ( $P<0.01$ )SOD 活力 23.48 U/mg prot 和 CAT 活力 15.71 U/mg prot, 且酶活力与多肽浓度呈现出一定的量效关系, 说明 BAPs 具有提高细胞中抗氧化酶活性以对抗氧化应激的能力。高含量的 MDA 是细胞发生严重氧化损伤的标志, 在正常细胞中, MDA 含量极低, 仅为 ( $5.88\pm 2.26$ )nmol/mg prot, 经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后模型组中细胞的 MDA 浓度达到 ( $29.66\pm 3.39$ )nmol/mg prot, 随着药物浓度增加, MDA 含量表现出梯度减少的趋势, 用质量浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 BAPs 作用后, 细胞内 MDA 含量较模型组极显著 ( $P<0.01$ )降低了 6.39 nmol/mg prot, 当药物浓度持续增加至最大浓度 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  后, 较模型组降低了 47.96%, 由以上试验结果表明, BAPs 对 RAW 264.7 细胞的氧化损伤具有保护作用。

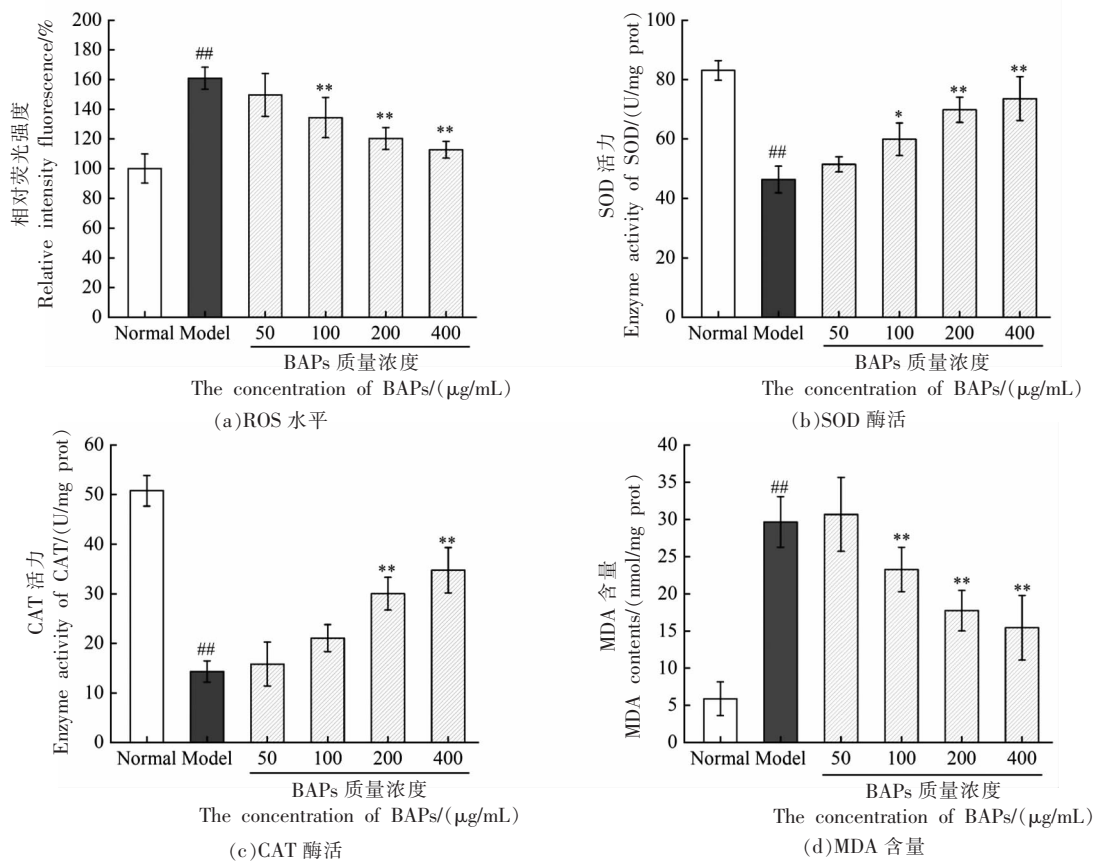


图 10 BAPs 对氧化损伤细胞抗氧化能力的影响

Fig.10 Effect of BAPs on the antioxidant capacity of oxidative damaged cells

### 3 结论

本研究以化学抗氧化为指标, 通过 Sephadex

G-25 凝胶柱分离层析结合 RP-HPLC 色谱分离的方法逐步从荞麦益生菌发酵水解液中分离出

BAPs, 并对其结构进行表征, 在此基础上进一步探究 BAPs 抵抗  $H_2O_2$  诱导 RAW 264.7 巨噬细胞氧化应激损伤作用的能力。结果表明, BAPs 具有较强的自由基清除能力和还原能力, 在细胞抗氧化实验中能有效降低氧化损伤细胞的 ROS 水平和脂质过氧化副产物 MDA 的含量, 减少细胞氧化应激反应的发生, 有效阻止细胞的凋亡, 增加细胞在氧化损伤发生时的细胞存活率, 这一结果与 BAPs 能显著提高细胞中抗氧化活性酶类 SOD 和 CAT 的活性有关。本试验基于分离纯化的方法制备得到 BAPs, 并在细胞水平进行试验探索其抗氧化能力, 然而, 对于多肽分子结构及其对细胞的调控机制和动物体内有关活性作用等领域还需要进行进一步研究探索。

### 参 考 文 献

- [1] VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39(1): 44-84.
- [2] LUO X Y, FEI Y, XU Q Z, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from tartary buckwheat albumin (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) and their antioxidant activities[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(3): 611-617.
- [3] WU Y Q, REECE A, ZHONG J X, et al. Type 2 diabetes mellitus induces congenital heart defects in murine embryos by increasing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis[J]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2016, 215(3): 366.e1-e10.
- [4] NEHA K, HAIDER R M, PATHAK A, et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 178: 687-704.
- [5] ALKADI, HOURIEH. A review on free radicals and antioxidants[J]. *Infectious Disorders Drug Targets*, 2018, 20(1): 16-26.
- [6] GORZYNIK -DEBICKA M, PRZYCHODZEN P, CAPPELLO F, et al. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(3): 547.
- [7] AGRAWAL H, JOSHI R, GUPTA M. Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (*Eleusine coracana*) protein hydrolysate[J]. *Food Research Internationale*, 2019, 120: 697-707.
- [8] SAIDI S, SAOUDI M, BEN AMAR R. Valorisation of tuna processing waste biomass: Isolation, purification and characterisation of four novel antioxidant peptides from tuna by-product hydrolysate[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(18): 17383-17392.
- [9] ROZI P, ABUDUWAILI A, MA S J, et al. Isolations, characterizations and bioactivities of polysaccharides from the seeds of three species glycyrrhiza[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 364-371.
- [10] 张强, 李伟华. 抗氧化肽的研究现状[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(2): 298-304.
- [10] ZHANG Q, LI W H. Research progress of antioxidant peptides[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(2): 298-304.
- [11] YU Y P, LAI S J, CHANG C R, et al. Peptidomic analysis of low molecular weight antioxidative peptides prepared by lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seed protein hydrolysates[J]. *LWT -Food Science and Technology*, 2021, 144: 111138.
- [12] GUO J B, LU A C, SUN Y N, et al. Purification and identification of antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides from Guangdong glutinous rice wine[J]. *LWT -Food Science and Technology*, 2022, 169: 113953.
- [13] KARAMI Z, PEIGHAMBARDOST S H, HESARI J, et al. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates[J]. *Food Bioscience*, 2019, 32: 100450.
- [14] JIN D X, LIU X L, ZHENG X Q, et al. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides[J]. *Food Chemistry*, 2016, 204: 427-436.
- [15] GIMENEZ -BASTIDA J A, ZIELINSKI H. Buckwheat as a functional food and its effects on health[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(36): 7896-7913.
- [16] ZIELINSKI H, SZAWARA -NOWAK D, BACZEK

- N, et al. Effect of liquid-state fermentation on the antioxidant and functional properties of raw and roasted buckwheat flours[J]. *Food Chemistry*, 2019, 271: 291-297.
- [17] GABR A M M, SYTAR O, GHAREEB H, et al. Accumulation of amino acids and flavonoids in hairy root cultures of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2019, 25(3): 787-797.
- [18] ZHU H L, LIU S X, YAO L L, et al. Free and bound phenolics of buckwheat varieties: HPLC characterization, antioxidant activity, and inhibitory potency towards alpha-Glucosidase with molecular docking analysis [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(12): 606.
- [19] 刘瑶, 王新然, 赵悦, 等. 荞麦皮多糖组成及其抗氧化特性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(13): 134-140.
- LIU Y, WANG X R, ZHAO Y, et al. Composition and antioxidant activity of polysaccharides extracted from buckwheat husk[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(13): 134-140.
- [20] 陈花, 张海悦, 王鹏. 苦荞蛋白酶解产物的抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(14): 12-16.
- CHEN H, ZHANG H Y, WANG P. Antioxidant activity of *Fagopyrum tataricum* enzymolysis product [J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(14): 12-16.
- [21] LUO X Y, FEI Y, XU Q Z, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from tartary buckwheat albumin (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) and their antioxidant activities [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(3): 611-617.
- [22] STARZYŃSKA-JANISZEWSKA A, STODOLAK B, DULIŃSKI R, et al. Effect of solid-state fermentation tempe type on antioxidant and nutritional parameters of buckwheat groats as compared with hydrothermal processing[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 40(2): 298-305.
- [23] HUANG S Q, MA Y L, SUN D, et al. In vitro DNA damage protection and anti-inflammatory effects of Tartary buckweats (*Fagopyrum tataricum* L. Gaertn) fermented by filamentous fungi[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2017, 52(9): 2006-2017.
- [24] CHEN L, ZHANG Q H, JI Z, et al. Production and fermentation characteristics of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides of goat milk fermented by a novel wild *Lactobacillus plantarum* 69 [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 91: 532-540.
- [25] JOSHI I, K J, NOORANI K P M, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibition and antioxidant peptide from by-catch shrimp (*Oratosquilla woodmasoni*) waste[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 29: 101770.
- [26] 戴志远, 任明, 张燕平. 电泳和层析方法对梅鱼蛋白酶解产物的分离分析[J]. *中国食品学报*, 2007(4): 101-105.
- DAI Z Y, REN M, ZHANG Y P. Isolation and analysis of enzymatic hydrolysate from small miscellaneous fish protein by electrophoresis and chromatography [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2007(4): 101-105.
- [27] 于冬蕾. 高温豆粕水解物糖基化法制备糖肽及其特性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018: 15-16.
- YU D L. Preparation and characterization research of glycopeptides by glycosylation of high-temperature denatured soybean meal hydrolysate [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018: 15-16.
- [28] AONDONA M M, IKYA J K, UKEYIMA M T, et al. *In vitro* antioxidant and antihypertensive properties of sesame seed enzymatic protein hydrolysate and ultrafiltration peptide fractions [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(1): e13587.
- [29] KIM D O, LEE K W, LEE H J, et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(13): 3713-3717.
- [30] 张立华, 孙凤杰, 赵文亚, 等. 石榴皮木醋液的化学成分及抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2016, 37(8): 127-130.
- ZHANG L H, SUN F J, ZHAO W Y, et al. Chemical constituents and antioxidant activities of wood vinegar from pomegranate husk [J]. *Food Science*, 2016, 37(8): 127-130.
- [31] CHANG O K, SEOL K H, JEONG S G, et al. Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum*

- KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(9): 5544–5555.
- [32] 邢珂慧. 辅色剂对红枣色素抗氧化活性及抗氧化稳定性的影响[D]. 银川: 宁夏大学, 2020: 20.
- XING K H. Effect of copigment on antioxidant activity and antioxidant stability of jujube Pigment[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2020: 20.
- [33] KIM C H, HWANG B S, HWANG Y, et al. Evaluation of antioxidant and antiinflammatory activity of ethanolic extracts of *Polygonum senticosum* in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages [J]. *Journal of Laboratory Medicine*, 2022, 46(1): 51–59.
- [34] 史辛夷, 封云倩, 李云萍, 等. 福建观音座莲根茎的抗氧化成分提取工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(11): 235–243.
- SHI X Y, FENG Y Q, LI Y P, et al. Study on extraction optimization of anti-oxidants from roots of *Angiopteris fokiensis* Hieron[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(11): 235–243.
- [35] 王晶波, 杨倬, 秦文, 等. 牛肝菌多酚细胞抗氧化活性评价模型研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(6): 273–279.
- WANG J B, YANG Z, QIN W, et al. Studies on evaluation model of cellular antioxidant activity for boletus polyphenols[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(6): 273–279.
- [36] QIN T, REN Z, LIU X P, et al. Study of the selenizing *Codonopsis pilosula* polysaccharides protects RAW264.7 cells from hydrogen peroxide-induced injury[J]. *Internationale Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 125: 534–543.
- [37] 李锋, 李清仙, 程志远, 等. 坛紫菜多酚抗氧化及抑制 UVB 致 HSF 细胞氧化损伤作用[J]. *食品科学*, 2017, 38(17): 190–197.
- LI F, LI Q X, CHENG Z Y, et al. Antioxidant and protective effect of porphyra haitanensis polyphenols against oxidative damage induced by UVB in HSF cells[J]. *Food Science*, 2017, 38(17): 190–197.
- [38] AVILÉS-GAXIOLA S, LEÓN-FÉLIX J, JIMÉNEZ-NEVÁREZ Y B, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of novel peptides from *Moringa oleifera* Lam. leaves [J]. *South African Journal of Botany*, 2021, 141: 466–473.
- [39] BOERI P, PINUEL L, DALZOTTO D, et al. Argentine Patagonia barberry chemical composition and evaluation of its antioxidant capacity [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(7): e13254.
- [40] CHO S J. Changes in the antioxidant properties of rice bran protein isolate upon simulated gastrointestinal digestion [J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2020, 126: 109206.
- [41] BARROSO R P, BERLIM L S, ITO A S, et al. *In vitro* antioxidant properties of golden grass (*Syngonanthus nitens*) by electron paramagnetic resonance [J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(4): 1353–1360.
- [42] ZANG S, TIAN S Z, JIANG J, et al. Determination of antioxidant capacity of diverse fruits by electron spin resonance (ESR) and UV-vis spectrometries [J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1221–1225.
- [43] 刘文, 张悦容, 张腾军, 等. 牡蛎体液糖蛋白的分离纯化及其理化性质分析 [J]. *中国食品学报*, 2013, 13(11): 179–184.
- LIU W, ZHANG Y R, ZHANG T J, et al. Isolation, purification and characterization of glycoprotein from Oyster juice [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(11): 179–184.
- [44] HUI X D, WU G, HAN D, et al. The effects of bioactive compounds from blueberry and blackcurrant powder on oat bran pastes: enhancing *in vitro* antioxidant activity and reducing reactive oxygen species in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(3): 338.
- [45] WANG W, ZHANG F M, LI Q, et al. Structure characterization of one polysaccharide from *Lepidium meyenii* Walp., and its antioxidant activity and protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury RAW264.7 cells [J]. *Internationale Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118(Pt A): 816–833.
- [46] LI Y, LI J, LIN S J, et al. Preparation of antioxidant peptide by microwave-assisted hydrolysis of collagen and its protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage of RAW264.7 cells [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(11): 642.
- [47] 赵翊君. 鲈鱼鱼肉抗氧化肽的分离鉴定及其对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用研究[D]. 广州: 华

南理工大学, 2018: 62-65.

ZHAO Y J. Separation and characterization of antioxidant Peptides from bass muscle and their pro-

tective effects against oxidative damage in HepG2 cells[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018: 62-65.

### Protective Effect of Buckwheat Antioxidant Peptides on Oxidative Damage of RAW 264.7 Macrophages

Zhou Liusha, Zhou Qingqing, Hu Xianglian, Yu Yuyuan, Xu Haixing, Shi Yongqing\*  
(College of Food and Biological Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

**Abstract** To improve the bioavailability of buckwheat protein, buckwheat antioxidant peptides (BAPs) was isolated from the fermentation hydrolysate of buckwheat by using Sephadex G-25 and reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC), and its structure and composition were preliminarily analyzed. The  $H_2O_2$ -induced RAW 264.7 macrophages cell model of oxidative stress was further established to evaluate the antioxidant activity of BAPs. The results showed that the BAPs obtained after separation by RP-HPLC has a purity of 96.25% and a molecular weight of 5.8 ku. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) was used to indicate that DPPH $\cdot$ , ABTS $^{+\cdot}$ ,  $\cdot OH$  scavenging ability and reducing power of BAPs were (12.12 $\pm$ 0.27), (153.82 $\pm$ 5.04), (901.95 $\pm$ 39.30), (109.23 $\pm$ 1.18)  $\mu g/mg$ , respectively. In the RAW 264.7 macrophage oxidative stress model, BAPs with the concentration of 200  $\mu g/mL$  had a significant ( $P < 0.05$ ) effect on all measured antioxidant indicators compared with the model group, which significantly ( $P < 0.05$ ) promoted the viability of oxidatively damaged cells by 13.80%, reduced the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) by 40.63% and malondialdehyde (MDA) by 11.92 nmol/mg prog. Meanwhile, the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were increased by 23.48 and 15.71 U/mg prot at this concentration, respectively. The above results showed that BAPs can effectively inhibit the oxidative stress response of RAW 264.7 macrophages, which could provide a theoretical basis for the development of buckwheat peptides as natural antioxidants.

**Keywords** buckwheat peptide; separation and purification; structure characterization; RAW 264.7 macrophages; antioxidant