

张佳怡, 李春楠, 金泽成, 等. 鹿茸肽的酶解工艺优化及其体外抗蓝光活性评价 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(16): 386–394. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090093

ZHANG Jiayi, LI Chunnan, JIN Zecheng, et al. Optimization of The Enzymatic Digestion Process of Deer Antler Peptides and Evaluation of Their *in Vitro* Anti-blue Light Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(16): 386–394. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090093

· 营养与保健 ·

鹿茸肽的酶解工艺优化及其体外 抗蓝光活性评价

张佳怡¹, 李春楠^{2,*}, 金泽成¹, 赵峻露², 程端端², 兰 梦², 李雅静¹, 孙佳明^{2,*}

(1. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117;

2. 长春中医药大学人参科学研究, 吉林长春 130117)

摘要:目的: 为了更好的开发鹿茸的高价值产品, 本研究确定了碱性蛋白酶酶解鹿茸肽的最佳工艺条件, 并对其体外抗蓝光活性进行评价。方法: 选择酶解温度、酶底比、酶解时间、pH 四个因素, 每个因素三个水平, 在单因素实验的基础上进行正交实验优化, 以鹿茸肽酶解收率为指标, 获得酶解鹿茸肽的最佳工艺, 测定鹿茸肽的含量; 利用 CCK-8 法检测不同浓度鹿茸肽培养下的人类永生表皮细胞 (Human immortal keratinocyte line, HaCat) 在蓝光照射后的存活率; ELISA 法分析超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽 (Glutathione-reduced, GSH) 的分泌水平以及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量; 紫外法计算鹿茸肽对 DPPH 自由基、OH 自由基清除的能力。结果: 最佳鹿茸肽酶解工艺条件为温度 45 ℃, 酶解时长 5 h, pH8.5, 酶底比 6%, 此时的鹿茸肽酶解收率为 52.7%; 设置不同浓度鹿茸肽给药组 (12.5、25、50、75、100 μg/mL), 与蓝光照射模型组相比, 给药组能够减轻蓝光照射对 HaCat 细胞增殖活力的抑制作用, 提高细胞存活率, 具有显著性差异 ($P<0.01$), 同时给药组 SOD、GSH 分泌水平升高, MDA 含量下降 ($P<0.05$); 另外, 鹿茸肽对 DPPH 自由基、OH 自由基的清除能力较强, 其 IC_{50} 分别是 0.98 和 0.63 mg/mL。结论: 鹿茸肽具有较好的抗蓝光活性, 对皮肤美白、抗衰老和损伤修复具有一定的作用, 这为鹿茸的精深加工和开发利用提供了理论依据。

关键词: 鹿茸, 鹿茸肽, 抗蓝光, 酶解法, HaCat 细胞

中图分类号: R915

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)16-0386-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090093

本文网刊:



Optimization of The Enzymatic Digestion Process of Deer Antler Peptides and Evaluation of Their *in Vitro* Anti-blue Light Activity

ZHANG Jiayi¹, LI Chunnan^{2,*}, JIN Zecheng¹, ZHAO Junlu², CHENG Duanduan², LAN Meng²,
LI Yajing¹, SUN Jiaming^{2,*}

(1. College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Jilin Institute of Ginseng Science, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: Objective: To better develop high-value products from deer antlers, this study determined the optimal process conditions for the enzymatic digestion of deer antler peptides by alkaline proteases and evaluated their *in vitro* anti-blue light activity. Methods: Select four factors: digestion temperature, substrate ratio, digestion time and pH, three levels of each factor, based on unifactor experiment optimization, the yield of the enzyme digestion of the deer antler peptide was obtained, and the content of the deer antler peptide was determined. The survival rate of the Human immortal keratinocyte

收稿日期: 2022-09-13

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202110199020); 吉林省卫生与健康科技能力提升计划项目 (2020Q026); 吉林省大学生创新创业训练计划项目 (S202210199030)。

作者简介: 张佳怡 (2001-), 女, 本科, 研究方向: 药物活性研究与应用开发, E-mail: 1955255770@qq.com。

* 通信作者: 李春楠 (1983-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药有效成分活性与应用开发, E-mail: lcn1013@hotmail.com。

孙佳明 (1976-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药物质基础与活性研究, E-mail: sun_jiaming2000@163.com。

line (HaCat) cultured with different concentrations of deer antler peptide was measured by the CCK-8 method. The method of ELISA was used to analyze the secretion levels of Superoxide dismutase (SOD) and reduced Glutathione-reduced (GSH) secretion levels. The UV method calculated the ability of antler peptides to scavenge DPPH free radicals and OH free radicals. Results: The optimum conditions for the enzymatic digestion of antler peptides were determined to be 45 °C, 5 h, pH8.5, and a 6% enzyme-substrate ratio. The extraction rate of antler peptide was 52.7% at this time. With different concentrations (12.5, 25, 50, 75, 100 µg/mL), the proliferation activity of HaCat cells was reduced, and the cell survival rate was increased, significant difference ($P<0.01$). Meanwhile, the level of SOD, GSH secretion increased and the MDA content decreased ($P<0.05$). In addition, the scavenging ability of antler peptide on DPPH free radicals and OH free radicals was higher, with IC_{50} of 0.98 and 0.63 mg/mL, respectively. Conclusion: At the same time, this study had verified that deer antler peptides have better *in vitro* anti-blue light activity. The results proved that antler peptides have certain effects on skin whitening, anti-aging and damage repair. These conclusions provided a theoretical basis for deer antler's deep processing, development, and utilization.

Key words: Cervi cornu pantotrichum; velvet antler peptides; anti-blue light; enzymatic hydrolysis; extraction

蓝光是介于 380~500 nm 波长之间可见光谱中波长最短的光,是占据可见光谱中能量最大、频率最高的区域,属于高能短波光^[1]。除太阳中含有蓝光之外,生活中手机、电脑等数码产品中均存在很强的蓝光波峰^[2],人们长时间处在一个蓝光的世界。电子产品释放的蓝光会造成视力减弱、视疲劳,同时也刺激皮肤加速老化等。研究发现,蓝光的穿透力远大于紫外线,能直达皮肤真皮层甚至更深层,刺激皮肤炎症因子的产生和释放,诱发氧化应激反应,延缓表皮屏障的修复,引起色素沉淀,使皮肤出现脱水,进而造成皮肤衰老^[3-4]。

鹿茸是上等的滋补保健品,我国拥有悠久的鹿产品食用历史,经国家市场监督管理总局网站中特殊食品信息查询平台检索到含有鹿茸的保健食品有 200 多种,主要以缓解体力疲劳和增强免疫力为主,此外鹿茸与其他的中草药配伍形成了新的保健、美容等作用。鹿茸肽(Velvet antler peptides, VAP)是从鹿科动物雄性梅花鹿或马鹿的密生茸毛的未骨化的幼角中提取出一种蛋白多肽类活性因子,具有抗炎^[5]、抗氧化^[6]、抗骨质疏松^[7]、延缓衰老^[8]、促进伤口愈合^[9]等药理作用,被视为传统名贵中药鹿茸(Cervi Cornu Pantotrichum)中极具研究价值的活性成分之一。目前,生物活性肽(Bioactive peptides, BAP)已经成为当下研究的热点,其常见的提取方法有化学水解法、微生物发酵法、酶解法等,在医药、化妆品、保健食品等行业均具有广阔应用前景,为药食同源中药的开发提供附加价值^[10-11]。近年来,鹿茸肽在美容护肤、养生保健、食品加工等领域得到越来越多的应用,但其在蓝光辐射造成的皮肤损伤修复方面研究尚未引起关注^[12-14]。因此,本课题组结合当前抗蓝光的热点对鹿茸展开进一步研究。

本研究以鹿茸为原料,选择较为温和、提取活性好的酶解法优化鹿茸肽提取工艺,并应用人化角质形成细胞(Human immortal keratinocyte line, HaCat)细胞进行抗蓝光活性研究。因此,在提高鹿茸综合利用的价值的基础上,为鹿茸肽的提取以及鹿茸高价值产品的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鹿茸 吉林省东丰鹿场;碱性蛋白酶(酶活力 200 U/mg)、中性蛋白酶(酶活力 5 万 U/g)、胰蛋白酶(酶活力 250 U/mg)、胃蛋白酶(酶活力 3500 U/mg)

长春百金生物有限公司;HaCat 细胞 武汉普诺赛生命科技有限公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8) 北京博奥森;牛血清蛋白 Hyclone 公司;胎牛血清、DMEM 培养基 美国 Gibco 公司;娃哈哈纯净水 吉林娃哈哈食品有限公司;碱性酮 长春百金生物有限公司;福林酚试剂 国药集团化学试剂有限公司;SOD、GSH 试剂盒 江苏晶美生物有限公司;MDA 试剂盒 美国 R&D 公司;其他试剂 均为国产分析纯。

METTLER TOLEDO pH 计 上海虹益仪器仪表有限公司;MiliQ 超纯水机 美国 Bedford 公司;VIS-7220 可见分光光度计 美国瓦里安公司;CO₂ 培养箱 日本 Sanyo 公司;JHBE-50S 闪试提取器 北京金鼎科技发展有限公司;超净工作台 美国 Merck-Millipore 公司;ETTTLER TOLEDO 电子天平(MAX=210 g, d=0.001 g) SARTORIUS AG;Jing LiL D5-10 型低速离心机 上海安亭科学仪器厂;CR20B2 型冷冻高速离心机 日本日立;GVDV300 三频恒温超声波清洗器 江苏昆山超美;FK-A 型组织捣碎机 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂;680 型酶标仪 上海伯乐生命医学产品有限公司;90-3 型恒温双向磁力搅拌器 上海振容科学仪器有限公司;1700 型紫外分光光度仪、LED 蓝光灯 435~445 nm 徐州爱佳 LED 科技。

1.2 实验方法

1.2.1 鹿茸蛋白的提取 取鹿茸鲜品 20 g,去除血渍和茸毛,剪成小块,用清水浸泡软化后,加入粉碎机粉碎,按照料液比 1:10(g/mL),置于闪式提取装置中,室温 25 °C 下提取 30 min 后,以 4000 r/min 离心 20 min,取上清液,微滤后,选用 3000 Da 的 Millipore 超滤膜对鹿茸蛋白溶液进行超滤,收集滤出液,冻干备用^[15]。

1.2.2 鹿茸肽酶解工艺

1.2.2.1 鹿茸酶解蛋白的选择 称取一定量鹿茸蛋白冻干粉,将底物浓度为 1%,反应的过程中加入 1 mol/L NaOH 或 HCl 以维持 pH 恒定,分成 4 份分别置于恒温磁力搅拌器中搅拌,酶解温度选择 45 ℃,分别加入碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶,待酶解反应 5 h 后,升温至 100 ℃灭酶 10 min。冷却,在 4000 r/min 条件下离心 20 min,取上清液冻干,即鹿茸肽,在相同条件下比较不同蛋白酶解收率。并将所制鹿茸肽储存于-20 ℃,备用。

1.2.2.2 鹿茸肽酶解收率计算 精密称定牛血清蛋白标准品 12 mg,加少量水溶解后转移至 50 mL 容量瓶中,再继续加水定容至刻度线,混匀,配成标准溶液(50、100、150、200、250 μg/mL)。以吸光度(Y)为纵坐标,各标准溶液的浓度(X, mg/mL)为横坐标绘制标准曲线,得线性回归方程 $A=0.0036x-0.0007$, $R^2=0.9994$,结果表明质量浓度为 50~250 μg/mL 范围内时,蛋白质标准溶液的质量浓度与吸光度线性关系良好。取鹿茸酶解肽,加水配制为 1 mg/mL 的溶液,再精密量取供试品溶液 1.0 mL 放置于 25 mL 容量瓶中,加水溶解稀释至刻度,混匀,即可得到待测溶液,按照标准曲线制备,于 650 nm 测定吸光度,然后将得到的吸光度代入至牛血清蛋白标准曲线中,根据公式计算。

$$\text{蛋白含量}(\%) = \frac{C \times D \times V}{W_{\text{样}}} \times 100$$

$$\text{酶解收率}(\%) = \frac{\text{冻干粉总质量} \times \text{蛋白含量}}{\text{原料总蛋白质量}} \times 100$$

式中,C 为供试品(样液)溶液中的蛋白质浓度,μg/mL;D 为样品溶液的稀释倍数;W 样为样品质量,μg。

1.2.3 鹿茸肽酶解工艺单因素实验设计 确定实验最佳酶解蛋白酶,设置酶解体系的固定条件为酶底比 5%、pH8、酶解时间为 4 h,考察不同温度(30、35、40、45、50、55 ℃)对鹿茸肽酶解的影响;设置酶解体系的固定条件为 pH8、酶解时间为 4 h,温度 45 ℃,考虑不同酶底比(1%、2%、3%、4%、5%、6%)对鹿茸肽酶解的影响;设置酶解体系的固定条件为酶底比 5%、pH8、温度 45 ℃,考虑不同酶解时间(2、3、4、5、6、7 h)对鹿茸肽酶解的影响;设置酶解体系的固定条件为酶底比 5%、温度 45 ℃、酶解时间为 4 h,考虑不同 pH(6、6.5、7、7.5、8、8.5)对鹿茸肽酶解的影响。实验均重复三次,实验结果以平均值±标准差表示。

1.2.4 正交实验设计 本试验主要分析酶解温度、酶底比、酶解时间、pH 四个因素对酶解的影响。如表 1 所示,以鹿茸肽酶解收率为指标,建立四因素三水平的实验,选出最优鹿茸肽酶解工艺条件,实验结果用 $L_9(3^4)$ 正交表来考察。

表 1 碱性蛋白酶正交实验因素设计

Table 1 Alkaline protease orthogonal experimental factor design

水平	因素			
	A 温度(℃)	B 酶底比(%)	C 时间(h)	D pH
1	40	4	3	7.5
2	45	5	4	8
3	50	6	5	8.5

1.2.5 鹿茸肽对 HaCat 细胞活性影响

1.2.5.1 细胞培养 将冷冻的 HaCat 细胞复苏后,接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,并在 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱下培养,当细胞贴壁生长时,吸去培养液,用 PBS 洗 3 次,加入完全培养基继续培养,隔 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于相关实验^[16]。

1.2.5.2 CCK-8 法测定细胞存活率 将配制好的细胞以 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板中,每孔加入 200 μL 完全培养基培养,置于 37 ℃的 CO₂ 培养箱,培养 24 h,给药组给予不同质量浓度稀释的药液,每组设 5 个复孔,四组每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,在培养箱中 37 ℃避光孵育 2 h,于 450 nm 处检测各组吸光度(OD)值^[17],OD 值越高,细胞增值率越好,存活率越高,计算公式如下:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{给药组吸光度}}{\text{空白组吸光度}} \times 100$$

1.2.5.3 鹿茸肽对蓝光照射 HaCat 细胞的影响 LED 蓝光灯设定波长 440 nm,水平放置细胞板底正下方进行避光照射,考察蓝光照射时间,分别选取 10、20、30、40 和 50 min, CCK-8 法计算存活率,确定蓝光模型照射时间。

将蓝光照射模型组和蓝光+给药组(12.5、25、50、75、100 μg/mL)进行蓝光照射,空白对照组在同等条件下避光培养。每次照射完成后将细胞放入培养箱中继续培养,24 h 后进行 CCK-8 检测,计算细胞存活率^[18]。

1.2.5.4 鹿茸肽对 HaCat 细胞 SOD、GSH 及 MDA 分泌量的影响 将孵育好的各组细胞,吸去每孔培养液,模型组和空白组加入新的完全培养液,给药组(12.5、25、50、75、100 μg/mL)加入不同剂量药物,培养 24 h 后,利用反复冻融法进行细胞破碎,离心取上清液。根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作,分别检测超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)水平^[19-20]、丙二醛(MDA)的含量,实验独立重复 3 次。

1.2.6 鹿茸肽的体外抗氧化能力分析

1.2.6.1 鹿茸肽对 DPPH 自由基清除能力的测定 参考文献 [21-22] 测定鹿茸肽清除 DPPH 自由基的能力。用无水乙醇配制 DPPH 溶液 2×10^{-4} mol/L,

避光, 保存备用。精确吸取 2 mL 样品于试管中, 加入 2 mL DPPH 溶液, 充分混合、摇匀, 水浴 27 ℃ 30 min 后倒入比色皿中, 于 517 nm 处测定其吸光度值 A_1 。平行测定三次, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示 ($\bar{x}\pm SD$), 对照组以无水乙醇代替 DPPH 无水乙醇溶液 A_2 , 空白组以无水乙醇代替样品 A_0 , BHT 为阳性对照组。按下式计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

1.2.6.2 对羟自由基清除能力的测定 参考文献 [23-25] 测定鹿茸肽清除羟自由基的能力。向 1 mL 的样品溶液中, 分别加入 2.0 mmol/L FeSO_4 溶液 1.5 mL、30 mmol/L H_2O_2 溶液 1.5 mL、6 mmol/L 水杨酸溶液 1.5 mL, 振荡, 摇匀。37 ℃ 条件下水浴 15 min 后, 在 510 nm 处测定吸光度 A_1 。用蒸馏水代替水杨酸溶液作为对照组, 用无水乙醇溶液代替样品溶液作为空白组, 平行测定三次, 结果用平均值 $\pm$ 标准误差表示, 采用蒸馏水代替 H_2O_2 作为对照组, 使用无水乙醇代替样品作为空白组分别测定吸光度为 A_2 和 A_0 , V_C 为阳性对照组。按下式计算 OH 自由基清除率:

$$\text{OH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

1.3 数据处理

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行作图, 应用 SPSS 21.0 软件进行数据的显著性分析, $n=3$, 计量数据以标准差 ($\bar{x}\pm SD$) 表示, 组间比较应用单因素方差分析和 t 检验。

2 结果与分析

2.1 鹿茸肽酶解蛋白的筛选

结果如图 1 所示, 在相同条件下以鹿茸肽收率为指标, 所得酶解鹿茸肽收率顺序为碱性蛋白酶>胰蛋白酶>中性蛋白酶>胃蛋白酶, 最终确定碱性蛋白酶水解效果更优, 因此, 本实验最终选择碱性蛋白酶作为鹿茸蛋白的水解酶。

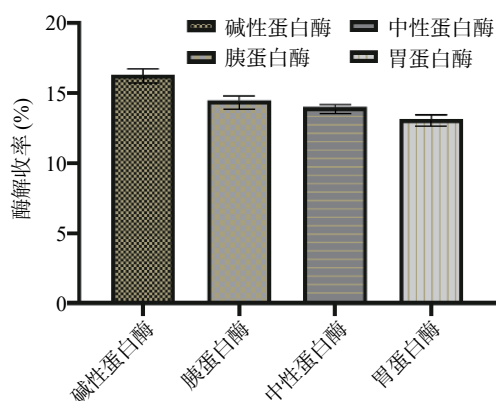


图 1 蛋白酶的种类对鹿茸酶解的影响

Fig.1 Effect of protease species on enzymolysis rate

2.2 鹿茸肽制备影响单因素初筛结果

2.2.1 不同温度对鹿茸肽酶解收率的影响 如图 2, 随着温度的升高, 鹿茸肽的酶解收率呈现先升高再下降的趋势。当酶解温度达到 45 ℃ 时, 鹿茸肽的酶解收率最大为 19.52%, 显著高于其他样品组。当温度大于 45 ℃ 时, 肽收率随着温度升高而下降。这是因为温度升高时, 分子热运动加快, 导致与底物的碰撞几率增加, 进而加快酶促反应, 当温度超过一定限度时, 酶的稳定结构被破坏, 最终使酶变性甚至失活^[26]。因此酶解温度在 40~50 ℃ 为宜。

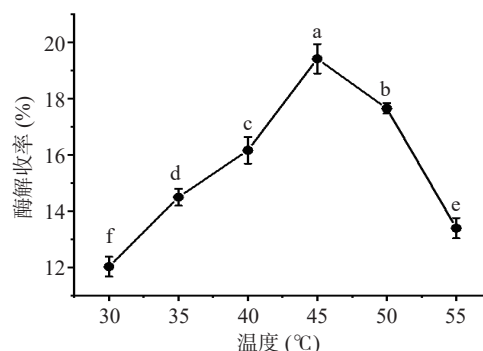


图 2 酶解温度与鹿茸肽酶解收率的关系

Fig.2 Relations between temperature and yield of antler peptides

注: 图中不同小写字母表示不同数据的显著性差异 ($P<0.05$); 图 2~图 5 同。

2.2.2 不同酶底比对鹿茸肽酶解收率的影响 从图 3 可知, 随着酶底比的百分数增加, 鹿茸肽的酶解收率先增加后降低, 当酶底比为 5% 左右时, 肽的含量最高 18.25%。由于随着蛋白酶量的增加可以加快酶解速率, 当底物已经充分酶解时, 继续增加酶会使体系流动性会变差, 降低酶解速率^[27]。故酶解反应时酶底比应控制在 4%~6%。

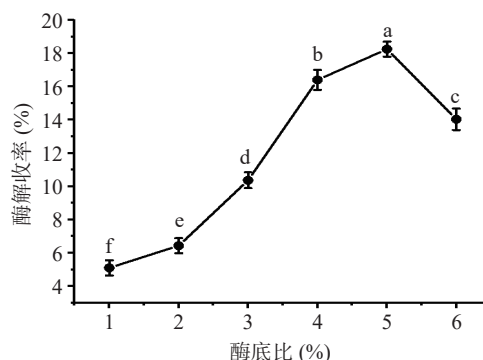


图 3 酶底比与鹿茸肽酶解收率的关系

Fig.3 Relation between enzyme base ratio and enzyme unyield of antler peptides

2.2.3 不同时间对鹿茸肽酶解收率的影响 从图 4 中可得, 随着时间延长, 鹿茸肽的酶解收率随着时间的增加呈现先快速增加后逐渐平缓, 再降低的趋势, 在 6 h 时, 鹿茸肽的酶解收率最高为 17.66%。这是种现象是由于刚开始时反应时间较短时, 酶与底物的

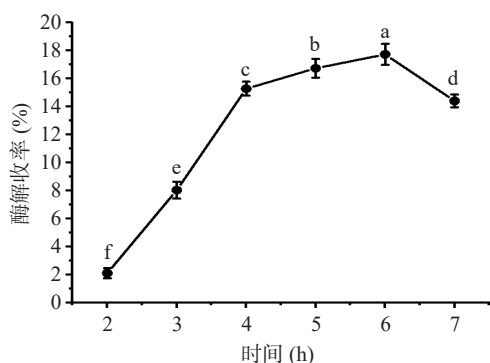


图4 酶解时间与鹿茸肽酶解收率的关系

Fig.4 Relation between enzymatic digestion time and the yield of antler peptides

作用不够充分,随着时间延长底物逐渐被消耗,产物含量增加,反应出现竞争性抑制,酶解速度逐渐降低^[28]。但由于4 h与5、6 h时的多肽酶解收率相差不大,从工业化的角度考虑,故最适时间为3~5 h。

2.2.4 不同 pH 对鹿茸肽酶解收率的影响 从图5中可知,鹿茸肽的酶解收率随着酶解温度的升高先增大后减小,当酶解 pH 达到8左右时,鹿茸肽酶解收率达到最大18.65%。这是因为酶都有一个最适 pH 反应条件,当 pH 过高或过低会影响酶的天然空间构型,使酶的活性受到抑制或失活^[29]。因此, pH 应控制在7.5~8.5左右。

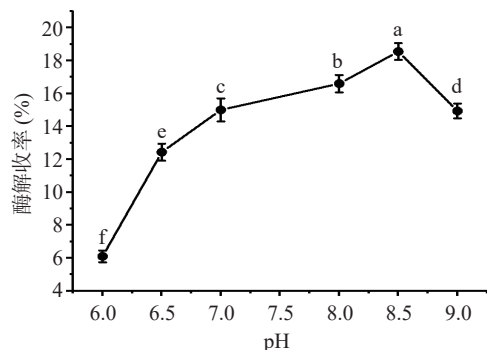


图5 pH与鹿茸肽酶解收率的关系

Fig.5 Relationship between pH and unyield of deer antler peptides

2.3 正交实验结果

根据单因素实验结果,选取的正交实验因素为酶解温度(A)、酶底比(B)、酶解时间(C)、pH(D),以鹿茸肽酶解收率(Y)为指标,根据正交中心组合原理,设计试验优化鹿茸肽酶解工艺,正交实验设计。由表2可以看出,采用碱蛋白对鹿茸肽进行水解时,通过方差分析可得出结论,各因素影响顺序为酶底比>温度>时间>pH;最优工艺参数为A₂B₃C₃D₃,即当酶解温度为45℃、酶底比为6%、酶解时间为5 h, pH8.5,是提取鹿茸肽的最佳工艺参数,酶解收率为52.7%。根据表3可知,B因素F值差异显著,所以在鹿茸酶解过程中首先应严格控制好酶底比的值,其次是酶解温度和酶解时间。

表2 正交实验结果分析

Table 2 Analysis of the orthogonal test results

序号	A 酶解温度	B 酶底比	C 酶解时间	D pH	酶解收率(%)
1	1	1	1	1	19.4
2	1	2	2	2	23.6
3	1	3	3	3	51.8
4	2	1	2	3	38.4
5	2	2	3	1	44.7
6	2	3	1	2	49.5
7	3	1	3	2	38.5
8	3	2	1	3	33.5
9	3	3	2	1	52.7
K ₁	94.80	96.30	102.40	116.80	
K ₂	132.60	101.80	114.70	111.60	
K ₃	124.70	154.00	135.00	123.70	
R	12.60	19.23	10.87	4.03	

表3 正交试验方差分析结果

Table 3 Results of ANOVA of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F值	显著性
A	265.03	2	10.75	
B	676.04	2	27.52	*
C	180.68	2	7.36	
D	24.56	2	1	

注: * $F_{0.05}(1,2)=5.36$, $P<0.05$, “*”表示差异显著。

2.4 鹿茸肽对 HaCat 细胞活性影响

2.4.1 HaCat 细胞蓝光模型条件确定 通过对蓝光模型考察,我们发现随着照射时间的加长,细胞存活率也逐渐下降,如图6所示,30 min 开始具有显著性($P<0.01$),存活率为49.1%;考虑细胞离开培养箱不易太久,故蓝光模型最佳时间选为30 min。

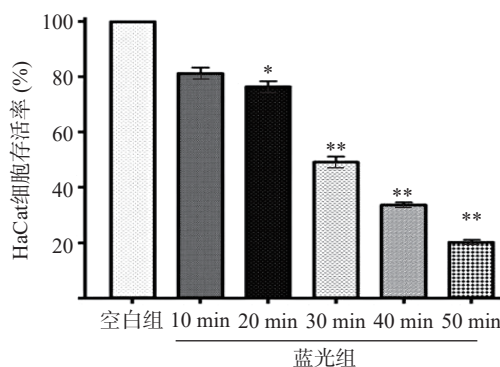


图6 不同时间蓝光照射对细胞存活率的影响

Fig.6 Effect of blue light exposure at different times on cell survival rate

注: *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ (与空白组比较) 图7~图8同。

2.4.2 鹿茸肽对 HaCat 细胞存活率的影响 由图7可知,在蓝光照射30 min下的细胞模型,与空白组相比,存活率为51.4%,显著性下降($P<0.01$),表明模型成功;给予不同浓度鹿茸肽溶液后,细胞存活率随着药物浓度的增加而提高,与模型组相比,在25~100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度之间,具有显著性,当浓度在100 $\mu\text{g/mL}$ 时,平均存活率达82%,与模型组有显著差异($P<0.01$)。

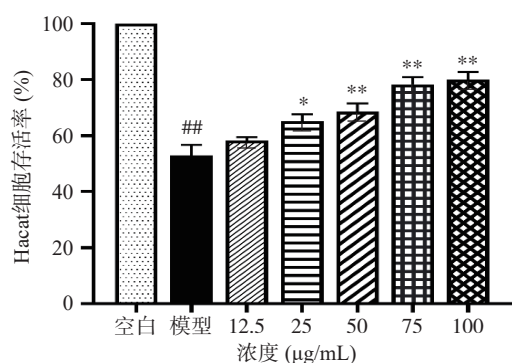


图 7 不同浓度鹿茸肽与 HaCat 细胞存活率的关系

Fig.7 Relationship between different concentrations of deer antler peptides and cell survival rate

2.4.3 鹿茸肽对 HaCat 细胞 SOD、GSH 及 MDA 分泌量的影响 SOD 和 GSH 是生物体内必要的氧自由基清除剂,是细胞内抵御氧化应激的重要机制^[30-31], SOD、GSH 分泌量高低的变化反映了细胞抗氧化能力的大小,分泌量越高,抗氧化能力越强,MDA 含量

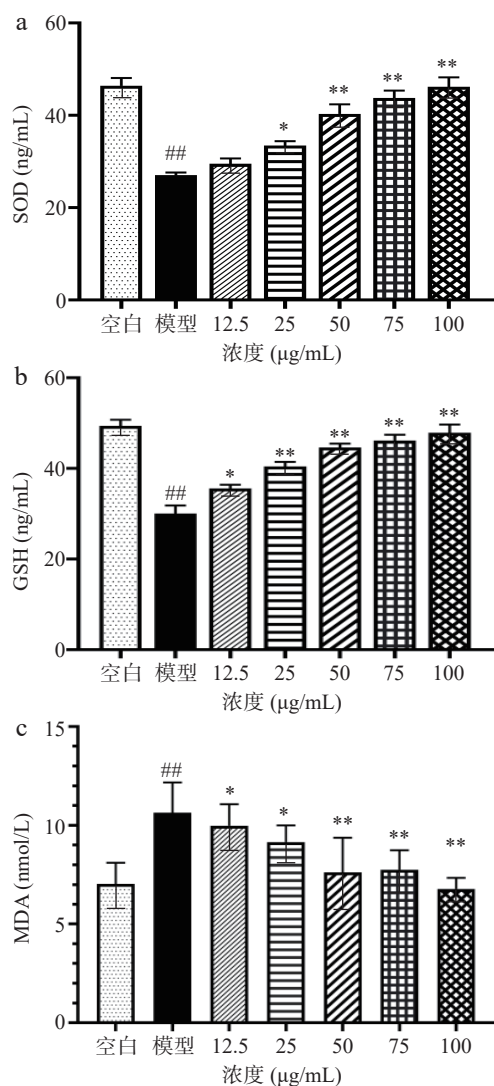


图 8 鹿茸肽对 SOD、GSH、MDA 的影响

Fig.8 Effects of different concentrations of deer antler peptides on SOD, GSH and MDA

注:图(a)为 SOD、图(b)为 GSH、图(c)为 MDA 检测结果。

的高低反映了机体自由基累积及脂质过氧化损伤的程度。如图 8 所示,同时蓝光照射细胞后,加入不同浓度鹿茸肽培育 24 h,模型组与空白组比较,具有显著性差异($P<0.01$),与模型组相比较,给药组细胞中 SOD、GSH 含量水平虽不如空白组高,但随着浓度增加其含量也有所增加,具有统计学意义;模型组 MDA 含量与空白组相比显著升高,但随着给药剂量增加逐渐降低,与模型组相比具有统计学意义;当浓度达 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞分泌 SOD、GSH 和 MDA 水平最显著($P<0.01$),表明鹿茸肽在一定范围内可以增加 HaCat 细胞的抗氧化水平。

2.4.4 鹿茸肽抗 DPPH 自由基清除能力 DPPH 化学名 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼,呈暗紫色棱柱状结晶,常用于定量测定物质抗氧化能力。本实验测定不同浓度的鹿茸肽对 DPPH 自由基的清除能力与 BHT 进行比较,结果如图 9 所示。可以看出鹿茸肽在低浓度时对 DPPH 的清除能力明显弱于 BHT,但随着浓度的增加,二者清除率的差值逐渐变小,当浓度增加到 0.8 mg/mL 时,鹿茸肽 DPPH 自由基的清除率接近 50%。经过计算鹿茸肽抗 DPPH 自由基清除率的 IC_{50} 为 0.98 mg/mL , BHT 的清除率 IC_{50} 是 0.50 mg/mL 。

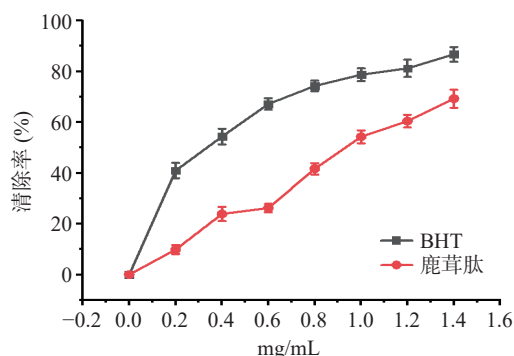


图 9 不同浓度鹿茸肽对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.9 Scavenging ability of DPPH radicals by different concentrations of deer antler peptides

2.4.5 鹿茸肽抗羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力 不同浓度的鹿茸胶原多肽对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力如图 10 所示,

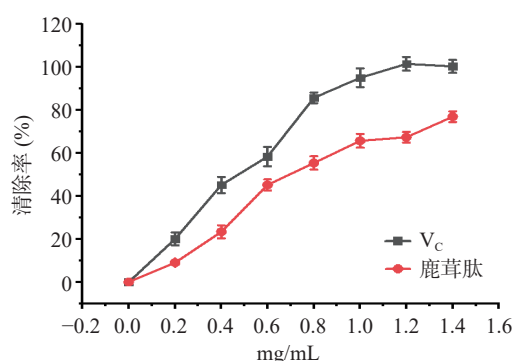


图 10 不同浓度鹿茸肽对羟基自由基的清除能力

Fig.10 Scavenging ability of hydroxyl radicals by different concentrations of deer antler peptides

结果表明,鹿茸肽清除率随着样品浓度的增加而增高,当浓度达到 0.8 mg/mL 以上,其·OH 抑制率均在 50% 以上,经计算,鹿茸肽对·OH 清除率的 IC_{50} 为 0.63 mg/mL, V_C 的清除率 IC_{50} 是 0.53 mg/mL,表明鹿茸肽清除羟自由基(·OH)能力较强。

3 讨论与结论

现有研究发现,鹿茸肽对光损伤造成的皮肤问题具有很好功效,能减缓皮肤衰老,降低日光对皮肤的侵蚀^[32-33],而蓝光作为生活中随处可接触的光源之一,更不亚于户外光辐射,其对皮肤的危害常常被人忽视^[34]。本研究在单因素实验的基础上,结合正交实验设计,优化了鹿茸肽应用酶解工艺,工艺条件为温度 45℃,酶解时长 5 h, pH 8.5, 酶底比 6%,方法温和,确保了得率、纯度和活性,且利用膜分离技术,保证了肽分子量低于 3000 Da,具有实际应用价值,为鹿茸肽工业制备提供了理论基础。

通过体外培养 HaCat 细胞,构建 HaCat 细胞的蓝光损伤模型,考察了不同时间及不同浓度下鹿茸肽对蓝光照射皮肤 HaCat 细胞活力的影响,当蓝光照射 30 min 时利于细胞损伤模型成功,若时间过久细胞离开培养箱容易受外界影响而死亡,则无法判断其是否受蓝光影响。HaCat 细胞具有遗传性质稳定、永生性和类角质形成细胞特性等特点,常被应用于研究各种皮肤损伤修复^[35]。本研究证实添加鹿茸肽的 HaCat 细胞,与模型组相比,鹿茸肽可以减轻蓝光照射对 HaCat 细胞增殖的不利影响,当鹿茸肽浓度最高时细胞存活率可恢复到 82%。同时,鹿茸肽可有效促进 HaCat 细胞中 SOD、GSH 分泌表达水平,使 MDA 含量下降。SOD 是人体中重要的氧化自由基清除剂,对抗皮肤衰老和促进皮肤愈合等方面具有重要的研究价值^[36-38];而 GSH 不仅在维持细胞内氧化还原平衡发挥着重要作用,还因其抑制酪氨酸酶的能力而被广泛用于皮肤美白^[39-41];MDA 作为脂质过氧化的重要产物之一,其含量的高低间接反映了机体受自由基攻击的程度及脂质过氧化损伤的程度^[42]。另外,在人类的各种疾病研究发现,抗氧化能力是关键,生物体中的自由基过多会产生有害影响,如破坏细胞膜、损伤蛋白质和基因,同时可能破坏组织的分子结构,导致出现衰老、炎症等问题^[43-44]。本研究发现,在一定浓度范围内鹿茸肽能有效清除 DPPH 和羟基自由基,有效提高机体抗氧化能力,防止蓝光对机体的侵害。另外,同其他学者鹿茸肽的清除自由基活性相比,本优化工艺后提取的鹿茸肽抗氧化能力较强。王琦^[21]研究发现只有当浓度增加到 10 mg/mL 时,鹿茸多肽对 DPPH 自由基的清除率才能达到 50% 以上。

综上所述,本研究优化了酶解鹿茸肽的制备工艺,初步验证了鹿茸肽具有较好的抗蓝光活性。该结果对于鹿茸肽抗蓝光护肤品或保健品的开发具有一

定参考价值^[45]。同时,本研究也为进一步开发鹿茸在美容护肤方向上的相关产品提供了新思路。但本研究仍具有一定的局限性,其具体的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] ENGBRETSEN K A, JOHANSEN J D, KEZIC S, et al. The effect of environmental humidity and temperature on skin barrier function and dermatitis[J]. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2016, 30(2): 223-249.
- [2] ABDULAZIZ A, MICHAEL J S, CATHERINE A O'. The impact of ultraviolet radiation on barrier function in human skin: Molecular mechanisms and topical therapeutics[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2018, 25(40): 5503-5511.
- [3] 葛格. 蓝光对皮肤老化的影响及分子机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021. [GE Ge. Effect of blue light on skin aging and its molecular mechanism[D]. Shenyang: China Medical University, 2021.]
- [4] 刘沛仪, 马彦云, 宁静, 等. 高能蓝光照射致皮肤屏障损伤的表型特征[J]. *临床皮肤科杂志*, 2022, 51(7): 394-400. [LIU Peiyi, MA Yanyun, NING Jing, et al. Phenotypic characteristics of skin barrier damage induced by high-energy blue light irradiation[J]. *Journal of Clinical Dermatology*, 2022, 51(7): 394-400.]
- [5] 高科翔. 酶解鹿茸肽的制备分离纯化及其抗氧化活性的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009. [GAO Kexiang. Study on the preparation, purification and antioxidant activity of enzymatic hydrolyzed pilose antler peptide[D]. Changchun: Jilin University, 2009.]
- [6] ZHAO L, LUO Y C, WANG C T, et al. Antioxidant activity of protein hydrolysates from aqueous extract of velvet antler (*Cervus elaphus*) as influenced by molecular weight and enzymes[J]. *Natural Product Communications*, 2011, 6(11): 1683-1688.
- [7] 李福荣, 赵爽, 张秋, 等. 食源性生物活性肽的功能及其在食品中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(20): 210-217. [LI Furong, ZHAO Shuang, ZHANG Qiu, et al. Functions of food derived bioactive peptides and their applications in food[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(20): 210-217.]
- [8] 梅兵, 杨吉平, 常桂娟. 鹿茸多肽提取分离及药理活性的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(6): 1926-1928. [MEI Bing, YANG Jiping, CHANG Guijuan, et al. Research progress in the extraction, separation and pharmacological activity of pilose antler polypeptides[J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 29(6): 1926-1928.]
- [9] ZHA E, LI X, LI D, et al. Immunomodulatory effects of a 3.2 kDa polypeptide from velvet antler of *Cervus nippon* Temminck[J]. *International Immunopharmacology*, 2013, 16(2): 210-213.
- [10] 王响, 鞠贵春. 鹿茸多肽的研究进展[J]. *野生动物学报*, 2020, 41(2): 518-522. [WANG Xiang, JÜ Guichun. Research progress of pilose antler polypeptides[J]. *Journal of Wildlife*, 2020, 41(2): 518-522.]
- [11] 张争明, 杨静, 林伟欣. 鹿源药材保健食品研发现状与方向[J]. *经济动物学报*, 2016, 20(4): 212-218. [ZHANG Zhengming, YANG Jing, LIN Weixin. Research and development status and direction of Luyuan medicinal herbs health food[J]. *Journal of Economic Animal Science*, 2016, 20(4): 212-218.]
- [12] 魏蔼玲, 曾彬, 周强. 鹿茸废弃物的化学成分及抗氧化、促创面愈合活性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(8): 372-381. [WEI Ailing, ZENG Bin, ZHOU Qiang. Study on the chemical constituents and antioxidant and wound healing promoting activities

- of velvet antler waste[J]. Food Industry Science and Technology, 2022, 43(8): 372–381.]
- [13] 田晏, 黄晓莉, 侯召华. 基于主成分和聚类分析的鹿茸加工技术研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 311–318. [TIAN Yan, HUANG Xiaoli, HOU Zhaohua. Study on processing technology of velvet antler based on principal component analysis and cluster analysis[J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(21): 311–318.]
- [14] 刘春红, 汤焱聪, 高瑜培, 等. 鹿茸提取物体外和体内的抗氧化作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(10): 1061–1067. [LIU Chunhong, TANG Yichong, GAO Yupei, et al. Antioxidant effect of pilose antler extract *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2021, 38(10): 1061–1067.]
- [15] 王亚苹, 李晶峰, 张凯月, 等. 基于电喷雾质谱法及化学计量法筛选鹿茸促睾九间质细胞分泌睾酮的活性成分[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 262–268, 233. [WANG Yaping, LI Jingfeng, ZHANG Kaiyue, et al. Screening of the active components of testosterone secretion by deer antler-promoting testicular stromal cells based on electrospray mass spectrometry and stoichiometry method[J]. Modern Food Technology, 2021, 37(4): 262–268, 233.]
- [16] 吴淇, 金鑫, 杨小倩. 一种抗光老化组合物的药效学研究及凝胶面膜的制备[J]. 日用化学工业, 2021, 51(12): 1192–1201. [WU Qi, JIN Xin, YANG Xiaoqian, et al. Pharmacodynamics study of an anti-aging composition and preparation of gel facial mask[J]. Daily Chemical Industry, 2021, 51(12): 1192–1201.]
- [17] Gao J, Chen F, Fang H, et al. Daphnetin inhibits proliferation and inflammatory response in human HaCaT keratinocytes and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion in mice[J]. Biological Research, 2020, 53(1): 48.
- [18] 夏艾婷, 田燕. 蓝光对皮肤的损伤及其防护剂的研究进展[J]. 照明工程学报, 2017, 28(6): 20–23. [XIA Aiting, TIAN Yan. Progress in skin damage caused by blue light and its protective agents[J]. Journal of Lighting Engineering, 2017, 28(6): 20–23.]
- [19] GAO X, XU D, ZHANG X, et al. Protective effect of lemon peel polyphenols on oxidative stress-induced damage to human keratinocyte HaCaT cells through activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 7: 606–776.
- [20] PARK J Y, PARK S H, OH S W, et al. Yellow chaste weed and its components, apigenin and galangin, affect proliferation and oxidative stress in blue light-irradiated HaCaT cells[J]. Nutrients, 2022, 14(6): 1217.
- [21] 王琦. 鹿茸多肽提取工艺的优化及抗氧化、促愈合功效的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019. [WANG Qi. Optimization of extraction process of pilose antler polypeptide and study on its antioxidant and healing promoting effects[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019.]
- [22] 刘春娟. 均匀设计优化鹿茸抗氧化多肽酶解工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(11): 2660–2663. [LIU Chunjuan. Study on optimization of enzymatic hydrolysis of antler antioxidant polypeptide by uniform design[J]. Shizhen Traditional Chinese Medicine, 2015, 26(11): 2660–2663.]
- [23] 刘春娟. 不同分子量鹿茸多肽抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(13): 53–56. [LIU Chunjuan. Study on antioxidant activity of pilose antler polypeptides with different molecular weights[J]. Food Industry Science and Technology, 2015, 36(13): 53–56.]
- [24] 杨小倩. 玉蜀黍不同部位降血糖作用的活性研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2021. [YANG Xiaoqian. Study on hypoglycemic activity of different parts of maize[D]. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2021.]
- [25] 谷洁洁, 秦翠丽, 赵思琪, 等. 发酵法制备鸡胚蛋抗氧化肽及清除自由基的研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(9): 113–119. [GU Jiejie, QIN Cuili, ZHAO Siqi, et al. Study on the preparation of antioxidant peptides from chicken embryo eggs by fermentation and free radical scavenging[J]. China Food Additives, 2022, 33(9): 113–119.]
- [26] 赵峻露, 李春楠, 尹馨雪, 等. 响应面法优化鹿鞭肽酶解工艺及体外补肾健骨活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 213–221. [ZHAO Junlu, LI Chunnan, YIN Xinxue, et al. Optimization of the enzymatic hydrolysis process of verben peptide and analysis of the activity of *in vitro* kidney tonifying and bone strengthening by response surface methodology[J]. Food Industry Science and Technology, 2023, 44(2): 213–221.]
- [27] 邱慧, 杨小倩, 张辉, 等. 响应面法优化鹿筋胶原蛋白酶解工艺及其氨基酸含量[J]. 食品工业, 2021, 42(6): 204–208. [ZHI Hui, YANG Xiaoqian, ZHANG Hui, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process of deer tendon collagen and its amino acid content by response surface methodology[J]. Food Industry, 2021, 42(6): 204–208.]
- [28] SHIN K S, LEE J H. Optimization of enzymatic hydrolysis of immature citrus (*Citrus unshiu* Marcov.) for flavonoid content and antioxidant activity using a response surface methodology[J]. Food Science and Biotechnology, 2021, 30(5): 663–673.
- [29] ZHENG Y B, SHAN A S, ZHANG H. Optimisation of the enzymatic hydrolysis of blood cells with a neutral protease[J]. BioMed Research International, 2013: 278927.
- [30] 余彩霞, 李勤. 双水相体系萃取超氧化物歧化酶(SOD)的研究[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(1): 63–66. [YU Caixia, LI Qin. Study on the extraction of superoxide dismutase (SOD) by aqueous two-phase system[J]. Food and Fermentation Technology, 2018, 54(1): 63–66.]
- [31] 杨世慧, 王军, 秦永发, 等. 谷胱甘肽生理功能、发酵生产及其在动物生产中应用的研究进展[J]. 动物营养学报, 2022, 34(1): 6927–6935. [YANG Shihui, WANG Jun, QIN Yongfa, et al. Research progress in physiological function, fermentation production and application in animal production of glutathione[J]. Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(1): 6927–6935.]
- [32] 张燕. 鹿皮胶原蛋白多肽脂质体水凝胶的制备及其在小鼠光老化中的保护作用[D]. 长春: 吉林大学, 2022. [ZHANG Yan. Preparation of deer skin collagen polypeptide liposome hydrogel and its protective effect on photoaging in mice[D]. Changchun: Jilin University, 2022.]
- [33] PHAM T L, THI T T, NGUYEN H T, et al. Anti-aging effects of a serum based on coconut oil combined with deer antler stem cell extract on a mouse model of skin aging[J]. Cells, 2022, 11(4): 597.
- [34] KRUTMANN J, BERNEBURG M. Sun-damaged skin (photoaging): What is new?[J]. Der Hautarzt, 2021, 72(1): 2–5.
- [35] ZHU C, LIU J, HE B, et al. The role of human immortal skin keratinocytes-acellular dermal matrix scaffold in skin repair and regeneration[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(8): 12182–12191.
- [36] 张笑天, 郑晓璞. 氧化自由基清除剂超氧化物歧化酶与疾病[J]. 中国公共卫生, 2014, 30(10): 1349–1352. [ZHANG Xiaotian, ZHENG Xiaoping. Oxidative free radical scavenger superoxide dismutase and disease[J]. China Public Health, 2014, 30(10): 1349–1352.]
- [37] LEE M J, AGRAHARI G, KIM H Y, et al. Extracellular su-

peroxide dismutase prevents skin aging by promoting collagen production via activation of AMPK and Nrf2/HO-1 cascades[J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2021, 141(10): 2344–2353.

[38] CHEN X, LIU S, RAO P, et al. Topical application of superoxide dismutase mediated by HIV-TAT peptide attenuates UVB-induced damages in human skin[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 107: 286–294.

[39] SONTALIA S, DAULATABAD D, SARKAR R. Glutathione as a skin whitening agent: Facts, myths, Glutathione as a skin whitening agent: Facts, myths, evidence and controversies evidence and controversies[J]. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 2016, 82(3): 262–272.

[40] LEE Y, KUMAR S, KIM S H, et al. Odorless glutathione microneedle patches for skin whitening[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(2): 100.

[41] WITTOO D, TEERAPON D, PIYAMETH D. The clinical effect of glutathione on skin color and other related skin conditions: A

systematic review[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2019, 18(3): 728–737.

[42] 星萍, 陈晓平, 邢钰彬, 等. 紫苏迷迭香酸对 D-半乳糖衰老模型小鼠的抗氧化作用[J]. *食品科技*, 2021, 46(4): 222–227.

[XING Ping, CHEN Xiaoping, XING Yubin, et al. Antioxidative effects of basilla rosemirac acid in D-galactose aging model mice[J]. *Food Technology*, 2021, 46(4): 222–227.]

[43] GULCIN I. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview[J]. *Archives of Toxicology*, 2020, 94(3): 651–715.

[44] YANG H, YU S, KIM J, et al. Facile solvent-free preparation of antioxidant idebenone-loaded nanoparticles for efficient wound healing[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(3): 521.

[45] 薄盼盼, 陆雨顺, 曲迪, 等. 我国鹿产品开发进展[J]. *特产研究*, 2022, 44(5): 139–147. [BO Panpan, LU Yushun, QÜ Di, et al. Progress of deer products development in China[J]. *Specialty Research*, 2022, 44(5): 139–147.]