

吴俊豪, 王晶, KHO SETHYKUN, 等. 龟肉蛋白肽延缓果蝇衰老的作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(17): 394–401.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110057

WU Junhao, WANG Jing, KHO Sethygun, et al. Research on Anti-aging Function and Mechanism of Pond Turtle Protein-derived Peptides on *Drosophila melanogaster*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(17): 394–401. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110057

· 营养与保健 ·

龟肉蛋白肽延缓果蝇衰老的作用及机制研究

吴俊豪^{1,2}, 王 晶^{1,2}, KHO SETHYKUN¹, 覃 川¹, 王倩倩¹, 余 鹏³, 冯凤琴^{1,2,*}

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058;

2. 浙江大学宁波研究院, 浙江宁波 315100;

3. 余姚市冷江鳖业有限公司, 浙江宁波 315400)

摘 要:目的: 探究龟肉蛋白肽 (pond turtle protein-derived peptides, PTPDP) 延缓果蝇衰老的作用和机制。方法: 酶解乌龟肉得到 PTPDP, 测定其营养成分、分子质量分布以及氨基酸组成; 分别以 0.2%、0.4% 和 0.8% 的 PTPDP 喂养果蝇, 通过生存实验和测定体内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量来分析其抗衰老功能; 通过测定 0.8% PTPDP 喂养的雌性果蝇抗氧化相关基因 *Sod1*、*Sod2*、*Cat* 和寿命相关基因 *mtl*、*Rpn11* 的表达来探究其抗衰老机制。结果: 龟肉酶解产物以 1000 Da 以下的小分子肽段为主, 富含甘氨酸、谷氨酸和脯氨酸等具有抗氧化活性的氨基酸。生存实验和抗氧化活性实验中, 0.8% PTPDP 组雌雄果蝇的平均寿命分别显著延长了 18.92% 和 9.37% ($P<0.01$); SOD 活性分别显著提高了 7.13% 和 7.37% ($P<0.05$); CAT 活性分别极显著提高了 42.14% 和 84.66% ($P<0.01$); MDA 含量分别显著下降了 22.22% 和 23.08% ($P<0.05$)。基因表达结果显示, 0.8% PTPDP 喂养显著上调了抗氧化相关基因 *Sod1*、*Sod2* ($P<0.05$) 和 *Cat* ($P<0.01$) 的表达, 同时对寿命相关基因 *mtl* 和 *Rpn11* ($P<0.01$) 的表达也表现出显著的调节作用。结论: PTPDP 通过影响果蝇抗氧化和寿命相关基因的表达, 提高其体内抗氧化活性, 延长果蝇寿命, 有潜在的抗衰老功效。

关键词: 龟肉蛋白肽, 分子质量, 氨基酸组成, 寿命, 抗氧化活性, 基因表达

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)17-0394-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110057

本文网刊:



Research on Anti-aging Function and Mechanism of Pond Turtle Protein-derived Peptides on *Drosophila melanogaster*

WU Junhao^{1,2}, WANG Jing^{1,2}, KHO Sethygun¹, QIN Chuan¹, WANG Qianqian¹, YU Peng³, FENG Fengqin^{1,2,*}

(1. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Ningbo Research Institute, Zhejiang University, Ningbo 315100, China;

3. Yuyao Lengjiang Turtle Industry, Ningbo 315400, China)

Abstract: Objective: To explore the anti-aging function and mechanism of pond turtle protein-derived peptides (PTPDP) on *Drosophila melanogaster*. Methods: PTPDP were obtained by enzymatic hydrolysis of turtle meat. Nutrients content, molecular weight distribution and amino acid composition of PTPDP were determined. *D. melanogaster* were fed with 0.2%, 0.4%, and 0.8% PTPDP. The activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), along with the content of malondialdehyde (MDA) were determined to analyze the anti-aging function of PTPDP. The anti-aging mechanism was explored by measuring the expression of antioxidant genes (*Sod1*, *Sod2* and *Cat*) and lifespan-related genes (*mtl* and *Rpn11*) in female *D. melanogaster* fed with 0.8% PTPDP. Results: The enzymatic hydrolysis products of turtle meat were mainly composed of small molecule peptides less than 1000 Da. PTPDP were rich in amino acids with antioxidant activity,

收稿日期: 2021-11-08

基金项目: 宁波市自然科学基金项目 (2021JCGY010347); 余姚市农业农村和社会发展科技计划 (2020NS03); 宁波市“科技创新 2025”重大专项 (2019B10060)。

作者简介: 吴俊豪 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物活性肽, E-mail: wujunhaojon@zju.edu.cn。

* 通信作者: 冯凤琴 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品功能配料及营养健康, E-mail: fengfq@zju.edu.cn。

such as glycine, glutamic acid and proline. In the survival experiment, the average lifespans of female and male *D. melanogaster* were significantly prolonged by 18.92% and 9.37% ($P<0.01$), respectively. In the antioxidant activity experiment, the SOD activity of female and male *D. melanogaster* increased significantly by 7.13% and 7.37% ($P<0.05$); the CAT activity of female and male *D. melanogaster* increased significantly by 42.14% and 84.66% ($P<0.01$); the MDA content of female and male *D. melanogaster* decreased significantly by 22.22% and 23.08% ($P<0.05$). In female *D. melanogaster* fed with 0.8% PTPDP, the expression of anti-oxidant related genes *Sod1*, *Sod2* ($P<0.05$) and *Cat* ($P<0.01$) were significantly up-regulated, and genes (*mth* and *Rpn11*) related to lifespan also showed different degrees of regulation ($P<0.01$). Conclusion: PTPDP increase the antioxidant activity of *D. melanogaster* by affecting the expression of antioxidant genes and lifespan-related genes, thereby prolonging the lifespan of *D. melanogaster*. This mechanism implies that PTPDP has potential anti-aging effects.

Key words: pond turtle protein-derived peptides; molecular mass; amino acid composition; life span; antioxidant activity; gene expression

衰老,通俗来说是指生物体的生长发育经过成熟期后,随着年龄的继续增长,生物个体的器官功能和内环境稳定性等发生不可避免地下降或衰退,从而趋向死亡的过程与状态^[1-2]。许多慢性疾病,如风湿免疫病、心脑血管疾病和中枢神经病等,都与衰老有着密切的联系^[3-4]。衰老是受基因与环境等多重因素影响的复杂表型,其具体机理目前尚无定论,而自由基学说是目前衰老研究领域较有说服力的理论学说^[3]。该学说认为,机体的自由基水平会随着有氧代谢增加,过剩的自由基会引发脂质的过氧化,破坏细胞的氧化还原稳态,造成组织的不可逆损伤,最终导致机体的衰老^[5-7]。随着社会发展和科技进步,人们对于延缓衰老的需求也在增加,开发天然的抗氧化功能性食品具有重要的现实意义。过往研究表明,抗氧化肽不仅具有优良的自由基清除能力,而且稳定性好、无免疫反应^[8-10]。Chen 等^[11]酶解深红鲷鱼鳞得到的抗氧化肽能有效延长果蝇的平均寿命、最高寿命和半数死亡时间。Ding 等^[12]通过酶解和纯化从鹿茸中提取的抗氧化四肽 Trp-Asp-Val-Lys 能有效抑制斑马鱼体内活性氧的生成。Tonolo 等^[13]研究证实,四种牛奶衍生肽在细胞内的抗氧化作用主要通过激活 Keap1-Nrf2 信号通路完成。由此可见,生物活性肽的抗衰老功能研究潜力巨大,开发新型抗氧化肽是食品与医药领域值得关注的重点方向。

乌龟肉在我国有着悠久的食用历史,传统中医认为乌龟肉有润肺滋阴、舒通心气的作用,兼具了营养和药用价值^[14-15]。石扬等^[14]以中华草龟为原料,通过酶解和葡聚糖凝胶柱层析得到了高纯度的抗肿瘤活性肽。杨昭等^[15]利用碱性蛋白酶和复合蛋白酶对中华草龟、中华花龟和鳄龟肉进行水解,结果表明龟肉酶解液具有较高的自由基清除率,推测其具有抗氧化作用。现阶段关于龟肉蛋白肽的研究主要集中在抗肿瘤活性和体外抗氧化活性方面,但是并未涉及动物寿命实验、体内抗氧化活性以及基因表达等相关方向。寿命是评价抗衰老作用最为直接的观测指标^[16],而果蝇有着生活史短、易于繁殖、含有人类 75% 已知疾病的同源基因等优良特性,是抗衰老研究中常用的动物模型^[17]。本研究以果蝇作为模型,用含不同

剂量龟肉蛋白肽的培养基喂养,通过生存实验以及体内 SOD、CAT 活性和 MDA 含量的测定来评价龟肉蛋白肽的抗衰老功能,并通过测定抗氧化相关基因 *Sod1*、*Sod2* 和 *Cat* 以及寿命相关基因 *mth*、*Rpn11* 的表达来探究龟肉蛋白肽的抗衰老机制,期望为开发龟肉蛋白肽抗衰老功能食品提供相关的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜乌龟肉 余姚市冷江鳖业有限公司; Canton-S 黑腹果蝇 浙江中医药大学动物实验中心; 动物蛋白酶 A1 (200000 U/g) 南宁庞博生物工程有限公司; 细胞色素 c、抑肽酶、杆菌肽、甘氨酸-甘氨酸-色氨酸-精氨酸和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸标准品 (纯度 $\geq 95\%$) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 总超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、丙二醛试剂盒 南京建成生物工程研究所; FastKing cDNA 第一链合成试剂盒、RNA simple 总 RNA 提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司。

Legend Micro 高速台式离心机 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; RE-3000A 型真空旋转蒸发器 郑州南北仪器设备有限公司; Ultimate3000 高效液相色谱仪 美国 Dionex 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 龟肉蛋白肽的制备 参考张永进等^[18]的方法稍作修改,将新鲜乌龟肉洗净切块、去除脂肪,蒸煮 3 h 后匀浆,加入动物蛋白酶 A1, 50 °C 恒温酶解 6 h 后取出,立即置于沸水浴中灭酶 20 min,然后过滤并离心,取上清液蒸发浓缩、冷冻干燥得到龟肉蛋白肽粉末。

1.2.2 龟肉蛋白肽的营养成分分析 参照 GB 5009-2016《食品安全国家标准》中相应的方法测定龟肉蛋白肽的水分、灰分、蛋白质、酸溶蛋白质等含量。

1.2.3 龟肉蛋白肽分子质量及分布测定 参照 GB 5009-2016《食品安全国家标准》,利用高效液相色谱法进行测定。样品处理方法:精确称取 0.02 g 龟肉蛋白肽样品,定容到 10 mL 并混匀,使用微孔滤膜 (0.22 μm) 过滤后进样检测。

色谱条件: TSK gel 2000 SWXL 分析柱 (300 nm $\times$

7.8 mm), 柱温 30 ℃, 流动相按照乙腈:水:三氟乙酸=450:550:1(v/v/v)的比例配制, 进样体积 20 μL, 流速 0.5 mL/min, 于 220 nm 检测波长下运行 30 min。分别以高纯度标准品甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(189 Da)、甘氨-甘氨-色氨-精氨酸(451 Da)、杆菌肽(1450 Da)、抑肽酶(6512 Da)以及细胞色素 c(12400 Da)的保留时间对分子量的对数作标准曲线, 得到 $y = -0.2187x + 6.7329 (R^2 = 0.9901)$, 进一步计算得到龟肉蛋白肽的分子质量, 单位为 Da。

1.2.4 龟肉蛋白肽的氨基酸组成测定

1.2.4.1 样品前处理 参考史晋源等^[19]方法, 取 20 mg 龟肉蛋白肽粉末置于 15 mL COD 消解瓶, 滴加 1 mL 盐酸溶液(6 mol/L), 同时充入适量氮气, 立刻密封消解瓶, 150 ℃ 恒温加热 1.5 h, 随后冷却至室温。取各氨基酸对照品 10 mg, 超声溶解于 0.1 mol/L 盐酸溶液, 定容至 25 mL 得到氨基酸标准溶液。

1.2.4.2 氨基酸衍生化反应 流动相 A 为乙酸钠溶液(0.1 mol/L, pH6.5); 流动相 B 为经过超声脱气的 80% 乙腈溶液; 按乙醇:水:三乙胺=2:2:1(v/v/v)的比例配制再干燥液; 按异硫氰酸苯酯:乙醇:三乙胺:水=1:7:1:1(v/v/v/v)的比例配制衍生溶液; 按流动相 A:流动相 B=9:1(v/v)的比例配制样品稀释液。将不同量的氨基酸标准液(1、5、10、15、20 μL)分别与 6 μL 水解液加入 1.5 mL 离心管中, 依次加入 10 μL 再干燥液和 20 μL 衍生溶液, 涡旋混匀, 期间多次使用氮气干燥, 依次加入 50 μL 流动相 B 和 450 μL 流动相 A, 涡旋混匀, 经膜过滤后进样上机检测。

1.2.4.3 高效液相色谱的测定条件 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 38 ℃, 进样体积 10 μL, 流速 1 mL/min, 于 254 nm 波长下运行。以乙酸钠溶液(0.1 mol/L, pH6.5)作为流动相 A, 经过超声脱气的 80% 乙腈溶液作为流动相 B, 梯度洗脱时间见表 1。以各氨基酸的峰面积为横坐标, 氨基酸标液的质量浓度为纵坐标, 分别进行线性回归分析, 得到各氨基酸的标准曲线, 用于龟肉蛋白肽样品中各氨基酸的定性和定量分析。

表 1 梯度洗脱时间
Table 1 Gradient elution time

时间(min)	流速(mL/min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	1	100	0
13	1	93	7
23	1	77	23
29	1	65	35
35	1	60	40
40	1	0	100
45	1	0	100
47	1	100	0
50	1	100	0

1.2.5 果蝇培养基的制备 基础培养基的配方为 105 g 玉米粉、40 g 酵母粉、75 g 白砂糖、7.5 g 琼脂、10 mL 丙酸及 1000 mL 纯净水。样品培养基配制方

法和剂量选择参考史晋源等^[19]的方法, 在基础培养基中加入不同剂量龟肉蛋白肽, 将实验组培养基配成对照组(空白)、低剂量组(0.2%)、中剂量组(0.4%)和高剂量组(0.8%), 按 40 g/瓶分装于玻璃瓶中用于果蝇扩种, 按 5 g/管分装于玻璃试管中用于果蝇的寿命分析。

1.2.6 果蝇扩种 果蝇的饲养环境为温度 25 ℃, 湿度 60%~70%, 昼夜 12 h 交替。将果蝇从保种瓶转移到新的扩种瓶中, 通入 CO₂ 使其全部麻醉, 在果蝇挑取板上区分雌雄性别, 按照雌:雄=40:20 转入含基础培养基的瓶中进行交配产卵。5 d 后放出初代果蝇, 培养约 10 d, 羽化的果蝇即为亲代果蝇。将亲代果蝇按照雌雄比 40:20 接入实验饲料组, 第 5 d 放飞亲代果蝇, 约第 10 d 飞出的果蝇即为接种果蝇。

1.2.7 果蝇生存试验 将 24 h 内羽化的果蝇转入空瓶, 通入 CO₂ 麻醉以区分雌雄性别。各试验组试管饲养 30 只雌性或雄性果蝇, 重复 10 次。每隔 3 d 给各试管果蝇换新培养基, 观测各试管果蝇的存活数, 计算果蝇实验常用的寿命指标^[20](半数死亡时间、平均寿命、平均最高寿命、平均寿命延长率以及存活率), 同时绘制雌雄果蝇的生存曲线。各项寿命指标的计算公式如下:

半数死亡时间(d)=每组50%的果蝇死亡时的时间

平均寿命(d)= $\frac{\text{每组所有果蝇寿命之和}}{\text{每组果蝇总数}}$

平均最高寿命(d)= $\frac{\text{每组最后10\%的果蝇寿命之和}}{\text{每组10\%的果蝇总数}}$

平均寿命延长率(%)= $\frac{\text{实验组平均寿命}-\text{对照组平均寿命}}{\text{对照组平均寿命}} \times 100$

存活率(%)= $\frac{\text{现存活的果蝇数}}{\text{每组果蝇总数}} \times 100$

1.2.8 果蝇抗氧化活性实验 参考 Xin 等^[21]和张明等^[22]的方法, 分别于 20 d 果蝇青年期和 40 d 果蝇老年期时, 使用 CO₂ 麻醉果蝇并加生理盐水制成 10% 组织匀浆, 置于低温离心机中离心 15 min(4 ℃, 8000 r/min), 取上清液, 使用试剂盒分别测定每组雌、雄果蝇的总 SOD、CAT 活性和 MDA 含量。

1.2.9 果蝇基因表达实验 参考张晓寒等^[23]的实验方法稍作修改, 选取基础培养基为空白对照组, 选取果蝇生存实验和抗氧化活性实验的最佳剂量, 即 0.8% 龟肉蛋白肽为实验剂量, 选择生存实验延寿效果较好的雌性果蝇为实验对象, 重复上述果蝇培养和

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	上游引物	下游引物
<i>rp49</i>	GCTAAGCTGTCGCACAAATG	TGTGCACCAGGAACCTTCTTG
<i>Sod1</i>	ACCGACTCCAAGATTACGCTCT	GTTGCCCGTTGACTTGCTC
<i>Sod2</i>	CCACATCAACCACACCATCT	CAGTTTGCCCGACTTCTTGT
<i>Cat</i>	TACGAGCAGGCCAAGAAGTT	ACCTTGTACGGGCAGTTCAC
<i>mtb</i>	CGTCTTCTGGTGGCTGACT	CGTGGATTAGGATGGTTCC
<i>Rpn11</i>	CATTGTGAGAGAAGGTGGA	GCGATTGTGGGTATGAAGG

扩种实验,在第 21 d 时,参照相关试剂盒说明进行果蝇总 RNA 提取和 cDNA 合成。以 cDNA 为模板,利用荧光实时 PCR 检测其抗氧化相关基因 *Sod1*、*Sod2* 和 *Cat*,以及寿命调节相关基因 *mtth*、*Rpn11* 的 mRNA 表达水平。引物序列见表 2,以 *rp49* 为内参基因,基因表达以 PCR 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示。

1.3 数据处理

本研究使用 SPSS 22.0 软件分析统计学差异,各项数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Graphpad Prism 9 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 龟肉蛋白肽营养成分分析

龟肉蛋白肽的部分成分含量见表 3。龟肉的蛋白酶解产物中含有大量蛋白质,占总营养成分的 86.49%,其中 85.98% 为酸溶蛋白,而且水解度高达 32%。酸溶蛋白含游离氨基酸和小肽,具有较低的分子量,可以很好地溶于酸性溶液中^[24],说明龟肉蛋白肽在体内容易被消化吸收。

表 3 龟肉蛋白肽的营养成分
Table 3 Nutrient content of PTPDP

营养成分	龟肉蛋白肽
水分(%)	4.04±0.05
灰分(%)	3.11±0.08
蛋白含量(%)	86.49±1.17
酸溶蛋白含量(%)	85.98±1.02

2.2 龟肉蛋白肽分子量分布

蛋白酶解产物中,分子量相对较小的肽链片段往往会表现出更强的抗氧化活性^[25]。申彩虹^[26]通过酶解法制备得到了海参寡肽(130~2000 Da)和海参多肽(2000~5000 Da),前者的抗氧化能力显著强于后者。另一研究也显示,鲈鱼肉水解所得肽段中抗氧化活性最强的肽段同时相对分子质量也最小^[27]。龟肉蛋白肽分子量分布情况见表 4,其中分子量为 180~500 Da 的肽段含量最大,占 60.39%。龟肉蛋白肽中 94.71% 的肽段为 1000 Da 以下的小肽,因此推测其具有潜在的抗氧化功能。

表 4 龟肉蛋白肽分子量分布
Table 4 Molecular weight distribution of PTPDP

分子量(Da)	含量(%)
<180	11.32±0.20
180~500	60.39±1.01
500~1000	22.99±0.77
>1000	5.29±0.08

2.3 龟肉蛋白肽氨基酸组成

过往研究表明,甘氨酸和谷氨酸是内源性抗氧化剂谷胱甘肽的组成氨基酸^[28],谷氨酸还参与红细胞的生产,具有抵抗记忆力减退、改善脑细胞等抗衰老

作用^[29];精氨酸与细胞增殖、信号传导等多种生物学功能相关,可改善多种衰老相关疾病^[19,30];支链氨基酸,包括缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸在内,可以有效延长实验小鼠的各项寿命指标,具有抗氧化、延缓衰老的作用^[31];此外,丙氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸也被广泛认为具有抗氧化功效^[19]。龟肉蛋白肽由 16 种氨基酸组成(见表 5),上述 10 种具有抗氧化、抗衰老功能的氨基酸共占 80.30%,其中甘氨酸(15.79%)、谷氨酸(14.70%)和脯氨酸(9.73%)的相对含量最高。因此推测龟肉蛋白肽可能具有抗氧化、延缓衰老的作用。

表 5 龟肉蛋白肽的氨基酸组成
Table 5 Amino acids composition of PTPDP

氨基酸名称	含量(mg/g)	含量(%)
天冬氨酸	59.86±0.97	8.04±0.26
谷氨酸	109.47±3.54	14.70±0.23
丝氨酸	20.95±0.51	2.81±0.04
甘氨酸	117.59±7.63	15.79±0.87
组氨酸	9.17±0.47	1.23±0.07
精氨酸	31.28±0.81	4.20±0.05
苏氨酸	22.08±0.35	2.96±0.01
丙氨酸	55.99±0.42	7.52±0.16
脯氨酸	72.45±1.54	9.73±0.05
酪氨酸	20.55±0.70	2.76±0.10
缬氨酸	35.88±0.66	4.82±0.10
甲硫氨酸	14.21±0.75	1.91±0.13
异亮氨酸	52.87±2.29	7.10±0.28
亮氨酸	48.94±1.96	6.57±0.24
苯丙氨酸	22.87±1.33	3.07±0.16
赖氨酸	50.61±0.53	6.80±0.05

2.4 龟肉蛋白肽对果蝇寿命的影响

寿命是评价抗衰老作用的生物实验中最直接的观测指标,果蝇实验中,通常用半数死亡时间、平均寿命、平均最高寿命和平均寿命延长率作为观测指标^[16]。不同剂量龟肉蛋白肽对雌、雄果蝇寿命的影响如表 6 所示,除低剂量组果蝇的半数死亡时间外,各实验组果蝇的各项寿命指标均较对照组有所上升,且对寿命的延长效果随喂食龟肉蛋白肽的含量增加而升高。对于雄性果蝇,高剂量组的平均寿命极显著增加($P<0.01$),平均最高寿命显著增加($P<0.05$)。对于雌性果蝇,低剂量组的平均最高寿命显著增加($P<0.05$),中剂量组的平均最高寿命极显著增加($P<0.01$),高剂量组半数死亡时间、平均寿命和平均最高寿命均极显著增加($P<0.01$)。综上所述,0.8% 龟肉蛋白肽培养基喂养果蝇对其寿命的延长效果最佳。

果蝇的生存曲线见图 1,20 d 之前,各实验组相比空白对照无显著性差异($P>0.05$),20 d 后高剂量组雌、雄果蝇的存活率均逐渐高于对照组。各剂量龟肉蛋白肽喂养下,雌雄果蝇存活率归零的时间均较对照组变晚,其中 0.8% 龟肉蛋白肽组最晚。总体来

表6 不同剂量龟肉蛋白肽对雌、雄果蝇寿命的影响

Table 6 Effects of different doses of PTPDP on the lifespan of female and male *D. melanogaster*

组别	半数死亡时间(d)		平均寿命(d)		平均最高寿命(d)		平均寿命延长率(%)	
	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄
对照组	36	48	36.40±0.97	46.18±0.72	60.31±0.64	63.41±0.61	—	—
低剂量组	36	48	38.54±1.01	46.49±0.82	63.21±0.51*	63.62±0.60	5.87±0.13	0.67±0.05
中剂量组	39	51	39.76±1.06	47.76±0.80	65.57±0.59**	65.57±0.63	9.24±0.17	3.43±0.12
高剂量组	45**	51	43.29±1.04**	50.51±0.78**	69.00±0.93**	68.33±0.82*	18.92±0.23	9.37±0.17

注: *表示各剂量组与对照组相比差异显著, $P<0.05$; **表示各剂量组与对照组相比差异极显著, $P<0.01$, 表7~表9同。

说, 龟肉蛋白肽可以增加雌雄果蝇的存活率, 其中0.8% 龟肉蛋白肽的效果最好。

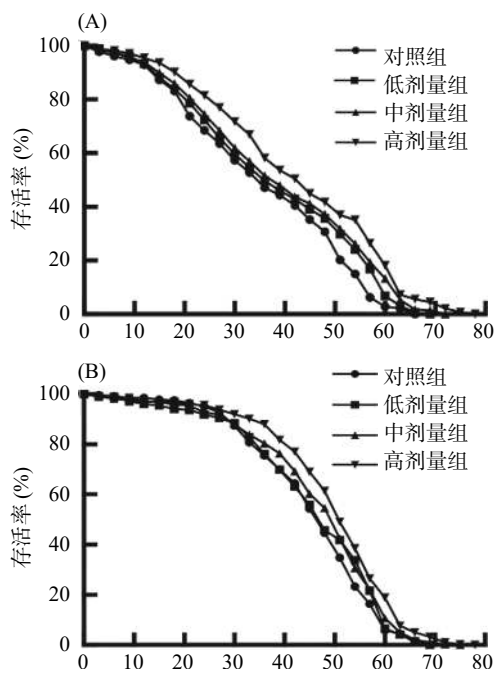


图1 雌性(A)和雄性(B)果蝇的生存曲线

Fig.1 The survival curves of female (A) and male (B) *D. melanogaster*

本实验中, 龟肉蛋白肽对雌性果蝇的延寿效果好于雄性: 喂食0.8% 龟肉蛋白肽的雌性果蝇半数死亡时间较对照组极显著延长($P<0.01$), 而雄性果蝇则无显著性差异($P>0.05$); 0.2%、0.4% 龟肉蛋白肽喂养的雌性果蝇平均最高寿命分别显著延长($P<0.05$)、极显著延长($P<0.01$), 而同组雄性果蝇不呈显著性差异($P>0.05$); 0.8% 龟肉蛋白肽组雌性果蝇的平均最高寿命较对照组极显著延长($P<0.01$), 而同组雄性果蝇并未呈现极显著差异($0.01<P<0.05$)。以往同类研究表明^[19,32], 由于对受试药物的适应性与敏感性不同, 雌、雄果蝇的寿命实验结果会存在差异, 因此可推测本实验中雌性果蝇对龟肉蛋白肽更为敏感。

2.5 龟肉蛋白肽对果蝇体内抗氧化活性的影响

抗氧化酶如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)可以清除机体的多余活性氧, 从而实现体内自由基的动态平衡^[32-34], 二者的活性是评价机体自由基清除能力的间接指标。丙二醛(malondialdehyde, MDA)是多不饱和

和脂肪酸等脂质在氧自由基作用下发生氧化反应的最终产物, 具有细胞毒性, 通常会随年龄的增大而增多^[35], 其含量是间接反应脂质氧化程度的重要指标^[36]。

如表7所示, 随着果蝇年龄的增长, 40 d时SOD活性较20 d普遍降低。0.4% 龟肉蛋白肽组雌性果蝇20 d和40 d的SOD活性均较对照组显著增强($P<0.05$), 同组雄性果蝇20 d的SOD活性显著增强($P<0.05$), 但40 d时无显著差异($P>0.05$)。0.8% 龟肉蛋白肽组雌、雄果蝇20 d和40 d的SOD活性均较对照组显著增强($P<0.05$), 其中雌性果蝇20 d时极显著增强($P<0.01$)。综上所述, 龟肉蛋白肽能有效提高果蝇SOD活性, 最佳剂量为0.8%, 且对雌性果蝇SOD活性的提升效果好于雄性。

表7 不同剂量龟肉蛋白肽对果蝇体内SOD活性的影响

Table 7 Effects of different doses of PTPDP on SOD activity of *D. melanogaster*

组别	雌果蝇SOD活性(U/mg prot)		雄果蝇SOD活性(U/mg prot)	
	20 d	40 d	20 d	40 d
对照组	264.71±12.85	261.68±8.58	358.33±5.84	328.71±10.32
低剂量组	282.44±9.11	257.49±4.65	364.18±13.93	329.97±8.90
中剂量组	294.24±3.37*	283.59±7.15*	390.90±7.08*	333.45±2.91
高剂量组	315.30±14.33**	280.35±3.52*	385.16±10.76*	352.93±5.21*

如表8所示, 0.2%和0.4% 龟肉蛋白肽喂养雌性果蝇20 d和40 d的CAT活性较对照组分别显著增加($P<0.05$)、极显著增加($P<0.01$), 而同剂量喂养的雄性果蝇CAT活性则没有显著增强($P>0.05$)。0.8% 龟肉蛋白肽组雌性果蝇20 d和40 d的CAT活性极显著增加($P<0.01$), 雄性果蝇20 d时显著增加($P<0.05$), 40 d时极显著增加($P<0.01$)。综上所述

表8 不同剂量龟肉蛋白肽对雌、雄果蝇体内CAT活性的影响

Table 8 Effects of different doses of PTPDP on CAT activity of female and male *D. melanogaster*

组别	雌果蝇CAT活性(U/mg prot)		雄果蝇CAT活性(U/mg prot)	
	20 d	40 d	20 d	40 d
对照组	57.03±3.22	63.49±4.56	117.25±9.19	85.33±6.49
低剂量组	82.14±12.16*	81.24±5.36*	114.19±5.04	94.41±7.91
中剂量组	97.08±4.86**	88.32±3.48**	121.38±11.41	93.07±7.48
高剂量组	113.59±3.99**	90.31±9.77**	144.28±5.89*	157.57±3.58**

述, 龟肉蛋白肽能有效提高果蝇 CAT 活性, 最佳剂量为 0.8%, 对雌性果蝇作用效果较好。

如表 9 所示, 与空白对照相比, 0.2% 龟肉蛋白肽饲养的果蝇体内 MDA 含量无显著性变化($P>0.05$)。0.4% 龟肉蛋白肽组雄果蝇 40 d 的 MDA 含量与对照组相比显著减少($P<0.05$)。喂食 0.8% 龟肉蛋白肽的雌、雄果蝇在 20 d 和 40 d 的体内 MDA 含量均显著减少($P<0.05$)。综上所述, 0.8% 龟肉蛋白肽能有效降低果蝇体内 MDA 含量。

表 9 不同剂量龟肉蛋白肽对雌、雄果蝇体内 MDA 含量的影响

组别	雌果蝇MDA含量 (nmol/mg prot)		雄果蝇MDA含量 (nmol/mg prot)	
	20 d	40 d	20 d	40 d
对照组	0.33±0.04	0.36±0.01	0.25±0.02	0.26±0.02
低剂量组	0.32±0.04	0.36±0.04	0.24±0.01	0.23±0.04
中剂量组	0.24±0.01	0.33±0.03	0.22±0.02	0.19±0.01*
高剂量组	0.21±0.03*	0.28±0.02*	0.19±0.04*	0.20±0.02*

2.6 龟肉蛋白肽对果蝇基因表达的影响

Sod1、*Sod2* 和 *Cat* 基因的表达分别影响超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性, 是评价生物体抗氧化能力的常用指标^[4,37]。*mtH* 基因的表达量被认为与寿命呈负相关性, 研究表明 *mtH* 发生突变会使成年果蝇的平均寿命会延长 35%^[38]。*Rpn11* 基因的表达可以减少衰老相关的泛素化蛋白在体内积累, 从而延长果蝇寿命^[39]。

如图 2 所示, 与对照组相比, 使用 0.8% 龟肉蛋白肽培养基的实验组雌性果蝇体内的抗氧化相关基因 *Sod1*、*Sod2* 和 *Cat* 的表达量均有上升, 其中 *Sod1* 和 *Sod2* 基因的表达量显著上升($P<0.05$), *Cat* 基因的表达量极显著上升($P<0.01$)。寿命相关基因 *mtH* 基因的表达量极显著下降($P<0.01$), 而 *Rpn11* 的表达量极显著上升($P<0.01$)。综上所述, 0.8% 龟肉蛋白肽通过上调抗氧化相关基因 *Sod1*、*Sod2*、*Cat* 和

寿命相关基因 *Rpn11* 的表达, 以及下调寿命相关基因 *mtH* 的表达来延长果蝇寿命。

3 结论

本研究酶解乌龟肉得到大量 1000 Da 以下的小分子肽段, 龟肉蛋白肽富含甘氨酸、谷氨酸和脯氨酸等多种具有抗氧化活性的氨基酸。0.2%、0.4% 和 0.8% 的龟肉蛋白肽都可以有效延长果蝇寿命, 提高果蝇体内多项抗氧化活性指标, 其中喂食 0.8% 龟肉蛋白肽的作用效果最佳。同等剂量下, 相较雄性果蝇, 雌性果蝇对龟肉蛋白肽更为敏感。0.8% 的龟肉蛋白肽通过上调抗氧化相关基因 *Sod1*、*Sod2*、*Cat* 和寿命相关基因 *Rpn11* 的表达, 以及下调寿命相关基因 *mtH* 的表达来延长果蝇寿命。综上所述, 本研究的结果表明龟肉蛋白肽具有潜在的抗衰老功效, 为后续相关医药产品或保健食品的开发与应用提供了一定的参考。由于衰老的机制较为复杂, 且果蝇与人类在许多层面上差异较大, 后续研究可以使用小鼠等哺乳动物作为模型, 为深度探究龟肉蛋白肽的抗衰老功能和作用机制, 提供更详实的实验依据。

参考文献

[1] 周佳雯, 新建亮. 衰老机制及其干预研究进展[J]. 医学研究生学报, 2021, 34(5): 524–529. [ZHOU J W, JIN J L. Research progress on aging mechanism and its intervention[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2021, 34(5): 524–529.]

[2] DATO S, CROCCO P, MIGLIORE N R, et al. Omics in a digital world: The role of bioinformatics in providing new insights into human aging[J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12: 689824.

[3] 卢春雪, 杨绍杰, 陶荟竹, 等. 衰老机制研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(1): 248–250. [LU C X, YANG S J, TAO H Z, et al. Research progress on aging mechanism[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2018, 38(1): 248–250.]

[4] NANDI A, YAN L J, JANA C K, et al. Role of catalase in oxidative stress and age-associated degenerative diseases[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 9613090.

[5] CARUSO G, GODOS J, CASTELLANO S, et al. The therapeutic potential of carnosine/anserine supplementation against cognitive decline: A systematic review with meta-analysis[J]. Biomedicines, 2021, 9(3): 253.

[6] SHEN C Y, JIANG J G, YANG L, et al. Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: Pharmacological mechanisms and implications for drug discovery[J]. British Journal of Pharmacology, 2017, 174(11): 1395–1425.

[7] POMATTO L C, DAVIES K J. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 124: 420–430.

[8] AGUILAR-TOALA J E, LICEAGA A M. Cellular antioxidant effect of bioactive peptides and molecular mechanisms underlying: Beyond chemical properties[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2020, 56(5): 2193–2204.

[9] TADESSE S A, EMIRE S A. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food

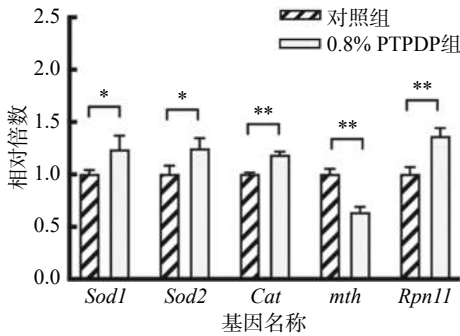


图 2 0.8% PTPDP 喂养的雌性果蝇基因表达

Fig.2 Gene expressions of female *D. melanogaster* fed by 0.8% PTPDP

注: *表示与对照组相比差异显著, $P<0.05$; **表示与对照组相比差异极显著, $P<0.01$ 。

- market[J]. *Heliyon*, 2020, 6(8): e04765.
- [10] ZENG W C, SUN Q, ZHANG W H, et al. Antioxidant activity *in vivo* and biological safety evaluation of a novel antioxidant peptide from bovine hair hydrolysates[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 56: 193–198.
- [11] CHEN S Y, YANG Q, CHEN X, et al. Bioactive peptides derived from crimson snapper and *in vivo* anti-aging effects on fat diet-induced high fat *Drosophila melanogaster*[J]. *Food & Function*, 2020, 11(1): 524–533.
- [12] DING Y L, KO S C, MOON S H, et al. Protective effects of novel antioxidant peptide purified from alcalase hydrolysate of velvet antler against oxidative stress in chang liver cells *in vitro* and in a zebrafish model *in vivo*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(20): 5187.
- [13] TONOLO F, FOLDA A, CESARO L, et al. Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103696.
- [14] 石扬, 张永进, 赖年悦, 等. 中华草龟肉抗肿瘤活性肽的分离纯化及鉴定研究[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(5): 24–31. [SHI Y, ZHANG Y J, LAI N Y, et al. Isolation, purification and identification of anti-tumor bioactive peptides from *Chinemys reevesii*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(5): 24–31.]
- [15] 杨昭, 曾琳琦, 凌叶婷, 等. 蛋白酶种类对龟肉酶解液品质的影响[J]. *食品工业*, 2021, 42(3): 188–191. [YANG Z, ZENG L Q, LING Y T, et al. Effect of protease species on the quality of enzymatic hydrolysate of turtle meat[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(3): 188–191.]
- [16] 段丽娟, 范慧君, 邢婕, 等. 龟龄集延缓果蝇衰老的作用研究[J]. *山西医科大学学报*, 2021, 52(3): 317–321. [DUAN L J, FAN H J, XING J, et al. Study on anti-aging effects of Guilingji in *Drosophila melanogaster*[J]. *Journal of Shanxi Medical University*, 2021, 52(3): 317–321.]
- [17] 闫明亮, 周玉枝, 李明花, 等. 基于¹H-NMR代谢组学的黄芩醇提取物延长果蝇寿命研究[J]. *中草药*, 2016, 47(10): 1714–1722. [YAN M L, ZHOU Y Z, LI M H, et al. Metabonomic study of alcohol extract from *Scutellariae Radix* in prolonging lifespan of *Drosophila melanogaster* based on ¹H-NMR[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2016, 47(10): 1714–1722.]
- [18] 张永进, 石扬, 赖年悦, 等. 中华草龟抗肿瘤生物活性肽提取工艺的初步研究[J]. *肉类工业*, 2017, 7: 28–33. [ZHANG Y J, SHI Y, LAI N Y, et al. Preliminary study on extraction technology of antitumor bioactive peptides of *Chinemys reevesii*[J]. *Meat Industry*, 2017, 7: 28–33.]
- [19] 史晋源, 钟浩, 王倩倩, 等. 甲鱼肽对果蝇寿命及其抗氧化活性的影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(11): 321–327. [SHI J Y, ZHONG H, WANG Q Q, et al. Effect of soft-shelled turtle peptide on the lifespan and antioxidant activities of *Drosophila melanogaster*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(11): 321–327.]
- [20] 王耀辉, 任海虹, 王景雪, 等. 白灵菇多糖对果蝇寿命及抗氧化活性的影响[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(5): 313–318. [WANG Y H, REN H H, WANG J X, et al. Effect of polysaccharides of *Pleurotus nebrodensis* on the life-span and antioxidant activities of *Drosophila melanogaster*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(5): 313–318.]
- [21] XIN X X, CHEN Y, CHEN D, et al. Supplementation with major royal-jelly proteins increases lifespan, feeding, and fecundity in *Drosophila*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(29): 5803–5812.
- [22] 张明, 何超, 邵颖, 等. 蛹虫草多糖对果蝇寿命及抗氧化活性的影响[J]. *食品科技*, 2016, 41(11): 179–183. [ZHANG M, HE C, SHAO Y, et al. Effect of polysaccharides from fruiting body of *Cordyceps militaries* on lifespan and antioxidant activity in *Drosophila melanogaster*[J]. *Food Science and Technology*, 2016, 41(11): 179–183.]
- [23] 张晓寒, 赵江, 韩英, 等. 根皮素延缓雌性果蝇的衰老作用[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(3): 9–16, 166. [ZHANG X H, ZHAO J, HAN Y, et al. Anti-aging effects of phloretin on female *Drosophila melanogaster*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(3): 9–16, 166.]
- [24] 余楠楠, 陈琛. 生物活性肽功能及制备技术研究进展[J]. *中国酿造*, 2018, 37(9): 17–21. [YU N N, CHEN C. Research progress of bioactive peptide function and preparation technology[J]. *China Brewing*, 2018, 37(9): 17–21.]
- [25] HU X M, WANG Y M, ZHAO Y Q, et al. Antioxidant peptides from the protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle: Purification, identification, and cytoprotective function on HepG2 cells damage by H₂O₂[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(3): 153.
- [26] 申彩红. 海参肽的酶法制备及其抗氧化、抗疲劳活性研究[D]. 厦门: 华侨大学, 2015. [SHEN C H. Study on the enzymatic preparation of sea cucumber peptide and its antioxidant and anti-fatigue activities[D]. Xiamen: Huaqiao University, 2015.]
- [27] 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. [ZHAO Y J. Separation and characterization of antioxidant peptides from bass muscle and their protective effects against oxidative damage in HepG2 cells[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.]
- [28] 杜瑞平, 张兴夫, 高氏, 等. 甘氨酸的免疫调节作用及其分子机制[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(3): 663–670. [DU R P, ZHANG X F, GAO M, et al. Immunomodulatory effect and molecular mechanism of glycine[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(3): 663–670.]
- [29] GARCIA E J, CAIN M E. Isolation housing elevates amphetamine seeking independent of nucleus accumbens glutamate receptor adaptations[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2021, 54(7): 6382–6396.
- [30] CHEN C L, HSU S C, ANN D K. Arginine signaling and cancer metabolism[J]. *Cancers*, 2021, 13(14): 3541.
- [31] SADEGHI M, TENBERG V, MUNZBERG S, et al. Phase equilibria of L-valine/L-leucine solid solutions[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 340: 117315.
- [32] 秦永燕, 王好婕, 李颖, 等. 黄芪多糖对果蝇寿命和抗氧化作用的影响[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(2): 288–291. [QIN Y Y, WANG Y J, LI Y, et al. Effects of astragalus polysaccharide on life

- span and antioxidation of *Drosophila melanogaster*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(2): 288–291.]
- [33] ZHANG J J, LIU X, PAN J H, et al. Anti-aging effect of brown black wolfberry on *Drosophila melanogaster* and d-galactose-induced aging mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 65: 103724.
- [34] 张婉迎, 赵文学, 尹翌秋, 等. 人参水提物对果蝇抗衰老的作用机制[J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(5): 557–562. [ZHANG W Y, ZHAO W X, YIN Y Q, et al. Mechanism of anti-aging activity of water extract of ginseng in *Drosophila melanogaster*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2018, 40(5): 557–562.]
- [35] WONG D, HU X Q, TAO N P, et al. Effect and mechanism of pyridoxamine on the lipid peroxidation and stability of polyunsaturated fatty acids in beef patties[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(10): 3418–3423.
- [36] 张静静, 刘暄, 赵琦, 等. 褐变黑枸杞对紫外照射损伤果蝇寿命及抗氧化能力的影响[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(1): 53–58. [ZHANG J J, LIU X, ZHAO Q, et al. Brown black wolfberry on the life-span of UV damaged *Drosophila melanogaster* and its anti-oxidation activities[J]. China Food Additives, 2020, 31(1): 53–58.]
- [37] DORAN M L, KNEE J M, WANG N, et al. Metabolomic analysis of oxidative stress: *Superoxide dismutase* mutation and paraquat induced stress in *Drosophila melanogaster*[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, 113: 323–334.
- [38] PANDEY A, KHATOON R, SAINI S, et al. Efficacy of *methuselah* gene mutation toward tolerance of dichlorvos exposure in *Drosophila melanogaster*[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 83: 54–65.
- [39] TANG R, CHEN X Y, DANG T T, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides extend the mean lifespan of *Drosophila melanogaster*[J]. Food & Function, 2019, 10(7): 4231–4241.