

家蝇幼虫耐高温抗氧化蛋白的筛选及其功能研究

黄靖怡,柯德森

(广州大学 生命科学院,广州 510006)

摘要:为寻找耐高温抗氧化蛋白并探究其功能特性,采用60、80、100℃处理家蝇幼虫水提取液获得蝇蛆蛋白提取液。通过测定蝇蛆蛋白提取液中蛋白质含量、蛋白质组成以及体外抗氧化活性,确定获得蝇蛆耐高温抗氧化蛋白的最佳处理条件,并对所得蝇蛆耐高温抗氧化蛋白的疏水性以及其对H9c2细胞的氧化损伤保护作用及机理进行了分析。结果表明:高温处理家蝇幼虫水提取液可获得耐高温蛋白,并具有较理想的超氧阴离子自由基、羟自由基清除能力及较高的还原力,100℃处理20 min可获得耐高温抗氧化蛋白。该耐高温抗氧化蛋白可使H₂O₂诱导损伤的H9c2细胞存活率提高约39%,LDH渗出率降低约24%,有效增强细胞的SOD活力、CAT活力及GSH含量($P < 0.05$)。研究显示,从蝇蛆中获得了具有良好耐高温特性的抗氧化蛋白,该蛋白对H₂O₂损伤的H9c2细胞有良好保护作用。

关键词:家蝇幼虫;耐高温;抗氧化;蛋白;H9c2细胞

中图分类号:TS201.4;Q51

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2020)02-0069-07

Screening and function of thermostable antioxidant protein of *Musca domestica* larvae

HUANG Jingyi, KE Desen

(College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to find thermostable antioxidant proteins and explore their functional properties, the protein extracts from fly maggot were obtained by treating the *Musca domestica* larvae water extract at 60, 80 °C and 100 °C. By determining the protein content, protein composition and antioxidant activity in the fly maggot protein extract, the optimal treatment conditions for obtaining thermostable antioxidant protein of fly maggot were determined. The hydrophobicity of the thermostable antioxidant proteins of fly maggot, as well as its protective effect on oxidative damage of H9c2 cells and its mechanism were analyzed. The results showed that high temperature treatment of the *Musca domestica* larvae water extract could obtain thermostable protein, and it had ideal superoxide anion radical, hydroxyl radical scavenging abilities and high reducing power. The optimal treatment condition was 100 °C for 20 min. Preliminary analysis of the physiological function of the protein showed that it could increase the survival rate of injured H9c2 cells damaged by hydrogen peroxide by about 39%, and the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) decreased by about 24%. In addition, the superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity and glutathione (GSH) content were effectively enhanced ($P < 0.05$). It showed that thermostable antioxidant protein was obtained from fly maggot, and the protein had a good protective effect on H9c2 cells damaged by hydrogen peroxide.

Key words: *Musca domestica* larvae; thermostable; antioxidant; protein; H9c2 cell

收稿日期:2019-04-26;修回日期:2019-09-16

基金项目:广东省科技计划项目(2007B030701006)

作者简介:黄靖怡(1993),女,硕士研究生,研究方向为应用生物化学(E-mail)2586171547@qq.com。

通信作者:柯德森,教授,博士(E-mail)270820679@qq.com。

家蝇(*Musca domestica*)对各种不良环境具有高度适应性,已作为一种资源昆虫受到广泛关注。而蝇蛆作为蝇的幼虫,富含脂肪酸、蛋白质等营养成分及多种维生素和生物活性物质,是一种宝贵的营养资源^[1-2]。从蝇蛆中提取的蝇蛆油含有十分丰富的

不饱和脂肪酸,不仅是维持生物体活动的重要成分,而且对皮肤损伤有良好的疗效^[3],同时还可作为生物柴油的合成原料^[4]。而蝇蛆蛋白质含量丰富、种类多样,具有良好的开发价值。研究发现,从蝇蛆中可提取抗菌谱广、杀菌能力强的抗菌物质(一般为多肽类物质),且该类抗菌物质普遍存在耐高温的特性^[5]。Ai等^[6-7]相继发现蝇蛆富含的蛋白质组分显示出优异的肝保护活性、禽流感病毒 H9N2 等病毒的抗病毒性、DPPH 自由基与超氧阴离子自由基清除活性及免疫调节功能。Zhang等^[8]发现家蝇幼虫蛋白水解物具有较高的综合抗氧化活性。

当机体受到有害刺激时,会产生过多活性氧(Reactive oxygen species, ROS)使机体内氧化与抗氧化系统失衡,发生脂质过氧化等反应导致机体氧化损伤,其中细胞膜系统将首先受到活性氧的攻击。而研究表明,活性氧堆积及引发的一系列反应是衰老及许多疾病的诱发因素^[9-12]。目前,用于抵御脂质过氧化等氧化损伤反应所需抗氧化剂包括化学合成抗氧化剂^[13]及天然抗氧化剂^[14],但前者存在潜在的毒性作用,而后者在生产应用过程中会因高温等不良环境导致活力丧失,故开发兼具耐高温特性的天然抗氧化剂有重要意义,其中抗氧化肽因其微量高效等特点,成为天然抗氧化剂的研究热点。

基于抗氧化肽等天然抗氧化产品在生产应用中存在的活性成分不稳定现状及蝇的环境适应性特点,本研究对蝇蛆蛋白进行高温处理及体外抗氧化能力的综合评价,筛选具有较高温度耐受性的抗氧化蛋白,探究其对 H₂O₂ 诱导损伤的 H9c2 细胞的保护作用,进一步探讨蝇蛆耐高温蛋白抗氧化活性效应,为优质蛋白资源开发及其在食品、保健品产业及饲料业和养殖业的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

家蝇(*Musca domestica*)幼虫,由广州市小卫生物技术有限公司提供,为经冷冻保存的 3 龄虫。NBT,上海麦克林生化科技有限公司;TPTZ,阿拉丁试剂股份有限公司;H9c2 细胞,中山大学惠赠;Cell Counting Kit-8、LDH、BCA、SOD、CAT、GSH 试剂盒,购于碧云天生物技术研究所;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

Bio-Rad 蛋白电泳系统(配有 PowerPac 通用电泳仪电源和 mini-PROTEAN Tetra 手灌胶系统),美国 Bio-Rad 公司;Gel Doc XR+ 全自动凝胶成像系

统,美国 Bio-Rad 公司;FreeZone 6 L 立式冻干机,美国 Labconco 公司;infinite 200Pro 酶标仪,瑞士 Tecan 公司;Agilent 1220 Infinity 高效液相色谱仪(配有紫外检测器和 OpenLAB CDS ChemStation 色谱工作站),美国 Agilent 公司;CKX41 倒置显微镜,日本 Olympus 公司;HERAcell150i CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品高温处理及蛋白质含量测定

家蝇幼虫与去离子水以 1:10 的比例研磨 2 min,静置 5 min 并用 8 层纱布过滤,4℃、12 000 r/min 高速离心 30 min,去除上层油脂及沉淀,留清液。取等量清液分别进行 60、80、100℃ 加热处理,前 30 min 每 5 min 取 1 次样,共处理 1 h。处理后样品经 4℃、12 000 r/min 高速离心 10 min,取上清液作为蝇蛆蛋白提取液备用。参考 Grintzalis 等^[15]的方法,采用考马斯亮蓝法检测蝇蛆样液蛋白质含量,检测波长 595 nm。

1.2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

对 Wu 等^[16]的方法作适当修改。采用 10% 的分离胶和 4% 的浓缩胶及考马斯亮蓝(R-250)染色,Bio-Rad 凝胶成像系统观察,检测样品的蛋白质分布。

1.2.3 体外抗氧化能力测定

1.2.3.1 羟自由基清除能力

参考农石生等^[17]水杨酸法测定羟自由基清除能力。取适当稀释样品与 2 mmol/L FeSO₄ 溶液、2 mmol/L 水杨酸醇溶液、0.3% H₂O₂ 混合,于 37℃ 水浴反应 1 h。以 50% 乙醇为参比,510 nm 下测吸光值。

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

式中:A₀为对照组吸光值;A₁为样品组吸光值;A₂为不含 H₂O₂ 的样品本底吸光值。

1.2.3.2 超氧阴离子自由基清除能力

参考 Pandey 等^[18] NBT 法测定超氧阴离子自由基清除能力。样品按梯度稀释,与 13 mmol/L 甲硫氨酸、63 μmol/L NBT、1.3 μmol/L 核黄素、0.1 mmol/L EDTA-2Na(溶液均以 pH 7.8、0.05 mol/L 磷酸缓冲液配制)混合。光照 15 min,设置空白对照与暗对照,测定样品吸光值,检测波长 560 nm。其中加样量控制在 A_{样品} 为 A_{空白} 的一半左右。

超氧阴离子自由基清除活力 =

$$\frac{(A_{\text{空白}} - A_{\text{黑暗}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{黑暗}})}{(A_{\text{空白}} - A_{\text{黑暗}}) \times V_{\text{加样}} \times W_{\text{鲜重}}} \times 2 \times V_{\text{总}}$$

式中: $A_{\text{空白}}$ 为不加样品(空白对照)吸光值; $A_{\text{黑暗}}$ 为不光照不加样品(暗对照)吸光值; $A_{\text{样品}}$ 为样品吸光值; $V_{\text{加样}}$ 为检测时加样体积,mL; $V_{\text{总}}$ 为样液总体积,mL; $W_{\text{鲜重}}$ 为样品鲜重,g。

1.2.3.3 还原力

参照 Benzie 等^[19] FRAP 法测定样品还原力。根据标准曲线,还原力以达到相同吸光值对应的 FeSO_4 毫摩尔数表示。

1.2.4 疏水性分析

参照贡雯玉等^[20]方法作适当修改,采用反相液相色谱法(RP-HPLC)分析样品的疏水性。色谱条件:Agilent 1220 Infinity 高效液相色谱仪,RGL8565 C_{18} 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为 10% 甲醇溶液,流速 0.8 mL/min,检测波长 254 nm,进样量 10 μL ,柱温(35 ± 0.8)°C。

1.2.5 H_2O_2 诱导 H9c2 细胞损伤模型的建立

H9c2 细胞用含 10% 牛血清的 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO_2 条件下培养,待细胞长至 80% ~ 90% 时,加入胰蛋白酶消化。将 H9c2 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,培养 24 h 后分为 6 组,对照组不作处理,实验组分别给予由 DMEM 培养液配制的 200、400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理,每组 5 个复孔,分别作用 8、12、24 h 后,弃培养液,用 CCK-8 法检测细胞存活率(测定条件为加 CCK 后孵育 2 h,用酶标仪检测 450 nm 处的吸光值)。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{处理}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

式中: $A_{\text{处理}}$ 为含有细胞、CCK 溶液和药物溶液的孔的吸光值; $A_{\text{对照}}$ 为含有细胞、CCK 溶液的孔的吸光值; $A_{\text{空白}}$ 为含有培养基和 CCK 溶液的孔的吸光值。

1.2.6 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H9c2 细胞的毒性测定

将 H9c2 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,分成 5 组,对照组加入含 10% 牛血清的 DMEM 培养液,实验组分别给予由 DMEM 培养液配制的 0.5、1、2、4 mg/mL 的蝇蛆耐高温抗氧化蛋白处理,每组 5 个复孔,分别作用 8、12、24 h 后,弃培养液,用 CCK-8 法检测细胞存活率。

1.2.7 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞氧化应激损伤的保护作用

将 H9c2 细胞接种于 96 孔板中,设置对照组、 H_2O_2 损伤模型组和给药组,对照组不作处理, H_2O_2 损伤模型组给予 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 8 h,给药组分别用 0.5、1、2、4 mg/mL 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白预孵 12、24 h 后,换入 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 8

h,用 CCK-8 法检测细胞存活率。

1.2.8 细胞形态观察

H9c2 细胞以 1×10^5 个/mL 培养于 6 孔板中并按 1.2.6 及 1.2.7 条件进行处理,在倒置显微镜下(×100)观察细胞形态,并用其配备的专用数码相机拍摄正常对照组、损伤模型组、给药组的典型细胞形态。

1.2.9 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞胞外 LDH 及胞内氧化还原酶系的影响

细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,按 1.2.7 条件进行处理。收集细胞上清液检测乳酸脱氢酶(LDH)含量。此后,收集各组细胞,用细胞裂解液(Cell Lysis Buffer-10X)处理细胞,离心并取上清液(离心条件:13 200 r/min,4 °C,6 min),检测蛋白质含量(BCA 法)及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活力与还原型谷胱甘肽(GSH)含量。LDH 含量、蛋白质含量及各氧化还原酶系的检测按试剂盒说明书操作。

1.2.10 数据分析

实验重复 3 次,用 Excel2007 对数据进行处理,结果以“平均值 ± 标准差”表示。采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析及 LSD 多重比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 蝇蛆耐高温蛋白筛选

图 1、图 2 分别为不同温度处理的蝇蛆蛋白提取液蛋白质含量变化及 SDS-PAGE 分析结果。由图 1、图 2 可见:未经高温处理的样品蛋白质相对分子质量主要集中在 80 ~ 90 kDa;60 °C 处理的样品蛋白质含量略有下降,且主要集中在 30 ~ 40 kDa,而处理时间对样品蛋白质含量影响不显著($P > 0.05$);80 °C 处理 20 min 及 100 °C 处理 5 min 样品中蛋白质含量明显下降($P < 0.05$),且在 40 kDa 及 20 kDa 附近得到清晰条带。表明 80 °C 以上高温加热能有效除去样品中不耐热蛋白,实现蛋白样品的初步纯化,而 100 °C 处理用时更短,纯化效果更佳。

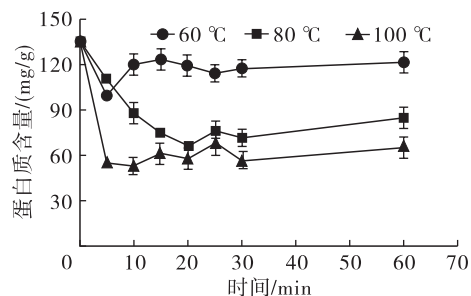
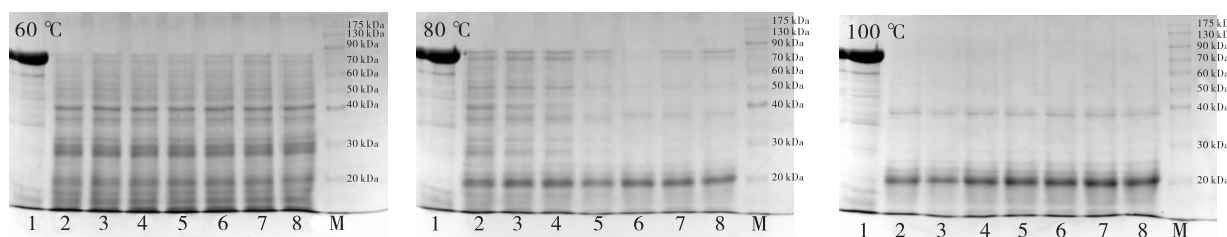


图 1 60、80、100 °C 处理的蝇蛆蛋白提取液蛋白质含量变化



注:泳道1~8表示各温度下处理0、5、10、15、20、25、30、60 min的样品;M为标准蛋白。

图2 60、80、100 °C处理的蝇蛆蛋白提取液的SDS-PAGE结果

2.2 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白的筛选

对不同温度处理的蝇蛆蛋白提取液进行抗氧化能力测定,结果见图3。由图3可见,60 °C处理仅对蝇蛆蛋白提取液还原力有显著降低作用($P < 0.05$),而80 °C和100 °C处理对蝇蛆蛋白提取液的还原力及超氧阴离子自由基清除能力均有显著降低作用($P < 0.05$),其中超氧阴离子自由基清除能力在100 °C处理20 min后趋于稳定。此外,不同温度处理不同时间对蝇蛆蛋白提取液羟自由基清除能力无显著影响($P > 0.05$),清除率基本可达到70%,说明蝇蛆中可能存在清除羟自由基的有效成分,且该成分具有良好的热稳定性。结合图1、图2结果,证

明蝇蛆耐高温蛋白具有超氧阴离子自由基、羟自由基清除能力及还原力,初步推测其抗氧化能力可能与40 kDa及约20 kDa的蛋白有关,且该范围内的蛋白质在80~100 °C高温下仍能保持生物活性。蝇蛆蛋白的抗氧化性在前人研究^[21-22]中已得到验证,而本研究发现蝇蛆耐高温蛋白在多种体外抗氧化系统中也具有较好的生物活性,有望成为良好的耐高温抗氧化功能蛋白的来源。从作用效果等角度考虑,确定筛选耐高温抗氧化蛋白的优化条件为100 °C处理20 min,对此条件下的蝇蛆蛋白提取液进行冷冻干燥处理,得到蝇蛆耐高温抗氧化蛋白冻干粉。

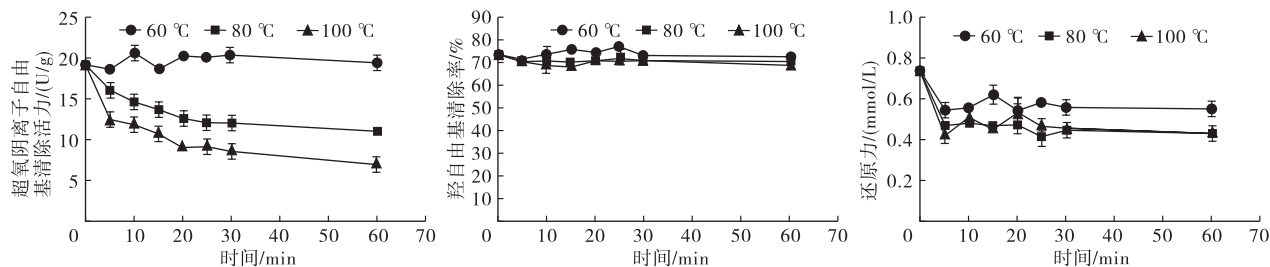
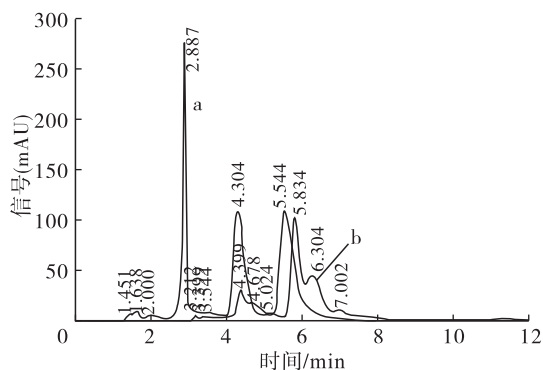


图3 60、80、100 °C处理的蝇蛆蛋白提取液的抗氧化活性

2.3 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白的疏水性

根据1.2.4,对未经高温加热处理以及100 °C处理20 min的蝇蛆蛋白提取液进行疏水性分析,结果见图4。



注:a、b分别为未经高温加热处理样品与100 °C高温处理20 min的样品。

图4 蝇蛆蛋白提取液反相液相色谱图

由图4可见,未经高温加热处理的样品出现3

个清晰主峰,峰1、2、3保留时间分别为2.887、4.304、5.544 min,其中峰3的峰面积大于峰1、2,占总峰面积的41.7%。100 °C处理20 min的蝇蛆蛋白提取液在3 min以前基本无明显出峰,在4~7 min范围内出现3个明显峰,峰间有重叠。与未进行高温加热处理的样品相比,总峰面积下降约50%,出峰时间略有后移。说明经高温加热处理后,蝇蛆蛋白提取液中疏水性相对较弱的蛋白量大幅下降,疏水性相对较强的蛋白被较好地保留下来,推测耐高温蛋白具有较好的疏水性,该结果与杨楠等^[23]研究结果相符。

2.4 H₂O₂诱导H9c2细胞损伤模型

H₂O₂处理可导致细胞氧化应激损伤,高浓度H₂O₂甚至引起细胞凋亡,因而H₂O₂常被用于细胞氧化损伤模型的构建^[24]。通过探讨H₂O₂浓度及处理时间对H9c2细胞存活率的影响,构建H₂O₂氧化损伤模型,结果如图5所示。由图5可见:

H9c2 存活率与 H_2O_2 浓度及处理时间呈一定相关性,相同处理时间下,随着 H_2O_2 浓度增加,细胞存活率下降($P < 0.05$);而相同 H_2O_2 浓度下,随着处理时间的延长,H9c2 存活率出现不同程度下降($P < 0.05$);400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 12 h 或 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 8 h,H9c2 存活率均达到 50% 左右,与对照组差异显著($P < 0.05$),符合 H_2O_2 诱导细胞损伤模型的建立条件。综合时间、效率等因素考虑,选取 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 8 h 为建模条件用于后续研究。

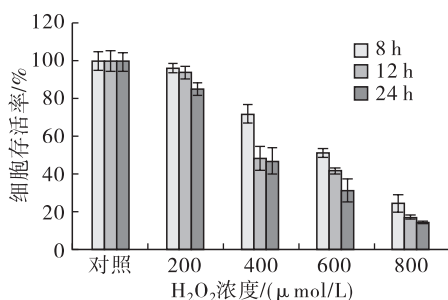


图5 H_2O_2 浓度及处理时间对 H9c2 细胞存活率的影响

2.5 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H9c2 细胞的毒性分析

蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H9c2 细胞存活率的影响如图 6 所示。由图 6 可见,蝇蛆耐高温抗氧化蛋白质量浓度在 0.5 ~ 4 mg/mL 范围内,分别处理 H9c2 细胞 8、12、24 h,各处理时间下 H9c2 细胞存活率与对照组无显著差异($P > 0.05$)。此外,该蛋白未见明显剂量依赖性($P > 0.05$),不同处理时间 H9c2 细胞存活率间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H9c2 细胞无明显毒性作用。

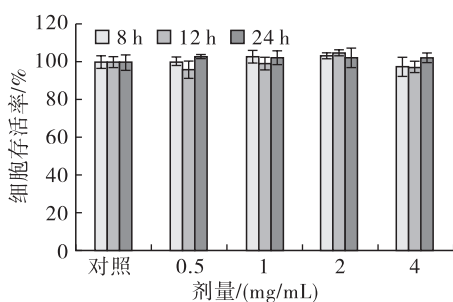
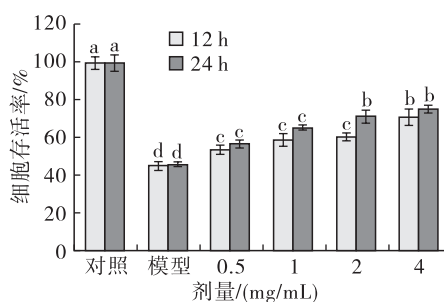


图6 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白剂量及处理时间对 H9c2 细胞存活率的影响

2.6 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞氧化应激损伤的保护作用

蝇蛆耐高温抗氧化蛋白预孵育 12、24 h 后,600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 8 h,CCK-8 法测定细胞存活率,结果如图 7 所示。由图 7 可见,与正常对照组相比, H_2O_2 模型组 H9c2 细胞存活率下降至约 46% ($P <$

0.05),而经过不同质量浓度的蝇蛆耐高温抗氧化蛋白 12、24 h 预孵育后,H9c2 细胞存活率明显提高,最大可提高约 39% ($P < 0.05$),并显示出一定范围内的剂量依赖性。相对于 12 h 预孵育,24 h 预孵育能显著提高细胞存活率($P < 0.05$)。推测蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H9c2 细胞有明显保护作用,并确定 24 h 为较佳预孵育时间。

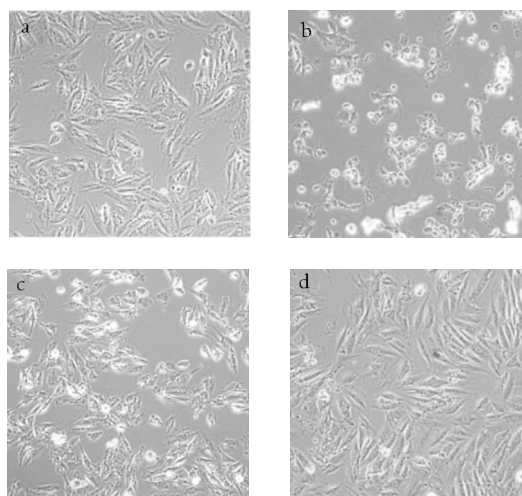


注:同一预孵时间不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。

图7 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H9c2 细胞的保护作用

2.7 细胞形态

不同处理条件对 H9c2 细胞形态的影响如图 8 所示。



注:a.对照组;b.600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 损伤 8 h;c.4 mg/mL 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白保护 24 h 后 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 损伤 8 h;d.4 mg/mL 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白保护 24 h。

图8 不同处理对 H9c2 细胞形态的影响($\times 100$)

由图 8a 可见,细胞呈长梭形,贴壁紧密,生长状况良好。由图 8b 可见,600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 8 h 后,细胞数量减少,形态出现较大改变,细胞皱缩呈现圆形,且堆积成团,显微镜下观察发现大量细胞漂浮,说明该条件下 H_2O_2 处理对 H9c2 细胞具有明显氧化损伤作用,细胞膜结构被破坏,细胞形态发生较大改变。由图 8c 可见,蝇蛆耐高温抗氧化蛋白保护 24 h 后, H_2O_2 处理对 H9c2 细胞的损伤程度明显降低,部分细胞因损伤而皱缩呈圆形,但大部分细胞呈

长梭形,贴壁情况较好,表明蝇蛆耐高温抗氧化蛋白在一定程度上能保护 H9c2 细胞,降低 H_2O_2 对其造成的氧化损伤。由图 8d 可见,4 mg/mL 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白保护 24 h 后,细胞分布均匀,形态正常,呈长梭形,贴壁紧密,未见明显损伤。0.5 ~ 2 mg/mL 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白处理后 H9c2 细胞形态与 4 mg/mL 蛋白处理结果相似,表明在一定质量浓度范围内,蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H9c2 细胞无明显毒害作用。H9c2 细胞形态变化与细胞存活率结果基本吻合。

2.8 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞胞外 LDH 及胞内氧化还原酶系的影响

乳酸脱氢酶(LDH)是一种胞内酶,细胞损伤或凋亡会导致细胞膜破裂,胞内 LDH 释放到培养液中,检测给药前后培养液中 LDH 含量,可评估蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H9c2 细胞膜的保护作用,LDH 释放可作为细胞膜完整性的重要指标。超氧化物歧化酶(SOD)可清除细胞内产生的超氧化物阴离子,其活力高低可反映细胞抵抗氧化损伤的能力;过氧化氢酶(CAT)是体内清除过氧化氢,降低其导致的机体氧化损伤的重要抗氧化酶;而谷胱甘肽过氧化物酶可通过还原型谷胱甘肽(GSH)清除机体

中的过氧化氢及脂类过氧化物,有效阻止活性氧自由基对机体的氧化损伤。蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞的 LDH 释放及胞内氧化还原酶系的影响见表 1。由表 1 可见, H_2O_2 损伤模型组细胞中 LDH 含量显著提高($P < 0.05$),而 SOD 活力、CAT 活力及 GSH 含量显著下降($P < 0.05$),表明 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 8 h 可导致 H9c2 细胞发生氧化损伤,大量 LDH 释放到培养液中,胞内氧化还原酶系受到破坏;而蝇蛆耐高温抗氧化蛋白预处理后,与 H_2O_2 损伤模型组相比,细胞培养液中的 LDH 含量显著降低($P < 0.05$),细胞中的 SOD 活力、CAT 活力及 GSH 含量显著提高($P < 0.05$),表明蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H9c2 细胞有一定保护作用,可有效降低 H_2O_2 对细胞膜系统及胞内氧化还原酶系造成的氧化损伤,可减少细胞膜破裂,降低 LDH 释放。此外,该样品在一定范围内存在剂量依赖性,4 mg/mL 给药处理后 LDH 释放量出现较明显降低(降低 24%),SOD 活力、CAT 活力及 GSH 含量均高于 0.5 ~ 2 mg/mL 的给药处理。此结果与赵春江等^[25]的结果相似,证明蝇蛆耐高温抗氧化蛋白具有较好的抗氧化活性。

表 1 蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H9c2 细胞的 LDH 释放及胞内氧化还原酶系的影响

组别	LDH 含量/ (U/L)	SOD 活力/ (U/mg)	CAT 活力/ (U/(min · mg))	GSH 含量/ (mU/(min · mg))
对照组	137.75 ± 4.34 ^d	13.03 ± 0.17 ^a	38.40 ± 0.30 ^a	46.60 ± 1.28 ^a
模型组	420.49 ± 7.41 ^a	6.65 ± 0.25 ^c	18.12 ± 0.27 ^c	20.38 ± 0.53 ^d
蛋白组				
0.5 mg/mL	355.14 ± 7.18 ^b	7.82 ± 0.19 ^d	23.10 ± 1.13 ^d	27.36 ± 0.53 ^c
1 mg/mL	348.98 ± 5.70 ^b	8.09 ± 0.36 ^c	24.94 ± 0.28 ^c	30.27 ± 2.56 ^c
2 mg/mL	321.05 ± 6.49 ^c	9.67 ± 0.14 ^b	25.06 ± 0.53 ^c	32.90 ± 1.81 ^b
4 mg/mL	318.44 ± 5.26 ^c	9.84 ± 0.26 ^b	27.37 ± 0.47 ^b	35.86 ± 0.21 ^b

注:同列不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。

3 结论

通过加热法从蝇蛆中获得了热稳定性蛋白,在 100 °C 处理 20 min 的条件下,对体外抗氧化能力综合评价发现所得蝇蛆耐高温抗氧化蛋白具有良好的超氧阴离子自由基、羟自由基清除能力和还原力。对细胞存活率、LDH 释放及 SOD 活力、CAT 活力、GSH 含量等与细胞抗氧化酶系相关指标的检测证明,获得的蝇蛆耐高温抗氧化蛋白对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞有保护作用,且在一定范围内存在剂量依赖性。提示蝇蛆耐高温抗氧化蛋白可提高细胞抗氧化系统相关酶活力,降低活性氧自由基对细胞

造成的氧化损伤。

参考文献:

- [1] 白钢,张翼翔. 蝇蛆营养成分的测定与评价[J]. 包头医学院学报, 2010, 26(1): 10-11,13.
- [2] 国洪旭. 蝇蛆油脂、蛋白粉和甲壳素的制备工艺研究[D]. 昆明:昆明理工大学, 2016.
- [3] 韩跃东,张超,张松,等. 蝇蛆油促进大鼠皮肤机械损伤愈合作用及机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(14): 2641-2646.
- [4] 陈倩文,蔡子哲,汪勇,等. 家蝇蛆油脂的 GC-MS 分析及合成生物柴油的研究[J]. 可再生能源, 2014, 32(5): 709-714.

- [5] KIYOSHI K, MINAKO A. Properties of induced antimicrobial activity in *Musca domestica* larvae [J]. Drug Discov Ther, 2017, 11(3): 156-160.
- [6] AI H, WANG F, LEI C. Antioxidant activities of protein-enriched fraction from the larvae of housefly, *Musca domestica* [J]. Nat Prod Res, 2008, 22(6): 507-515.
- [7] AI H, WANG F, ZHANG N, et al. Antiviral, immunomodulatory, and free radical scavenging activities of a protein-enriched fraction from the larvae of the housefly, *Musca domestica* [J]. J Insect Sci, 2013, 13(1): 1-16.
- [8] ZHANG H, WANG P, ZHANG A J, et al. Antioxidant activities of protein hydrolysates obtained from the housefly larvae [J]. Acta Biol Hung, 2016, 67(3): 236-246.
- [9] ILARIA L, GENNARO R, FRANCESCO C, et al. Oxidative stress, aging, and diseases [J]. Clin Interv Aging, 2018, 13: 757-772.
- [10] FÖRSTERMANN U, XIA N, LI H. Vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2017, 120(4): 713-735.
- [11] RAMANA K V, SRIVASTAVA S, SINGHAL S S. Lipid peroxidation products in human health and disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2014(4): 1-3.
- [12] MONTINE T J, NEELY M D, QUINN J F, et al. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(5): 620-626.
- [13] 孔辉. 阿托伐他汀对老年缺血性脑卒中患者氧化应激及脂质过氧化的影响 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2018, 21(14): 1605-1608.
- [14] 黄蕾, 刘新国, 杨全伟, 等. 洋参抗衰合剂对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 药学研究, 2018, 37(12): 690-693.
- [15] GRINTZALIS K, GEORGIU C D, SCHNEIDER Y J. An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination [J]. Anal Biochem, 2015, 480: 28-30.
- [16] WU S H, WU X M, ZHANG C, et al. Exploration on separation of *Periplaneta americana* small peptides with Tricine-SDS-PAGE system [J]. Agric Biotechnol, 2012, 132(2): 14-16.
- [17] 农石生, 龚子龙, 周金花, 等. 板蓝根抗氧化成分及抗氧化性能研究 [J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(3): 14-16.
- [18] PANDEY V K, GOPAL R. Nickel toxicity effects on growth and metabolism of eggplant [J]. Int J Veg Sci, 2010, 16(4): 351-360.
- [19] BENZIE I F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. Anal Biochem, 1996, 239(1): 70-76.
- [20] 贡雯玉, 卞欢, 吴海虹, 等. 高效液相色谱法检测鲫鱼不同组织中的胶原蛋白含量 [J]. 食品科学, 2015, 36(14): 65-69.
- [21] WANG J, WANG Y, DANG X, et al. Housefly larvae hydrolysate: orthogonal optimization of hydrolysis, antioxidant activity, amino acid composition and functional properties [J/OL]. BMC Res Notes, 2013, 6(1): 197 [2019-04-26]. <http://link.springer.com/article/10.1186/1756-0500-6-197>.
- [22] 王芙蓉, 黄文, 王艳丽, 等. 家蝇幼虫活性蛋白组分的提取及清除羟自由基活性研究 [J]. 应用昆虫学报, 2005, 42(5): 546-549.
- [23] 杨楠, 梁琪, 杨敏, 等. 牦牛脱脂乳中酪蛋白受热处理温度及时间影响的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 121-125.
- [24] LI P, LIU Z, XIE Y, et al. Serum exosomes attenuate H_2O_2 -induced apoptosis in rat H9c2 cardiomyocytes via ERK1/2 [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2018, 12(1): 37-44.
- [25] 赵春江, 魏洪, 夏冰天, 等. 蝇蛆肽对衰老小鼠的抗氧化作用 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(5): 1209-1212.

告
读
者

为了更好地服务于广大读者,《中国油脂》杂志社常年办理《中国油脂》逾期补订和过刊订阅业务;常年办理油脂专业书籍邮购业务,书目、代号、价格请查阅近期《中国油脂》杂志社专业书籍征订广告。

订阅、邮购地址:西安市劳动路118号,《中国油脂》杂志社读者服务部
邮编:710082 电话:029-88631255 联系人:潘亚萍