

牡蛎蛋白酶解肽制备工艺优化及其对小鼠睾丸间质细胞睾酮分泌和氧化应激的影响

刘璐, 李晶峰, 兰梦, 李冬冰, 张凯月, 王跃龙, 申嘉明, 李春楠, 张辉, 孙佳明

Optimization of the Preparation Process of Oyster Peptide by Enzymatic Hydrolysis and Its Effects on Testosterone Secretion and Oxidative Stress in Mouse Testicular Interstitial Cells

LIU Lu, LI Jingfeng, LAN Meng, LI Dongbing, ZHANG Kaiyue, WANG Yuelong, SHEN Jiaming, LI Chunnan, ZHANG Hui, and SUN Jiaming

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050205>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

牡蛎蛋白酶解多肽降糖及抗氧化活性评价

Evaluation of hypoglycemic and antioxidant activity for peptides from oyster protein

食品工业科技. 2018, 39(3): 28-31 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.03.006>

响应面法优化酸酶结合法水解牡蛎肽工艺

Optimization of Hydrolysis Process of Oyster Peptide by Acid-Enzyme Binding Method Based on Response Surface Methodology

食品工业科技. 2019, 40(17): 167-172 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.17.027>

响应面法优化南极磷虾蛋白酶解物溶解性工艺

Optimization of hydrolysis process on solubility of protein from Antarctic krill(*Euphausia superba*) by response surface methodology

食品工业科技. 2018, 39(5): 151-156 <https://doi.org/>

响应面法优化龙须菜蛋白酶解工艺及酶解液的抗氧化活性

Optimization for enzymatic hydrolysis of Gracilaria lemaneiformis protein and antioxidant activity of its hydrolysate

食品工业科技. 2017(12): 157-163 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.12.029>

响应面法优化复合酶解制备可口革囊星虫胶原蛋白抗氧化肽工艺研究

Optimization of the Preparation of Collagen Antioxidant Peptides from *Phascolosoma esculenta* by Compound Enzymatic Hydrolysis by Response Surface Methodology

食品工业科技. 2021, 42(22): 230-239 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021070183>

响应曲面法优化鸭肫酶解制备抗氧化肽工艺

Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for duck gizzard antioxidant peptide preparation by response surface methodology

食品工业科技. 2017(19): 177-183 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.033>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

刘璐, 李晶峰, 兰梦, 等. 牡蛎蛋白酶解肽制备工艺优化及其对小鼠睾丸间质细胞睾酮分泌和氧化应激的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(9): 168–176. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050205

LIU Lu, LI Jingfeng, LAN Meng, et al. Optimization of the Preparation Process of Oyster Peptide by Enzymatic Hydrolysis and Its Effects on Testosterone Secretion and Oxidative Stress in Mouse Testicular Interstitial Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(9): 168–176. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050205

· 工艺技术 ·

牡蛎蛋白酶解肽制备工艺优化及其对小鼠睾丸间质细胞睾酮分泌和氧化应激的影响

刘 璐¹, 李晶峰², 兰 梦¹, 李冬冰¹, 张凯月¹, 王跃龙¹, 申嘉明¹, 李春楠¹, 张 辉^{1,*}, 孙佳明^{1,*}

(1.长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林长春 130117;

2.长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117)

摘要:为探究牡蛎在药食同源领域的研究与开发,本实验采用响应面法优化牡蛎蛋白酶解肽酶法制备工艺,并研究其对小鼠睾丸间质细胞睾酮分泌和氧化应激的影响。以水解度为考察指标,采用仿生酶解法,在单因素实验的基础上,根据响应面分析法优化牡蛎蛋白酶解肽的制备工艺。同时构建过氧化氢(H_2O_2)诱导的小鼠睾丸间质细胞(TM3)氧化损伤模型,通过细胞存活率、DAPI染色、睾酮(Testosterone, T)分泌量,超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量研究牡蛎蛋白酶解肽对TM3细胞睾酮分泌和氧化应激的影响。结果表明:牡蛎蛋白酶解肽的最佳酶解条件为:料液比1:10 g/mL、胃蛋白酶量为1.1%、酶解时间为1.0 h、胰蛋白酶量为2.1%、酶解时间3.1 h,此条件下的水解度为39.43%±0.42%。牡蛎蛋白酶解肽对 H_2O_2 诱导的TM3细胞均有不同程度的增殖活性,可显著($P<0.05$)增加TM3细胞睾酮分泌量、SOD酶活力和降低($P<0.05$)MDA含量,并且在牡蛎蛋白酶解肽物质量浓度为200 μg/mL时效果最好。综上所述,响应面法优化酶解工艺有效可行,牡蛎蛋白酶解肽可极显著的促进TM3细胞增殖,促进睾酮分泌量,增加SOD酶活力,降低MDA含量($P<0.01$)。

关键词:牡蛎蛋白酶解肽, 响应面优化, 仿生酶解, 睾酮, 氧化应激

中图分类号:TS201.2

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2024)09-0168-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050205

本文网刊:



Optimization of the Preparation Process of Oyster Peptide by Enzymatic Hydrolysis and Its Effects on Testosterone Secretion and Oxidative Stress in Mouse Testicular Interstitial Cells

LIU Lu¹, LI Jingfeng², LAN Meng¹, LI Dongbing¹, ZHANG Kaiyue¹, WANG Yuelong¹, SHEN Jiaming¹, LI Chunnan¹, ZHANG Hui^{1,*}, SUN Jiaming^{1,*}

(1.Jilin Institute of Ginseng Science, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2.College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: In order to explore the research and development of oyster in the field of medicine and food homology, response surface methodology was used to optimize the preparation process of oyster protease-depeptidase, and its effects on testosterone secretion and oxidative stress in mouse leydig cells were studied. Based on the investigation of hydrolysis degree as the evaluation index, a biomimetic enzymatic hydrolysis method was employed to optimize the preparation process of oyster protein enzymolysis peptides using response surface analysis, building upon the foundation of single-factor experiments. Simultaneously, a hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced oxidative damage model was established using

收稿日期: 2023-05-18

基金项目: 国家中医药公益性行业科研专项(201507002-4);吉林省发改委产业技术研究与开发(2022C42-5)。

作者简介: 刘璐(1997-),女,硕士研究生,研究方向:中药及复方药效物质基础和质量标准的研究,E-mail: 15804426590@163.com。

*通信作者: 张辉(1958-),男,本科,教授,研究方向:中药及复方药效物质基础和质量标准的研究,E-mail: zhanghui_8080@163.com。

孙佳明(1976-),男,博士,教授,研究方向:中药及复方药效物质基础和质量标准的研究,E-mail: sun_jiaming2000@163.com。

mouse testicular interstitial cells (TM3), and the effects of oyster protein enzymolysis peptides on testosterone (T) secretion and oxidative stress were investigated through assessments of cell viability, DAPI staining, testosterone secretion level, superoxide dismutase (SOD) activity, and malondialdehyde (MDA) content in TM3 cells. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis conditions for oyster protein enzymolysis peptides were as follows: Substrate-to-solvent ratio of 1:10 g/mL, gastric protease concentration of 1.1%, hydrolysis time of 1.0 h, pancreatic protease concentration of 2.1%, and hydrolysis time of 3.1 h. Under these conditions, the degree of hydrolysis was determined to be 39.43%±0.42%. Oyster protein enzymolysis peptides exhibited varying degrees of proliferative activity on H₂O₂-induced TM3 cells, significantly ($P<0.05$) increasing testosterone secretion, SOD enzyme activity, and reducing MDA levels in TM3 cells. In conclusion, the optimization of enzymatic hydrolysis process using response surface methodology proved to be effective and feasible. Oyster protein enzymolysis peptides was found to extremely significant promote TM3 cell proliferation, increase testosterone secretion, enhance SOD enzyme activity, and reduce MDA levels ($P<0.01$).

Key words: oyster protein enzymolysis peptides; response surface optimization; biomimetic enzymolysis; testosterone; oxidative stress

牡蛎为牡蛎科动物长牡蛎(*Ostrea gigas* Thunberg)、大连湾牡蛎(*Ostrea talienwhanensis* Crosse)或近江牡蛎(*Ostrea rivularis* Gould)的贝壳,素有“海洋牛奶”的美誉,富含丰富的蛋白质、多糖、牛磺酸等物质^[1],其中牡蛎蛋白是牡蛎最重要的营养来源^[2]。牡蛎壳约占牡蛎总重量的60%^[3-4],虽其主要成分为碳酸钙,但其棱柱层中富含丰富的蛋白质^[5-6]。我国每年会产生数以万计的牡蛎壳废料^[7],不仅会对自然环境产生影响,同时也会对自然资源造成浪费,因此针对牡蛎壳的再利用迫在眉睫。

牡蛎补肾益精的功效在多本医术中均有记载,《名医别录》中记载牡蛎能“疗泻精”,《本草经疏》指出牡蛎能“敛涩精气”,《海药本草》指出牡蛎“主男子遗精”。Zhang等^[8]研究发现牡蛎肉提取物可提高雷公藤内酯(TP)诱导的小鼠睾丸损伤模型的精子数量和活力,降低丙二醛(MDA)水平,增加抗氧化酶(SOD和GSH-Px)活性,对睾丸损伤具有保护作用。叶贤英^[9]研究发现近江牡蛎多糖能通过调节细胞自噬显著改善氧化应激引起的细胞损伤。

生物活性肽是指具有丰富生物学活性的肽类化合物。近年来,通过生物活性肽开发为高附加值食品在世界范围内越来越受到关注。常见的提取生物活性肽的方法有化学提取法、酶解法、微生物提取法^[10-11]等,其中化学提取法水解条件难以控制,蛋白质易变性^[12];微生物提取法的代谢过程复杂,产物难以控制^[13];而酶解法条件温和、安全性高,酶解反应没有副反应且不会降低蛋白质的营养价值而被广泛应用。Liao等^[14]通过木瓜蛋白酶水解得到了中华鳖甲壳肽,且对血管紧张素I转换酶的抑制活性较强。王振杰^[15]采用响应法优化杂色蛤多肽的酶法制备工艺,得到的酶解肽具有较强的抗氧化活性。

因此,本实验选用模拟消化道酸碱环境的两种酶即胃蛋白酶和胰蛋白酶进行仿生酶解,以期模拟蛋白质大分子在人体消化过程,通过单因素实验和响应面优化试验确定最佳酶解条件,制备牡蛎蛋白酶解肽,并探究其对小鼠睾丸间质细胞睾酮分泌和氧化应

激的影响,为牡蛎蛋白酶解肽的合理开发和牡蛎资源的合理利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牡蛎 长春市同鑫海鲜市场;胃蛋白酶(1:3000)、胰蛋白酶(1:250) 百克赛斯生物科技(镇江)有限公司;茚三酮 广州和为医药科技有限公司;牛血清白蛋白、DMEM/F12(1:1)培养基、胎牛血清 美国 Gibco 公司;小鼠睾丸间质细胞 TM3 上海弘顺生物科技有限公司;噻唑蓝(MTT) 上海炎熙生物可以有限公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色液 上海碧云天生物科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO) 陕西养元神生物科技有限公司;小鼠睾酮 ELISA 检测试剂盒、SOD、MDA 测定试剂盒 黄石科研生物科技有限公司;其余试剂 均为国产分析纯。

WP-UP-III-40 超纯水机 四川沃特尔科技发展有限公司;85-2A 双数显恒温磁力加热搅拌器 金坛区西城新瑞仪器厂;GIPP-FD-3 冷冻干燥机 上海继谱电子科技有限公司;L-8900 型氨基酸自动分析仪 日本日立公司;C3-6550-01 酶标仪 日本 ASONE 公司;CKX 53 倒置荧光生物显微镜 日本 Olympus 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 牡蛎蛋白的制备 取牡蛎适量,洗净后在通风处阴干,粉碎过20目筛,以料液比1:5 g/mL加入蒸馏水,冷浸法提取12 h,共提取3次,合并提取液^[16],3600 r/min 离心15 min,将上清液在冷冻温度-50 °C 和真空度10~12 Pa条件下真空冷冻干燥,即得牡蛎蛋白冻干粉,备用。

1.2.2 牡蛎蛋白含量测定 参考 Lowry 法测定牡蛎蛋白含量^[17]。标准曲线的建立:精密称取2.0 mg牛血清白蛋白(BSA)于10 mL容量瓶中,加蒸馏水溶解并定容至刻度。分别取标准液0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL于干燥试管中,每管补充蒸馏水至

1.0 mL。分别加入碱性铜试液 1 mL, 摆匀, 加入福林酚试液 4 mL, 立即撆匀, 置 55 ℃ 水浴中反应 5 min, 取出, 置冷水浴中 10 min, 以 0 号管做空白, 测定其在 650 nm 处的吸光度值, 以吸光度为纵坐标, 对照品溶液浓度为横坐标制作标准曲线。

样品测定: 将牡蛎蛋白冻干粉待测样品配制成为质量浓度为 1 mg/mL 溶液, 照标准曲线的制作项下的方法, 测定牡蛎蛋白含量, 从标准曲线中计算供试品中蛋白质的含量。

1.2.3 牡蛎蛋白酶解工艺 为模拟人的消化道环境, 将酶解固定条件设为温度 37 ℃, 胃蛋白酶酶解 pH 为 2.0, 胰蛋白酶酶解 pH 为 8.0^[18]。称取适量牡蛎蛋白冻干粉, 以料液比 1:10 g/mL 加入蒸馏水, 于恒温磁力搅拌器中搅拌, 加入 1.0% 的胃蛋白酶酶解 1.0 h 后加入 2.0% 的胰蛋白酶酶解 3.0 h, 期间加入 1 mol/L NaOH 或 HCl 使溶液维持在酶的最适 pH^[19], 酶解结束后转入 100 ℃ 沸水中灭活 15 min, 以 3600 r/min 离心 15 min, 取其上清液在冷阱温度 -50 ℃ 和真空度 10~12 Pa 条件下真空冷冻干燥, 即得牡蛎蛋白酶解肽冻干粉, 备用。

1.2.4 牡蛎蛋白酶解工艺优化

1.2.4.1 单因素实验 以水解度为指标, 考察酶用量对水解效果的影响。在固定料液比为 1:10 g/mL, 胃蛋白酶酶解时间为 1.0 h, 胰蛋白酶用量为 2.0%、酶解时间为 3.0 h 的基础上, 研究胃蛋白酶量在 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 时对水解度的影响; 在固定料液比为 1:10 g/mL, 胃蛋白酶用量为 1.0%、酶解时间为 1.0 h, 胰蛋白酶酶解时间为 3.0 h 的基础上, 研究胰蛋白酶量 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 对水解度的影响。

考察酶解时间对水解效果的影响。在固定料液比为 1:10 g/mL, 胃蛋白酶用量为 1.0%, 胰蛋白酶用量为 2.0%、酶解时间为 3.0 h 的基础上, 研究胃蛋白酶酶解时间为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 对水解度的影响; 在固定料液比为 1:10 g/mL, 胃蛋白酶用量为 1.0%、酶解时间为 1.0 h, 胰蛋白酶用量为 2.0%, 研究胰蛋白酶酶解时间 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h 对水解度的影响。

考察料液比对水解效果的影响。在固定胃蛋白酶用量为 1.0%、酶解时间为 1.0 h, 胰蛋白酶用量为 2.0%、酶解时间为 3.0 h 的基础上, 研究料液比在 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14 g/mL 时对水解度的影响。

1.2.4.2 响应面试验设计 Box-Behnken 设计(BBD)因其不包含嵌入的因子或分数因子设计, 所以被称为独立的二次设计。在这种设计中, 处理组合位于工艺空间边缘的中点和中心^[20]。根据单因素实验结果选取胰胃蛋白酶量(A), 胃蛋白酶量(B)和胰蛋白酶酶解时间(C)为自变量, 选取水解度(Y)作为响应值, 进行三因素三水平的响应面试验设计, 设计如表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 试验因素与水平

Table 1 Box-Behnken test factors and horizontal

水平	因素		
	A胰蛋白酶量(%)	B胃蛋白酶量(%)	C胰蛋白酶酶解时间(h)
-1	1.5	0.5	2.5
0	2	1	3
-1	2.5	1.5	3.5

1.2.4.3 水解度的测定 参照刘丽红等^[21]等的方法测定水解度, 标准曲线回归方为: $y=1.8327x-0.0163$, $R^2=0.9949$, x 为完全水解液的浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y 为测得的吸光度值。标准曲线可以计算出蛋白质量, 带入下列公式中计算可得到牡蛎蛋白酶解肽的水解度:

$$\text{DH}(\%) = \frac{A \times V_1 \times 100}{(1000 \times W) \times V_2} \times 100$$

其中: A 为通过标准曲线计算得到的待测溶液中的蛋白质量, mg; V_1 水解液的总体积, mL; W 为实验中称取的样品质量, g; V_2 表示所用稀释液的体积, mL。

1.2.5 牡蛎蛋白酶解肽对 TM3 细胞存活率、睾酮分泌及氧化应激水平的影响

1.2.5.1 细胞培养、分组及造模 将冻存的 TM3 细胞在 37 ℃ 的水中快速解冻后离心, 弃去上清液加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12(1:1) 培养液混悬, 混悬后将其转移到培养瓶中, 并补足培养基, 放入细胞培养箱(37 ℃, 含有 5% CO_2)中培养。取对数生长期细胞将其密度稀释为 4×10^3 个/mL 后接种于 96 孔培养板内, 培养 24 h 后将细胞分为空白组、模型组和给药组, 模型组、给药组加入 200 μL 含有 H_2O_2 (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 培养基^[22], PBS 缓冲液作为空白组。

1.2.5.2 MTT 法测定细胞存活率 TM3 细胞按“1.2.5.1”项下培养 4 h 后, 各给药组加入相应浓度的牡蛎蛋白酶解肽(50、100、200、300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每组设置 3 个复孔。培养 24 h 后, 培养板每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT, 4 h 后吸出上清液, 加入 DMSO 150 μL , 振摇 10 min 至结晶物完全溶解, 通过酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔吸光度, 计算细胞存活率, 公式如下:

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

1.2.5.3 DAPI 染色 将细胞密度稀释为 3×10^5 个/mL 后接种于 6 孔培养板内, 培养 24 h, 按照“1.2.5.1”的方法设定空白组、模型组和给药组, 给药组加入相应浓度的牡蛎蛋白酶解肽(50、100、200、300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 培养 48 h 后, 每孔加入 DAPI 染色液 5 μL , 放入培养箱中孵育 20 min, 弃去染色液, PBS 洗涤 2 次, 在荧光显微镜下随机选取视野拍照。

1.2.5.4 牡蛎蛋白酶解肽对睾酮分泌量和氧化应激水平的影响 空白组、模型组、给药组设定方法同“1.2.5.1”。给药组加入相应浓度的牡蛎蛋白酶解肽

(100、200、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 培养 24 h 后, 吸出上清液, 按睾酮、SOD、MDA 试剂盒说明书进行测定。

1.2.6 牡蛎蛋白酶解肽氨基酸组成 取牡蛎蛋白酶解肽冻干粉 10 mg 加入 10 mL 6 mol/L 的 HCl, 置于 130 °C 烘箱中水解 24 h, 得到牡蛎蛋白酶解肽完全水解液, 将水解液蒸干并加水反复蒸干 3 次后溶于 1 mL 0.02 mol/L 的 HCl 中, 于氨基酸自动检测仪中检测氨基酸含量^[23]。

1.3 数据处理

本实验应用 Design Expert 13.0 软件进行响应面设计及结果分析, 采用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行分析及绘图, 应用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析和 *t* 检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 牡蛎蛋白含量测定

标准曲线的回归方程为: $y=2.7972x+0.0228$, $R^2=0.9973$, x 为牛血清白蛋白质量浓度 mg/mL , y 为测得的吸光度值, 计算得牡蛎蛋白冻干粉的蛋白含量为 $11.04\% \pm 0.54\%$ 。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 蛋白酶用量对牡蛎蛋白酶解肽水解度的影响

蛋白酶用量对牡蛎蛋白酶解肽水解度的影响如图 1 所示。当胃蛋白酶量为 1.0%, 胰蛋白酶量为 2.0% 时, 水解程度达到最大, 分别为 34.98%、35.07%。这可能是因为随着酶浓度的增大, 底物与酶接触的概率增加, 使水解度增加。当胃蛋白酶用量>1.0%, 胰蛋白酶用量>2.0% 时, 水解度有下降的趋势。可能因为酶蛋白酶量增加后, 水解速度加快, 产生的小分子肽会和底物竞争与酶结合, 导致牡蛎蛋白与酶作用概率大大减小, 从而水解度降低^[24-25]。当水解度达到最大值时, 继续增加酶用量, 水解度显著降低($P<0.05$)。因此, 使用 0.5%~1.5% 的胃蛋白酶和 1.5%~2.5% 的胰蛋白酶进行后续的响应面试验。

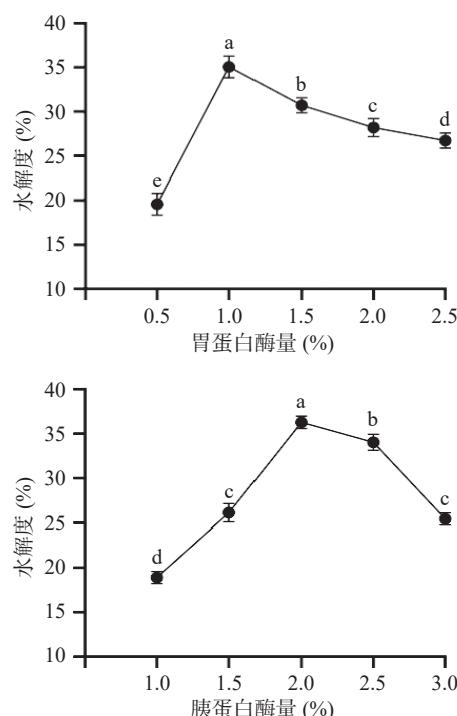


图 1 酶用量对水解度的影响

Fig.1 Effect of enzyme dosage on hydrolysis degree
注: 图中不同字母表示差异显著($P<0.05$); 图 2~图 3 同。

白酶用量>2.0% 时, 水解度有下降的趋势。可能因为酶蛋白酶量增加后, 水解速度加快, 产生的小分子肽会和底物竞争与酶结合, 导致牡蛎蛋白与酶作用概率大大减小, 从而水解度降低^[24-25]。当水解度达到最大值时, 继续增加酶用量, 水解度显著降低($P<0.05$)。因此, 使用 0.5%~1.5% 的胃蛋白酶和 1.5%~2.5% 的胰蛋白酶进行后续的响应面试验。

2.2.2 酶解时间对牡蛎蛋白酶解肽水解度的影响

酶解时间对牡蛎蛋白酶解肽水解度的影响如图 2 所示。当胃蛋白酶酶解时间达到 1.0 h, 胰蛋白酶酶解时间达到 3.0 h 时, 水解程度达到最大, 分别为 35.13%、37.26%, 这可能因为在水解前期随着酶解时间的增加, 底物与酶反应更彻底, 从而水解度增大。当胃蛋白酶酶解时间>1.0 h, 胰蛋白酶酶解时间>3.0 h 时, 水解度有下降趋势, 这可能是因为酶解时间的延长, 酶解反应体系中酶解物浓度增大, 使酶解体系变稠, 不适合酶解反应进行, 使水解度降低^[26]。当胃蛋白酶酶解时间为 1.5 h 时, 水解度与 1.0 h 时相比没有显著性变化($P>0.05$), 当水解度达到最大值时, 继续增加胰蛋白酶酶解时间, 水解度显著降低($P<0.05$)。所以在后续的响应面试验中未选择胃蛋白酶酶解时间作为优化因素, 以胃蛋白酶酶解 1.0 h 作为固定条件, 选择胰蛋白酶酶解 2.5~3.5 h 对牡蛎蛋白酶解肽进行酶解。

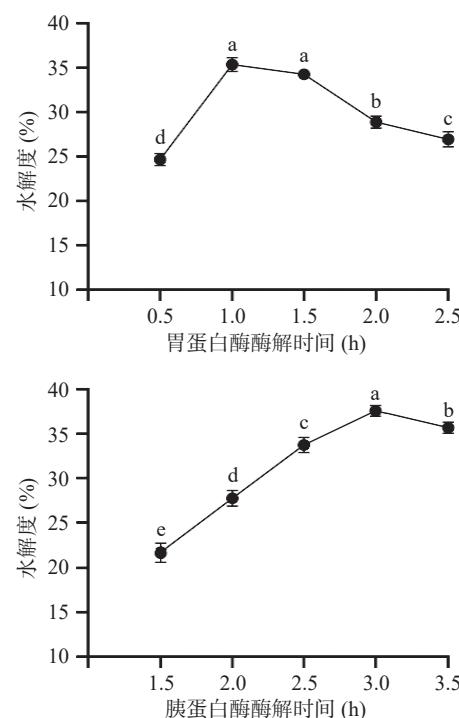


图 2 酶解时间对水解度的影响

Fig.2 Effect of enzymatic hydrolysis time on hydrolysis degree

2.2.3 料液比对牡蛎蛋白酶解肽水解度的影响 料液比对牡蛎蛋白酶解肽水解度的影响如图 3 所示。当料液比达到 1:10 g/mL 时, 水解度达到最大为 34.72%。料液比的变化即是底物浓度的变化, 当底物浓度为 1:6、1:8 g/mL 时, 底物浓度较大, 导致底物与酶接触概率减小, 水解度降低^[27]。

物与蛋白酶之间扩散与运动受到限制^[27-28],使酶解不完全。当底物浓度<1:10 g/mL时,水解度开始降低,这可能是因为此时底物浓度过小导致底物与酶的碰撞机会变少,酶未被完全饱和。当水解度达到最大值时继续改变料液比,水解度显著降低($P<0.05$),但其对水解度的总体趋势较为平缓,故未在后续响应面试验中选择料液比作为优化因素,使用料液比1:10 g/mL作为固定条件。

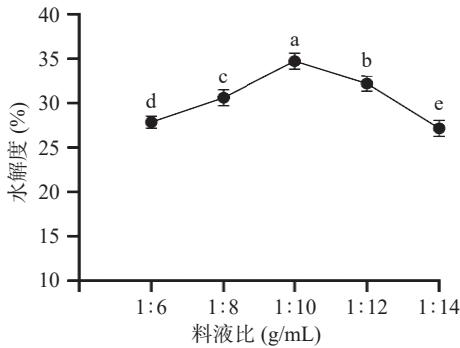


图3 料液比对水解度的影响

Fig.3 Effect of material-liquid ratio on hydrolysis degree

2.3 Box-Behnken 试验优化分析

响应面试验设计及结果见表2。两个因素之间交互作用结果见图4,得到以水解度为目标的(Y)预测值对所选自变量的回归方程: $Y=38.252+2.98125A+4.9875B+1.06375C+0.225AB+0.3925AC+0.785BC-5.58475A^2-10.36725B^2-3.59975C^2$ 。

由表3可知,方程二次多项式回归模型 $P<0.001$,失拟项不显著($P>0.05$),模型的 $R^2=0.9835$,说明该模型可解释 98.35% 的水解度变化, $R^2_{adj}=0.9622$,表明试验结果与模型拟合度好,该模型可用于优化牡蛎

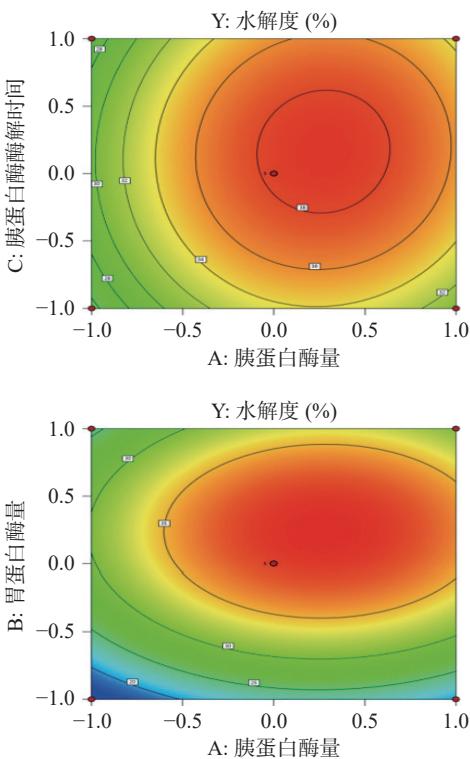
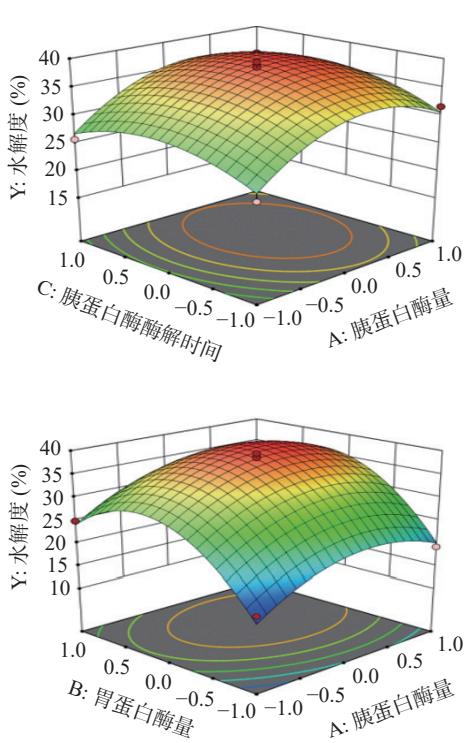
表2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken experimental

试验号	A胰蛋白酶量	B胃蛋白酶量	C胰蛋白酶酶解时间	Y:水解度(%)
1	-1	0	1	25.73
2	1	0	-1	31.62
3	0	0	0	37.03
4	0	1	1	31.31
5	1	-1	0	19.23
6	0	-1	-1	18.83
7	-1	1	0	24.92
8	0	0	0	37.58
9	0	-1	1	19.04
10	1	1	0	28.93
11	-1	-1	0	16.12
12	0	0	0	38.18
13	0	0	0	37.79
14	-1	0	-1	24.04
15	0	1	-1	27.96
16	0	0	0	38.44
17	1	0	1	34.88

的酶解工艺。由 F 值及相应曲面坡度可知各因素的影响大小为 $B>A>C$,即胃蛋白酶用量对牡蛎肽水解度影响最大。通过 P 值可以看出 AC 、 BC 因素交互作用较强。

通过 Design-Expert 13 软件得到了最佳工艺条件优化的组合为料液比 1:10 g/mL, 胃蛋白酶量 1.13%, 酶解时间 1.0 h, 胰蛋白酶量 2.14%, 酶解时间为 3.09 h,在此基础上的水解度预测值为 39.40%。考虑到实验的操作情况选取胰蛋白酶量 2.1%, 胃蛋白酶量 1.1%, 胰蛋白酶酶解时间 3.1 h,验证模型预测的准确性。进行 3 次平行实验,水解度为 $39.43\% \pm 0.42\%$,与预测值无明显差异。综上,采用响应面的方法优化牡蛎仿生酶解工艺是可行的。



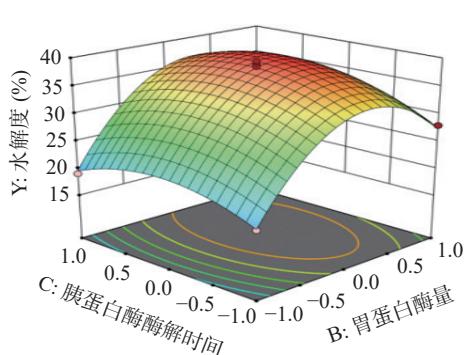


图 4 各因素的交互作用影响
Fig.4 Interaction influence of various factors

表 3 水解度显著性检验及方差分析

Table 3 Significance test and variance analysis of hydrolysis degree

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型项	978.90	9	108.77	46.23	<0.0001	**
A	71.10	1	71.10	30.22	0.0009	**
B	199.00	1	199.00	84.58	<0.0001	**
C	9.05	1	9.05	3.85	0.0906	
AB	0.2025	1	0.2025	0.0861	0.7778	
AC	0.6162	1	0.6162	0.2619	0.6246	
BC	2.46	1	2.46	1.05	0.3401	
A ²	131.32	1	131.32	55.81	0.0001	**
B ²	452.55	1	452.55	192.33	<0.0001	**
C ²	54.56	1	54.56	23.19	0.0019	**
残差	16.47	7	2.35			
失拟项	12.84	3	4.28	4.71	0.0843	不显著
误差项	3.63	4	0.9085			
总和	995.37	16				

注: *表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$; $R^2=0.9835$, $R^2_{adj}=0.9622$ 。

2.4 牡蛎蛋白酶解肽对 TM3 细胞存活率的影响

由图 5 可知, H_2O_2 诱导的 TM3 细胞与空白组细胞相比, 存活率极显著下降($P<0.01$), 表明氧化损伤模型造模成功。与 H_2O_2 模型组相比, 50~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度的牡蛎蛋白酶解肽对 TM3 细胞存活率的影响呈先上升后下降的趋势。当牡蛎蛋白酶解肽的

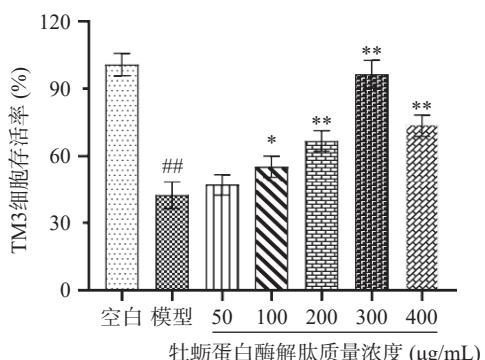


图 5 不同质量浓度牡蛎蛋白酶解肽对 TM3 细胞存活率的影响

Fig.5 Effects of oyster protein enzymolysis peptides with different concentration on the survival rate of TM3 cells

注: 与空白组相比, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$; 与模型组相比, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$; 图 7~图 9 同。

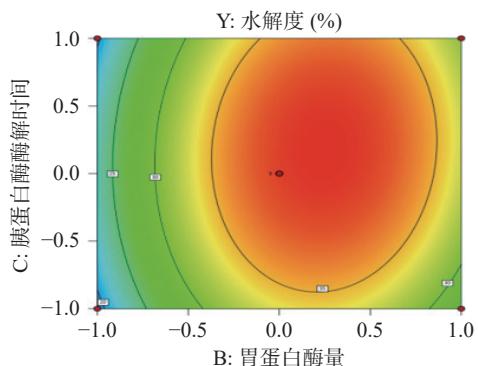


图 4 各因素的交互作用影响

质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 TM3 细胞增殖影响显著($P<0.05$); 当牡蛎蛋白酶解肽的质量浓度为 200~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 TM3 细胞增殖影响极显著($P<0.01$), 且 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度的牡蛎肽对 TM3 细胞存活率最大达 93.25%。随着牡蛎蛋白酶解肽质量浓度的继续增加, 存活率开始下降, 故选择 100~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的牡蛎蛋白酶解肽进行进一步研究。

2.5 DAPI 染色结果

由图 6 可知, 与模型组相比, 不同质量浓度的牡蛎蛋白酶解肽处理过的 TM3 细胞数量发生明显变

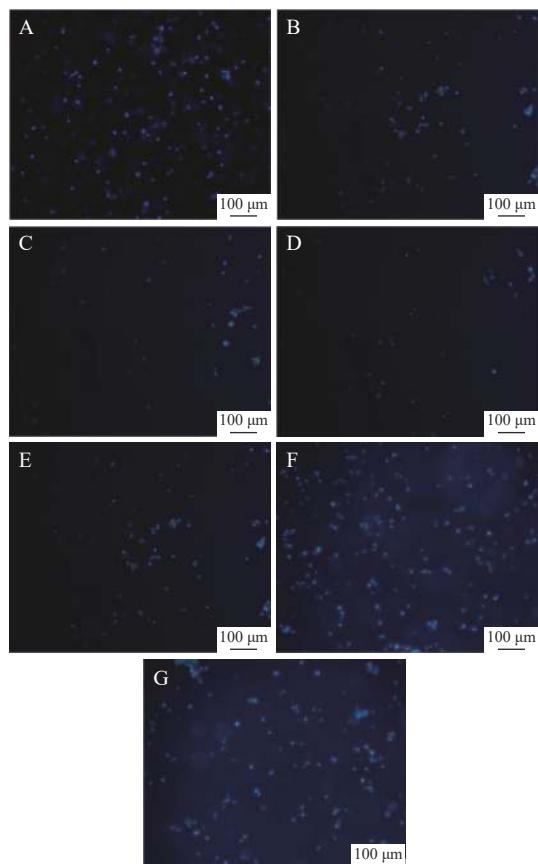


图 6 DAPI 染色观察

Fig.6 DAPI staining observation

注: A: 空白组; B: 模型组; C: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牡蛎蛋白酶解肽; D: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牡蛎蛋白酶解肽; E: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牡蛎蛋白酶解肽; F: 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牡蛎蛋白酶解肽; G: 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牡蛎蛋白酶解肽。

化,质量浓度为300 μg/mL时,细胞数量最多,与细胞存活率的实验结果相一致。

2.6 牡蛎蛋白酶解肽对TM3细胞睾酮分泌量的影响

睾丸间质细胞的主要功能是合成和分泌睾酮,睾酮是促进睾丸和前列腺等男性生殖组织发育以及维持精子发生和第二性征的重要激素,维系着男性正常的生殖功能^[29-30]。由图7可知,与模型组比较,给药24 h后200、300 μg/mL质量浓度的牡蛎蛋白酶解肽极显著增加了TM3细胞的睾酮分泌量($P<0.01$),且质量浓度为200 μg/mL时睾酮分泌量达到最大,为20.43 ng/mL,表明了牡蛎蛋白酶解肽有一定的补肾作用。200 μg/mL的牡蛎蛋白酶解肽睾酮分泌量最多,而细胞存活率的最佳浓度为300 μg/mL,这两者的浓度并不一致,推测牡蛎蛋白酶解肽对TM3细胞的增殖作用可能还伴随着其他物质的分泌来发挥药效。

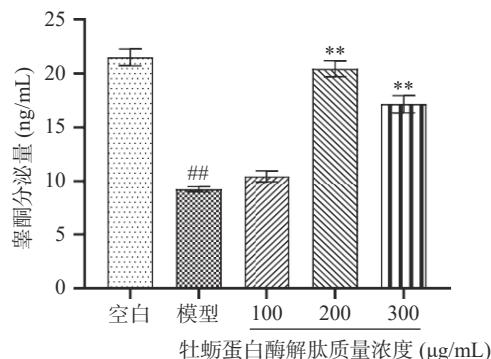


图7 不同质量浓度牡蛎蛋白酶解肽对TM3细胞睾酮分泌量的影响

Fig.7 Effects of oyster protein enzymolysis peptides with different concentration on testosterone secretion in TM3 cells

2.7 牡蛎蛋白酶解肽对TM3细胞SOD酶活力、MDA含量的影响

TM3细胞内发生氧化应激是睾酮水平下降的重要原因,睾酮的分泌需要保证细胞内合适的氧化环境^[31]。超氧化物歧化酶(SOD)可以催化超氧自由基歧化为过氧化氢和氧气,去除细胞中自由基^[32],常表征机体抗氧化水平^[33],SOD酶活力较低代表着严重的氧化应激水平。丙二醛(MDA)是一种机体过氧化的重要最终产物^[34],其含量可有效地反映机体组织中脂质过氧化的强度及速率,已被广泛用于评估氧化应激的水平^[35],高含量的MDA浓度代表着严重的氧化应激水平^[36]。二者常用来评价氧化应激水平。

由图8和图9可知,与模型组相比,200、300 μg/mL牡蛎蛋白酶解肽极显著提高SOD酶活力($P<0.01$),极显著降低MDA含量($P<0.01$),且质量浓度为200 μg/mL时,SOD酶活力最高,为12.85 ng/mL,MDA含量最低,为6.59 nmol/mL,可以认定牡蛎蛋白酶解肽可以平衡细胞内氧化应激水平。调节氧化应激的最佳浓度与细胞存活率最佳浓度不一致,推测牡蛎蛋白酶解肽对TM3细胞的增殖作用不仅仅是

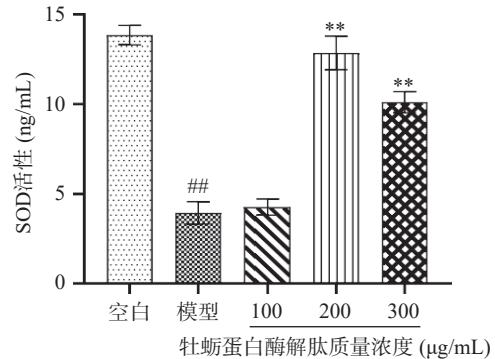


图8 不同质量浓度牡蛎蛋白酶解肽对TM3细胞SOD活性的影响

Fig.8 Effects of oyster protein enzymolysis peptides with different concentration on SOD activity of TM3 cells

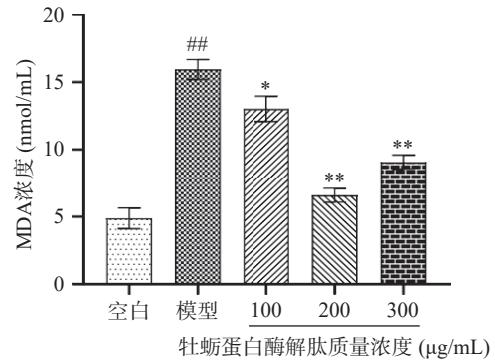


图9 不同质量浓度牡蛎蛋白酶解肽对TM3细胞MDA浓度的影响

Fig.9 Effects of oyster protein enzymolysis peptides with different concentration on MDA concentration in TM3 cells
调节氧化应激这一个途径。

结果表明,牡蛎蛋白酶解肽浓度为200 μg/mL时,睾酮分泌量达到最大值且此时细胞内氧化环境最好。

2.8 牡蛎蛋白酶解肽氨基酸的组成

由表4可知,牡蛎蛋白酶解肽中含有17种氨基

表4 牡蛎蛋白酶解肽氨基酸组成(n=6)

Table 4 Amino acid composition of oyster protein peptides (n=6)

氨基酸种类	氨基酸含量(%)
天冬氨酸(Asp)	1.38±0.32
苏氨酸(Thr)	1.19±0.16
丝氨酸(Ser)	1.26±0.22
谷氨酸(Glu)	3.15±0.17
甘氨酸(Gly)	11.04±0.13
丙氨酸(Ala)	1.03±0.37
半胱氨酸(Cys)	0.87±0.45
缬氨酸(Val)	2.46±0.27
甲硫氨酸(Met)	0.15±0.19
异亮氨酸(Ile)	1.54±0.61
亮氨酸(Leu)	2.26±0.56
酪氨酸(Tyr)	0.04±0.36
苯丙氨酸(Phe)	2.16±0.31
赖氨酸(Lys)	2.85±0.26
组氨酸(His)	1.23±0.33
精氨酸(Arg)	3.87±0.51
脯氨酸(Pro)	1.89±0.36

酸, 其中甘氨酸的含量最高, 精氨酸的含量次之。Liu 等^[37]研究发现甘氨酸减轻了氯化钠诱导的猪睾丸细胞的氧化应激, 细胞凋亡和衰老。初步认为甘氨酸可以防止机体氧化损伤和细胞凋亡。El-Shalofy 等^[38]研究发现肌肉注射精氨酸可以增强热应激公羊中的血浆睾酮和一氧化氮浓度。初步认定精氨酸可以降低脂质过氧化反应的程度并且维持细胞内 ATP 的稳定^[39–40]。研究表明, 赖氨酸、精氨酸、脯氨酸等氨基酸都具有抗氧化活性, 在维持机体内氧化应激水平有着重要作用^[41]。牡蛎蛋白酶解肽中甘氨酸和精氨酸含量较高, 因此能够极显著增加($P<0.01$) TM3 细胞的 SOD 酶活力与睾酮分泌量, 极显著降低($P<0.01$) MDA 含量。

3 结论

本研究以牡蛎壳为原料, 冷浸法提取牡蛎蛋白, 确定最佳酶解工艺为: 温度 37 °C, 料液比 1:10 g/mL, 胃蛋白酶量 1.1%, 酶解时间 1.0 h, pH 2.0, 胰蛋白酶量 2.1%, 酶解时间 3.1 h, pH 8.0, 制备牡蛎蛋白酶解肽, 水解度达最大值为 39.43%±0.42%。同时, 本研究发现 300 μg/mL 质量浓度的牡蛎蛋白酶解肽对 H₂O₂ 诱导的 TM3 细胞表现出较强的增值活性, 200 μg/mL 质量浓度的牡蛎蛋白酶解肽能够极显著的增加睾酮分泌, 增强 SOD 酶活力, 降低 MDA 水平($P<0.01$), 表明牡蛎蛋白酶解肽对促进 TM3 细胞分泌睾酮, 抑制氧化应激反应具有一定作用。综上所述, 本实验为实现废弃牡蛎壳的资源化及牡蛎蛋白酶解肽在食品、保健品领域内的开发提供合理依据。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 施恬, 李东萍. 牡蛎的营养价值及加工利用[J]. 中国水产, 2023(6): 95–96. [SHI T, LI D P. Nutritional value and processing utilization of oysters[J]. Chinese Fisheries, 2023(6): 95–96.]
- [2] 曹苇, 冯娅婷, 谭成玉. 牡蛎蛋白及肽的研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2020, 28(4): 5–8. [CAO W, FENG Y T, TAN C Y. Research progress on oyster protein and peptides[J]. Fine and Specialty Chemicals, 2020, 28(4): 5–8.]
- [3] CHENG S Z, TU M L, CHEN H, et al. Identification and inhibitory activity against α-thrombin of a novel anticoagulant peptide derived from oyster (*Crassostrea gigas*) protein[J]. Food & Function, 2018, 9(12): 6391–6400.
- [4] XING R E, QIN Y K, GUAN X H, et al. Comparison of anti-fungal activities of scallop shell, oyster shell and their pyrolyzed products[J]. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2013, 39(2): 83–90.
- [5] HAO L L, WANG X C, CAO Y R, et al. A comprehensive review of oyster peptides: Preparation, characterisation and bioactivities[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 14(1): 120–138.
- [6] UPADHYAY A, THIYAGARAJAN V, TONG Y. Proteomic characterization of oyster shell organic matrix proteins (OMP)[J]. *Bioinformation*, 2016, 12(5): 266–278.
- [7] 张熙, 肖玲, 宋春霞. 牡蛎壳资源化利用研究进展[J]. *水产养殖*, 2023, 44(1): 14–17. [ZHANG X, XIAO L, SONG C X. Research progress on the utilization of oyster shell resources[J]. *Aquaculture*, 2023, 44(1): 14–17.]
- [8] ZHANG X Y, PENG Z L, ZHENG H N, et al. The potential protective effect and possible mechanism of peptides from oyster (*Crassostrea hongkongensis*) hydrolysate on triptolide-induced testis injury in male mice[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(10): 566–566.
- [9] 叶贤英. 近江牡蛎多糖调节自噬对生殖氧化应激损伤的作用研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021. [YE X Y. Study on the effect of oyster polysaccharide on regulating autophagy on reproductive oxidative stress injury[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2021.]
- [10] 王斌雅, 肖婉玲, 刘春环, 等. 螺旋藻源 ACE 抑制肽的筛选及生物活性研究[J/OL]. 食品与发酵工业: 1–10. [2023-9-18]. doi:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.034617. [WANG Y B, XIAO W L, LIU C H, et al. Screening of ACE inhibitory peptides from *Spirulina* and their biological activities [J/OL]. Food and Fermentation Industry: 1–10 [2023-9-18]. doi:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.034617.]
- [11] 舒思凯. 现代食品工艺在肽制备生产中的应用[J]. 现代食品, 2023, 29(2): 97–99. [SHU S K. Application of modern food technology in peptide preparation and production[J]. Modern Food, 2023, 29(2): 97–99.]
- [12] 李晓杰, 李富强, 朱丽萍, 等. 生物活性肽的制备与鉴定进展[J]. 齐鲁工业大学学报, 2021, 35(1): 23–28. [LI X J, LI F Q, ZHU L P, et al. Advances in the preparation and identification of bioactive peptides[J]. Journal of Qilu University of Technology, 2021, 35(1): 23–28.]
- [13] 王耀冉, 陈明杰, 李治平, 等. 生物活性肽制备、鉴定及其生物活性研究进展[J]. 食品工业, 2021, 42(12): 349–354. [WANG Y R, CHEN M J, LI Z P, et al. Preparation, identification, and research progress on the bioactive peptides[J]. Food Industry, 2021, 42(12): 349–354.]
- [14] LIAO P Y, LAN X D, LIAO D K, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from the enzymatic hydrolysate of carapax trionycis (the shell of the turtle *Pelodiscus sinensis*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(27): 7015–7022.
- [15] 王振杰. 杂色蛤多肽的酶法制备及其抗氧化活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022. [WANG Z J. Enzymatic preparation of polypeptides from mixed-color clam and their antioxidant activity research [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.]
- [16] 郑慧, 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. [ZHENG H, YANG X Q, ZHANG H, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis technology and amino acid content of deer tendon collagen by response surface methodology[J]. Food Industry, 2021, 42(6): 204–208.]
- [17] 贺建华, 鹿麟, 邵纯君, 等. 福林酚法与考马斯亮蓝法测定甘露聚糖肽口服溶液中蛋白质含量的比较[J]. *中国药师*, 2017, 20(10): 1861–1863. [HE J H, LU L, SHAO C J, et al. Comparison of Folin-phenol method and Coomassie brilliant blue method for determining protein content in oral solution of ganlu peptide[J]. *Chinese Pharmacist*, 2017, 20(10): 1861–1863.]
- [18] 刘玉军, 李金华, 孙志强, 等. 基于仿生酶解技术制备牡丹籽油小肽及其抗氧化活性研究[J]. 轻工科技, 2022, 38(2): 42–44.
- [19] LIU Y J, LI J H, SUN Z Q, et al. Preparation of small peptides from peony seed meal based on bionic enzymatic hydrolysis technol-

- ogy and its antioxidant activity[J]. Light Industry Science and Technology, 2022, 38(2): 42–44.]
- [19] GAO X, CHEN Y, ZHOU J, et al. Study on different factors affecting the bionic enzymatic hydrolysis of icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C and eplmedium flavonoids[C]// Professional committee of traditional Chinese medicine and natural medicine of China pharmaceutical society. Abstract of the 14th national symposium on traditional Chinese medicine and natural medicine, 2014: 308–309.
- [20] CHEN S H, CHEN H X, TIAN J G, et al. Enzymolysis-ultrasonic assisted extraction, chemical characteristics and bioactivities of polysaccharides from corn silk[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 332–341.
- [21] 刘丽红, 雷清华. 节三酮比色法与甲醛滴定法测定棉籽粕蛋白水解度的比较[J]. 化学工程与装备, 2012(11): 160–163. [LIU L H, LEI Q H. Comparison between ninhydrin colorimetry and formaldehyde titration in determining the degree of hydrolysis of cottonseed meal protein[J]. Chemical Engineering and Equipment, 2012(11): 160–163.]
- [22] 穆杨, 杨菁. 二甲双胍对 H_2O_2 诱导的 TM3 小鼠睾丸间质细胞氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30(5): 644–648. [MU Y, YANG J. Effects of metformin on oxidative stress and apoptosis of leydig cells in TM3 mice induced by H_2O_2 [J]. Journal of Reproductive Medicine, 2021, 30(5): 644–648.]
- [23] 孙慧, 李晶峰, 赵子佳, 等. 传统加工方式对鹿茸氨基酸组成与促睾丸间质细胞分泌睾酮的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(11): 2656–2658. [SUN H, LI J F, ZHAO Z J, et al. Effects of traditional processing methods on amino acid composition of pilose antler and the secretion of testosterone by leydig cells[J]. Shizhen Traditional Chinese Medicine, 2017, 28(11): 2656–2658.]
- [24] 齐丽颖, 郭倩, 赵明, 等. 火麻仁蛋白及多肽提取工艺研究进展[J]. 高师理科学刊, 2022, 42(12): 61–63, 85. [QI L Y, GUO Q, ZHAO M, et al. Research progress on extraction technology of hemp seed protein and polypeptide[J]. Journal of Science of Normal University, 2022, 42(12): 61–63, 85.]
- [25] 黄雨, 刘魏红, 王洪阳, 等. 裙带菜孢子叶仿生酶解工艺优化及酶解肽的抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 180–189. [HUANG Y, LIU W H, WANG H Y, et al. Optimization of bionic enzymatic hydrolysis process of *Undaria pinnatifida* spore leaves and analysis of antioxidant activity of enzymatic peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 180–189.]
- [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 J L, LI C N, YIN X X, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis technology of deer penis by response surface methodology and analysis of its activity of tonifying kidney and strengthening bone *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(2): 213–221.]
- [27] 肖雪, 王金浩, 邵俊花, 等. 超声辅助酶法优化鸡肉蛋白水解工艺[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(2): 124–131. [XIAO X, WANG J H, SHAO J H, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis of chicken protein[J]. Food Research and Development, 2023, 44(2): 124–131.]
- [28] 上官玲玲, 张辉燕, 王文欣, 等. 大豆分离蛋白酶解工艺优化及在发酵调味料中的应用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 272–280. [SHANGGUAN L L, ZHNAG H Y, WANG W X, et al. Optimization of proteolytic process of soybean separation and its application in fermented seasonings[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 272–280.]
- [29] MUSA F R, TAKENAKA I, KONISHI R, et al. Effects of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and epidermal growth factor on expression and kinase activity of cyclin-dependent kinase 5 in Leydig TM3 and Sertoli TM4 cell lines[J]. Journal of Andrology, 2000, 21(3): 392–402.
- [30] YANG M H, GUAN S Y, TAO J L, et al. Melatonin promotes male reproductive performance and increases testosterone synthesis in mammalian Leydig cells[J]. Biology of Reproduction, 2021, 104(6): 1322–1336.
- [31] 赵晓龙, 牛治平, 谭继东, 等. 氧化应激和能量代谢与中国男性精子质量的关联性研究[J]. 中国全科医学, 2023, 26(11): 1318–1324. [ZHAO X L, NIU Z P, TAN J D, et al. Study on the correlation between oxidative stress and energy metabolism and sperm quality of men in China[J]. China General Medicine, 2023, 26(11): 1318–1324.]
- [32] HOUMANI H, RODRIGUEZ-RUIZ M, PALMA J M, et al. Modulation of superoxide dismutase (SOD) isozymes by organ development and high long-term salinity in the halophyte *Cakile maritima*[J]. Protoplasma, 2016, 253(3): 885–894.
- [33] 郭倩, 万生芳, 何蕴良, 等. 脾气虚弱型 DGP 与 SOD、MDA、GSH-Px 的相关性研究[J]. 云南中医中药杂志, 2021, 42(6): 16–18. [GUO Q, WAN S F, HE Y, L, et al. Correlation between DGP with spleen-qì deficiency and SOD, MDA and GSH-Px[J]. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 42(6): 16–18.]
- [34] DIMITRIOS T. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges[J]. Analytical Biochemistry, 2016, 524: 13–30.
- [35] CHEN X M, ZHANG E, FANG L, et al. Repair effects of exogenous SOD on *Bacillus subtilis* against gamma radiation exposure[J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2013, 126: 259–263.
- [36] 王广建, 李波, 邓晋超, 等. 百合育子方对特发性弱精子症及精浆睾酮和氧化应激的影响[J]. 中国男科学杂志, 2023, 37(1): 80–84. [WANG G J, LI B, DENG J C, et al. Effects of Baihe Yuzi recipe on idiopathic asthenospermia, testosterone and oxidative stress in seminal plasma[J]. Chinese Journal of Andrology, 2023, 37(1): 80–84.]
- [37] LIU Y, SUN B X, ZHANG S X, et al. Glycine alleviates fluoride-induced oxidative stress, apoptosis and senescence in a porcine testicular Sertoli cell line[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2021, 56(6): 884–896.
- [38] EI-SHALOFY A S, HANEY S, EI-SHERBINY H R. Intramuscular administration of l-arginine boosts testicular hemodynamics, plasma concentrations of testosterone and nitric oxide in heat-stressed rams[J]. Theriogenology, 2023, 197: 127–132.
- [39] 赵荣坡, 杨石强. 精氨酸与男性生殖[J]. 现代医药卫生, 2005(12): 1510–1511. [ZHAO R P, ZHAO S Q. Arginine and male reproduction[J]. Modern Medicine and Health, 2005(12): 1510–1511.]
- [40] 徐学玉, 罗仁武, 王珂, 等. 精氨酸对雄性动物繁殖性能的影响[J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(9): 121–124. [XU X Y, LUO R W, WANG K, et al. Effects of arginine on reproductive performance of male animals[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 49(9): 121–124.]
- [41] 刘文颖, 谷瑞增, 鲁军, 等. 大豆低聚肽的成分分析及体外抗氧化作用[J]. 食品工业, 2015, 36(4): 200–203. [LIU W Y, GU R Z, LU J, et al. Composition analysis and antioxidant effect of soybean oligopeptide *in vitro*[J]. Food Industry, 2015, 36(4): 200–203.]