翁文, 董旭, 杜芬, 等. 巴沙鱼鱼鳔肽的制备及其对过氧化氢诱导的细胞衰老的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(13): 90−102. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060034

WENG Wen, DONG Xu, DU Fen, et al. Preparation of Swim Bladder Peptides from Basa Catfish and Its Protective Effects on H_2O_2-induced Premature Senescence[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(13): 90−102. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060034

· 研究与探讨 ·

巴沙鱼鱼鳔肽的制备及其对过氧化氢诱导的细胞衰老的保护作用

翁　文[1], 董　旭[2], 杜　芬[3,4], 付雪媛[3,4], 王长伟[3], 冯晓梅[2,3], 曹婉秀[2,3], 唐庆娟[1], 王　岚[1], 刘楚怡[2,3,*]

（1.中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266000;
2.中国海洋大学医药学院, 山东青岛 266000;
3.青岛海洋生物医药研究院, 山东青岛 266000;
4.青岛海洋生物医药研究院股份有限公司, 山东青岛 266000）

摘　要: 目的：探究巴沙鱼鱼鳔肽的最佳酶解工艺及其对过氧化氢诱导的细胞衰老的保护作用。方法：采用酶解法制备巴沙鱼鱼鳔肽（Basa Catfish Swim Bladder Peptides，BBP），以水解度和总还原力为指标，通过单因素结合响应面法确定最佳酶解工艺；采用 Sephadex G-10 凝胶柱层析对 BBP 分离纯化得到 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ，并通过分子量分布、氨基酸组成和体外抗氧化活性表征三种组分的性质；利用小鼠成纤维细胞（L929 细胞）建立 H_2O_2 诱导的应激性细胞衰老模型，检测 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对细胞活力、β-半乳糖苷酶活力、ROS 水平、抗氧化酶活力及胶原蛋白分泌的影响，评价其对 H_2O_2 诱导的皮肤衰老的保护作用。结果：以风味蛋白酶为实验用酶，最佳的酶解条件为底物浓度 4%，pH5.0，温度 50.5 ℃，酶解时间 3.9 h，酶添加量 5000 U/g，此条件下，BBP 的总还原力达 0.426±0.011。BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的分子量分别为 925、809 和 640 Da，BBP-Ⅰ中芳香族氨基酸含量最高，BBP-Ⅱ中疏水氨基酸含量高于 BBP-Ⅰ和 BBP-Ⅲ，三种活性肽组分都能够有效清除 DPPH·、O_2^-·和·OH，且相同浓度下 BBP-Ⅰ的清除能力最强。此外，BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ均无细胞毒性，能够显著恢复 L929 衰老细胞的细胞活力并延缓细胞衰老（P<0.05）；显著降低活性氧水平和丙二醛含量（P<0.05），同时提高超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶含量（P<0.05），抑制了氧化应激反应的发生；同时，三种活性肽能够上调Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白的含量（P<0.05），具有延缓皮肤衰老的功能。结论：巴沙鱼鱼鳔来源的 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ均具有显著抗氧化和抗细胞衰老活性，为水产副产物高值化利用提供了理论依据与技术支撑。

关键词: 巴沙鱼鱼鳔, 小鼠成纤维细胞（L929）, 抗氧化, 氧化应激, 应激性细胞衰老（SIPS）
中图分类号: TS254.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)13−0090−13
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060034
本文网刊:

Preparation of Swim Bladder Peptides from Basa Catfish and Its Protective Effects on H_2O_2-induced Premature Senescence

WENG Wen[1], DONG Xu[2], DU Fen[3,4], FU Xueyuan[3,4], WANG Changwei[3], FENG Xiaomei[2,3], CAO Wanxiu[2,3], TANG Qingjuan[1], WANG Lan[1], LIU Chuyi[2,3,*]

（1.College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, China;
2.School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266000, China;
3.Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266000, China;
4.Qingdao Marine Biomedical Research Institute Co., Ltd., Qingdao 266000, China）

收稿日期: 2025−06−05
基金项目: 国家重点研发计划（2023YFF1105305）; 山东省自然科学基金资助项目（ZR2025QC335）。
作者简介: 翁文（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能蛋白活性肽及其功能制品, E-mail: wwen1192@163.com。
*** 通信作者:** 刘楚怡（1986−）, 女, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 功能蛋白活性肽及其功能制品, E-mail: liucy@ouc.edu.cn。

Abstract: Objective: To investigate the optimal enzymatic hydrolysis process for peptides derived from the swim bladder of Basa catfish and to evaluate their protective effects against hydrogen peroxide-induced cellular senescence. Methods: Basa catfish swim bladder peptides (BBP) were prepared through enzymatic hydrolysis. Using the degree of hydrolysis and total reducing power as evaluation indicators, the optimal enzymatic hydrolysis conditions were determined via the single-factor experiments combined with response surface methodology. BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ were isolated and purified using Sephadex G-10 gel column chromatography. Their physicochemical properties were characterized in terms of molecular weight distribution, amino acid composition, and *in vitro* antioxidant activity. A hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced cellular senescence model was established using mouse fibroblast (L929) cells to evaluate the effects of BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ on cell viability, *β*-galactosidase activity, reactive oxygen species (ROS) levels, antioxidant enzyme activity, and collagen secretion, thereby assessing their protective effects against H_2O_2-induced skin senescence. Results: Results demonstrated that when flavor protease was used as the experimental enzyme, the optimal enzymatic conditions were as follows: a substrate concentration of 4%, a pH value of 5.0, a temperature of 50.5 ℃, an enzymatic time of 3.9 hours, and an enzyme dosage of 5000 U/g. Under these conditions, the total reducing power of BBP was determined to be 0.426±0.011. The molecular weights of BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ were 925, 809, and 640 Da, respectively. BBP-Ⅰ exhibited the highest content of aromatic amino acids, whereas BBP-Ⅱ contained a higher proportion of hydrophobic amino acids compared with BBP-Ⅰ and BBP-Ⅲ. All three active peptide fractions demonstrated effective scavenging activity against DPPH·, O_2^{-}·, and ·OH radicals. Among them, BBP-Ⅰ exhibited the strongest scavenging capacity at the same concentration. In addition, BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ exhibited no cytotoxic effects. They effectively restored the viability of senescent L929 cells and significantly inhibited cellular senescence (P<0.05). These peptides also significantly reduced the levels of reactive oxygen species and malondialdehyde (P<0.05), while increasing the levels of superoxide dismutase and glutathione peroxidase (P<0.05), thereby inhibited the occurrence of the oxidative stress response. Moreover, the three active peptides were found to upregulate the expression of type I and type Ⅲ collagen (P<0.05), indicating their potential in delaying skin aging. Conclusion: BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ derived from the swim bladder of Basa catfish, exhibited significant antioxidant and anti-cellular senescence activities, thereby providing a theoretical basis and technical support for the high-value utilization of aquatic by-products.

Key words: Basa catfish swim bladders; mouse fibroblasts (L929); antioxidant; oxidative stress; stress-induced premature senescence (SIPS)

鱼鳔，俗称鱼泡、鱼肚，是一种高蛋白、低脂肪且矿物质含量丰富的水产资源[1]。传统医学理论认为，鱼鳔具有很高的滋补作用与药用价值，与鱼翅、海参、燕窝齐名，素有“海洋人参”的美誉[2]。随着现代生物医学技术的发展，鱼鳔的潜在价值被进一步挖掘，研究发现其不仅是优质的天然蛋白质来源，而且在生理调节与健康维护中也展现出显著作用[3]。相关研究表明，鱼鳔中的胶原蛋白及其水解产物具有良好的抗氧化能力，可通过调节机体代谢，发挥降血脂[4−5]，延缓衰老[6]，提高机体免疫力[7]，预防卵巢早衰[8] 等功效。近年来，鱼鳔提取物的研究不断聚焦于皮肤健康领域，其在促进胶原合成、改善皮肤屏障功能等方面的积极作用已被逐步证实[9]，为该类成分在功能性食品、化妆品及生物医药领域的转化应用提供了科学依据。

细胞衰老是指细胞在生命活动进程中，受内在遗传程序调控与外在环境因素共同作用，逐渐丧失正常生理功能与增殖能力，并伴随一系列表型与功能特征改变的不可逆生理过程[10]。其中，内在遗传因素以端粒磨损导致的复制性衰老和癌基因的激活为主，其进程多随着时间推移而逐步发生；外在环境因素主要包括各种遗传毒性剂如过氧化氢（H_2O_2）、乙醇、各类细胞抑制剂、紫外线（UV）辐射等，这些因素能够诱发细胞内的氧化应激反应，造成 DNA 损伤和脂质过氧化，进而加速细胞衰老，并最终导致应激性细胞衰老（Stress-Induced Premature Senescence, SIPS）的发生[11−13]。到目前为止，氧化应激在 SIPS 中的致病作用已得到充分证实[11,14−15]。在一系列 SIPS 的公认诱导剂中，过氧化氢（H_2O_2）因具备能诱导自由基大量生成，从而高度还原衰老过程中细胞内可能出现的氧化环境状态的特性，被认为是诱导应激性细胞衰老的理想物质，常被用于在体外模型中构建氧化应激环境及诱导应激性细胞衰老模型[16−17]。

根据自由基/氧化应激理论，通过抗氧化物抑制生物体过度氧化应激是一种有效延缓或预防衰老的干预策略[18]。近年来，相关研究发现通过酶解鱼鳔制备的多肽具备良好的抗氧化能力，能够抑制 ROS 的过度产生并维持细胞内的氧化平衡，在延缓应激性细胞衰老中发挥了显著的作用。孙彦庆等[2] 从大黄鱼鱼鳔中分离出了抗氧化活性良好的大黄鱼鱼鳔低聚肽（HSBP），发现 HSBP 能显著促进氧化损伤 HaCaT 细胞中Ⅰ型胶原蛋白（Type Ⅰ Collagen, COL Ⅰ）、Ⅳ型胶原蛋白（Type Ⅳ Collagen, COL Ⅳ）和透明质酸（Hyaluronic Acid, HA）的分泌，提高超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase, SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione Peroxidase, GSH-Px）的酶活力，并降低丙二醛（Malondialdehyde, MDA）和 *β*-半乳糖苷酶表达量，表现出显著的皮肤屏障修复活性，延缓了

皮肤衰老。Li 等[6] 的研究表明, 通过酶解制备得到的大西洋鳕鱼鱼鳔肽(SWP-Ⅰ和 SWP-Ⅱ)能够有效清除 O_2^{-}·、DPPH·和·OH, 具有很强的 Fe^{2+}螯合活性, 在 H_2O_2 诱导的过早衰老 2BS 细胞模型中, SWP-Ⅰ和 SWP-Ⅱ表现出了显著的活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)清除活性, 能够显著降低 SA-β-gal 活性并抑制过早衰老 2BS 细胞的凋亡率, 从而有效保护了过氧化氢诱导的细胞衰老。Sheng 等[19] 分离出了安康鱼鱼鳔的十八种生物活性肽, 发现其具有显著的自由基清除能力、脂质过氧化抑制能力和铁还原能力, 能够保护质粒 DNA 和 HepG 2 细胞免受 H_2O_2 诱导的氧化应激, 从而延缓细胞衰老。

巴沙鱼(*Pangasius bocourti*)是湄公河流域中一种特有的优质经济鱼类, 其生产加工中的副产物鱼鳔主要以冷冻品和干制品两种方式进行销售, 产品附加值低, 资源并未得到有效利用[2,20]。近几年, 国内外学者对于巴沙鱼副产物的研究多集中在鱼皮、鱼骨、内脏等, 用于制造明胶、壳聚糖、生物活性肽、鱼油或水产养殖饲料[21], 对鱼鳔的开发利用程度并不高, 关于其抗衰老功效的研究也鲜有报道。因此本研究通过酶解法从巴沙鱼鱼鳔中提取具有良好抗氧化能力的胶原肽, 利用单因素实验结合响应面试验筛选制备巴沙鱼鱼鳔肽(Basa Catfish Swim Bladder Petide, BBP)的最佳工艺参数, 采用凝胶柱层析对巴沙鱼鱼鳔肽进行分离纯化, 并利用 H_2O_2 构建氧化应激诱导的 L929 成纤维细胞衰老模型, 从细胞活力、β-半乳糖苷酶活力、ROS 含量、抗氧化酶活性和胶原蛋白分泌等角度, 探究 BBP 的三个分离纯化组分在修复氧化损伤和抵抗皮肤衰老方面的作用效果, 以期为后续海洋活性肽延缓衰老的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

巴沙鱼鱼鳔 正大(CP)食品有限公司; 小鼠成纤维细胞(L929 细胞) 中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; 胰蛋白酶(酶活>250 U/mg)、木瓜蛋白酶(酶活 10^5 U/g)、中性蛋白酶(酶活 2×10^5 U/g)、风味蛋白酶(酶活 1.5×10^4 U/g)、胃蛋白酶(酶活 800~2500 U/mg)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、抗坏血酸、Sephadex G-10、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、DPPH 自由基清除能力检测试剂盒、超氧阴离子含量检测试剂盒、羟自由基清除能力检测试剂盒、DMEM 高糖培养基、青链霉素混合液(100×)细胞培养专用、0.25% 胰蛋白酶消化液、PBS 缓冲液、CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒、β-半乳糖苷酶染色试剂盒、活性氧(ROS)检测试剂盒、丙二醛(MDA)含量检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒(WST-1 法)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性检测试剂盒 北京索莱宝生物科技有限公司; 胎牛血清(Gbico) 美国 Life Technologies Corporation 公司; 谷胱甘肽(L-Glutathione, GSH)、H_2O_2 美国 Sigma-Aldrich 公司; 小鼠Ⅰ型胶原蛋白(COL Ⅰ)ELISA 试剂盒、小鼠Ⅲ型胶原蛋白(COL Ⅲ)ELISA 试剂盒 青岛中西生物技术有限公司; 若无特指, 所用试剂均为分析纯。

SB-800DTD 超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司; 荣华 HH-4 数显恒温水浴锅 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; PHS3CW 型 pH 计 上海般特仪器制造有限公司; FC 多功能酶标仪 美国赛默尔公司; CR21 高速离心机 日立有限公司; Lab-1A-50E 型真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; E2695 液相色谱仪(配备相应型号自动进样器、紫外检测器及工作站)、AccQ-Tag 氨基酸分析柱(3.9 mm×150 mm, 5μm, 柱体积 1.8 mL) 美国 Waters 公司; CCL-170B-8 型 CO_2 培养箱 新加坡艺思高科技有限公司; DHP-9052 型恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; CKX53 型倒置显微镜 奥林巴斯株式会社; Tecan Infinite M200 Pro 多功能酶标仪 瑞士 Tecan 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 巴沙鱼鱼鳔预处理 将巴沙鱼鱼鳔清洗后, 去除鱼鳔内部组织和表面脂肪, 剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 加入 20 倍体积 0.1 mol/L NaOH 溶液, 于 4 ℃下搅拌 12 h 后用蒸馏水洗至中性; 再加入 25 倍体积的 10% 异丙醇溶液 4 ℃ 下处理 24 h 进行脱脂, 然后用蒸馏水冲洗干净后备用。

1.2.2 巴沙鱼鱼鳔肽的制备

1.2.2.1 蛋白酶种类的筛选 以预处理的巴沙鱼鱼鳔为原料, 分别选择胰蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶 5 种酶进行酶解实验。在 5 种酶的最适条件下酶解(表 1), 固定底物浓度 5%, 加酶量 3000 U/g, 酶解时间 4 h, 以酶解液的水解度、总还原能力为主要指标, DPPH 自由基清除率为次要指标, 确定适用于巴沙鱼鱼鳔酶解的最佳酶制剂。

表 1 蛋白酶酶解条件

Table 1 Parameters of enzymatic hydrolysis

酶种类	pH	温度(℃)
胰蛋白酶	8	50
中性蛋白酶	6.5	50
风味蛋白酶	7	50
胃蛋白酶	2.88	37
木瓜蛋白酶	6.5	50

1.2.2.2 酶解单因素条件的优化 根据蛋白酶种类的筛选结果确定实验用酶, 以底物浓度 5%, pH7.0, 加酶量 3000 U/g, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 4 h 为基本条件, 分别对底物浓度(3%、4%、5%、6%、7%、8%)、pH(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)、加酶量(1000、2000、3000、4000、5000 U/g)、酶解温度(40、45、50、55、60 ℃)和酶解时间(1、2、3、4、5、6、7、8 h)进行单因素实验, 以水解度、总还原力

为考察指标，优化蛋白酶的酶解条件。

1.2.2.3　响应面优化试验　在单因素实验的基础上，根据 Box-behnken 试验设计原理，选取酶解时间（A）、酶解温度（B）和加酶量（C）为自变量，以总还原力为响应值，设计 3 因素 3 水平的响应面优化试验（表 2），探究蛋白酶酶解法制备巴沙鱼鱼鳔肽的最佳酶解工艺参数。

表 2　响应面因素及水平

Table 2　Factors and levels of response surface test

因素	水平		
	−1	0	1
A: 酶解时间（h）	3	4	5
B: 酶解温度（℃）	45	50	55
C: 加酶量（U/g）	3000	4000	5000

1.2.3　水解度的测定　参照周先艳[22] 的方法，采用茚三酮法测定巴沙鱼鱼鳔肽的水解度（DH）。取酶解液 1 mL 定容到 50 mL，取 1 mL 稀释液于试管中并加入 1 mL 蒸馏水和 1.0 mL 茚三酮显色剂混匀后置于沸水浴中加热 15 min，用冷水迅速冷却至室温，随后加入 5 mL 40% 乙醇溶液混匀后静置 20 min，测定 570 nm 处的吸光值。利用标准曲线 y=0.0061x+0.0002（R^2=0.993）计算水解蛋白液中-NH_2 的含量（mmol/L），采用下式计算水解度的大小。

$$DH(\%)=\frac{\frac{-NH_2\text{含量}}{6.25\times N}-\mu}{h_{tot}}\times 100$$

式中，-NH_2 含量根据标准曲线计算得出，μmol/mL；N 为凯氏定氮法所测值，mg/mL；μ 为原料中游离-NH_2 含量，μmol/mL；h_{tot} 为每 1 g 巴沙鱼鱼鳔肽中肽链当量数，经氨基酸含量测定后计算为 9.48 mmol/g。

1.2.4　总还原力的测定　参照 Ahmadi 等[23] 的方法，测定巴沙鱼鱼鳔肽的总还原力。在离心管中分别加入 0.2 mol/L pH6.6 的磷酸盐缓冲液 2.5 mL，酶解液 1 mL，1% 铁氰化钾溶液 2.5 mL，混合均匀后，在 50 ℃ 下反应 20 min，冷却至室温，向混合溶液中加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸溶液混匀，终止反应，于 5000 r/min 条件下离心 10 min，取上清液 2.5 mL，加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 的 $FeCl_3$ 溶液，静置 10 min 后，于 700 nm 波长处测定吸光度，平行测定 3 次，以 V_C 溶液做阳性对照。

1.2.5　巴沙鱼鱼鳔肽的层析分离　参考王婉怡[24] 的方法并稍作调整，将巴沙鱼鱼鳔肽冻干粉末配制成 100 mg/mL 的溶液，离心后取上清备用。吸取 1 mL 巴沙鱼鱼鳔肽溶液加到平衡完全的 Sephadex G-10 柱（1.5 cm×40 cm）中，用超纯水以 0.5 mL/min 的流速进行洗脱。每 2 min 收集一管洗脱液，检测每管样品在 280 nm 波长处的紫外吸收，同时使用 BCA 试剂盒检测每管蛋白含量，根据检测结果绘制洗脱曲线，并收集主峰。

1.2.6　氨基酸组成　按照 GB 5009.124-2016 中规定的方法鉴定巴沙鱼鱼鳔肽及其分离纯化组分的氨基酸组成[25]。

1.2.7　分子量分布的测定　参考刘楚怡等[26] 的研究方法并略作修改，使用高效液相色谱测定巴沙鱼鱼鳔肽及其分离纯化组分的分子量，并用 GPC 软件进行分析。检测条件为：色谱柱 TSKgelG 2000 SWXL（300 mm×7.8 mm），流动相为乙腈/水（3∶7，v/v），在柱温 30 ℃、流速 1.0 mL/min 条件下，以检测波长 220 nm 对样品进行测定。标准品为尿嘧啶（112 Da）、谷胱甘肽（307 Da）、杆菌肽（1422 Da）、抑肽酶（6511 Da）、细胞色素 C（12394 Da）、牛血清白蛋白 V（68000 Da）。将巴沙鱼鱼鳔肽及其分离纯化组分冻干粉和标准品用超纯水配制成 3~5 mg/mL 的溶液，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后加入进样瓶中，上机进样。

1.2.8　体外自由基清除能力测定　根据 DPPH 自由基清除能力试剂盒、超氧阴离子清除能力试剂盒以及羟自由基清除能力试剂盒检测巴沙鱼鱼鳔肽及其分离纯化组分对三种自由基的清除能力。设置多肽溶液的浓度分别为 0.1、0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/mL，以相同浓度的抗坏血酸（V_C）做阳性对照，蒸馏水做空白对照，评价巴沙鱼鱼鳔肽及其分离纯化组分的体外自由基清除能力。

1.2.9　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的细胞毒性评价　参考李娜等[27] 的方法并略作修改。将 L929 细胞按 1×10^3 个细胞/孔的密度接种到 96 孔板中，设置空白组、对照组和样品组，空白组不接种细胞（下同），每组设置 6 个平行，于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后向空白组和对照组中加入 DMEM 完全培养基，样品组加入含浓度为 10、50、100、200、400 和 600 μg/mL BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的 DMEM 完全培养基，置于 CO_2 培养箱中继续培养 24 h，使用 CCK-8 试剂盒测定细胞增殖率，评估不同浓度胶原肽对 L929 的细胞毒性。

1.2.10　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对氧化损伤的 L929 细胞活力的影响　将 L929 细胞以 1×10^3 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板中，设置空白组、正常对照组、模型组（1.0 mmol/L H_2O_2）和药物干预组（含浓度为 100 μg/mL 和 400 μg/mL BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的 DMEM 高糖培养基）。培养至细胞密度增加到 50% 左右时，向除空白组和正常对照组外的其余各组中加入 1.0 mmol/L H_2O_2 进行诱导处理。处理结束后，空白组、正常对照组和模型组加入不含胎牛血清的 DMEM 高糖培养基，药物干预组加入含浓度为 100 和 400 μg/mL BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的 DMEM 完全培养基，于 CO_2 培养箱中继续培养 24 h 后，以 CCK-8 法测定细胞增殖率，评估不同浓度胶原肽对 H_2O_2 诱导下细胞增殖率变化的

影响，确定后续实验的胶原肽浓度。

1.2.11 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对氧化损伤 L929 细胞 β-半乳糖苷酶阳性率的影响 将细胞以 1×10^4 个细胞/孔的密度接种到 6 孔板中，细胞分组和培养流程同 1.2.10。细胞经 H_2O_2 诱导后，药物干预组加入浓度为 400 μg/mL 的三种鱼鳔肽分离纯化组分，继续培养 24 h，按照 β-半乳糖苷酶染色试剂盒说明书的方法对细胞进行固定和染色。在倒置显微镜下观察计数，阳性细胞显示为蓝色，采用 ImageJ 软件计算阳性细胞占总细胞比值来表示 β-半乳糖苷酶活性。

1.2.12 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对氧化损伤 L929 细胞内 ROS 含量的影响 以 5×10^3 个细胞/孔的密度接种细胞于 12 孔板中，细胞分组和培养流程同 1.2.10，加入浓度为 400 μg/mL 的三种鱼鳔肽分离纯化组分，继续培养 24 h。按照 ROS 活性氧试剂盒说明书中原位装载探针的方法进行实验，以 GSH 做阳性对照，利用多功能酶标仪检测活性氧(ROS)的荧光强度(激发光 488 nm，发射光波长 525 nm)。

1.2.13 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对氧化损伤 L929 细胞抗氧化指标的影响 按 1.2.10 中的方法培养和处理细胞。细胞内 MDA、SOD 和 GSH-Px 含量的测定参照试剂盒说明，分别采用酶标法、WST-1 法和双抗体夹心法进行测定。

1.2.14 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对氧化损伤 L929 细胞胶原蛋白分泌的影响 按 1.2.10 中的方法培养和处理细胞。细胞内Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白含量的测定参照试剂盒说明，均采用双抗体夹心法进行测定。

1.3 数据处理

每个实验重复三次或三次以上，结果以平均值±标准差(SD)表示。采用 Origin 2024、GraphPad Prism 9.0 软件分析实验数据并绘图，采用 t 检验或单因素分析 ANOVA 分析两组或多组数据之间的差异性，以 $P<0.05$ 表示差异显著，以 $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 巴沙鱼鱼鳔肽的制备工艺优化

2.1.1 蛋白酶的筛选 酶解法是胶原蛋白肽最常用的提取方法。由于不同蛋白酶的底物特异性及作用位点的差异，不同蛋白酶作用于鱼鳔的水解程度不同，酶解产物的功能性也将有所不同[28]。而根据自由基/氧化应激理论，通过抗氧化物抑制生物体过度氧化应激是一种有效延缓或预防衰老的干预策略[18]。因此本研究以酶解液的水解度和抗氧化能力(总还原力、DPPH 自由基清除活性)为指标，筛选制备抗衰老活性肽的酶解条件。蛋白酶筛选结果如图 1(a)所示，在所选用的 5 种蛋白酶中，风味蛋白酶组水解度、总还原力和 DPPH 自由基清除活性最高，分别为 21.70%±1.19%、0.212±0.006 和 24.54%±1.64%，因此选择风味蛋白酶为实验用酶进行后续实验。

2.1.2 底物浓度对水解度和总还原力的影响 图 1(b)显示了不同底物浓度对水解度和总还原力的影响，随着底物浓度的增大，酶解液的水解度和总还原力均先升高，后趋于平稳；在底物浓度 4% 时，总还原力达到最高值 0.225±0.012，水解度为 26.91%±1.51%；此时继续升高底物浓度，水解度和总还原力在整体上无明显变化，说明底物浓度已趋于饱和，继续增大底物浓度时酶促反应速率不再增加[29]，因此为了避免资源浪费，选择最佳底物浓度为 4%。

2.1.3 pH 对水解度和总还原力的影响 图 1(c)显示酶解产物的水解度随着 pH 的升高无明显变化，而

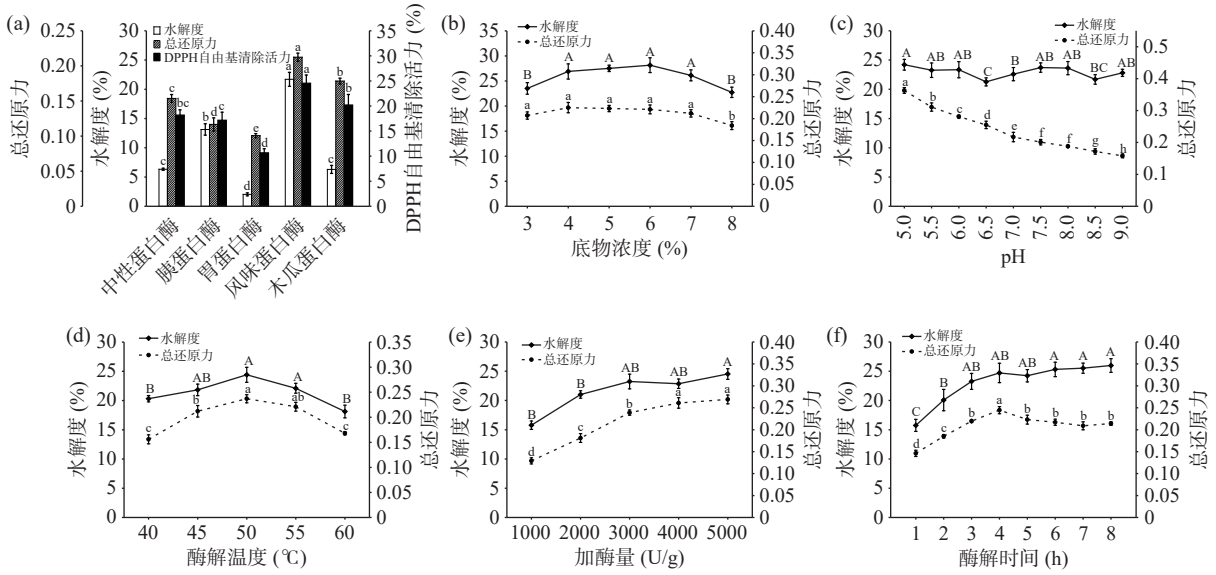


图 1 不同因素对巴沙鱼鱼鳔酶解产物水解度及抗氧化能力的影响

Fig.1 Effects of different factors on degree of hydrolysis and antioxidant capacity of Basa catfish swim bladder enzymatic hydrolysate

注：(a)蛋白酶种类；(b)底物浓度；(c)pH；(d)酶解温度；(e)加酶量；(f)酶解时间；不同字母表示差异显著($P<0.05$)，图 2、图 4~图 9 同。

总还原力逐渐降低，当 pH 为 5.0 时，酶解液的总还原力最高，为 0.363±0.009，水解度为 24.20%±0.92%；继续增大 pH 时，由于偏离了酶的最适 pH，会使酶的活性降低甚至失活，不利于酶解反应进行[30]，因此选择 pH5.0 为最佳酶解 pH。

2.1.4　酶解温度对水解度和总还原力的影响　图 1(d)显示酶解液的水解度和总还原力均随着酶解温度的提高呈现升高后降低的趋势，当酶解温度为 50 ℃时，酶解产物的水解度达到最高值 24.41%±1.28%，总还原力也达到最大值 0.237±0.008，继续提高温度超过了蛋白酶的最适温度，导致酶解效率降低，因此选择最适的酶解温度为 50 ℃。

2.1.5　加酶量对水解度和总还原力的影响　图 1(e)表示随着加酶量的增加，酶解液的水解度和总还原力呈现出先升高后趋于平稳的趋势，当加酶量为 4000 U/g 时，酶解液的水解度为 22.86%±0.80%，总还原力为 0.261±0.012；继续提高加酶量，酶解产物的水解度和总还原力无显著变化(P>0.05)，推测此时底物基本上已水解完全，因此，综合考虑酶解效果和加酶量成本问题，选择最佳酶添加量为 4000 U/g。

2.1.6　酶解时间对水解度和总还原力的影响　图 1(f)显示总还原力随着酶解时间的延长呈现先升高后降低的趋势，当酶解时间为 4 h 时，酶解产物的总还原力最大，为 0.245±0.008，此时水解度为 24.71%±1.65%，继续延长酶解时间，酶解产物的水解度趋于平稳且无显著变化(P>0.05)，而总还原力逐渐降低，推测原因可能为酶解时间过长，部分具有铁离子还原能力的多肽由于反应过度被分解成氨基酸而失去了活性，导致酶解产物的总还原力逐渐降低[31]，因此选择最佳酶解时间为 4 h。

2.1.7　响应面试验结果　在单因素实验的基础上，采用 Box-Behnken 设计响应面试验，以酶解时间(A)、酶解温度(B)和加酶量(C)为试验变量，总还原力(Y)为响应值，进行三因素三水平的响应面试验，得到响应面试验设计及结果见表 3。

表 3　响应面设计及结果

Table 3　Design and results of response surface

试验号	酶解时间(h)	酶解温度(℃)	加酶量(U/g)	总还原力
1	5	50	5000	0.413
2	4	50	4000	0.413
3	4	45	3000	0.352
4	4	55	3000	0.358
5	4	50	4000	0.408
6	5	55	4000	0.362
7	4	50	4000	0.416
8	4	50	4000	0.419
9	5	45	4000	0.354
10	5	50	3000	0.372
11	4	50	4000	0.397
12	3	50	3000	0.366
13	4	55	5000	0.386
14	3	45	4000	0.346
15	3	50	5000	0.406
16	4	45	5000	0.373
17	3	55	4000	0.359

通过 Design-expert 9.1 软件对表 3 的数据进行拟合分析，得到的多元回归方程为：$Y=0.4107+0.003A-0.0052B+0.0165C-0.001AB+0.0005AC+0.0018BC-0.0167A^2-0.0386B^2-0.0049C^2$。对回归模型进行方差分析，结果如表 4 所示。模型的 F 值为 18.78，P<0.05，表明该模型显著，方程与实际情况拟合良好，能正确反映巴沙鱼鱼鳔酶解过程中酶解时间、酶解温度和加酶量之间的关系；失拟项 P 值为 0.6919(P>0.05)，相对于纯误差不显著，说明模型与实际数据拟合较好，能够很好地反映数据的真实情况；模型决定系数 R^2=0.9602，说明模型能够有效预测巴沙鱼鱼鳔酶解产物的总还原力。因此，可以利用此模型确定最佳酶解工艺。

表 4　回归模型方差分析

Table 4　ANOVA of response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.0105	9	0.0012	18.78	0.0004	显著
A-酶解时间	0.0001	1	0.0001	1.13	0.3231	
B-酶解温度	0.0002	1	0.0002	3.41	0.1071	
C-加酶量	0.0022	1	0.0022	34.89	0.0006	***
AB	4.202E-06	1	4.202E-06	0.0676	0.8023	
AC	8.100E-07	1	8.100E-07	0.0130	0.9123	
BC	0.0000	1	0.0000	0.2144	0.6574	
A^2	0.0012	1	0.0012	18.91	0.0034	**
B^2	0.0063	1	0.0063	101.12	<0.0001	****
C^2	0.0001	1	0.0001	1.60	0.2468	
残差	0.0004	7	0.0001			
失拟项	0.0001	3	0.0000	0.5184	0.6919	不显著
纯误差	0.0003	4	0.0001			
总和	0.0109	16				

注：*代表P<0.05，**代表P<0.01，***代表P<0.001，****代表P<0.0001。

经软件分析确定的最佳酶解条件为：酶解时间 3.86 h、温度 50.45 ℃、酶添加量 4964.30 U/g；理论总还原力为 0.422，根据实际的制备过程中的可操作性，调整酶解工艺参数为酶解时间 3.90 h，酶添加量 5000 U/g，温度 50.50 ℃，以调整后的条件进行 3 次平行验证实验，测得实际总还原力为 0.426±0.011，测定值稳定、偏差小，证明该结果合理可靠。

2.2　巴沙鱼鱼鳔肽的体外抗氧化能力

按照最佳制备工艺条件获得巴沙鱼鱼鳔肽(Basa Catfish Swim Bladder Petide，BBP)，检测其体外自由基清除能力，结果如图 2 所示。由图 2 可知，BBP 在高浓度时均表现出良好的体外自由基清除能力。其中，BBP 对 DPPH·的清除能力最好，在浓度为 20 mg/mL 时，对 DPPH·的清除能力达到 86.62%，IC_{50} 值为 2.259 mg/mL；其次对于 O_2^-·的最大清除率可以达到 66.64%，IC_{50} 值为 4.767 mg/mL；对于·OH 的清除能力表现较差，在高浓度时才显示出良好的清除能力，与 V_C 对照组的 IC_{50} 值 0.046 mg/mL 相比

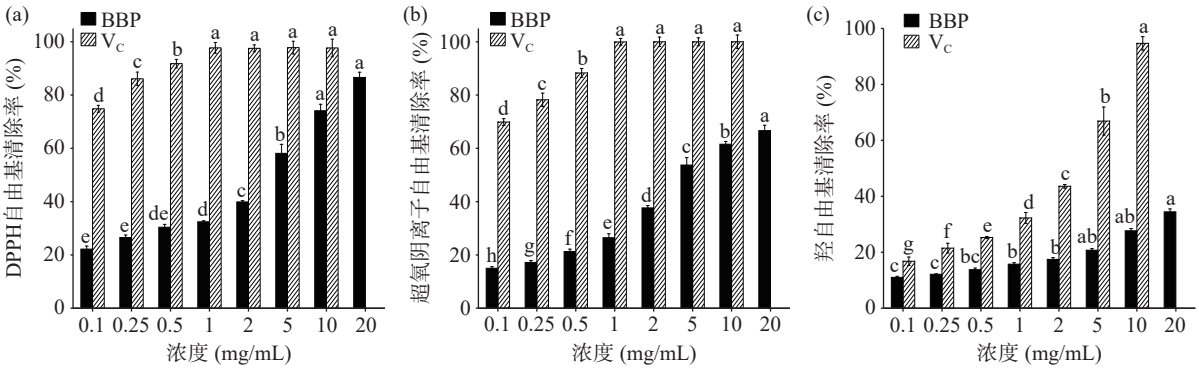


图 2 巴沙鱼鱼鳔肽体外自由基清除能力

Fig.2 Free radical scavenging ability *in vitro* of Basa catfish swim bladder peptide

注:(a)DPPH 自由基清除能力;(b)超氧阴离子自由基清除能力;(c)羟自由基清除能力。

还有一定差距。李娜等[27] 采用复合蛋白酶酶解鳕鱼鱼鳔制备抗氧化肽,其在浓度 20 mg/mL 时对 DPPH·与 O_2^{-}·的清除率分别能达到 71.4% 和 63.6%, IC_{50} 值为 8.29 和 5.03 mg/mL;涂宗财等[32] 利用风味蛋白酶制备草鱼鱼鳔胶原肽,在浓度 30 mg/mL 时对 DPPH 自由基的清除率可达到 81.27%, IC_{50} 值为 8.05 mg/mL。综上,BBP 能够有效地清除自由基,效果优于其他鱼鳔来源的鱼鳔肽,是良好的抗氧化肽来源。

2.3 巴沙鱼鱼鳔肽的分子量分布

表 5 显示了在最佳酶解条件下得到的巴沙鱼鱼鳔肽的分子量分布情况。由于酶解所用的风味蛋白酶包含了内切与外切两种活性酶,内切酶特异性作用于蛋白质肽链内部的肽键,通过水解作用将长链切割为短肽片段;外切酶则从多肽链的 N-端或 C-端逐步切断肽键,释放游离氨基酸,这种协同酶解机制使得最终产物呈现出广泛的分子量分布特性[33]。如表 5 所示,鱼鳔肽的分子量主要分布在 3 kDa 以下,占比 99.307%,其中<1 kDa 的寡肽含量为 78.921%,说明使用风味蛋白酶能够较为充分地水解巴沙鱼鱼鳔胶原蛋白,酶解产物分子量相对集中在低分子量(<3 kDa)的区间。

表 5 巴沙鱼鱼鳔肽分子量分布

Table 5 Molecular weight distribution of BBP

分子量(kDa)	峰面积百分比(%)	重均分子量(Da)
>3	0.694	729
1~3	20.386	
0.5~1	39.897	
<0.5	39.024	

2.4 巴沙鱼鱼鳔肽的分离纯化

由于 BBP 的分子量主要分布在 3 kDa 以下,因此本实验采用 Sephadex G-10 凝胶柱对巴沙鱼鱼鳔肽进行层析分离。在紫外吸收波长 280 nm 处检测洗脱产物的吸光度,按照检测结果绘制洗脱曲线,结果如图 3 所示。根据 280 nm 处的洗脱曲线,BBP 被分出两个明显的峰,为了探究巴沙鱼鱼鳔肽中发挥抗衰老功能的具体分子量段,将第二个较大的洗脱峰分成分子量不同的两部分进行研究,依次在第 27~30、37~38、39~42 min 对洗脱组分进行收集,对收集到的三个高活性肽段依次命名为 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ。

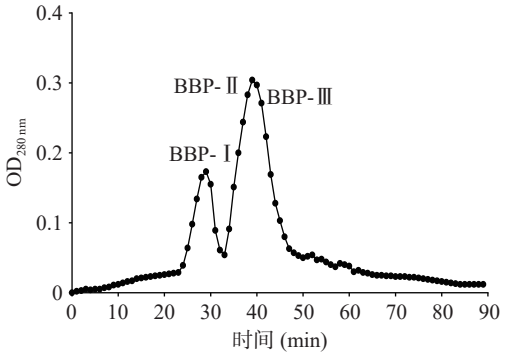


图 3 巴沙鱼鱼鳔肽的 G-10 葡聚糖凝胶层析洗脱曲线

Fig.3 Elution profile of BBP on the Sephadex G-10 column

2.5 BBP、BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的氨基酸组成

多肽的生物活性与氨基酸的组成密切相关,氨基酸的组成与其 R 基团有关,如亲核的含硫侧链、含苯环的芳香族侧链、咪唑侧链等[34]。芳香族氨基酸(包括苯丙氨酸和酪氨酸)能够提供电子将自由基转化为稳定的分子,从而发挥抗氧化作用[35]。氨基酸疏水性的增加被证明可以增强其在脂质中的溶解度,从而增加其抗氧化特性[36]。此外,组氨酸被证明能够螯合咪唑环、捕获和分解脂质而具有很强的自由基清除特性[37]。BBP、BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的氨基酸组成分析结果如表 6 所示。结果显示,与鳕鱼鱼鳔肽的组成类似[27],BBP 及三种分离纯化组分的主要氨基酸组成均为甘氨酸、脯氨酸、谷氨酸、丙氨酸和羟脯氨酸,但四种多肽之间的氨基酸组成仍有一定差异。BBP-Ⅰ中芳香族氨基酸的含量最高,为 2.079±0.127 g/100 g。BBP-Ⅱ中疏水氨基酸含量最高,为 50.055±0.713 g/100 g,接着依次是 BBP-Ⅲ(49.226±0.659 g/100 g)、BBP-Ⅰ(45.915±0.802 g/100 g)和 BBP(41.908±0.747 g/100 g)。此外,四种多肽的组氨酸含量类似,除 BBP-Ⅱ中组氨酸含量略低外,其余三种多肽均无显著差异(P>0.05)。这些多肽

表 6　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的氨基酸组成(g/100 g)

Table 6　Amino acid composition of BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ and BBP-Ⅲ (g/100 g)

氨基酸样品	BBP	BBP-Ⅰ	BBP-Ⅱ	BBP-Ⅲ
天冬氨酸Asp	4.289±0.127^{c}	6.151±0.132^{b}	6.055±0.108^{b}	6.476±0.116^{a}
苏氨酸Thr	2.355±0.098^{a}	2.406±0.127^{a}	2.343±0.125^{a}	2.239±0.083^{a}
丝氨酸Ser	2.664±0.075^{a}	2.706±0.066^{a}	2.831±0.126^{a}	2.604±0.079^{a}
谷氨酸Glu	8.524±0.134^{d}	10.445±0.156^{b}	11.844±0.138^{a}	9.459±0.142^{c}
甘氨酸Gly	17.087±0.172^{d}	18.100±0.156^{c}	23.861±0.145^{a}	22.014±0.186^{b}
丙氨酸Ala	7.931±0.057^{c}	8.043±0.084^{c}	8.282±0.096^{b}	9.020±0.046^{a}
半胱氨酸Cys	–	–	–	–
缬氨酸Val	2.369±0.078^{a}	2.429±0.089^{a}	1.638±0.128^{c}	1.933±0.059^{b}
甲硫氨酸Met	0.758±0.016^{a}	0.877±0.039^{a}	0.647±0.027^{c}	0.735±0.032^{b}
异亮氨酸Ile	1.323±0.106^{a}	1.374±0.078^{a}	0.854±0.038^{c}	0.996±0.045^{b}
亮氨酸Leu	2.155±0.114^{a}	2.251±0.104^{a}	1.170±0.086^{c}	1.474±0.102^{b}
酪氨酸Tyr	0.371±0.016^{c}	0.393±0.021^{c}	0.857±0.035^{b}	1.046±0.066^{a}
苯丙氨酸Phe	1.635±0.086^{a}	1.686±0.106^{a}	0.745±0.046^{b}	0.762±0.038^{b}
赖氨酸Lys	3.281±0.122^{b}	4.096±0.155^{a}	2.536±0.127^{d}	2.904±0.102^{c}
组氨酸His	0.653±0.017^{a}	0.646±0.032^{a}	0.515±0.028^{b}	0.651±0.024^{a}
精氨酸Arg	6.438±0.122^{c}	6.517±0.134^{c}	8.016±0.120^{b}	10.695±0.129^{a}
脯氨酸Pro	8.650±0.118^{d}	11.155±0.146^{c}	12.858±0.147^{a}	12.292±0.151^{b}
羟脯氨酸Hyp	6.055±0.123^{c}	8.701±0.097^{b}	9.013±0.101^{a}	8.851±0.120^{a}
总氨基酸含量	76.538±1.581^{c}	87.976±1.722^{b}	94.065±1.621^{a}	94.151±1.520^{a}

注: –表示未检出, 同一行数据不同字母表示差异显著(P<0.05)。

之间氨基酸组成的差异可能正是导致其表现出不同抗氧化活性的主要原因。Li 等[20]、李娜等[27] 在分析其他鱼鳔肽的氨基酸组成时也得到了类似的结论。

2.6　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的分子量分布

巴沙鱼鱼鳔肽分离纯化得到的三种组分的分子量分布情况如表 7 所示。BBP 中大部分肽段的分子量在 3 kDa 以下, 其中在 1~3 kDa 的肽段占比 20.386%, <1 kDa 的肽段占比达 78.921%, 属于短肽; 经分离纯化后, BBP-Ⅰ的肽段分子量主要分布在 0.5~3 kDa, 约占总量的 90%; BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ中肽段分子量主要分布在 1 kDa 以下, BBP-Ⅱ中多肽分子量在 0.5~1 kDa 之间占比 61.417%, BBP-Ⅲ中< 500 Da 的多肽占比达到 42.128%, 表明经 Sephadex G-10 对巴沙鱼鱼鳔肽进行层析分离后, 巴沙鱼鱼鳔肽被分成了三个分子量段不同的多肽。

表 7　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的分子量分布

Table 7　Molecular weight distribution of BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ and BBP-Ⅲ

样品	重均分子量(Da)	分子量范围(%)			
		<500 Da	0.5~1 kDa	1~3 kDa	>3 kDa
BBP-Ⅰ	925	9.503	58.471	31.899	0.127
BBP-Ⅱ	809	22.022	61.417	16.561	0
BBP-Ⅲ	640	42.128	49.179	8.693	0

2.7　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的抗氧化活性

对 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的体外自由基清除能力进行比较分析, 结果如图 4 所示。随着浓度的增加, BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对 DPPH·、O_2^{-}·和·OH 的清除率逐渐升高, 均呈现出良好的量效关系。其中, 三个组分对自由基清除能力大小排序均为: BBP-Ⅰ>BBP-Ⅱ>BBP-Ⅲ。对于 BBP-Ⅰ组分而言, 当质量浓度达到 20 mg/mL 时, DPPH·清除率

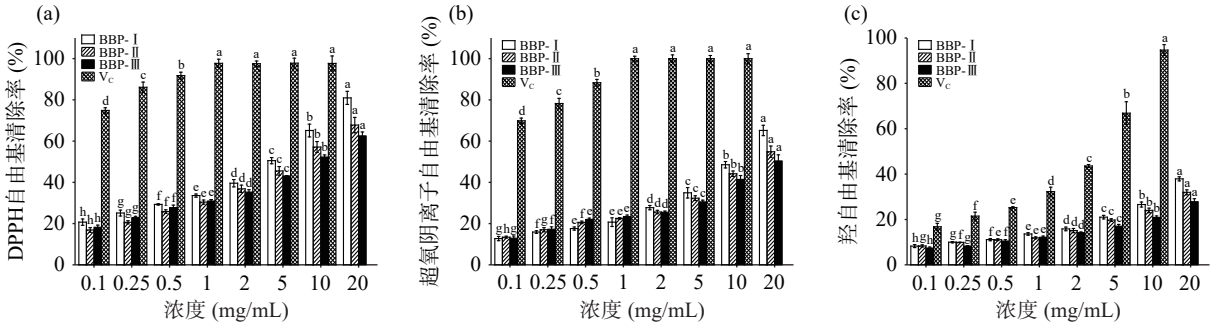


图 4　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的体外自由基清除能力

Fig.4　Free radical scavenging ability *in vitro* of BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ

注: (a)DPPH 自由基清除能力; (b)超氧阴离子自由基清除能力; (c)羟自由基清除能力。

达到最高 80.96%, IC_{50} 值为 3.049 mg/mL; 在相同浓度下, BBP-Ⅱ的自由基清除率为 67.77%, IC_{50} 值为 5.517 mg/mL; BBP-Ⅲ的清除率最低, 仅为 62.55%, IC_{50} 值为 9.411 mg/mL。对于 O_2^{-}·清除能力, BBP-Ⅰ在 20 mg/mL 时, O_2^{-}·清除率最高, 可以达到 65.16%, IC_{50} 值为 10.21 mg/mL; 该浓度下 BPP-II 和 BBP-Ⅲ的 O_2^{-}·清除率分别为 54.85% 和 50.39%。三者的超氧阴离子清除能力均显著低于其对 DPPH 自由基的清除能力, 且在低浓度下清除率提升缓慢, 高浓度下才呈现显著上升趋势。此外, 相较于对 DPPH· 和 O_2^{-}·的清除能力, 三种组分对羟自由基的清除能力整体较弱。当浓度达到 20 mg/mL 时, BBP-Ⅰ对·OH 的清除率最高仅为 37.91%, BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的清除率则分别为 31.97% 和 27.85%, 均未达到 50%, 说明三者对·OH 的清除能力有限。整体来看, BBP-Ⅰ在三种自由基清除能力中均表现出最优活性, BBP-Ⅱ次之, BBP-Ⅲ最弱, 这一趋势可能与组分间的极性大小、分子量分布及活性基团含量差异有关。

2.8 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的细胞毒性评价

为评价巴沙鱼鱼鳔肽的三个分离纯化组分 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的生物安全性, 采用 CCK-8 法检测三种组分对小鼠表皮成纤维细胞(L929 细胞)的增殖率的影响, 结果如图 5 所示。与空白对照组相比, 在浓度为 10~600 μg/mL 的区间内, 三个组分对 L929 细胞的增殖率均超过 100%, 当 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的浓度在 50 μg/mL 以上时, 三种组分能够显著促进细胞增殖(P<0.05), 当 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ的浓度在 100 μg/mL 以上时, 三种组分能够极显著促进细胞增殖(P<0.01), 并随浓度的升高呈现出明显的剂量依赖关系。其中 BBP-Ⅱ对于细胞增殖的促进作用最明显, 最高可超过 200%, BBP-Ⅰ与 BBP-Ⅲ促进 L929 细胞的增殖最高也可达到 160% 以上, 说明 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ与 BBP-Ⅲ均无细胞毒性, 并且对细胞增殖有极显著的促进作用。

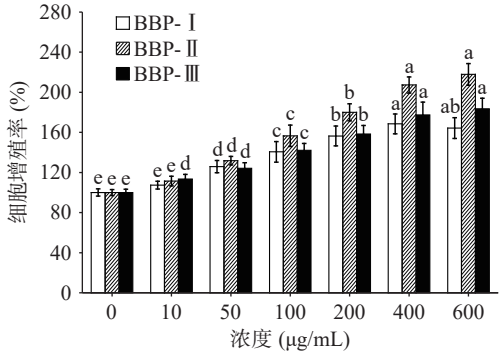


图 5 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对 L929 细胞增殖率的影响

Fig.5 Effects of BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ on proliferation rate of L929 cells

2.9 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ能够恢复 H_2O_2 诱导的 L929 衰老细胞的细胞活力

为了探究巴沙鱼鱼鳔肽是否能够恢复衰老细胞的细胞活力, 利用 1.0 mmol/L H_2O_2 建立 L929 细胞衰老模型[2], 考虑到 H_2O_2 构建的细胞衰老模型会抑制细胞的增殖, 根据 2.8 节的实验结果, 选择能够极显著促进细胞增殖(P<0.01)的最低和最高剂量来探究 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对衰老 L929 细胞的保护作用, 由于 400 mg/mL 与 600 mg/mL 的样品浓度对促进衰老细胞增殖的效果无显著差异(P>0.05), 综合考虑选择 100 mg/mL 与 400 mg/mL 的样品浓度对细胞进行培养, 结果如图 6 所示。与正常对照组细胞相比, 模型组细胞的增殖率显著降低(P<0.05); 与模型组相比, 加入巴沙鱼鱼鳔肽分离纯化组分培养的药物干预组细胞的增殖率均极显著提升(P<0.01)。其中, BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ与 BBP-Ⅲ的低浓度组(100 μg/mL)的细胞增殖率均恢复到了正常对照组的水平, 但与正常对照组没有显著差异(P>0.05), 而 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ与 BBP-Ⅲ的高浓度组(400 μg/mL)相较于正常对照组和模型组均具有统计学意义(P<0.05), 故后续以 400 μg/mL 的药物干预浓度进行细胞实验。相较于 2.8 节中未造模的 100 mg/mL 与 400 mg/mL 药物干预组, 本节造模后药物干预组中的细胞增殖率均出现了一定程度的降低, 说明造模后部分细胞出现了不可逆的细胞生长停滞, 在一定程度上表明 H_2O_2 诱导细胞进入了衰老状态。以上结果表明, BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ与 BBP-Ⅲ能够显著提高 H_2O_2 诱导的 L929 衰老细胞的细胞活力, 对延缓细胞衰老具有一定的保护作用。

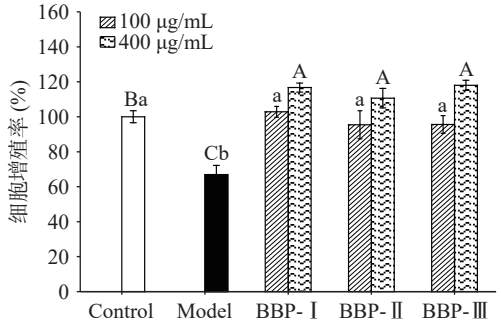


图 6 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对 H_2O_2 诱导的 L929 细胞增殖率的影响

Fig.6 Effects of BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ on proliferation rate of L929 cells treated with H_2O_2

2.10 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ能够抑制 H_2O_2 诱导的 L929 细胞衰老

β-半乳糖苷酶含量是评估细胞衰老水平的一种普遍的生物标志物。为了探究多肽组分是否对改善细胞衰老发挥作用, 对 H_2O_2 诱导的衰老 L929 细胞中的 β-半乳糖苷酶染色阳性率进行了检测。结果如图 7 所示, 正常对照组的细胞染色阳性率较低, 只占细胞总量的 12.5%, 与正常对照组相比, 模型组细胞经 H_2O_2 诱导后染色阳性率极显著升高, 达到 67.8%(P<0.01), 表明 H_2O_2 成功诱导 L929 细胞构建了应激性细胞衰老模型; 与模型组相比, 经 BBP-Ⅰ、

BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ处理后细胞中的 β-半乳糖苷酶染色细胞阳性率分别下降至 36.8%（P<0.01）、46.6%（P<0.05）和 40.7%（P<0.01），均具有统计学意义；其中，BBP-Ⅰ下降程度最大，GSH 组能够降低至接近正常对照组水平。上述结果均表明，BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ与 BBP-Ⅲ能有效地延缓 H_2O_2 诱导的 L929 细胞衰老。

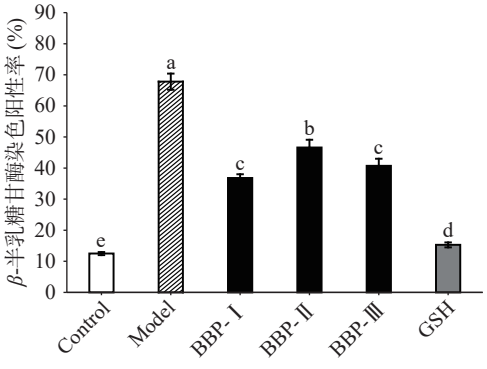


图 7　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对 H_2O_2 诱导的 L929 衰老细胞中 β-半乳糖苷酶染色阳性率的影响

Fig.7　Effects of BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ on the positive rate of senescence-associated β-galactosidase staining of L929 cells treated with H_2O_2

2.11　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对 H_2O_2 诱导的 L929 衰老细胞中抗氧化能力的影响

过氧化氢（H_2O_2）能够诱导细胞产生自由基（ROS）并导致脂质过氧化，引起氧化应激反应，导致应激性细胞衰老[17]。ROS 在细胞信号传导和体内平衡中发挥重要作用，但其水平急剧增加可能会对细胞结构造成严重损害[38−39]。丙二醛（MDA）是脂质过氧化的产物，能够衡量机体氧化损伤的程度[40]。图 8 显示了各组细胞中 ROS（a）、MDA（b）、SOD（c）和 GSH-Px（d）的含量。经 H_2O_2 诱导后，模型组细胞内的 ROS 荧光强度较正常对照组提高了 4.4 倍（P<0.01），MDA 含量显著升高（P<0.05），SOD 和 GSH-Px 的含量极显著降低（P<0.01），说明细胞内氧化还原稳态失衡，处于氧化应激状态；加入 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ与 BBP-Ⅲ处理后，L929 衰老细胞内的 ROS 荧光强度和 MDA 含量显著降低（P<0.05），SOD 和 GSH-Px 含量显著升高（P<0.05），细胞的氧化应激状态明显减轻。其中，BBP-Ⅰ组 ROS 荧光强度降低了 59.78%（P<0.01），相对于 BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ组的下降趋势更为明显；BBP-Ⅱ能使 MDA 含量降低到与 GSH 对照组相近的程度，BBP-Ⅲ提升 SOD 和 GSH-Px 的含量的效果最为明显，但和 GSH 对照组仍有一定差距。上述结果表明，BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ能够通过抑制 H_2O_2 诱导的 L929 细胞中 ROS 和 MDA 的生成，提高 SOD 和 GSH-Px 的含量，维持细胞内正常的氧化平衡，从而改善 H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤，延缓细胞衰老。

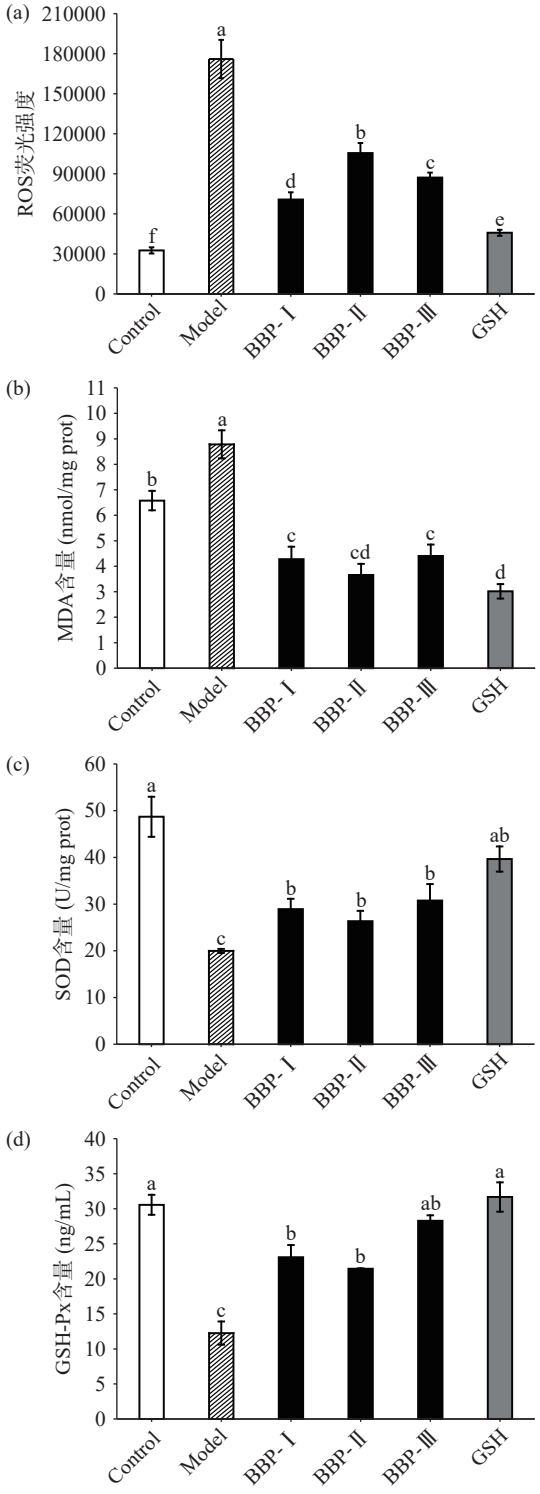


图 8　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对 H_2O_2 诱导的 L929 细胞中 ROS 荧光强度，MDA、SOD 和 GSH-Px 含量的影响

Fig.8　Effects of BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ on ROS fluorescence intensity, MDA, SOD, and GSH-Px contents of L929 cells treated with H_2O_2

注：（a）ROS 荧光强度；（b）MDA 含量；（c）SOD 含量；（d）GSH-Px 含量。

2.12　BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ能够上调 H_2O_2 诱导的 L929 衰老细胞中的胶原表达

成纤维细胞是真皮中可以合成胶原蛋白的主要细胞，其分泌的胶原蛋白能够起到延缓细胞衰老，维持和提供皮肤弹性的作用[41]。H_2O_2 诱导 L929 细胞

衰老模型可模拟衰老细胞中的 I/Ⅲ型胶原比例失衡，引发皮肤硬化、弹性下降的问题[17]。因此，评估细胞中的胶原蛋白含量变化是探究巴沙鱼鱼鳔肽是否发挥抗细胞衰老作用的一个重要指标。图 9 显示了 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对 H_2O_2 诱导的 L929 衰老细胞内Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原含量的影响。结果显示，三种组分对衰老细胞中的Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原含量有着不同程度的提升，其中 BBP-Ⅰ对细胞中Ⅰ型胶原含量提升最明显，对比模型组提升了 67%（P<0.01），对比正常对照组提升了 40%（P<0.05）；BBP-Ⅲ处理后的细胞内Ⅲ型胶原含量提升最高，相较于正常对照组提升了 54%（P<0.05），相较于模型组提升了 228%（P<0.01）。此外，BBP-Ⅱ对于细胞内两种胶原含量提升最小，但与模型组相比仍有提高；但 GSH 组对细胞中胶原含量的增加没有帮助（P>0.05），说明 GSH 可能不是通过提高胶原含量改善细胞衰老的。综上，BBP-Ⅰ和 BBP-Ⅲ可以显著上调 H_2O_2 诱导的 L929 衰老细胞中的胶原表达，改善了衰老细胞的功能衰退，延缓了细胞衰老。

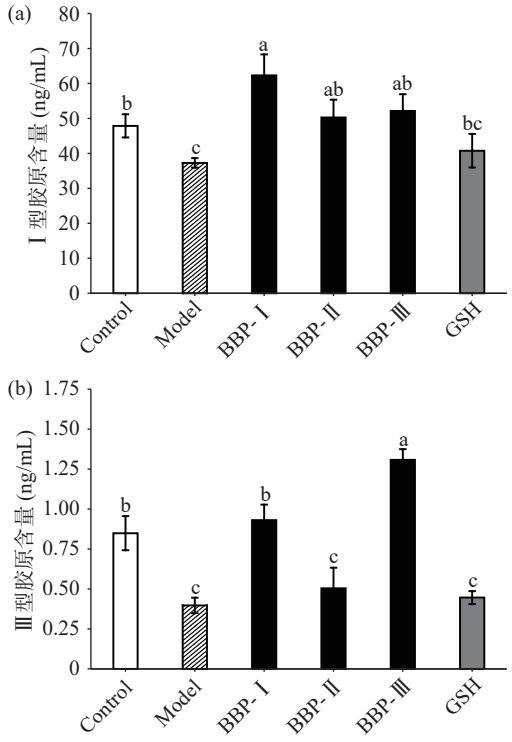


图 9 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ对 H_2O_2 诱导的 L929 细胞内Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原含量的影响

Fig.9 Effects of BBP-Ⅰ, BBP-Ⅱ, and BBP-Ⅲ on type I and type III collagen contents of L929 cells treated with H_2O_2

注：(a) Ⅰ型胶原含量；(b) Ⅲ型胶原含量。

3 结论

本研究以水解度和总还原力为指标，对巴沙鱼鱼鳔肽的酶解工艺进行优化，通过 G-10 葡聚糖凝胶柱层析对巴沙鱼鱼鳔肽进行分离纯化，得到分子量不同的三种鱼鳔肽（BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ）。三种鱼鳔肽均表现出较强的 DPPH·、O_2^-·、·OH 清除能力，且在相同浓度下 BBP-Ⅰ的自由基清除能力最强；氨基酸组成分析中，BBP-Ⅱ中疏水氨基酸含量高于 BBP-Ⅰ和 BBP-Ⅲ，BBP-Ⅰ中芳香氨基酸的含量高于 BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ，氨基酸组成的不同可能是引起三种鱼鳔肽出现抗氧化活性差异的重要原因之一。对 BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ和 BBP-Ⅲ进行细胞毒性评价，在 10~600 μg/mL 的浓度范围内，三种活性肽均无细胞毒性；利用 H_2O_2 构建氧化应激诱导的细胞衰老模型，H_2O_2 处理后，模型组细胞中出现细胞活力下降，衰老细胞增多，胶原蛋白分泌减少的现象，且细胞内 ROS 水平、MDA 含量显著升高，SOD 和 GSH-Px 含量降低，说明 H_2O_2 诱导细胞产生了氧化应激反应，引起细胞衰老，导致胶原蛋白流失；BBP-Ⅰ、BBP-Ⅱ、BBP-Ⅲ处理后，通过降低衰老细胞中 ROS 水平和 MDA 含量，提高 SOD 和 GSH-Px 含量，提高了细胞抗氧化水平，减少了氧化应激反应的发生（SIPS 诱因减少）；同时，三种活性肽能够显著恢复 L929 衰老细胞的细胞活力，抑制细胞衰老并显著上调Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白的含量，展现出良好的延缓衰老作用。上述结果表明本研究制得的巴沙鱼鱼鳔肽是良好的抗氧化活性肽资源，在延缓衰老方面表现出良好的功能活性，能够为鱼鳔资源的综合开发与高值化利用提供理论及技术支撑，有望推动水产副产物在功能性食品、护肤品及生物医药领域的应用。

© The Author(s) 2026. 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] 汪超, 陈季旺, 王聃乔, 等. 四种鱼鳔感官品质、营养成分及挥发性有机化合物分析[J]. 武汉轻工大学学报, 2024, 43(4): 1−11. [WANG Chao, CHEN Jiwang, WANG Danqiao, et al. Analysis for sensory quality, nutrients and volatile organic compounds of four swim bladders[J]. Journal of Wuhan Polytechnic University, 2024, 43(4): 1−11.]

[2] 孙彦庆, 杜芬, 朱宗敏, 等. 大黄鱼鱼鳔低聚肽的制备及其延缓皮肤衰老的研究[J]. 轻工学报, 2025, 40(1): 107−119. [SUN Yanqing, DU Fen, ZHU Zongmin, et al. Preparation of swim bladder peptide of *Pseudosciaena crocea* and its study on delaying skin aging[J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(1): 107−119.]

[3] 李丹, 王涵, 任鹏飞. 鱼鳔中胶原蛋白提取工艺及功能活性研究[J]. 中国调味品, 2024, 49(10): 70−73. [LI Dan, WANG Han, REN Pengfei. Study on extraction technology and functional activity of collagen from swim bladder[J]. China Condiment, 2024, 49(10): 70−73.]

[4] WANG Yumei, GE Mingxue, RAN Suzhen, et al. Antioxidant peptides from miiuy croaker swim bladders: Ameliorating effect and mechanism in NAFLD cell model through regulation of hypolipidemic and antioxidant capacity[J]. Marine Drugs, 2025, 23(2): 63.

[5] WU Mingfeng, XI Qinghao, SHENG Yan, et al. Antioxidant peptides from monkfish swim bladders: Ameliorating NAFLD *in vitro* by suppressing lipid accumulation and oxidative stress via regulat-

ing AMPK/Nrf2 pathway[J]. Marine Drugs, 2023, 21(6): 360.
[6] LI Na, LÜ Shiwei, MA Yujie, et al. *In vitro* antioxidant and anti-aging properties of swim bladder peptides from Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. International Journal of Food Properties, 2020, 23(1): 1416−1429.
[7] 李玉玲, 范志强, 刘雯恩, 等. 鱼鳔胶原蛋白的研究进展[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(1): 31−38. [LI Yuling, FAN Zhiqiang, LIU Wenen, et al. Research progress on collagen from fish swim bladders: A review[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2020, 35(1): 31−38.]
[8] ZHANG Mingyi, CHEN Ting, HU Jiaruo, et al. Collagen (peptide) extracted from sturgeon swim bladder: Physicochemical characterization and protective effects on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in mice[J]. Food Chemistry, 2025, 466: 142217.
[9] SHI Zhihui, ZHENG Zhilong, ZHANG Yansheng, et al. Evaluation of swim bladder-derived oligopeptides on skin nutrition and health *in vitro*[J]. Journal of Functional Foods, 2024, 122: 106500.
[10] KAMMEYER A, LUITEN R M. Oxidation events and skin aging[J]. Ageing Research Reviews, 2015, 21: 16−29.
[11] CHATTERJEE N, KIRAN S, RAM B M, et al. Diperoxovanadate can substitute for H_2O_2 at much lower concentration in inducing features of premature cellular senescence in mouse fibroblasts (NIH3T3)[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2011, 132(5): 230−239.
[12] HARMAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry[J]. Journal of Gerontology, 1956, 11(3): 298−300.
[13] PARK S. Biochemical, structural and physical changes in aging human skin, and their relationship[J]. Biogerontology, 2022, 23(3): 275−288.
[14] PIEŃKOWSKA N, BARTOSZ G, PICHLA M, et al. Effect of antioxidants on the H_2O_2-induced premature senescence of human fibroblasts[J]. Aging, 2020, 12(2): 1910−1927.
[15] TOUSSAINT O, MEDRANO E E, von ZGLINICKI T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes[J]. Experimental Gerontology, 2000, 35(8): 927−945.
[16] WANG Zhe, WEI Dandan, XIAO Hengyi. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress[M]. TOLLEFSBOL T O. Biological Aging: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2013: : 135-144.
[17] LIU X Y, XING Y, YUEN M, et al. Anti-aging effect and mechanism of proanthocyanidins extracted from sea buckthorn on hydrogen peroxide-induced aging human skin fibroblasts[J]. Antioxidants, 2022, 11(10): 1900.
[18] YANG Hui, ZHANG Qiting, ZHANG Bin, et al. Potential active marine peptides as anti-aging drugs or drug candidates[J]. Marine Drugs, 2023, 21(3): 144.
[19] SHENG Yan, WANG Wanyi, WU Mingfeng, et al. Eighteen novel bioactive peptides from monkfish (*Lophius litulon*) swim bladders: Production, identification, antioxidant activity, and stability[J]. Marine Drugs, 2023, 21(3): 169.
[20] LI Suxin, GU Jinhui, ZHONG Biluan, et al. Isolation and purification of antioxidant peptides from swim bladder of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Aquaculture and Fisheries, 2025, 10(3): 485−493.
[21] KAKATKAR A S, KUMAR V, DEBBARMA A, et al. Valorization of Basa (*Pangasius bocourti*) fish waste to prepare safe pet food and its shelf-life extension using gamma irradiation[J]. Waste and Biomass Valorization, 2024, 15(8): 4647−4656.
[22] 周先艳. 鳕鱼皮胶原蛋白水解液体外模拟消化研究及抗氧化肽的分离纯化[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2016. [ZHOU Xianyan. Study on simulated digestion of collagen hydrolysate from cod skin *in vitro* and separation and purification of antioxidant peptides [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2016.]
[23] AHMADI F, KADIVAR M, SHAHEDI M. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems [J]. Food Chemistry, 2007, 105(1): 57−64.
[24] 王婉怡. 鲸鳣鱼鱼鳔抗氧化肽的制备及其对非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)细胞模型的作用机制[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022. [WANG Wanyi. Preparation of antioxidant peptides from swimming bladder of *Lophius litulon* and their effect on cell model of non-alcoholic fatty liver disease[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022.]
[25] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.5-2016 食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission, People's Republic of China. GB 5009.124-2016 Determination of amino acids in food safety national standards[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[26] 刘楚怡, 隋海松, 车帅, 等. 海蜇、牛骨和鳕鱼皮胶原肽的透皮吸收性能研究[J]. 日用化学工业, 2017(3): 164−167,177. [LIU Chuyi, SUI Haisong, CHE Shuai, et al. Investigation of transdermal absorption performance of collagen peptides from jellyfish, bovine bone and cod skin[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2017(3): 164−167,177.]
[27] 李娜, 马玉洁, 刘楠, 等. 鳕鱼鳔胶原肽对 H_2O_2 诱导 2BS 细胞早期衰老的保护作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 101−107. [LI Na, MA Yujie, LIU Nan, et al. Protective effect of SWP on premature senescence 2BS cells induced by H_2O_2[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(10): 101−107.]
[28] 易一帆, 王越, 程宽, 等. 胶原蛋白肽的制备、生物活性及应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(23): 396−404. [YI Yifan, WANG Yue, CHENG Kuan, et al. Research progress on preparation, biological activity and application of collagen peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(23): 396−404.]
[29] 张喆, 马凌云, 尚凡凡, 等. 酶解鱿鱼皮制备 ACE 抑制肽的工艺优化及产物特性研究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(17): 252−259. [ZHANG Zhe, MA Lingyun, SHANG Fanfan, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process and characterization of ACE inhibitory peptide from squid skin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(17): 252−259.]
[30] 苏梓盈, 陆旭丽, 代亚萍, 等. 响应面法优化金鲳鱼皮抗氧化肽制备工艺及其组成分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(23): 198−207. [SU Ziying, LU Xuli, DAI Yaping, et al. Optimization of preparation process of antioxidant peptides from golden pompano (*Trachinotus ovatus*) skin by response surface method and its composition analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(23): 198−207.]

［31］ ZHAO Yuqin, ZHANG Lun, TAO Jing, et al. Eight antihypertensive peptides from the protein hydrolysate of Antarctic krill (*Euphausia superba*): Isolation, identification, and activity evaluation on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)[J]. Food Research International, 2019, 121: 197−204.

［32］ 涂宗财, 唐平平, 郑婷婷, 等. 响应面优化鱼鳔胶原肽制备工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(5): 160−166. ［TU Zongcai, TANG Pingping, ZHENG Tingting, et al. Optimization of swimming bladder collagen peptide preparation using response surface methodology and its antioxidant activity research[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(5): 160−166.］

［33］ 吴飞林, 赵明治, 张瑶, 等. 蛋白质水解酶和样品预处理优化技术在蛋白质组学研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2016, 32(3): 306−316. ［WU Feilin, ZHAO Mingzhi, ZHANG Yao, et al. Application of optimized multi-enzyme combination and sample pretreatment in proteomics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(3): 306−316.］

［34］ KARAMI Z, AKBARI-ADERGANI B. Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(2): 535−547.

［35］ SHI Y N, KOVACS-NOLAN J, JIANG B, et al. Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from eggshell membrane proteins and its protective capacity in human intestinal epithelial Caco-2 cells[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 35−45.

［36］ SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: A review[J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949−1956.

［37］ SABEENA FARVIN K H, ANDERSEN L L, OTTE J, et al. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 409−419.

［38］ KOU Z Y, YANG R, LEE E, et al. Oxidative stress modulates expression of immune checkpoint genes via activation of AhR signaling[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2022, 457: 116314.

［39］ ORTIZ G G, PACHECO MOISÉS F P, MIRELES-RAMÍREZ M, et al. Oxidative stress[M]. Stress and Inflammation in Disorders. Amsterdam: Elsevier2017: 1−31.

［40］ 马慧秀, 戴德慧, 胡小康, 等. 不同来源灵芝多糖的分离纯化、结构表征及抗衰老与应激活性研究[[J/OL]. 中国食品学报, 1−14［2026-05-26］. https://link.cnki.net/urlid/11.4528.ts.20250311.1746.004. ［MA H X, DAI D H, HU X K, et al. Purification, structural characterization and anti-aging and stress activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides from different sources[[J/OL]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 1−14［2026-05-26］. https://link.cnki.net/urlid/11.4528.ts.20250311.1746.004.］

［41］ CHUNG K Y, AGARWAL A, UITTO J, et al. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human α2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-β[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(6): 3272−3278.