

水產複方保護人類神經細胞 (SH-SY5Y) 及降低氧化傷害之能力

蔡慧君* · 何欣珺 · 楊舒涵

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘 要

本研究係將魷魚 (*Dosidicus gigas*) 皮及石蓴 (*Ulva lactuca*) 分別製備成魷魚皮酵素水解物和石蓴醣溶液，並以 7:3 之配比，研發具有高抗氧化能力的水產複方 (aquatic formula)。試驗目的係探討水產複方在過氧化氫 (hydrogen peroxide) 所誘導之氧化壓力下，對人類神經母細胞瘤細胞株 (neuroblastoma cells, SH-SY5Y) 的保護作用。MTT 試驗結果顯示，水產複方 (1.25、2.5 及 5 mg/ml) 對 SH-SY5Y 不具細胞毒性。在氧化壓力下，水產複方可藉由提高細胞內抗氧化酵素，例如超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、觸酶 (catalase, CAT) 及穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx) 等活性和降低活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的表現量，進而達到保護細胞及降低氧化傷害的效果。綜合實驗結果顯示：水產複方因具有抗氧化和保護神經細胞的雙重能力，應可作為神經退化症的保健食品之發展潛力。

關鍵詞：石蓴、魷魚皮酵素水解物、水產複方、人類神經母細胞瘤細胞株、神經退化症

前 言

生物體內在進行有氧代謝過程中會自然形成許多活性氧物質，例如過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)、超氧陰離子 (superoxide anion radical, $O_2^{\cdot-}$)、氫氧自由基 (hydroxyl radical, $\cdot OH$) 及單重態氧 (single oxygen, 1O_2) 等，當這些物質累積量超過生物體所具備之清除能力時，便會在體內造成氧化壓力 (oxidative stress)。過多的含氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 會隨機攻擊生物體內的蛋白質、DNA 和生物膜上之多元不飽和脂肪酸，從而擾亂細胞功能及其完整性 (Gardner *et al.*, 1997; Gorman *et al.*, 1996)，當這種現象發生於神經系統時，可能會誘使神經細胞凋亡 (apoptosis) 因而提高例如阿茲海默氏症 (Alzheimer's diseases) 和帕金森氏症 (Parkinson's diseases) 等神經退化性疾病的罹患率 (Finkel and Holbrook, 2000)。另研究亦指出阿茲海默氏症的成

因有很多，其中因氧化壓力所造成的細胞受損是引發該疾病發生的關鍵因子之一 (Choi *et al.*, 2006; Markesbery, 1997)。

SH-SY5Y 為人類神經母細胞瘤細胞株 (neuroblastoma cells)，由 Biedler *et al.* (1973) 自 SK-N-SH 經三次繼代所得，其某些特性與正常神經元相似，常應用於研究神經性疾病的細胞模式 (Omar *et al.*, 1998; Mandel *et al.*, 2006)。

石蓴 (*Ulva lactuca*) 為臺灣常見綠藻之一，主要分佈於北部、東北部和南部恆春半島之潮間帶，生長在岩石、沙礫或石沼中且全年可見。「本草綱目拾遺」記載：石蓴「味甘、平、無毒」，「下水、利小便」。傳統中醫學則指稱具有治療甲狀腺腫大、鎮痛解熱、降血壓及降膽固醇等療效。此外近期研究亦指出石蓴屬具有保健效果，例如孔石蓴 (*U. pertusa*) 所萃取的硫酸多醣具有螯合亞鐵、清除自由基及提升還原力等抗氧化能力 (Qi *et al.*, 2005)；硬石蓴 (*U. rigida*) 所萃得的水溶性多醣具有免疫調節的作用 (Leiro *et al.*, 2007)。石蓴因質地堅硬故鮮少食用，多用於飼料或工業原料的添加劑 (黃, 1989)，屬於低應用性及經濟性的海洋資源。又，2010 年台灣漁業年報統計資料指

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2462-3306; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw

出，魷魚類之年產量約為 15 萬公噸，在加工過程中約會產生 35% 的副產物，其中魷魚皮約佔總量 8~13% (盧等, 2008)。本研究以魷魚皮及石蓴為原料，分別製備成魷魚皮酵素水解物和石蓴醣溶液，並以 7:3 配比複合成水產複方 (aquatic formula)，以探討其在過氧化氫所誘導之氧化壓力下，是否對 SH-SY5Y 具有保護能力，期能研發有助於國人健康的保健素材，並達到活用低度利用水產資源及減少水產副產物產生之目的。

材料與方法

一、實驗材料

(一) 水產複方之製備

將石蓴藻粉以 0.5 M 鹽酸在 121°C 加熱 10 min 後，製備成石蓴醣溶液；魷魚皮以商用蛋白酵素水解製備成酵素水解物 (萃取方法擬進行技術授權，故不揭示萃取條件)。將魷魚皮酵素水解物和石蓴醣溶液以 7:3 之比例 (V/V) 所製成的溶液稱為水產複方。將水產複方經凍乾處理後 (Freeze drying system, Labcono AST Instruments Corporation, KS, U.S.A.) 備用 (蔡等, 2013)。

(二) 人類神經母細胞瘤細胞株

SH-SY5Y 購自財團法人食品工業發展研究所。

(三) 試藥

化學分析藥品購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, U.S.A.)；細胞試驗藥品購自 Gibco 公司 (Grand Island, NY, U.S.A.)。

二、實驗方法

(一) 細胞活化及繼代培養

將細胞凍結液 (1×10^6 cells/ml) 以 37°C 快速回溫後加到 DMEM-FBS medium [含 10% Fetal calf serum (FBS)、50 U/ml penicillin 及 50 mg/ml streptomycin 之 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)]，培養於 37°C、5% CO₂ 濃度

下，每 2 天更換一次新鮮培養基，待細胞活化後以 phosphate-buffered saline (PBS) 沖洗細胞二次，吸除 PBS 並加入 1 ml 胰蛋白酶 (0.25% trypsin-EDTA)，待細胞懸浮後再加入 1 ml FBS 終止胰蛋白酶反應，取 20 μ l 細胞懸浮液以血球計數盤計算細胞數，再以 1×10^5 cells/ml 進行繼代，其培養條件與上述相同 (Chang *et al.*, 2002)。

(二) MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 試驗法

參照 Ferrari *et al.* (1990) 之方法測定。MTT 分析是生物學上常用來測定細胞存活率的方法之一，其可被活細胞內的琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase) 代謝，當細胞呼吸作用旺盛時則琥珀酸去氫酶活性也越高。將細胞離心收集後調整為 5×10^3 cells/well，於 37°C、5% CO₂ 培養，待細胞貼盤後加入樣品反應 24 h，去除樣品並以 PBS 清洗 2 次再加入 100 μ l/well 的 MTT 及 YLP (yolk lipoprotein) 等比例之混合溶液，並於 37°C 反應 4 h 後，振盪 2 min，於 570 nm 測定吸光值。細胞存活率 (%) = [(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / (控制組吸光值 - 空白組吸光值)] \times 100%。本試驗的控制組為含細胞不含樣品之培養液，並視其為 100%；空白組為不含細胞及樣品之培養液。

(三) 神經細胞抗氧化酵素活性測定

1. 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性之測定

參考 Marklund 和 Marklund (1974) 之方法。鄰苯三酚 (pyrogallol) 在 pH < 7 的環境下極為穩定，但當 pH > 7 時則會發生自氧化反應進而產生超氧陰離子自由基，並以一定速率生成中間產物紅桔酚，而 SOD 可將超氧陰離子自由基歧化，使得 pyrogallol 的自氧化速率受到抑制，根據其抑制程度大小可換算 SOD 之活性。測定方法係取 10 μ l 測試液 (或 10 μ l H₂O₂) 及 10 μ l pyrogallol 加入 3 ml Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 8.2)，混合均勻後立刻以分光光度計測定 325 nm 下之吸光值，並記錄 1 min 內每 15 sec 的吸光值變化。單位 (unit) SOD 定義：在一定的測定條件

下，可使 pyrogallol 自氧化速率減少二分之一所需的酵素量。

2. 觸酶 (catalase, CAT) 活性分析

取 2×10^5 cells/ml 於 6-well 盤，以 DMEM-FBS medium 於 37°C 、5% CO_2 培養 24 h，待細胞貼盤後去除培養基，並添加樣品與細胞反應 24 h，再加入 0.2 mM 過氧化氫 (H_2O_2) 處理 24 h，依 catalase assay kit (Cayman, USA) 方法測定。以刮刀刮下細胞於 430 g (4°C) 離心 15 min 收集細胞，加入 50 μM 之 phosphate buffer (pH 7.0, containing 1 μM EDTA solution) 再以超音波破碎細胞，於 430 g (4°C) 離心 15 min。取 20 μl 上層液置入 96-well plate 後加 100 μl 之 assay buffer、20 μl 甲醇與 20 μl H_2O_2 於室溫下振盪 20 min，加入 30 μl 氫氧化鉀 (potassium hydroxide) 和 30 μl purpald (呈色劑)，於室溫下振盪 10 min，再加入 10 μl 過碘酸鉀 (potassium periodate) 於室溫下振盪 5 min 後，測定波長 540 nm (Dyne- exmrx ELISA 96-well plate reader) 之吸光值。

3. 穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx) 活性測定

測定原理為利用 GSH 為還原當量經 GPx 作用將過氧化物 cumene hydroperoxide 還原成醇類，再以 NADPH 與 glutathione reductase (GSSG-R) 將上一步反應產生的氧化態 glutathione disulfide (GSSG) 迅速轉換成還原態，伴隨著 NADPH 氧化成 NADP^+ 。測定每單位時間內 NADPH 氧化成 NADP^+ 的速率 (340 nm 下吸光值的變化情形) 得知 GPx 活性，單位 GPx 定義為每分鐘 NADPH 所氧化的微莫耳數，在反應中依序加入 620 μl 磷酸鉀緩衝溶液 (0.25 M)、200 μl GSSG-R (5 U/ml)、50 μl GSH (40 mM) 及 100 μl 之測試液混合均勻，再加入 10 μl NADPH (20 mM) 及 20 μl cumene hydroperoxide (15 mM)，混合均勻後立刻於 25°C 、340 nm 下測定 1 min 內吸光值的變化量 (Paglia *et al.*, 1967)。

(四) 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量測定

參考 Martinez and Moreno (2000) 之方法。取 5×10^5 cells 在 12-well plate 中 (含 2% 血清之培養基)，同時加入實驗樣品與最終濃度 400 μM 之 H_2O_2 ，於 37°C 、5% CO_2 之恆溫培養箱內培養 12 h，至反應終點前 30 min，再添加濃度為 20 μM 之螢光染劑 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 於培養液中，而非極性物質 DCFH-DA 滲入胞內之後，經由細胞內酯化作用，可成為非螢光極性物質 DCFH，待其進入細胞後，受胞內 H_2O_2 等氧化，使其成為螢光物 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF)，而間接量測胞內之 ROS 生成量，細胞與 DCFH-DA 於 37°C 反應 30 min，400 g 離心 10 min，去除上清液，再以 PBS 清洗 2 次，加入 0.5 ml PBS 懸浮細胞，並移置 96-well 黑盤中，以螢光分析儀 (Hitachi F-4500, Hitachi Co. Ltd., Tokyo, Japan) 偵測螢光反應 (Excitation 485 nm, Emission 527 nm)。

(五) 統計分析

實驗數據進行單項變異數分析 (One-way analysis of variance)，並以鄧肯氏多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 測定各處理組間之差異，顯著水準定為 0.05。

結果與討論

一、氧化壓力對SH-SY5Y之影響

許多研究指出—利用酵素水解動、植物性蛋白質所產製的機能性肽，已被證實具有抗過敏、抗氧化、降低膽固醇、降血壓、促進營養素吸收、調節免疫、抗衰老及預防骨質疏鬆等生理功能 (Wang and Mejia, 2005; Hartmann and Meisel, 2007; Shimizu and Dong, 2007; Wei and Chiang, 2009)。本試驗將魷魚皮酵素水解物及石蓴醣溶液，以7:3之比例 (V/V) 研製成的水產複方，經試驗已證實該樣品具有清除 DPPH 自由基、螯合亞鐵、還原力及 SOD-like 等抗氧化能力 (蔡等, 2013)。另研究指出，當氧化壓力發生於神經系統，會造成神經膠細胞 (microglia) 異常活化並分泌促發炎分子，而開啟細胞的發炎反應，在長期的發炎反應下，細胞最後會走向凋亡，並形成神經

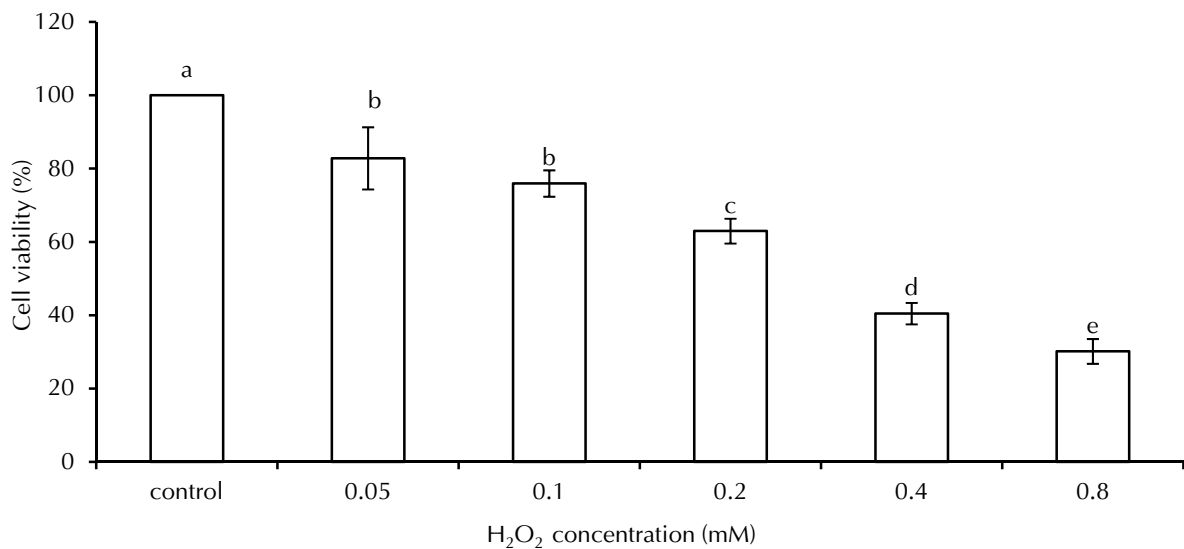


Fig. 1 Effect of H₂O₂-induced reduction in cell viability for SH-SY5Y cells. Cells were treated with different H₂O₂ concentration at 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, and 0.8 mM for 24 h, respectively. The viability of SH-SY5Y cells was assessed by using of MTT assay and presented as percentage of untreated (0 mM) control cells. The results are expressed as mean \pm SEM of four independent experiments. The data with different letters represent significant difference ($p < 0.05$) when compared to the control group.

退化症 (neurodegenerative diseases) (Colton *et al.*, 2000; Yvert *et al.*, 2000)。因此具有高抗氧化能力之素材可能具有預防或減緩神經退化症產生之潛力，故本試驗以水產複方續探討其在氧化壓力下對 SH-SY5Y 是否具有保護能力。

H₂O₂ 為一種促氧劑容易形成羥基自由基，而對神經細胞造成氧化壓力，進而破壞細胞組成及導致細胞死亡 (Rhee, 2006)。本試驗先以不同濃度 (0.05 ~ 0.80 mM) H₂O₂ 對 SH-SY5Y 施以氧化壓力並探討其對細胞存活率 (cell viability) 之影響。試驗中以不添加 H₂O₂ 為對照組 (control) 且將其細胞存活率視為 100%，當 SH-SY5Y 與不同濃度 H₂O₂ 共同培養 24 h 後，其細胞存活率與過氧化氫濃度呈現負相關，亦即濃度越高對 SH-SY5Y 所造成的氧化損傷程度越大而使細胞存活率越低 (Fig. 1)。其中 0.2 mM H₂O₂ 之處理組的細胞存活率 (62.98 \pm 3.39%) 與 Chetsawang *et al.* (2010) 之研究相近，推測 0.2 mM 的 H₂O₂ 對細胞雖可形成氧化壓力，但卻不會完全毒殺細胞，故後續實驗皆以 0.2 mM 的 H₂O₂ 作為正對照組 (positive control)。

二、水產複方在氧化壓力下對SH-SY5Y之影響

在不添加 H₂O₂ 的處理下，以 MTT 試驗法探討不同濃度 (0 ~ 5 mg/ml) 的水產複方對 SH-SY5Y 之影響，試驗結果顯示，水產複方與 SH-SY5Y 共同培養 24 h 後，不僅對 SH-SY5Y 無細胞毒性 (cytotoxicity) 且可顯著促進細胞生長，同時在 1.25、2.5 和 5 mg/ml 等濃度下，其細胞相對存活率分別為 114.45 \pm 4.67%、117.19 \pm 8.84% 及 125 \pm 3.83% (Fig. 2; without H₂O₂)，比不添加樣品之對照組均有顯著提升的趨勢。

將不同濃度的水產複方與 SH-SY5Y 共同培養 24 h 後，添加 0.2 mM H₂O₂ 再培養 24 h 藉以施予氧化壓力，來探討水產複方在氧化壓力下對 SH-SY5Y 之影響，結果顯示，0.2 mM H₂O₂ 之處理組其細胞存活率為 63.58 \pm 3.28%，然水產複方在氧化壓力下隨著試驗濃度的增加，細胞存活率亦分別提升為 74.61 \pm 8.59%、80.86 \pm 5.47% 及 89.84 \pm 9.07% (Fig. 2; with H₂O₂)，顯示水產複方在氧化壓力下可減低 H₂O₂ 所造成的氧化損傷，而提高細胞存活率。

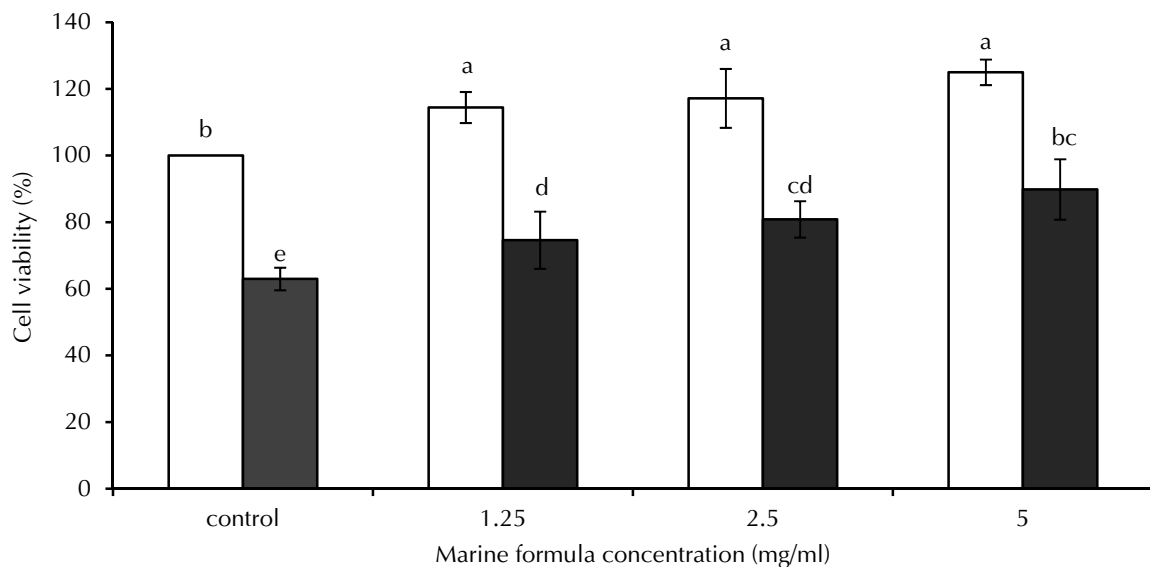


Fig. 2 Effect of cell viability for SH-SY5Y treated with the different concentration (mg/ml) of aquatic formula with or without H₂O₂. The data with different letters represent significant difference ($p < 0.05$) when compared to the control group. □ Without H₂O₂; ■ With 0.2 mM H₂O₂.

許多文獻證實利用酵素水解產製的機能性胜肽，於細胞試驗上可表現良好的生理功能，例如龍鬚菜 (*Gracilaria tenuistipitata*) 胜肽具有降低因過氧化氫所引起的 DNA 損傷的效果 (Yang *et al.*, 2012)；自 kefir grain 發酵乳原料分離出之 β -酪蛋白 (β -casein) 的特定片段胜肽具有抗高血壓效果 (朱, 2012)。依據我們先前的研究 (蔡等, 2013) 顯示，魷魚皮酵素水解物複合石蓴醃溶液以 7:3 配比所產生之水產複方，其清除 50% 自由基的有效濃度 (EC₅₀ 值) 在清除 DPPH 自由基、螯合亞鐵及還原力等皆比 3:7 配比之水產複方低，顯示水產複方中含有較多量的魷魚皮酵素水解物時，可呈現較高的抗氧化能力。另分析魷魚皮酵素水解物之組成，以分子量 (molecular weight) < 3000 Da 的胜肽最多約佔總量 80.97%。因此本試驗推測水產複方在 H₂O₂ 所造成氧化壓力下，可提高神經細胞的存活率，可能係來自魷魚皮酵素水解物中的胜肽之貢獻所致。

三、水產複方在氧化壓力下對SH-SY5Y之胞內抗氧化酵素及ROS表現量之影響

超氧歧化酶 (SOD)、觸酶 (CAT) 和穀胱甘肽過氧化酶 (GPx) 等可直接清除活性氧或抑制活

性氧之產生，是細胞內用來清除自由基的重要酵素，其中 SOD 之作用是將超氧陰離子自由基轉變成 H₂O₂ 及 O₂，再經由 CAT 和 GPx 將 H₂O₂ 分解成對身體無毒害之水和氧 (Fang *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2007)。另在一般正常生理狀態下，CAT 對於細胞而言屬非必要的，然而卻與氧化壓力的耐受度有關，其主要存在於人體各個組織中，以清除體內自由基而避免產生氧化損傷 (Turrens *et al.*, 1984; 黎和曾, 2008)。因此本試驗續探討水產複方可降低 H₂O₂ 對 SH-SY5Y 的氧化損傷而提高細胞的存活率，是否是經由提升細胞內抗氧化酵素之活性所致。

將 SH-SY5Y 在無 H₂O₂ 及水產複方的處理組視為 control，測其 SOD 活性，並將其表現量視為 $100 \pm 1.25\%$ ，當加入濃度 1.25 及 2.5 mg/ml 的水產複方時，其 SOD 活性分別顯著增加至 $109.92 \pm 0.63\%$ 和 $112.62 \pm 0.52\%$ (Fig. 3; without H₂O₂)。另將 SH-SY5Y 與 0.2 mM H₂O₂ 共同培養後，其細胞內 SOD 活性表現量與 control 組相比較，則顯著降為 $31.36 \pm 1.23\%$ ；當分別再加入濃度 1.25 及 2.5 mg/ml 的水產複方後，細胞內的 SOD 活性呈現劑量效應，其表現量分別顯著提升至 $39.4 \pm 1.41\%$ 及 $54.81 \pm 1.39\%$ (Fig. 3; with H₂O₂)，此結果表示水產複方在氧化壓

力下具有促進細胞內 SOD 活性的效果。

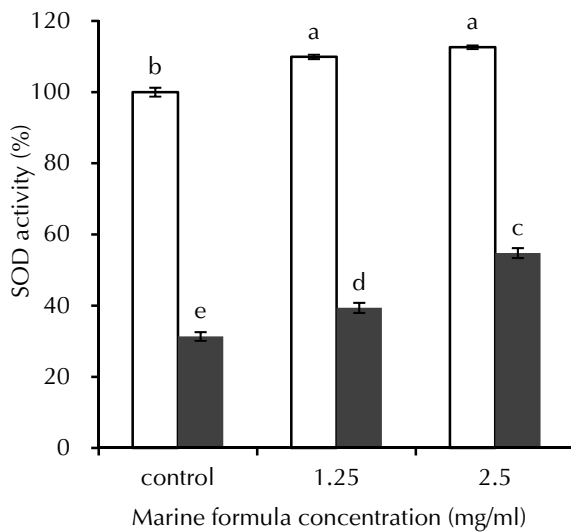


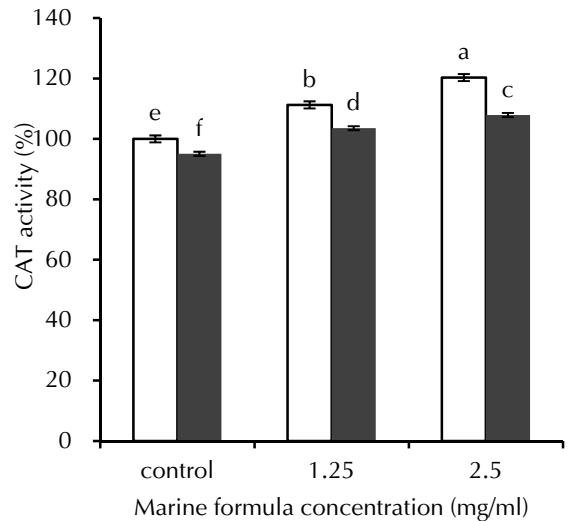
Fig. 3 Superoxide dismutase (SOD) activity of SH-SY5Y treated with different concentration (mg/ml) of aquatic formula with or without H₂O₂. The data with different letters represent significant difference ($p < 0.05$) when compared to the control group. □ Without H₂O₂; ■ With 0.2 mM H₂O₂.

試驗中，CAT 之酵素活性在無 H₂O₂ 予以氧化傷害的處理組，隨著水產複方濃度的增加，其酵素活性由 $100 \pm 1.15\%$ 分別顯著增加 $111.26 \pm 1.19\%$ 及 $120.3 \pm 1.17\%$ (Fig. 4; without H₂O₂)。另添加 0.2 mM H₂O₂ 之處理時，則使細胞內之 CAT 活性顯著降為 $95.06 \pm 0.69\%$ ；但隨著水產複方濃度的增加，其細胞內 CAT 活性表現量也隨之顯著上升，其值為 $103.56 \pm 0.66\%$ 及 $107.92 \pm 0.69\%$ (Fig. 4; with H₂O₂)，表示水產複方在氧化壓力下具有提高細胞內 CAT 表現量的效果。

GPx 廣泛存在於血液、肝臟、粒線體和細胞質中，主要功能是活化 glutathione (GSH)，直接將過氧化脂質 R-OOH 還原成醇 R-OH 或分解 H₂O₂ (黎和曾, 2008)。試驗中在不添加 H₂O₂ 亦無水產複方之處理組 (control)，其 GPx 活性為 $100 \pm 18.49\%$ ，而添加 1.25 及 2.5 mg/ml 的水產複方則可使其 GPx 活性提升為 $112.93 \pm 12.45\%$ 及 $142.24 \pm 27.36\%$ (Fig. 5; without H₂O₂)。另 0.2 mM H₂O₂ 則使細胞內 GPx 活性表現量顯著降為 $50.00 \pm 2.56\%$ ，然添加 1.25 及 2.5 mg/ml 的水產複方後，該細胞內 GPx 活性分別增

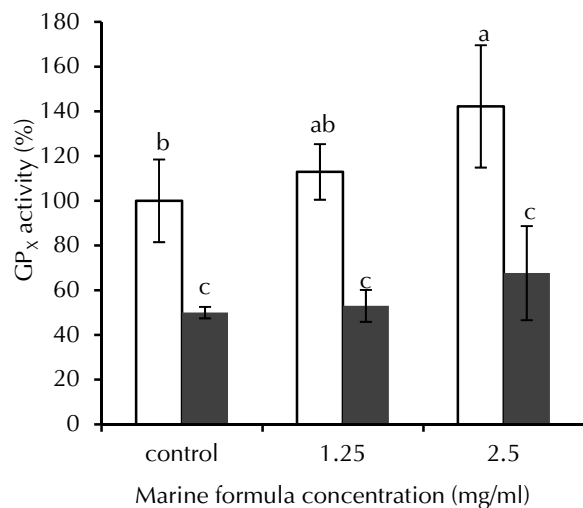
加至 $53.02 \pm 7.13\%$ 及 $67.67 \pm 21.04\%$ (Fig. 5; with H₂O₂)。整體而言，與 control 組相比較，只有添加 2.5 mg/ml 水產複方組，對 SH-SY5Y 之 GPx 活性，有顯著提升的趨勢。

Fig. 4 Catalase (CAT) activity of SH-SY5Y treated



with the different concentration (mg/ml) of aquatic formula with or without H₂O₂. The data with different letters represent significant difference ($p < 0.05$) when compared to the control group. □ Without H₂O₂; ■ With 0.2 mM H₂O₂.

Fig. 5 Glutathione peroxidase (GPx) activity of



SH-SY5Y treated with the different concentration (mg/ml) of aquatic formula with or without H₂O₂. The data with different letters represent significant difference ($p < 0.05$) when compared to the control group. □ Without H₂O₂; ■ With 0.2 mM H₂O₂.

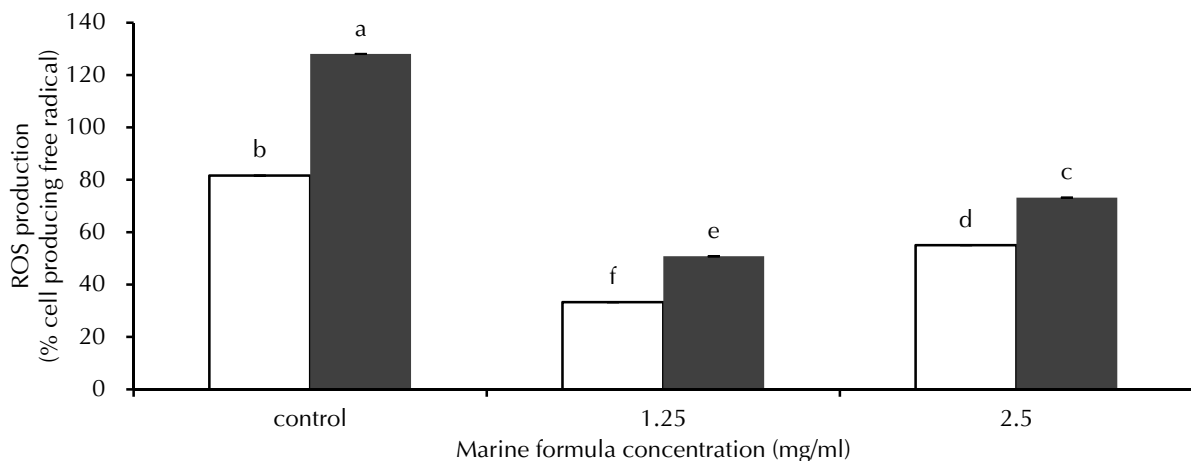


Fig. 6 Inhibition of H₂O₂-induced reactive oxygen species (ROS) production on SH-SY5Y cells by different concentration (mg/ml) of aquatic formula. The data with different letters represent significant difference ($p < 0.05$) when compared to the control group. □ Without H₂O₂; ■ With 0.2 mM H₂O₂.

細胞在正常生理代謝狀態下會產生活性氧 (ROS)，而適當濃度的 ROS 可以幫助細胞內訊息之傳遞，反之過量的 ROS 則會造成細胞毒性 (Chan *et al.*, 1986)。另研究指出，過氧化氫所引發的氧化壓力可使體內及體外的神經細胞走向凋亡途徑 (Nunomura *et al.*, 2001)，因此研究中利用 H₂O₂ 對 SH-SY5Y 施以氧化壓力，是常被用來探討神經退化的一種細胞模式 (Zhang *et al.*, 1997)。本試驗在無添加 H₂O₂ 及水產複方之 control 組，其 ROS 生成量為 $81.60 \pm 0.08\%$ ，而當添加 1.25 及 2.5 mg/ml 的水產複方時，細胞內 ROS 生成量分別顯著降為 $33.27 \pm 0.04\%$ 及 $55.07 \pm 0.04\%$ (Fig. 6; without H₂O₂)。

當添加 0.2 mM H₂O₂ 處理神經細胞時，其 ROS 含量較 control 組 (without H₂O₂) 顯著提升約 1.6 倍 ($128.07 \pm 0.05\%$)，表示 H₂O₂ 對 SH-SY5Y 可誘導其氧化壓力之產生。然在 H₂O₂ 所造成之氧化壓力下，水產複方 (1.25 及 2.5 mg/ml) 可將 SH-SY5Y 內之 ROS 生成量顯著降低為 $50.8 \pm 0.05\%$ 和 $73.2 \pm 0.07\%$ (Fig. 6; with H₂O₂)。

綜合上述結果顯示，水產複方無論是否於氧化壓力下，對 ROS 皆具有顯著的清除能力，其中又以 1.25 mg/ml 組之清除能力顯著較佳，此結果與 Lu *et al.* (2008) 之研究相似，即以 200 μ M H₂O₂ 與 primary astrocyte 共培養後，100 μ M 的試驗樣品其清除 ROS 的能力顯著比 10 μ M 之處理組低。

另，研究指出，限制熱量 (caloric restriction, CR) 可顯著降低試驗動物之腦、心、肝中粒線體的含氧自由基量，但對其體內抗氧化酵素 (例如 SOD、CAT、GPx) 的活性與表現量卻無一致性影響 (Gredilla *et al.*, 2001, 2001a; Lopez-Torres *et al.*, 2002)。在本試驗中亦發現，1.25 和 2.5 mg/ml 的水產複方，在氧化壓力下對含氧自由基具有顯著的清除能力，但其細胞內抗氧化酵素的表現量則僅有 SOD (Fig. 3; with H₂O₂) 和 CAT (Fig. 4; with H₂O₂) 有呈現增加的趨勢。

另試驗中亦發現 1.25 和 2.5 mg/ml 水產複方在正常狀態下 (without H₂O₂) 對神經細胞的存活率 (Fig. 2) 及抗氧化酵素 (SOD; GPx) 之影響 (Figs. 3 & 5)，在 2 種處理組間不僅無顯著差異，甚至 2.5 mg/ml 的水產複方抑制神經細胞中 ROS 的產生量 (Fig. 6) 卻顯著低於 1.25 mg/ml 的處理組，此趨勢亦發現以 H₂O₂ 誘導 SH-SY5Y 所產生之 ROS 並未隨水產複方濃度之增加而減少，此等結果推測係因 1.25 和 2.5 mg/ml 的水產複方其抗氧化能力相當；且在氧化壓力下神經細胞內之 GPx 的表現量 (Fig. 5; with H₂O₂) 亦未隨試驗濃度之增加而呈現增加的趨勢，可能因而無法協同 CAT 之作用，共同將 H₂O₂ 所誘導產生的含氧自由基分解成對身體無毒害之水和氧 (Fang *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2007)。但是總結而言，無論是否添加 H₂O₂ 的處理，水產複方相較於對照組，在其試驗濃度 (1.25 和 2.5 mg/ml) 內皆可顯著提升

抗氧化酵素 (SOD; CAT) 之表現量及降低 ROS 的生成量，顯示水產複方具有提升神經細胞之抗氧化能力，並達保護細胞之作用以提高細胞的存活率。

先前文獻指出，利用酵素水解蛋白質所產製的機能性胜肽具有提升細胞抗氧化之效果，例如從 Hoki (*Johnius belengerii*) 魚皮產製的 gelatin peptides 可提升 Hep3B 細胞內 SOD、CAT 和 GPx 的表現量 (Mendis *et al.*, 2005)；自 flounder fish muscle 所萃之 peptides 則可抑制 Vero 細胞 ROS 生成量 (Ko *et al.*, 2013)。而本試驗所使用的水產複方含有 70% 的魷魚皮酵素水解物，也與此等之研究結果相似，不僅可促進 SH-SY5Y 生長，且具備良好的抗氧化能力外，亦可在過氧化氫所誘導之氧化壓力下，提高細胞內抗氧化酵素之表現量，而有效清除自由基以減少 ROS 生成量，而降低細胞之氧化損傷，進而提高細胞存活率並達到保護 SH-SY5Y 之作用。

結 論

魷魚皮酵素水解物複合石蓴醣溶液所產製的水產複方，經細胞試驗證實其對 SH-SY5Y 不具細胞毒性，且具備高度抗氧化及保護神經之能力，應可作為機能保健食品新素材，同時本研究也達到活用低度利用水產資源及水產加工廢棄物，裨利水產產業永續利用之目的。

參考文獻

- 朱書宏 (2012) 以斑馬魚卵產製新穎抗高血壓胜肽. 大葉大學分子生物科技學系碩士論文.
- 黃淑芳 (1989) 認識藻類. 台灣省立博物館, 台北, 台灣, 1-54.
- 黎孝韻, 曾國慶 (2008) 自由基及抗氧化物功能的探討. 藥學雜誌, 24(2): 95-103.
- 蔡儀冠, 何欣珏, 蔡慧君 (2013) 水產複方對 3T3-L1 前脂肪細胞脂質生成之影響. 水產研究, 21(1): 61-71.
- 盧雅雯, 范繼中, 吳純衡 (2008) 自魷魚皮中萃取 PL-DHA 之技術. 水試專訊, 22: 22-24.
- Biedler, J. L., L. Helson and B. A. Spengler (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.*, 33: 2643-2652.
- Chan, T. M., E. Chen, A. Tatoyan, N. S. Shargill, M. Pleta and P. Hochstein (1986) Stimulation of tyrosine-specific protein phosphorylation in the rat liver plasma membrane by oxygen radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139: 439-445.
- Chang, R. C. C., K. C. Suen, C. H. Ma, W. Elyaman, H. K. Ng and J. Hugon (2002) Involvement of doublestranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. *J. Neurochem.*, 83: 1215-25.
- Chetsawang, J., P. Govitrapong and B. Chetsawang (2010) Hydrogen peroxide toxicity induces ras signaling in human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells. *J. Biomed. Biotechnol.*, 803815: 1-4 .
- Choi, J., M. C. Sullards, J. A. Olzmann, H. D. Rees, S. T. Weintraub, D. E. Bostwick, M. Gearing, A. I. Levey, L. S. Chin and L. Li (2006) Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J. Biol. Chem.*, 281: 10816-10824.
- Colton, C. A., O. N. Chernyshev, D. L. Gilbert and M. P. Vitek (2000) Microglial contribution to oxidative stress in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 899: 292-307.
- Fang, Y. Z., S. Yang and G. Wu (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18: 872-879.
- Ferrari, M., M. C. Fornasiero and A. M. Isetta (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods.*, 131: 165-172.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408: 239-247.
- Gardner, A. M., F. H. Xu, C. Fady, F. J. Jacoby, D. C. Duffey, Y. Tu and A. Lichtenstein (1997) Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Bio. Med.*, 22: 73-83.
- Gorman, A. M., A. McGowan, C. O'Neill and T. Cotter (1996) Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J. Neurol. Sci.*, 139: 45-52.
- Gredilla, R., A. Sanz, M. Lopez-Torres and G. Barja (2001a) Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.*, 15: 1589-1591.
- Gredilla, R., G. Barja and M. Lopez-Torres (2001) Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver

- mitochondria and location of the free radical source. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 33: 279-287.
- Hartmann, R. and H. Meisel (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotech.*, 18: 163-169.
- Ko J. Y., J. H. Lee, K. Samarakoon, J. S. Kim and Y. J. Jeon (2013) Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food Chem. Toxicol.*, 52: 113-120.
- Leiro, J. M., R. Castro, J. A. Arranz and J. Lamas (2007) Immunomodulating activities of acidic sulphated poly saccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. agardh. *Int. Immunopharmacol.*, 7: 879-888.
- Lopez-Torres, M., R. Gredilla, A. Sanz and G. Barja (2002) Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 32: 882-889.
- Lu M., L. F. Hu, G. Hu and Bian J. S. (2008) Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radic. Biol. Med.*, 45: 1705-1713.
- Mandel, S., T. Amit, L. Reznichenko, O. Weinreb and M. B. H. Youdim (2006) Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50: 229-234.
- Marksberry, W. R. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Bio. Med.*, 23: 134-147.
- Marklund, S. L. and G. Marklund (1974) Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of super oxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47: 469-474.
- Martinez, J. and J. J. Moreno (2000) Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.*, 59: 865-870.
- Mendis, E., N. Rajapakse and S. K. Kim (2005) Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agr. Food Chem.*, 53(3): 581-587.
- Nunomura, A, G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E. K. Balraj, P. K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya and S. Shimohama (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60(8): 759-767.
- Omar, M. A., E. A. R. Jakes, M. D. Curran, D. Middleton, R. Ingenito, E. Bianchi, A. Pessi, D. Neill and A. Wallace (1998) Aggregates from mutant and wild-type K-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of L-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett.*, 440: 71-75.
- Paglia, D. E. and W. N. Valentine (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70: 158-169.
- Qi, H., Q. Zhang, T. Zhao, R. Chen, H. Zhang, X. Niu and Z. Li (2005) Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (chlorophyta) in vitro. *Int. J. Biol. Macromol.*, 37: 195-199.
- Rhee, S. G. (2006) H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*, 312: 1882-1883.
- Shimizu, M. and O. S. Dong (2007) Food-derived peptides and intestinal functions. *Curr. Pharm. Design.*, 13(9): 885-895.
- Turrens, J. F., J. D. Crapo and B. A. Freeman (1984) Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.*, 73: 87-95.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39: 44-84.
- Wang W. and E. G. de Mejia (2005) A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 4: 63-78.
- Wei, J. T. and B. H. Chiang (2009) Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. *J. Sci. Food Agric.*, 89: 372-378.
- Yang, J. I., C. C. Yeh, J. C. Lee, S. C. Yi, H. W. Huang, C. N. Tseng and H. W. Chang (2012) Aqueous extracts of the edible *Gracilaria tenuistipitata* are protective against H₂O₂-induced DNA damage, growth inhibition, and cell cycle arrest. *Molecules*, 17: 7241-7254.
- Yvert, G., K. S. Lindenberg, S. Picaud, G. B. Landwehrmeyer, J. A. Sahel and J. L. Mandel (2000) Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.*, 9: 2491-506.
- Zhang L, B. Zhao, D. T. Yew, J. W. Kusiak and G. S.

Roth (1997) Processing of Alzheimer's amyloid precursor protein during H₂O₂-induced apoptosis

in human neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235(3): 845-848.

Neuroprotective Effects of a Aquatic Formula Against Oxidative Stress-induced Damage for SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells

Huey-Jine Chai*, Hsin-Chueh Ho and Shu-Han Yang

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

A aquatic formula composed of 70% squid skin hydrolysates and 30% *Ulva* sugar solution (V/V) were extracted from squid (*Dosidicus gigas*) skins and *Ulva lactuca*, respectively. The current study was conducted in order to evaluate the neuroprotective effects of aquatic formula with highly antioxidant properties on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative damage. In vitro data demonstrated that there was no cytotoxic effect on human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) when using 1.25, 2.5, and 5 mg/ml of the aquatic formula by the MTT assays. The aquatic formula in this study was also able to protect SH-SY5Y cells from H₂O₂-induced oxidative damage by increasing the intracellular antioxidant enzymes (including superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase) and lowering the total amount of reactive oxygen species (ROS).

The aquatic formula possessed dual antioxidant activities and neuron protective abilities, which could be capable of protecting SH-SY5Y cells against H₂O₂-induced oxidative damage. Thus, aquatic formula may have the potential to be developed into nutraceuticals for some neurodegenerative diseases.

Key words: *Ulva*, enzymatic hydrolysates of squid skin, aquatic formula, SH-SY5Y, neurodegenerative diseases

*Correspondence: 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 2462-2101; Fax: (02) 2462-3306; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw