

# 不同聚合度琼寡糖对肝细胞 内外抗氧化活性的影响\*

陈海敏<sup>1</sup> 马红辉<sup>1</sup> 郑立<sup>2</sup> 林伟<sup>3</sup> 严小军<sup>1</sup>

(1. 宁波大学海洋生物重点实验室 宁波 315211; 2. 国家海洋局第一研究所 青岛 266061;  
3. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 通过研究不同聚合度琼寡糖对肝细胞的内外抗氧化活性的影响,对琼寡糖聚合度与活性间的关系进行了评价。利用二苯基苦味酰肼自由基(DPPH·)检测方法研究了琼寡糖的细胞外抗氧化活性,结果表明,琼六糖具较高的淬灭自由基活性的能力。采用二氯荧光素检测方法(DCF)细胞内的活性,结果与细胞外的活性结果相吻合,并抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所造成的细胞氧化损伤及死亡。通过选用五种聚合度的琼胶寡糖,研究了其抗氧化活性,从细胞内、外两个水平说明琼六糖均有良好的清除自由基活性的能力,进一步证实琼寡糖的抗氧化作用较强。

**关键词** 琼寡糖, 抗氧化, DPPH, DCF, 肝细胞

**中图分类号** Q53

活性氧是生物体内氧化-还原反应的代谢产物,包括超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基、单线态氧、次氯酸、过亚硝酸盐等,细胞在多种因素(如细胞因子、激素、各种化学致促癌物、紫外线照射及电离辐射等)的作用下皆能产生胞内活性氧(施广璞等, 2002; Bhatia *et al*, 2003; 周站平等, 2005; 丁诗华等, 2006)。在正常生理情况下,其产生和清除维持在一个平衡状态上,但是当活性氧过多时,多余的自由基就会对机体造成损伤,因此活性氧自由基与机体的多种疾病和损伤有关,如心脑血管病、哮喘、肺气肿、白内障、溃疡、老年性痴呆、帕金森氏综合症、类风湿病、糖尿病并发症等疾病(李慧等, 2002; 方芳等, 2002; Kim *et al*, 2003)。而抗氧化活性物质的研究则能够保护机体免受自由基的损害,减少疾病的发生,延缓衰老,并使免疫细胞在慢性炎症反应中免受过多的活性氧损伤、避免并发症的产生,增强机

体免疫力等(Hong *et al*, 2004)。因此,对于食品、化妆品以及医药保健品均有重要意义。

寡糖的抗氧化作用近几年得到重视,特别是针对海洋生物寡糖产物的研究较为集中,如壳素低聚糖具有清除超氧阴离子的作用(杜世振, 2004)<sup>1)</sup>;硫酸化的低分子量壳聚糖能够抑制卵磷脂的氧化(吕志华等, 2001);海带岩藻糖硫酸酯低聚糖可以保护肝细胞内的内源性抗氧化系统(赵雪等, 2003)等。

琼胶寡糖是一类从红藻中提取的琼胶的降解产物。目前国内外针对琼胶寡糖的抗氧化研究非常多,如赵雪等(2002)曾对酶解得到的几种聚合度范围的琼寡糖的细胞外抗氧化能力进行过检测;徐强等(2002)采用酸降解法得到的琼胶寡糖具有清除羟基自由基的作用;Enoki等(2003)也曾探讨过琼寡糖抑制诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的活性。由此可见,琼胶寡糖在抗氧化领

\* 浙江省高校青年教师资助计划项目, 2005.09—2007.09; 浙江省自然科学基金资助项目, Y506132 号; 浙江省教育厅资助项目, 20051693 号。陈海敏, 博士, E-mail: chenhai@hotmail.com

① 通讯作者: xiaojunyan@hotmail.com

1) 杜世振, 2004. 甲壳素低聚糖的制备及其生理活性的研究. 青岛: 中国海洋大学, 硕士学位论文, 44—47

收稿日期: 2006-02-18, 收修改稿日期: 2006-12-20

域已经引起广泛重视,但其研究均局限在细胞外的水平上,尚缺少较系统的细胞内外的研究,无法确证其在细胞体系下的作用情况。

本文中作者运用 DPPH· 及二乙酰基 2,7-二氯荧光素(DCFH-DA)检测方法,从细胞内及细胞外两个角度对比研究五种聚合度琼寡糖的抗氧化活性,以及其聚合度与活性间的关系,探讨不同聚合度琼寡糖对肝细胞内外抗氧化活性的影响。

## 1 材料

二苯基苦味酰肼自由基(DPPH·)、二乙酰基 2,7-二氯荧光素(DCFH-DA)、MTT 购于 Sigma 公司,其余试剂皆为国产化学纯。Olympus B×60 型荧光显微镜。五种聚合度的琼寡糖样品为本实验室分离制备(Chen *et al*, 2004)。

## 2 方法

### 2.1 琼寡糖的 DPPH· 清除能力

寡糖给氢的能力按照 Moon 等(1997)的 DPPH· 方法检测。琼寡糖溶解在 50%的乙醇中, DPPH· 以 90%的乙醇配成 0.15 mmol/L 的溶液作为检测试剂。将 2  $\mu$ l 的寡糖溶液加入到 200  $\mu$ l 的 DPPH· 中于 25°C 下暗处避光反应 30 min,然后用酶标仪测定溶液在 492 nm 下的吸光值  $A$ , 结果取三次的平均值。寡糖的抗氧化能力按以下公式计算:

$$\text{抑制百分率 } I(\%) = (A_{\text{Blank}} - A_{\text{Test}}) / A_{\text{Blank}} \times 100,$$

其中  $A_{\text{Blank}}$  是空白管的吸光值( $t = 0 \text{ min}$ ),  $A_{\text{Test}}$  是测试管的吸光值( $t = 30 \text{ min}$ )。

### 2.2 细胞及细胞培养

人正常肝细胞 L-02 购于中国科学院上海细胞生化所,将 L-02 复苏后转接在 RPMI-1640 培养基中,用含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养基于 37°C 含 5%  $\text{CO}_2$  的孵箱内。

### 2.3 细胞内的二氯荧光素(DCF)实验

将 DCFH-DA 溶于甲醇中配成 1 mmol/L 的储备液,冻存于 -20°C—-80°C 条件下。将细胞加入到 96 孔板中,细胞密度为  $2 \times 10^5/\text{ml}$ , 37°C、5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养一天后以 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 190  $\mu$ l PBS, 5  $\mu$ l 不同浓度的寡糖样品,于 37°C 下放置 2 h 后加入 30 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 继续培养 45 min 后,加入 2.5  $\mu$ l DCFH-DA(最终浓度为 20  $\mu$ mol/L), 37°C 孵育 45min, 产生的荧光于荧光分光光度计下检测,激发波长为 488 nm, 发射波

长为 525 nm (Wang *et al*, 1999)。另将细胞置于荧光显微镜下拍照。

### 2.4 细胞存活实验

采用 MTT 法检测活性氧对细胞存活的影响以及琼寡糖对细胞的保护作用。首先检测不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  对细胞存活的影响,将细胞加入到 96 孔板中( $2 \times 10^5$ ), 37°C、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中孵育 1 天,加入不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 继续培养 45 min 后,加 MTT 培养 4 h, 倒掉培养基,每孔加入 150  $\mu$ l 的 DMSO, 于酶标仪上检测,波长为 492 nm (Holownia *et al*, 2004)。在确定实验中所使用的  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度后,仍然将细胞于 96 孔板中孵育 1 天后,加入不同浓度的 5 种寡糖样品, 2 h 后再加入  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 其余步骤同前。

## 3 结果与讨论

### 3.1 琼寡糖的清除 DPPH· 自由基的能力

DPPH· 在有机溶剂中是一种稳定的自由基,在 517 nm 附近有强吸收(显深紫色)。当有自由基清除剂存在时,孤电子被配对,吸收消失或减弱,因此通过测定吸收减弱的程度,可评价该自由基清除剂的活性(Siriwardhana *et al*, 2002)。本文中作者选择 5 种聚合度的寡糖,研究了其清除 DPPH· 自由基的能力。

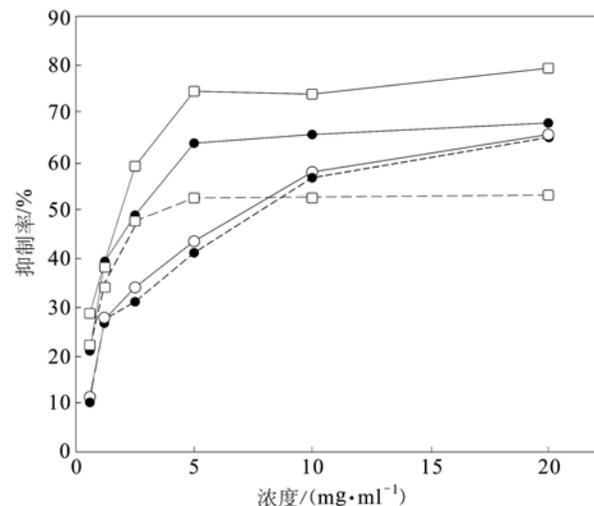


图 1 5种琼寡糖的清除DPPH· 的能力  
Fig.1 DPPH·-scavenging ability of 5 agarose oligosaccharides

—●— 二糖; —○— 四糖; —■— 六糖; —●— 八糖;  
-- -- 十糖

图 1 结果显示, 5 个样品的抑制趋势都是在低浓度时上升得非常快, 但是随浓度的升高, 其清除能力基本趋于稳定, 在 5 个样品中, 六糖具

有最高的 DPPH·清除能力,当浓度达到 5mg/ml 时,其清除率就已经达到 75%左右。八糖清除 DPPH·的能力也较好,可以达到 60%以上;四糖和二糖在低浓度时抑制效果不太好,但高浓度时与八糖的作用差不多;十糖在 5 mg/ml 时的清除率达到 50%左右后就不再上升,所以在高浓度区域,它的清除效果最差。本实验结果与赵雪等(2002、2003)的结果有所差别,在他们的实验中,含二糖和四糖的寡糖清除 DPPH·的能力强于六糖和八糖,但是含六糖和八糖的混合寡糖却有最高的清除·OH 和 O<sub>2</sub><sup>-</sup>的能力。Wang 等(2004)同样对不同分子量的酶降解琼胶寡糖的抗氧化作用进行过研究,而他们认为高分子量的寡糖(聚合度在 16—24)反而比低分子量寡糖表现出更好的抗超氧阴离子和羟基自由基的能力。Xue 等(2001)在对来源于 *Laminaria japonica* 的硫酸寡糖的研究中认为,低分子量寡糖的抗氧化活性更高。因此结合本实验结果以及前人的研究结论发现:首先,在抗氧化方面,琼胶寡糖在不同体系中的清除自由基的活性是有差异的;其次,从目前的研究状况来看,大家对这类寡糖的抗氧化作用的构效关系尚不能达到共识,结果间存在明显的差异性,这一点说明寡糖的抗氧化机制目前还不清楚,必须将机制与构效关系相结合才能够真正筛选出高活性的琼胶寡糖。

### 3.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对肝细胞的影响

目前已发现有许多化学和物理方法可以诱导细胞内产生活性氧,其中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一种强氧化剂,并且是最常用的建立细胞内活性氧产生模型的试剂。据报道,由于过氧化氢本身是一种活性氧,其进入细胞培养液后,会直接攻击细胞上的蛋白质、脂类,破坏膜系的完整性,同时会导致细胞内活性氧的进一步增多, Ca<sup>2+</sup> 产生内流,细胞受损,少量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 也会作为第二信使,引起细胞凋亡,但大量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 会造成细胞连续受损而坏死 (Hong *et al.*, 2004)。本实验中,通过在细胞培养过程中加入外源性的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 观察其导致细胞的氧化损伤程度,研究琼寡糖对活性氧产生的抑制作用,以及其对细胞氧化损伤的保护作用,因不清楚 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对肝细胞 L-02 的生长是否影响,在何种浓度下可引发活性氧的大量产生,同时又不至于造成细胞的过快死亡,作者比较了不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对肝细胞 L-02 存活的影响。

图 2 中的结果表明,高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞的影响非常大,当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 80 mmol/L 时,细胞的存活率是 10%;当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度处于 20—0.8 mmol/L 时,细胞的存活率变化不大,为 50%—65%左右。但是如果氧化剂的浓度再降低时,它对细胞的影响就非常小了,在 0.4 mmol/L 时,细胞死亡率仅有 15%左右。因此根据图 2 中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度和存活率的关系,最终选择 25 mmol/L 作为实验浓度。

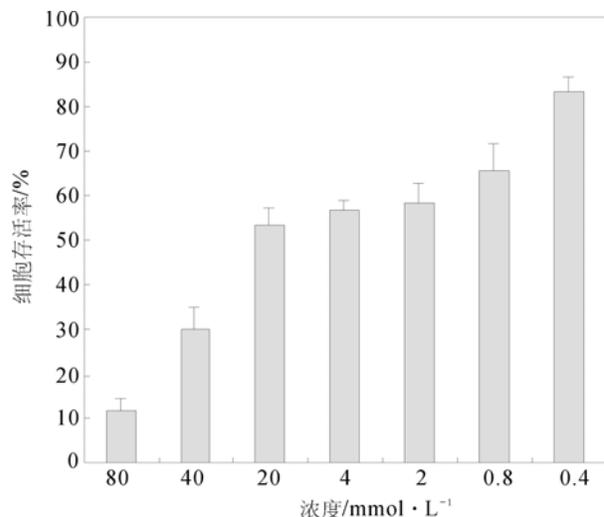


图 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞存活率的影响  
Fig.2 The impact of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell viability

### 3.3 琼寡糖的细胞内抗氧化实验

DCFH-DA 是一种细胞可穿透性的非荧光性物质,属于无选择性的氧化指示剂,能够被各种 ROS 所氧化。它在进入细胞以后,经脂酶作用脱去二乙酰基生成非荧光的 2', 7'-二氯氢化荧光素 (DCFH), DCFH 被活性氧类物质氧化以后生成发荧光的 2', 7'-二氯荧光素 (DCF), 因此通过检测荧光的强度可以判断细胞的氧化程度 (Kanski *et al.*, 2001)。

实验中采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 来激发细胞的氧化,同时观测琼寡糖对这种氧化的保护作用。

图 3 是细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 60 min 后不同浓度琼寡糖对活性氧的淬灭能力。结果表明,在 5 种聚合度的寡糖中,六、八糖的细胞内抗氧化效果最好,其抑制率在 1.000 mg/ml 时可达 50%左右,并且随浓度的降低,活性的减弱程度较小。而四糖在高浓度时有较好的抗氧化效果,随浓度降低,抗氧化性明显下降,到 0.125 mg/ml 时,它反而有

少量促氧化效果。二糖的活性并没有随浓度的降低而呈规律的下降趋势,它是在 0.250 mg/ml 时达到最低的抗氧化能力,但是与四糖情况类似,在 0.125 mg/ml 时二糖也出现了少量促氧化作用。总体而言,十糖的活性变化最小,但抗氧化能力不强。与前面的体外抗氧化活性比较,这里的结果与寡糖的清除 DPPH· 的能力相近,即六糖的抗氧化能力最高。

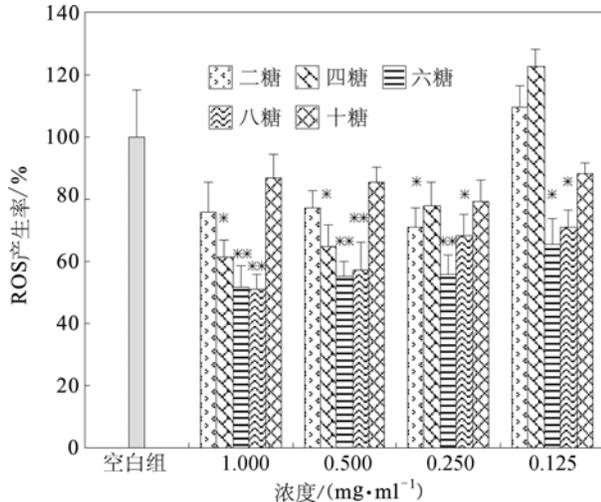


图3 不同浓度琼寡糖的细胞内抗氧化能力

Fig.3 The antioxidant activity of agarose oligosaccharide in various concentrations

结果为平均值±标准误差; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与未加寡糖的细胞比较

随后利用荧光显微镜对抗氧化能力最强的六糖的淬灭荧光能力进行了观察。从图4中可以看出明显的荧光变化,未加氧化剂的细胞中产生荧光的数量非常少,这有可能是细胞自身代谢过程中产生的少量 ROS 导致的(图4a),而仅加了氧化剂的细胞的荧光非常强(图4c),说明大部分细胞都被氧化。用 500  $\mu\text{g/ml}$  的六糖处理过的细胞中有部分细胞出现了荧光(图4b),比阴性对照多,

但明显少于阳性对照的荧光数,说明六糖起到了抑制部分活性氧产生的作用。

### 3.4 琼寡糖对活性氧致死细胞的保护作用

由于  $\text{H}_2\text{O}_2$  主要是通过细胞内产生活性氧致使细胞死亡,  $\mu\text{mol/L}$  级的  $\text{H}_2\text{O}_2$  会使细胞凋亡,而  $\text{mmol/L}$  级的  $\text{H}_2\text{O}_2$  会使细胞坏死,因为少量的活性氧可以作为细胞凋亡的第二信使起作用,但是活性氧过多,则造成细胞的严重损伤,出现急性坏死状态(Fleury *et al*, 2002)。因此抑制活性氧的产生应该能够提高细胞的存活率,实验中对琼寡糖的这种保护作用进行了研究。为了排除琼寡糖自身对细胞死亡的影响,首先利用 MTT 法测定了其对 L-02 细胞的毒性。图5显示5种寡糖样品对正常肝细胞完全没有毒性,甚至有部分促生长作用,琼二糖的促生长效果可以高达 40%。而效果最差的六糖也有 20% 的增长。这个结果说明,实验中的细胞死亡与所加的样品本身无关,而完全是  $\text{H}_2\text{O}_2$  的氧化作用所造成的,高浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  导致细胞内活性氧的过多的产生,从而引发细胞膜的脂质过氧化、DNA 损伤及坏死等现象。随即对受  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化的细胞用琼寡糖处理,结果如图6。

图6的结果表明,细胞在用  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后 2 h,存活率大大下降,存活率仅 40% 左右,与对照组相比,用高浓度的琼寡糖样品处理过的细胞,其死亡率大大降低,其中四糖的保护作用最高,其存活率提高到 65% 左右,而六八糖也有较好的保护作用,但这种保护作用与样品的浓度相关,随寡糖浓度的降低,其抑制死亡的能力也随之降低,当寡糖浓度至 0.250 mg/ml 时,细胞存活率的升高已经不再显著。

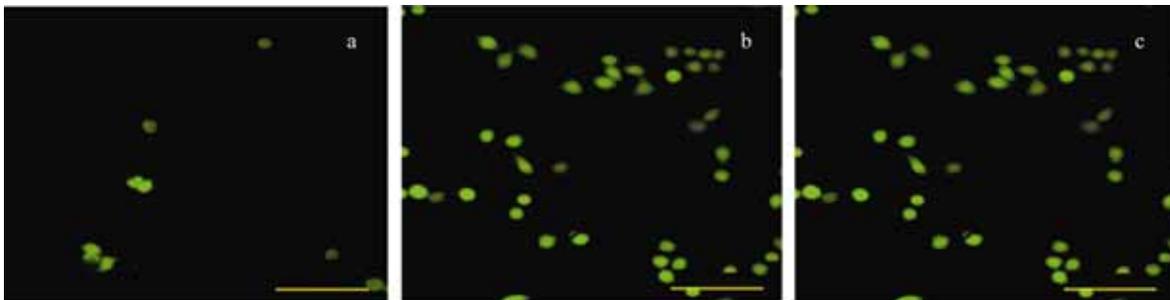


图4 琼六糖的细胞内抗氧化效果(图中比例尺为 100  $\mu\text{m}$ )

Fig.4 The intracellular antioxidant activity of agarohexaose

a. 未经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理; b. 经 500  $\mu\text{g/ml}$  琼六糖和 25 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理; c. 经 25 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理

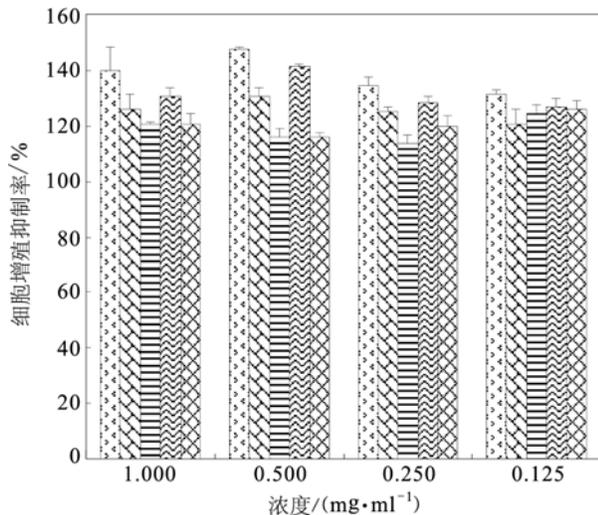


图5 琼寡糖对 L-02 细胞存活的影响(图例同图 3)  
Fig.5 The impact of agaro-oligosaccharide on survival rate of L-02 liver cells

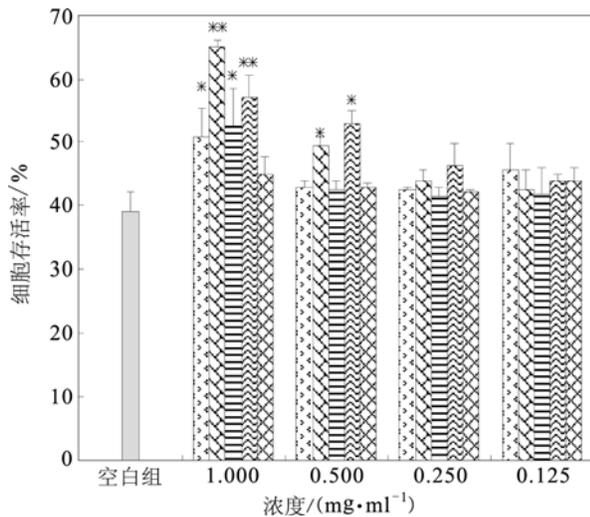


图6 琼寡糖对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后的细胞存活的影响(图例同图 3)

Fig.6 The impact of agaro-oligosaccharide on survival rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated liver cells  
结果为平均值±标准误差; \* P<0.05, \*\* P<0.01, 与 25 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的细胞比较

## 4 结论

通过选用 5 种聚合度的琼寡糖, 研究其细胞内外抗氧化作用, 从中发现琼寡糖的聚合度与抗氧化活性有密切的关系, 其中琼六糖在细胞内、外均有良好的清除自由基活性的能力, 并且琼寡糖的这种抗氧化作用能够减少肝细胞因氧化而引起的死亡现象, 证明此类寡糖具有无毒副作用的特点, 这为琼寡糖作为药源前体、保健品或化妆品添加剂提供了理论依据。

## 参考文献

- 丁诗华, 孙翰昌, 陈大庆等, 2006. 活性剂十二烷基硫酸钠对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 抗氧化功能的影响. 海洋与湖沼, 37(2): 111—117
- 方芳, 陈晓春, 朱元贵, 2002. 抗氧化作用可能是人参皂甙 Rg1 抗细胞凋亡的机制. 中国临床药理学与治疗学, 7: 412—416
- 吕志华, 于广利, 梁勇等, 2001. “916” 低聚糖抗卵磷脂氧化活性的研究. 青岛海洋大学学报, 31(1): 53—56
- 李慧, 高飞, 易静等, 2002. 白血细胞固有活性氧水平与 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 促凋亡作用的关系. 上海第二医科大学学报, 22: 486—504
- 周站平, 刘鲁宁, 陈秀兰等, 2005. 光照、变性剂和 pH 对钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 藻蓝蛋白 (APC) 抗氧化活性的影响. 海洋与湖沼, 36(2): 179—185
- 施广璞, 杜洪震, 刘子文, 2002. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致 WB-F344 细胞活性氧的产生及机理. 生物物理学报, 18(4): 462—466
- 赵雪, 薛长湖, 王静凤等, 2003. 海带岩藻糖硫酸酯低聚糖对小鼠肝损伤的保护作用. 营养学报, 25(3): 286—289
- 赵雪, 薛长湖, 徐强等, 2002. 琼胶寡糖体外清除自由基活性的研究. 中国水产科学, 9(3): 280—282
- 徐强, 薛长湖, 赵雪, 2002. 酸解法制琼胶低聚糖及其抗氧化性评价. 中国海洋药物, 1: 19—22
- Bhatia S, Shukla R, Madhu S V *et al*, 2003. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clinical Biochemistry*, 36: 557—562
- Chen H M, Zheng L, Lin W, Yan X J, 2004. Product monitoring and quantitation of oligosaccharides composition in agar hydrolysates by precolumn labeling HPLC. *Talanta*, 64: 773—777
- Enoki T, Sagawa H, Tominaga T *et al*, 2003. Drugs, foods or drinks with the use of algae-derived physiologically active substances. US Patent, 0105029 A1
- Fleury C, Mignotte B, Vayssière J L, 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84: 131—141
- Holownia A, Braszko J J, 2004. Tamoxifen cytotoxicity in hepatoblastoma cells stably transfected with human CYP3A4. *Biochemical Pharmacology*, 67: 1057—1064
- Siriwardhana S, Shahidi F, 2002. Antiradical activity of extracts of almond and its by-products. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 79: 903—908
- Hong H, Liu G Q, 2004. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC 12 cells by scutellarin. *Life Science*, 74: 2959—2973
- Kanski J, Drake J, Aksenova M *et al*, 2001. Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(N,N-dimethylamino)] benzenetellurenyl propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. *Brain Research*, 911: 12—21
- Kim K S, Lee S, Lee Y S *et al*, 2003. Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*.

- Journal of Ethnopharmacology, 85: 69—72
- Moon J H, Terao J, 1997. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 5062—5065
- Wang H, Joseph J A, 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology & Medicine*, 27: 612—616
- Wang J X, Jiang X L, Mou H J *et al*, 2004. Anti-oxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. *Journal of Applied Phycology*, 16: 333—340
- Xue C, Fang Y, Lin H *et al*, 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 13: 67—70

## AGARO-OLIGOSACCHARIDE ENHANCES THE ANTIOXIDANT PROPERTY OF LIVER CELL *IN VITRO* AND *IN VIVO*

CHEN Hai-Min<sup>1</sup>, MA Hong-Hui<sup>1</sup>, ZHENG Li<sup>2</sup>, LIN Wei<sup>3</sup>, YAN Xiao-Jun<sup>1</sup>

(1. *Key Laboratory of Marine Biology, Ningbo University, Ningbo, 315211*; 2. *The First Institute of Oceanography, Qingdao, 266061*; 3. *Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

**Abstract** The extracellular and intracellular antioxidant activities of agaro-oligosaccharide in different degrees of polymerizations (DPs) were evaluated in this paper with the establishment of a relationship between the activity and DPs. The extracellular antioxidant capability of oligosaccharides was determined by examining 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH•) radical scavenging activity. Dichlorofluorescein (DCF) assay was used to evaluate the influence of DP of agaro-oligosaccharide on antioxidant capability in normal liver cell system (L-02), which was directly oxidized by exposing to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The cellular cytotoxic impact of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and agaro-oligosaccharide on liver cell L-02 was also assessed with MTT assay. The DPPH• radical scavenging assay indicated that agarohexaose at 1.85 mg/ml concentration showed higher DPPH•-scavenging capability in IC<sub>50</sub> than agarooctaose at 2.62 mg/ml. Both agarobiose and agarotetraose showed relatively low scavenging activity at lower concentration below 8 mg/ml. Intracellular test showed that DPs of agaro-oligosaccharides could affect the antioxidation level significantly. Among 5 agaro-oligosaccharides (agarobiose, agarotetraose, agarohexaose, agarooctaose and agarodecaose), agarohexaose had the strongest protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS, and the ROS yield was decreased by half. To exclude the possibility of cellular cytotoxic property of agaro-oligosaccharides, a cell viability assay was carried out without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. The result shows that agaro-oligosaccharides exhibited no cytotoxic effects on human liver cell L-02. In contrast, the oligosaccharides especially the agarobiose could stimulate the growth of liver cells. The liver cell viability exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was as low as 60%. However, by pre-treatment with the 5 agaro-oligosaccharides, the viability was enhanced obviously. Therefore, agaro-oligosaccharides especially agarohexaose are potential antioxidants to protect cells damage caused by reactive oxygen species, exhibiting desirable effects on intercellular and extracellular ROS. These findings also stress the importance of these compounds for being potential excellent antioxidant agents.

**Key words** Agaro-oligosaccharide, Antioxidant, DPPH, DCFH-DA, Liver cell