

鸿雁雁血多肽的制备 及免疫调节作用的初步研究

王 铮¹, 赵 宇¹, 高晓晨², 孙 尧¹, 崔本海³, 高 冷^{1,*}

(1. 长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林长春 130012;

2. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林长春 130012;

3. 通榆县向海崔成大雁养殖有限公司, 吉林白城 137200)

摘要:本研究以酶解法提取雁血多肽, 探究提取工艺对水解度的影响, 以新鲜鸿雁血为原料, 通过单因素实验和响应面法优化提取工艺, 并通过 SDS-PAGE 电泳测定分子量分布, 同时采用小鼠脾淋巴细胞体外增殖检测实验, 并以超滤法和凝胶过滤层析法对雁血多肽进行分离纯化。采用 ELISA 法检测细胞因子 IL-2、IFN- γ 、PGE2 的含量。结果表明, 最佳提取工艺为酶解温度 47 $^{\circ}\text{C}$, pH7, 加酶量 4500 U/g, 此时水解度为 29.29%; 复合蛋白酶酶解效果最佳; 雁血蛋白酶解前后在不同浓度下均可促进淋巴细胞的增殖活性; 从雁血多肽中分离纯化出 3 种组分多肽; ACP1、ACP2、ACP3 均可促进小鼠淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- γ , 抑制分泌 PGE2, 且 ACP2 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下效果最佳, 由此可以判定雁血多肽具有一定的免疫调节作用, 这为雁血多肽免疫机理的深度开发提供了理论依据。

关键词: 鸿雁血, 响应面法, 小鼠脾淋巴细胞增殖, 凝胶过滤层析, 免疫调节

Preliminary Study on Preparation and Immunomodulatory Effect of *Anser cygnoides* Blood Protein Peptide

WANG Zheng¹, ZHAO Yu¹, GAO Xiao-chen², SUN Yao¹, CUI Ben-hai³, GAO Leng^{1,*}

(1. School of Chemistry and Life Sciences, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China;

2. Jilin Institute of Ginseng Science, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China;

3. Tongyu County Xianghai Cuicheng Dayan Breeding Co., Ltd., Baicheng 137200, China)

Abstract: In this study, the polypeptide of *Anser cygnoides* blood was extracted by enzyme hydrolysis and the effect of extraction process on the degree of hydrolysis was investigated. Using fresh *Anser cygnoides* blood as raw material, the extraction process was optimized by single factor tests and response surface experiment. And the molecular weight distribution was determined by SDS-PAGE electrophoresis. At the same time, mouse spleen lymphocyte proliferation assay was used in this work. The polypeptide from *Anser cygnoides* blood was separated and purified by ultrafiltration and gel filtration chromatography. The contents of cytokines IL-2, IFN- γ and PGE2 were detected by ELISA. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: The hydrolysis temperature was 47 $^{\circ}\text{C}$, the pH was 7, the amount of enzyme was 4500 U/g and the hydrolysis degree was 29.29%. The enzyme hydrolysis effect of complex protease was the best. The proliferation of lymphocytes could be promoted at different concentrations before and after the hydrolysis of *Anser cygnoides* blood protein. Three component peptides were isolated and purified from the peptides of *Anser cygnoides* blood. ACP1, ACP2 and ACP3 could promote the secretion of IL-2 and IFN- γ by mouse lymphocytes and inhibit the secretion of PGE2. The effect of ACP2 was the best at the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Thus, it could be determined that the *Anser cygnoides* blood protein polypeptide had a certain immunomodulatory effect. It would provide a theoretical basis for the deep development of immune mechanism of *Anser cygnoides* blood protein peptide.

Key words: *Anser cygnoides* blood; response surface method; mouse spleen lymphocyte proliferation; gel filtration chromatography; immunoregulation

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)13-0065-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.011

引文格式: 王铮, 赵宇, 高晓晨, 等. 鸿雁雁血多肽的制备及免疫调节作用的初步研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 65-71.

收稿日期: 2019-10-16

作者简介: 王铮(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物与功能食品, E-mail: 373395869@qq.com。

* 通讯作者: 高冷(1963-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: 308981315@qq.com。

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20190304086YY)。

鸿雁(*Anser cygnoides*)属鸟纲鸭科^[1]。雁血可作药用,据《本草纲目》、《日华本草》、《千金食治》、《随息居饮食谱》等十多部药典、食谱记载,雁血能大补五脏,养阴益气,暖胃开津,强身健体,并且对增强机体免疫力、防癌、防“三高”等具有特殊医疗功效。

我国鸿雁人工养殖场日益增加,雁血资源丰富。血液作为肉制品行业中最大的副产品,在保存与加工方面仍存在一定困难^[2],目前的应用仅限于简单制成血制品食用,或用作饲料,大部分的血液作为废料被丢弃^[3],利用率极低,这样既会对环境造成污染,又会浪费了宝贵的雁血资源^[4]。免疫系统是疾病防御的第一道防线,如今人们的不健康生活方式导致自身免疫力下降从而引发各类疾病^[5],人们可以通过食用免疫活性肽来提高自身免疫力,且无毒副作用^[6]。现阶段我国对雁血的研究甚少,因此对鸿雁血的医食性食品研究及开发具有重要意义。

本研究以向海鸿雁的新鲜血液为原料,采用生物酶解技术提取新鲜雁血中的有效成分,确定最佳酶解条件,并对有效成分进行分离纯化。采用 SDS-PAGE 电泳技术测得酶解后有效成分的分子量分布情况。本研究拟通过研究雁血多肽对小鼠脾淋巴细胞体外增殖及对 IL-2、INF- γ 与 PGE2 分泌量的影响,初步探究雁血多肽的免疫调节作用,为今后雁产品的开发及应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜鸿雁血 吉林省白城市通榆县向海崔成大雁养殖有限公司提供;清洁级小鼠(60只,雌雄各半),体质量 18~22 g 吉林大学实验动物中心提供(许可号:SYXK(吉)2016-0001);SephadexG-50 上海研卉生物科技有限公司;RPMI-1640 培养基、胎牛血清 上海联硕生物科技有限公司;白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2) ELISA 检测试剂盒、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ) ELISA 检测试剂盒、前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2) ELISA 检测试剂盒 上海晶抗生物工程有限公司;木瓜蛋白酶(400 U/mg)、中性蛋白酶(60000 U/g)、碱性蛋白酶(200000 U/g)、复合蛋白酶(400 U/mg) 苏柯汉(涨滩坊)生物工程有限公司;实验所有试剂 均为分析纯。

LQZ-211 型落地式全温振荡器 上海精宏实验设备有限公司;LGJ-30 冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司;UV-3000PC 紫外可见分光光度计 杭州俊升科学器材有限公司;TGL16M 高速冷冻离心机 长沙湘智离心机仪器有限公司;PH-050A 型恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司;ReadMax1900 型光吸收全波长酶标仪 上海闪谱生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 雁血多肽的酶解工艺研究

1.2.1.1 原料预处理 取新鲜鸿雁血 2 L,加 0.1% 的柠檬酸三钠抗凝,5000 r/min 离心 30 min,超声 2 h 破膜,5000 r/min 离心 15 min,冷冻干燥得到雁血蛋白。

1.2.1.2 酶解工艺流程 雁血蛋白 \rightarrow 蛋白酶酶解 \rightarrow 灭酶 \rightarrow 离心 \rightarrow 冷冻干燥 \rightarrow 雁血多肽

将 20 g 雁血蛋白溶于 200 mL 去离子水中,称取一定的蛋白酶,在一定的温度和 pH 下酶解一定的时间。酶解结束后,灭酶 10 min,静置冷却,5000 r/min 离心 15 min,取上清液,冷冻干燥,以备后续实验使用。

1.2.1.3 雁血多肽的蛋白酶选择 首先选用中性蛋白酶(60000 U/g)、碱性蛋白酶(200000 U/g)、木瓜蛋白酶(400 U/mg)和复合蛋白酶(以上三种蛋白酶按 1:1:1 的酶活比例组成),在每一种蛋白酶的最佳酶解条件下,利用凯氏定氮法和甲醛滴定法测定水解度^[7]。

1.2.1.4 雁血多肽单因素实验 称取 20 g 雁血蛋白 5 份分别置于烧杯中,加入 200 mL 去离子水,调节 pH 到 7 后加入 4000 U/g 的复合蛋白酶,分别在 30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 下酶解 5 h 后,将温度升至 100 $^{\circ}\text{C}$ 灭酶 10 min,完全冷却后以 5000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用凯氏定氮法和甲醛滴定法测定水解度。

称取 20 g 雁血蛋白 5 份分别置于烧杯中,加入 200 mL 去离子水,分别调节 pH 到 6、7、8、9、10 后加入 4000 U/g 的复合蛋白酶,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下酶解 5 h 后,将温度升至 100 $^{\circ}\text{C}$ 灭酶 10 min,完全冷却后以 5000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用凯氏定氮法和甲醛滴定法测定水解度。

称取 20 g 雁血蛋白 5 份分别置于烧杯中,加入 200 mL 去离子水,调节 pH 到 7 后,分别加入 2000、3000、4000、5000、6000 U/g 的复合蛋白酶,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下酶解 5 h 后,将温度升至 100 $^{\circ}\text{C}$ 灭酶 10 min,完全冷却后以 5000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用凯氏定氮法和甲醛滴定法测定水解度。

称取 20 g 雁血蛋白 5 份分别置于烧杯中,加入 200 mL 去离子水,调节 pH 到 7 后加入 4000 U/g 的复合蛋白酶,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下分别酶解 3、4、5、6、7 h 后,将温度升至 100 $^{\circ}\text{C}$ 灭酶 10 min,完全冷却后以 5000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用凯氏定氮法和甲醛滴定法测定水解度^[8]。

1.2.1.5 雁血多肽响应面优化 选取影响水解度的三个因素分别为酶解温度、pH、加酶量^[9]。采用 3 因素 3 水平响应面试验,因素与水平编码见表 1。

表 1 响应面试验因素水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

因素	水平		
	-1	0	1
A 酶解温度($^{\circ}\text{C}$)	40	50	60
B pH	6	7	8
C 加酶量(U/g)	4000	5000	6000

1.2.1.6 水解度测定 甲醛滴定法测定氨基氮含量^[10],凯氏定氮法测定样品中总氮含量^[11],按下列公式计算:

$$\text{水解度}(\%) = \frac{\text{氨基氮含量}}{\text{样品中总氮含量}} \times 100$$

1.2.2 雁血蛋白酶解前后的分子量分布测定 配制

12% 分离胶和 5% 浓缩胶。取 1 mg 样品置于 1 mL 蒸馏水中, 取 20 μL 样品溶液置于离心管中, 同时加入 20 μL 上样 Buffer, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min, 12000 r/min 离心 1 min, 取 10 μL 上清液上样。电泳仪电压 80 V, 样品通过浓缩胶后将电压调至 120 V。电泳结束后剥出凝胶, 浸泡在考马斯亮蓝 R-250 染色液中, 染色结束后将凝胶置于脱色液中, 脱色后将凝胶进行扫描获取图像^[12-13]。

1.2.3 雁血蛋白酶解前后免疫活性的比较

1.2.3.1 小鼠脾淋巴细胞悬液的制备 对小白鼠进行颈椎脱臼致死, 置于 75% 的乙醇中浸泡 5 min。在超净工作台中进行无菌分离脾脏, 放入盛有 PBS 的培养皿中。取 200 目的细胞筛, 将脾脏放于细胞筛上, 切成小块, 加入适量的全血及组织稀释液, 用注射器活塞轻轻研磨脾脏, 将细胞悬液立即转移到 15 mL 无菌离心管中, 1500 r/min 离心 20 min。用吸管吸出中间乳白色的淋巴细胞层置于 15 mL 无菌离心管中, 加入 10 mL 的 PBS 洗涤, 1000 r/min 离心 10 min 弃上清液, 再加入 5 mL 的 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞, 将细胞转移至培养瓶中置于恒温细胞培养箱备用^[14]。

1.2.3.2 小鼠脾淋巴细胞增殖实验 按 1.2.3.1 方法制备小鼠脾淋巴细胞悬液, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL 。试验分为空白组(每孔加 40 μL 的 RPMI-1640); 协同 ConA 刺激组(各组每孔分别加入未酶解雁血与雁血酶解产物 20 μL , 终浓度分别为 25、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加 ConA 20 μL , ConA 的终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每组 6 个复孔。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 培养箱中培养 45 h, 每孔加 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL , 培养箱继续孵育 4 h 后, 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 在每孔加入 150 μL 二甲基亚砷, 低速振荡 10 min, 在 570 nm 波长处测定吸光度 OD 值^[15]。

1.2.4 雁血多肽的分离纯化

1.2.4.1 超滤法分离雁血多肽 通过复合蛋白酶酶解得到雁血多肽溶液, 将雁血多肽溶液倒入分子量为 10 kDa 的超滤管中, 配平后使用 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中, 5000 r/min 离心 30 min, 取滤膜下的液体到另一离心管中, 重复 3 次得到分子量小于 10 kDa 的雁血多肽溶液^[16]。

1.2.4.2 凝胶过滤层析纯化雁血多肽 经超滤得到的雁血多肽溶液采用 Sephadex G-50 凝胶层析柱(1.6 cm \times 50 cm) 进行分离。用去离子水对凝胶柱进行平衡, 平衡 120 min 后上样, 上样量为 2 mL, 洗脱液为去离子水, 洗脱速度为 0.5 mL/min, 紫外检测波长为 280 nm, 每隔 5 min 收集各峰组分。重复上述分

离操作以得到足够的雁血多肽样品进行冷冻干燥备用^[17-18]。

1.2.5 雁血多肽的免疫功能研究 按 1.2.3.1 的方法制备的小鼠脾淋巴细胞悬液, 加入 24 孔培养板, 每孔 100 μL , 空白组细胞用完全培养基常规培养, 其余各组分别加入不同质量浓度的雁血多肽分离组分, 使各组分的终浓度分别为 25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{L}$, 再加入 ConA 使其终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{L}$, 另设 ConA 单独刺激组, 每个孔加 20 μL 的 ConA, 使其终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每组设 6 个复孔。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的培养箱中培养 48 h, 1500 r/min 离心 5 min, 收集培养上清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 参照 IL-2、IFN- γ 、PEG2 的 ELISA 检测试剂盒说明书的方法绘制标准曲线, 检测培养上清中各细胞因子的含量^[19-20]。

1.3 数据处理

每组实验重复 6 次。采用 SPSS 17.0 对数据进行统计分析, 计量资料用($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行单因素方差(ANOVA)分析和 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 酶解条件的优化

2.1.1 蛋白酶的选择结果 由表 2 可知, 不同蛋白酶在其最佳条件下水解度最高为复合蛋白酶(28.05%), 明显高于其他蛋白酶, 所以选用复合蛋白酶进行酶解实验。

2.1.2 雁血多肽的单因素实验结果 由图 1a 可知, 随酶解温度提升, 水解度呈上升趋势, 当酶解温度达到 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, 水解度最高。当温度高于 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, 水解度呈下降趋势。蛋白酶本质上是具有生理活性的蛋白质, 温度过高时蛋白质会发生变性, 减少有效酶量, 从而引起酶反应速率下降, 使得水解度下降。因此, 酶解温度选择为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。由图 1b 可知, 当 pH 达到 7 时, 水解度最高。pH 会直接影响酶和蛋白质分子某些解离基团的解离状态, 只有在特定的 pH 条件下, 酶和底物蛋白质的解离基团才能处于最易于结合并转化成产物的解离状态。因此, pH 选择为 7。由图 1c 可知, 当加酶量达到 4000 U/g 时, 水解度最高。加酶量达到一定程度后, 酶促反应速度达到最大, 水解度不再增加。由于加酶量为 300 U/g 时, 水解度较低, 因此, 加酶量选择为 4000、5000、6000 U/g。由图 1d 可知, 当酶解时间达到 5 h 时, 水解度最高。随着反应时间的增加, 可参与反应的底物量减少, 蛋白酶活性下降, 反应速率放缓直至蛋白酶完全失活, 反应几乎停顿, 水解度几乎不再增加。由于反应时间的影响相对较小, 因此选择为 5 h, 后续不再优化。

表 2 不同蛋白酶在最佳条件下的水解度

Table 2 Degree of hydrolysis of different proteases under optimal conditions

蛋白酶	最适 pH	最适温度($^{\circ}\text{C}$)	加酶量(U/g)	酶解时间(h)	水解度(%)
中性蛋白酶	7.0	50	4000	5	25.12
碱性蛋白酶	10.0	50	4000	5	17.33
木瓜蛋白酶	7.0	50	4000	5	22.80
复合蛋白酶	7.0	50	4000	5	28.05

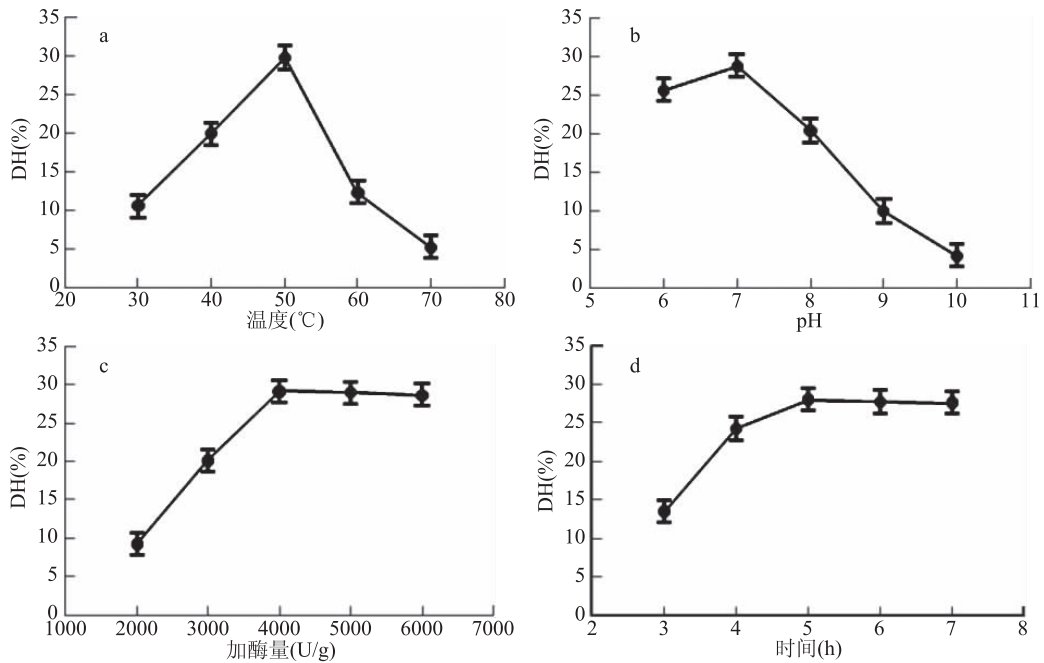


图1 雁血多肽单因素实验结果

Fig.1 Single factor tests results of *Anser cygnoides* blood peptide

2.1.3 雁血多肽响应面优化结果 如表3所示雁血多肽的响应面试验设计及结果,根据各项的回归系数建立回归模型,二次多项回归方程为:

$$Y = 29.45 - 0.45A - 0.46B - 0.48C + 0.28AB + 0.21AC + 0.27BC - 1.04A^2 - 0.82B^2 - 0.94C^2。$$

表3 雁血多肽的响应面试验设计及结果

Table 3 Response surface test design and results of *Anser cygnoides* blood peptide

实验号	A	B	C	DH(%)
1	0	0	0	29.96
2	-1	0	1	27.29
3	0	0	0	29.03
4	-1	1	0	27.25
5	0	1	-1	27.47
6	0	0	0	29.27
7	-1	-1	0	28.76
8	0	1	1	27.01
9	0	-1	-1	27.35
10	-1	0	-1	28.61
11	0	-1	-1	28.89
12	0	-1	1	27.36
13	1	1	0	26.97
14	1	0	-1	27.23
15	1	0	1	26.74
16	0	0	0	29.35
17	0	0	0	29.62

如表4所示回归模型的方差分析,回归方程的模型 $P = 0.0001$, $F = 27.35$,说明模型项差异性极显著;模型失拟项 $P = 0.9902 > 0.05$,说明失拟项不显著,表示未知因素对试验干扰较小;模型决定系数 $R^2 = 0.9723$,调整决定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9468$,说明选用的模

表4 雁血多肽响应面方差分析结果

Table 4 Response surface variance analysis result of *Anser cygnoides* blood peptide

差异来源	平方和	df	均方	F	P
模型	18.31	9	2.03	27.35	0.0001 **
A	1.64	1	1.64	22.02	0.0022 **
B	1.67	1	1.67	22.51	0.0021 **
C	1.81	1	1.81	24.26	0.0017 **
AB	0.32	1	0.32	4.29	0.0771
AC	0.17	1	0.17	2.31	0.1719
BC	0.29	1	0.29	3.85	0.0906
A ²	4.55	1	4.55	61.13	0.0001 **
B ²	2.86	1	2.86	38.45	0.0004 **
C ²	3.71	1	3.71	49.93	0.0002 **
残差	0.52	7	0.074		
失拟项	0.013	3	4.350E-003	0.034	0.9902
净误差	0.51	4	0.13		
总回归	18.83	16			

注:**表示影响极显著($P < 0.01$)。

型是适当的,该模型可以解释94.68%的响应值变化,因此回归模型理想,优化条件可靠,可用该模型对雁血蛋白的水解度进行预测分析。由回归方程各项方差分析可以看出一次项三个因素A、B、C,二次项A²、B²、C²均对雁血蛋白的水解度有极显著影响($P < 0.01$)。

图2所示的是各因素交互作用对响应值的影响。由图2可知,当酶解温度一定时,雁血多肽的水解度随着pH的增加先增加后降低,当pH一定时,雁血多肽的水解度也随着酶解温度的上升先增加后降低;当酶解温度一定时,雁血多肽的水解度随着加酶量的增加先增加后降低,当加酶量一定时,雁血多肽的水解度也随着酶解温度的上升先增加后降低;当pH一定时,雁血多肽的水解度随着加酶量的

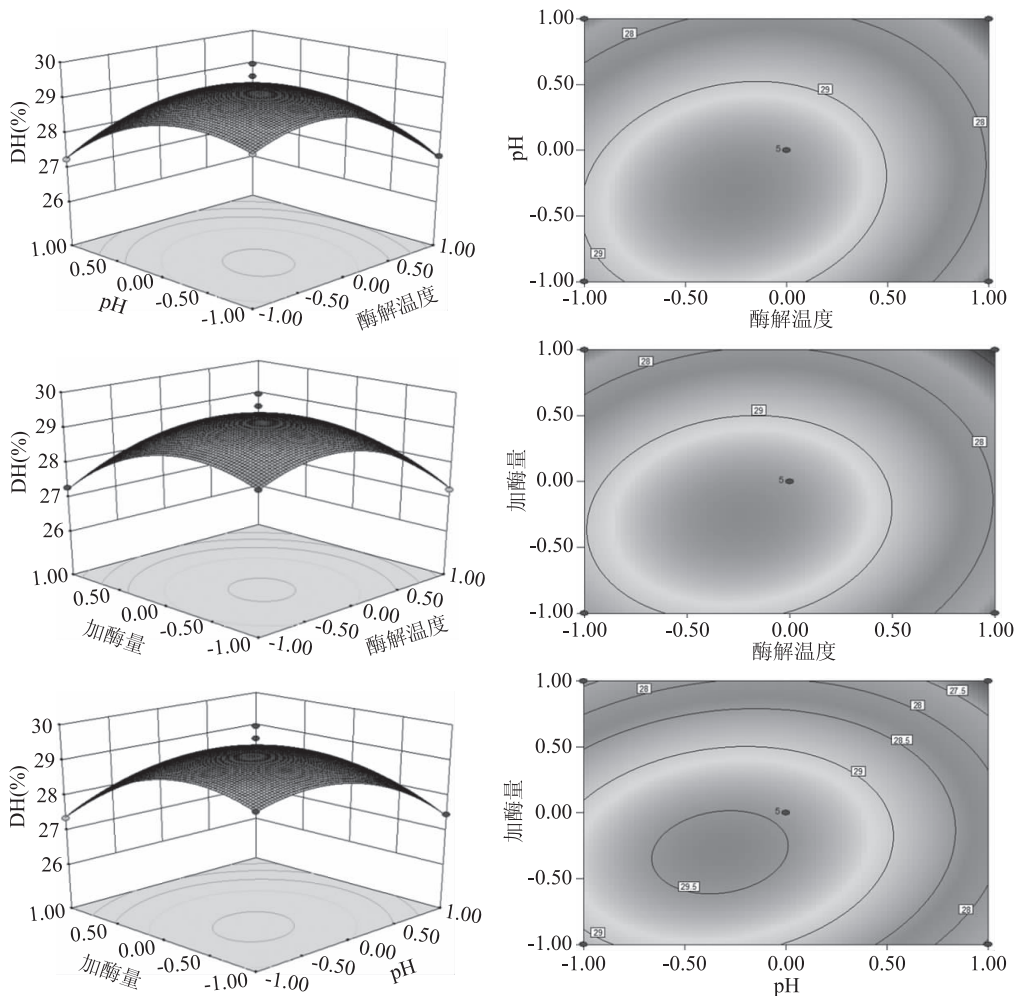


图2 各因素交互作用三维响应面图

Fig.2 Three-dimensional response surface diagram of interaction of various factors

增加先增加后降低,当加酶量一定时,雁血多肽的水解度也随着 pH 的上升先增加后降低。由此可见方差分析中虽各交互项对水解度影响不显著,但酶解温度与 pH、酶解温度与加酶量、加酶量与 pH 的交互作用仍对水解度有一定影响。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件进行分析,确定最佳酶解工艺为酶解温度 46.96 °C, pH6.61, 加酶量 4658.29 U/g, 此时水解度为 29.6839%。考虑到实验设施的可操作性,对酶解工艺进行修正:酶解温度 47 °C, pH7, 加酶量 4500 U/g, 酶解时间 5 h。进行 3 次重复实验,水解度的平均值为 29.29%, 与预测值接近,说明该响应面模型是科学有效的。

2.2 雁血蛋白酶解前后的 SDS-PAGE 电泳

由图 3 可以清晰的看出雁血蛋白酶解前后的分子量分布,泳道 3~6 与泳道 2 相比条带数明显减少,说明均有降解效果。其中泳道 3 条带数最少,说明复合蛋白酶的效果最佳,分子量在 10 kDa 以下。

2.3 雁血蛋白酶解前后对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

脾脏是机体重要的免疫器官之一,是机体进行体液免疫和细胞免疫的重要场所^[21],脾淋巴细胞的增殖,可直接反应细胞免疫情况^[22]。通过小鼠脾淋巴细胞增殖实验,观测 25、50、100、200、400 μg/mL

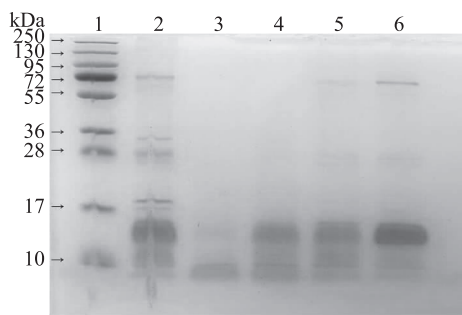


图3 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE map

注:泳道 1 蛋白 Maker(10~250 kDa);
泳道 2 未酶解空白组;泳道 3 复合蛋白酶酶解产物;
泳道 4 中性蛋白酶酶解产物;泳道 5 木瓜蛋白酶酶解产物;泳道 6 碱性蛋白酶酶解产物。

浓度水平下,雁血蛋白酶解前后对小鼠脾淋巴细胞增殖情况的影响。结果如表 5 所示,协同 ConA 作用于小鼠脾淋巴细胞时,OD 值均高于空白组,且呈一定量效关系。与空白组比较,在不同浓度下,雁血蛋白酶解前后均能协同 ConA 促进小鼠脾淋巴细胞增殖,且在 200 μg/mL 浓度水平下复合蛋白酶酶解产物效果最佳($P < 0.01$)。

表5 雁血蛋白酶解前后对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 5 Effects of pre- and post-hydrolysis of *Anser cygnoides* blood protein on proliferation of mouse spleen lymphocytes($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	未酶解雁血蛋白 OD 值	中性蛋白酶 酶解产物 OD 值	碱性蛋白酶 酶解产物 OD 值	木瓜蛋白酶 酶解产物 OD 值	复合蛋白酶 酶解产物 OD 值
空白组	0.231 ± 0.025	0.312 ± 0.017	0.282 ± 0.022	0.297 ± 0.019	0.307 ± 0.016
ConA + 25 μg/mL 组	0.282 ± 0.021	0.321 ± 0.018	0.296 ± 0.025	0.312 ± 0.017	0.329 ± 0.015
ConA + 50 μg/mL 组	0.321 ± 0.013	0.354 ± 0.016	0.334 ± 0.014	0.342 ± 0.015	0.367 ± 0.017
ConA + 100 μg/mL 组	0.337 ± 0.021	0.366 ± 0.027 *	0.343 ± 0.024	0.351 ± 0.019	0.379 ± 0.018 *
ConA + 200 μg/mL 组	0.358 ± 0.028 *	0.389 ± 0.026 **	0.371 ± 0.026 **	0.377 ± 0.030 **	0.403 ± 0.029 **
ConA + 400 μg/mL 组	0.355 ± 0.019	0.384 ± 0.015 *	0.362 ± 0.021 *	0.369 ± 0.019 *	0.397 ± 0.020 **

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;表6同。

表6 ACPI、ACP2、ACP3 对小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- γ 、PGE2 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 6 Effects of ACPI, ACP2 and ACP3 on the secretion of IL-2, IFN- γ and PGE2 by mouse spleen lymphocytes($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度(μg/mL)	IL-2 含量(pg/mL)	IFN- γ 含量(pg/mL)	PGE2 含量(pg/mL)
空白组		57.76 ± 5.81	51.07 ± 4.12	255.43 ± 21.37
ConA 单独刺激组	5	65.23 ± 5.03 *	62.15 ± 5.02 *	230.13 ± 20.05 *
ConA + ACPI 组	5 + 25	72.42 ± 6.23 *	67.53 ± 5.23 *	224.57 ± 19.21 *
	5 + 50	83.73 ± 7.15 *	76.41 ± 6.62 *	208.75 ± 17.86 *
	5 + 100	93.92 ± 8.07 **	87.53 ± 6.13 **	189.63 ± 16.21 *
	5 + 200	92.21 ± 9.31 **	84.89 ± 6.71 *	188.37 ± 15.92 *
	5 + 400	92.21 ± 9.31 **	84.89 ± 6.71 *	188.37 ± 15.92 *
ConA + ACP2 组	5 + 25	74.28 ± 5.41 *	68.61 ± 5.86 *	219.36 ± 18.24 *
	5 + 50	85.52 ± 7.39 *	77.88 ± 6.73 *	201.75 ± 17.31 *
	5 + 100	95.71 ± 8.21 **	88.92 ± 6.21 **	181.55 ± 16.82 **
	5 + 200	93.96 ± 7.97 *	86.03 ± 6.12 *	180.54 ± 16.11 *
	5 + 400	93.96 ± 7.97 *	86.03 ± 6.12 *	180.54 ± 16.11 *
ConA + ACP3 组	5 + 25	70.31 ± 5.76 *	65.87 ± 5.73 *	234.47 ± 19.59 *
	5 + 50	81.67 ± 6.89 *	74.38 ± 6.57 *	216.33 ± 18.02 *
	5 + 100	91.86 ± 7.92 **	85.27 ± 6.01 **	195.56 ± 17.15 *
	5 + 200	90.35 ± 8.52 *	82.81 ± 6.22 *	194.01 ± 15.97 *
	5 + 400	90.35 ± 8.52 *	82.81 ± 6.22 *	194.01 ± 15.97 *

2.4 雁血多肽分离纯化结果与分析

图4所示,雁血多肽经 Sephadex G-50 凝胶层析柱分离,250 min 后得到3个明显主峰,分别将其命名为 ACPI、ACP2、ACP3。

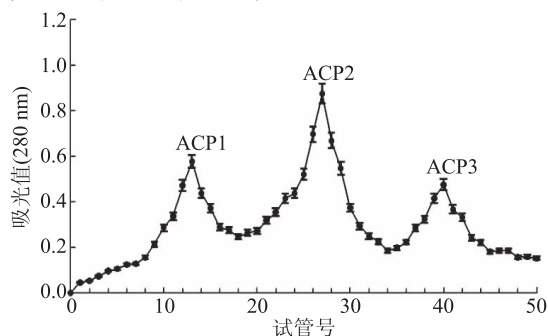


图4 雁血多肽的凝胶层析 Sephadex G-50 洗脱曲线
Fig.4 Eluting curve of *Anser cygnoides* blood polypeptide by gel chromatography Sephadex G-50

2.5 ACPI、ACP2、ACP3 对脾脏淋巴细胞分泌 IL-2、INF- γ 与 PGE2 的影响

IL-2 是 T 细胞生长因子,能刺激其他 T 淋巴细胞衍生的细胞因子的合成^[23]。IFN- γ 可调节癌基因的表达,抑制肿瘤细胞的分裂增殖^[24-25]。PGE2(前列腺素 E2)是花生四烯酸经过环加氧酶催化的代谢产

物,是重要的炎症因子,与多种疾病的发生发展有关^[26-27]。由表6可见,ConA 组 IL-2、IFN- γ 分泌水平平均高于空白组,PGE2 均低于空白组。ACPI、ACP2、ACP3 能协同 ConA 促进小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- γ ,其分泌量均高于空白组并呈一定的量效关系,差异具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。而与空白组比较,ConA 协同 ACPI、ACP2、ACP3 中的 PGE2 含量均有降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$),其中3种组分多肽在100和200 μg/mL 浓度下效果较好,且 ACP2 在100 μg/mL 浓度下效果最佳。

3 结论

在制备雁血多肽时,确定最佳酶解工艺为酶解温度 47 °C, pH7,加酶量 4500 U/g,此时多肽水解度为 29.29%,且使用复合蛋白酶酶解效果最佳;雁血蛋白酶解前后均能够明显促进小鼠脾淋巴细胞增殖,且在 200 μg/mL 浓度水平下复合蛋白酶酶解产物效果最佳;对雁血多肽进行分级洗脱,得到 ACPI、ACP2、ACP3;ACPI、ACP2、ACP3 能够明显提升 IL-2、INF- γ 和降低 PGE2 的分泌量,且 ACP2 在 100 μg/mL 浓度下效果最佳。综上所述,雁血多肽能够促进机体细胞免疫功能,具有一定的免疫调节性,且 ACP2 效果最明显,为雁血多肽在免疫调节方面的合理应用及产品开发提供了有效的实验数据。

参考文献

- [1] 王志新. 科学引领大雁产业发展[J]. 吉林林业科技, 2018, 47(6):41-43.
- [2] 吴宇. 从鸭血中提取血肽素及其性质、应用研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2009.
- [3] 布冠好, 姬莉莉, 王琳珍, 等. 鹅血红蛋白抗氧化活性肽的制备及工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3):201-204.
- [4] 张崧, 刘文龙, 熊伟, 等. 响应面法优化酶解猪血制备血红素工艺[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(20):101-106.
- [5] 王秋楹, 庞广昌, 陈庆森. 免疫活性肽的研究进展与展望[J]. 食品科学, 2002, 23(7):136-139.
- [6] 曹靖文, 黄占旺, 吴少福, 等. 纳豆菌糖肽对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 现代食品科技, 2015, 31(9):61-67.
- [7] Zhao Q, Wang X, Liu H, et al. Structural characterization of Chinese quince fruit lignin pretreated with enzymatic hydrolysis[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 262(262):212-220.
- [8] 周洁静, 侯银臣, 刘旺旺, 等. 羊胎盘提取残余物免疫肽制备工艺的优化[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(3):129-134.
- [9] 张亚茹, 闫海强, 杨最素, 等. 青蛤多肽的酶法制备及对前列腺癌 DU-145 细胞的抑制活性[J]. 食品科学, 2019, 40(11):167-174.
- [10] 王剑锋, 孙爽, 李瑶, 等. 甲醛滴定法测定牛血清白蛋白的酶解度[J]. 大连民族学院学报, 2012, 14(5):441-444.
- [11] 金根娣, 马武生, 刘俊. 凯氏定氮法测定吡拉西坦含量的研究[J]. 扬州职业大学学报, 2019, 23(1):26-29.
- [12] Elia G. Cell surface protein biotinylation for SDS-PAGE analysis[J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2019, 1855(1855):449-459.
- [13] 徐亚军, 李珂, 刘珂珂, 等. 大豆根瘤内生菌全细胞可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱分析[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(11):159-165.
- [14] Festus B C O, Damian C O, Chukwuemeka S N, et al. Modulation of intracellular expression of IFN γ and IL-2 in culture of splenic T lymphocytes by some flavonoid glycosides of *Alchornea floribunda* [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2016, 54(9):1873-1880.
- [15] 马玉芳, 郑小香, 衣伟萌, 等. 金线莲多糖对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞体外增殖、分泌 NO 及细胞因子的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1):21-26.
- [16] 李可. 蛭螬多肽的提取纯化及其免疫调节作用的研究[D]. 北京: 北京农学院, 2019.
- [17] Duan G, Yu X. Isolation, purification, characterization, and antioxidant activity of low-molecular-weight polysaccharides from *Sparassis latifolia* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 137(137):1112-1120.
- [18] 王帅, 刘剑利, 霍雅鹏, 等. 小米抗氧化肽的纯化及其抑制 H₂O₂ 诱导损伤的胰岛素瘤细胞氧化应激作用[J]. 食品科学, 2018, 39(19):169-174.
- [19] Maciel G S, Uscategui R R, de Almeida V T, et al. Quantity of IL-2, IL-4, IL-10, INF- γ , TNF- α and KC-like cytokines in serum of bitches with pyometra in different stages of oestrous cycle and pregnancy[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2014, 49(4):701-704.
- [20] 管咏梅, 张建林, 刘佳, 等. 雷公藤甲素微乳凝胶对 CIA 大鼠 T 细胞相关因子调节作用研究[J]. 世界中医药, 2019, 14(7):1635-1638.
- [21] 韩德军, 夏宁, 郑双, 等. 狼毒大戟多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖及细胞因子分泌的影响[J]. 中国医学创新, 2018, 15(24):26-28.
- [22] 李丹, 苏冀彦, 苏璐, 等. 喂食蛹虫草的小鼠血清对小鼠脾淋巴细胞增殖及活化的影响[J]. 食用菌学报, 2019, 26(2):72-82.
- [23] André B T, Amber P. Mechanisms of action of low-dose IL-2 restoration therapies in SLE [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2019, 61(61):39-45.
- [24] 米仁沙·牙库甫, 丛媛媛. 阿里红多糖组分对小鼠脾淋巴细胞免疫功能的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(16):191-196.
- [25] Zheng X D, Xie T L, Lin Y, et al. Immune response and mechanisms of IFN- γ in administration for keratomycosis [J]. *Ocular Immunology and Inflammation*, 2019, 27(6):958-967.
- [26] Anna L P, Małgorzata B, Marzanna J, et al. Parainfluenza virus infection enhances NSAIDs-induced inhibition of PGE2 generation and COX-2 expression in human airway epithelial cells[J]. *Advances in Medical Sciences*, 2019, 64(2):338-343.
- [27] 王曼. PGE2/EP2R 信号通路上调 NLRP3 炎性小体活性促进 DR 发生发展的作用及机制研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2019.
- [28] Dehghannya J, Hosseinalar S H, Heshmati M K. Multi-stage continuous and intermittent microwave drying of quince fruit coupled with osmotic dehydration and low temperature hot air drying[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2018, 45:132-151.
- [29] 张慧, 张裕仁, 杨佳, 等. 响应面法优化香菇热风-微波联合干燥工艺[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14):214-221, 232.
- [30] 魏来, 唐道邦, 傅曼琴, 等. CO₂ 浸渍处理对生姜热风间歇微波联合干燥动力学及品质的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9):204-213.
- [31] Tao Y, Han M, Gao X, et al. Applications of water blanching, surface contacting ultrasound-assisted air drying, and their combination for dehydration of white cabbage: Drying mechanism, bioactive profile, color and rehydration property [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 53:192-201.
- [32] 黄姬俊. 香菇微波真空干燥技术的研究[D]. 福建: 福建农林大学, 2010.

(上接第 64 页)

及其动力学模型[J]. 农业工程学报, 2012(S1):262-266.

[27] 彭郁, 赵丹丹, 李莱, 等. 白萝卜间歇微波热风耦合干燥过程干燥特性分析[J]. 食品科学, 2017, 38(17):85-93.

[28] Dehghannya J, Hosseinalar S H, Heshmati M K. Multi-stage continuous and intermittent microwave drying of quince fruit coupled with osmotic dehydration and low temperature hot air drying[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2018, 45:132-151.

[29] 张慧, 张裕仁, 杨佳, 等. 响应面法优化香菇热风-微波联合干燥工艺[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14):214-221, 232.