

鲍鱼水解肽的抗氧化、 抗炎及免疫调节作用

王 敏¹, 卢 赛¹, 张曾亮², 邹圣灿¹, 丁 伟¹, 李丽杰^{1,*}, 王尚龙^{1,*}

(1. 青岛颐圣康和生物制药有限公司, 山东青岛 266100;

2. 内蒙古医科大学中医学院, 内蒙古呼和浩特 010110)

摘 要:探讨了复合酶解法制备的鲍鱼水解肽(AHP)的理化性质以及抗氧化、抗炎、调节免疫的作用效果。以自由基清除能力为依据,研究了其抗氧化能力;以对LPS诱导小鼠肺泡巨噬细胞(MH-S)白细胞介素与肿瘤坏死因子 α (TNF- α)分泌活性的影响为依据,研究其抗炎作用;经口灌胃给予小鼠0.02、0.10、0.20 g/kg·bw三个剂量组的AP,测定小鼠体重、脏器/体重比值、迟发型变态反应、碳廓清和NK细胞活性变化,验证其对免疫功能的影响。结果表明,本研究的鲍鱼水解肽具有较强的清除DPPH自由基、ABTS自由基和超氧阴离子自由基能力,1.0 mg/mL的鲍鱼水解肽对DPPH自由基、超氧阴离子自由基的清除率分别可达到84.06%、69.74%,0.10 mg/mL的鲍鱼水解肽对ABTS自由基的清除率可达到62.41%;10 μ g/mL AP组显著抑制LPS诱导MH-S细胞分泌IL-1 β 、IL-6、TNF- α 活性($P < 0.05$),50、100 μ g/mL AP组抑制效果极显著($P < 0.01$);中剂量AP组显著增强NK细胞活性($P < 0.05$);高剂量AP组显著促进小鼠的单核-巨噬细胞碳廓清功能($P < 0.05$),极显著增强NK细胞活性($P < 0.01$),从而达到调节免疫的作用。结论:鲍鱼水解肽具有较好的抗氧化性,同时具有抗炎和免疫调节作用。

关键词:鲍鱼水解肽,自由基清除率,抗炎,免疫调节

Antioxidant, Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of Abalone Hydrolytic Peptide

WANG Min¹, LU Sai¹, ZHANG Zengliang², ZOU Shengcan¹, DING Wei¹, LI Lijie^{1,*}, WANG Shanglong^{1,*}

(1. Qingdao Yisheng Kanghe Biopharmaceutical Co., Ltd., Qingdao 266100, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

Abstract: Abalone hydrolytic peptide (AHP) was prepared from abalone meat by complex enzymatic method, and its anti-inflammatory and immunity enhancing effects were discussed. Method: The antioxidant of AHP was studied and free radical scavenging ability was taken as index, the anti-inflammatory effect of mouse alveolar macrophages (MH-S) was studied by interleukin and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and the body weight, organ/body weight ratio, delayed allergy, carbon clearance and NK cell activity of mice were measured to study the effect of AAP (0.02, 0.10 and 0.20 g/kg, respectively) on immune function. Results: AHP had strong ability to scavenge DPPH free radical, ABTS free radical and superoxide anion free radical, the scavenging rates of DPPH free radical and superoxide anion free radicals by 1.0 mg/mL AHP were 84.06% and 69.74%, respectively, and the scavenging rate of ABTS free radical by 0.10 mg/mL AHP was 62.41%. 10 μ g/mL AP group significantly inhibited the secretion of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in MH-S cells induced by LPS ($P < 0.05$), 50, 100 μ g/mL AP group were highly significant ($P < 0.01$). Middle dose AHP group significantly increased NK cell activity ($P < 0.05$), high dose AP group significantly promoted monocyte macrophage carbon clearance function ($P < 0.05$), significantly enhanced NK cell activity ($P < 0.01$), so as to achieve immune regulation. Conclusion: The AHP has good antioxidant activity, anti-inflammatory and immunomodulatory effects.

Key words: abalone hydrolytic peptide; free radical scavenging rate; anti-inflammatory; immunomodulatory

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)05-0282-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050062

引文格式: 王敏, 卢赛, 张曾亮, 等. 鲍鱼水解肽的抗氧化、抗炎及免疫调节作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(5):

收稿日期: 2020-05-08

作者简介: 王敏(1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: xiaowuzi1990@163.com。

* 通信作者: 李丽杰(1982-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 天然产物研究与开发, E-mail: lilijielinxi@126.com。

王尚龙(1988-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 健康食品研究与开发, E-mail: mwang@chenland.com。

基金项目: 科技部国家重点研发计划资助项目(2018YFC0311203)。

282-288.

WANG Min, LU Sai, ZHANG Zengliang, et al. Antioxidant, Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of Abalone hydrolytic Peptide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(5): 282-288. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

鲍鱼(Abalone)是一种原始海洋贝类,单壳软体动物,全世界已命名的216种鲍鱼中,分布在我国沿海的鲍鱼有7种,其营养丰富,具有极高的药用价值。《本草纲目》中记载,鲍鱼性平,味甘,咸,可明目补虚、清热滋阴、养血益胃、补肝肾^[1],其胶原蛋白含量高达30%~50%^[2],远远高于其他鱼贝类,同时含有丰富的生理活性物质,如牛磺酸^[3]、硒等的含量大大高于贻贝、牡蛎、文蛤等常见海洋贝类,是开发海洋生物活性肽的良好资源。

目前,越来越多研究将中医保健功能与现代医学相结合,海洋活性肽的作用机理也被广泛研究^[4]。鲍鱼肽是以鲍鱼为来源制备的海洋生物活性肽,具有功能多样、来源广泛、特异性强、毒副作用小等优点^[5],目前中外学者对于鲍鱼肽的酶法制备有相关研究,郭芳等^[6]以鲍鱼内脏为原料,采用碱性蛋白酶水解鲍鱼内脏制备ACE抑制肽;欧柳舒等^[7]以雄性皱纹盘鲍性腺为原料,以木瓜蛋白酶与中性蛋白酶复合酶解,并通过高效液相色谱(HPLC)分析,结果表明获得的酶解液中多肽的分子质量主要分布在1 ku以下且具有较强的清除自由基效果;田裕心等^[8]利用鲍鱼内脏结缔组织为原料,选择风味蛋白酶为最适水解酶酶解制备内脏多肽。但是,对鲍鱼肽的功能研究较少, Park等^[9-10]将鲍鱼蛋白通过酶进行水解,证实得到的鲍鱼蛋白水解物(APH)表现出原血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性,表明APH可用作功能性食品的成分;梁杰等^[11]通过研究鲍鱼水解肽的清除自由基能力、还原能力来评价其抗氧化活性,结果表明鲍鱼水解肽具有较强清除自由基的能力和还原力;中外学者研究还表明其具有明显的肿瘤抑制活性^[12-13],对于免疫力方面的研究还鲜少见报道。

本研究以自制的鲍鱼水解肽为研究对象,以自由基清除能力验证其抗氧化性,同时对其分子量分布、主要营养素含量进行测定,并研究其抗炎、免疫调节的作用效果,以期鲍鱼肽的应用提供科学依据,尤其是与中药复方、其他非肽类物质的协同作用,是目前生物活性肽研究的热点^[14],可以作为鲍鱼肽开发利用的方向之一。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

SPF级ICR雄性小鼠 体重18~23 g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,生产许可证编号SCXK 2014-0007,饲养环境为屏障级,许可证号SYXK 2013-0008,实验环境温度20~22℃,相对湿度45%~65%;鲜皱纹盘鲍 市售;胰蛋白酶(250000 U/g)、中性蛋白酶(60000 U/g)、风味蛋白酶(30000 U/g) 北京索来宝有限公司;氯化硝基四氮唑蓝(NBT, ≥98%) 上海弘顺生物科技有限公司,现用现配;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、脂多糖(LPS)、二铵盐

(ABTS)、地塞米松 美国Sigma公司;小鼠肺泡巨噬细胞系MH-S 北纳创联生物科技有限公司;胎牛血清 Gibco公司;RPMI-1640培养基 Hyclone公司;IL-1β、IL-10测定试剂盒、TNF-α酶联免疫检测试剂盒 上海一研生物科技有限公司。

XW-80A漩涡振荡器 上海沪西分析仪器厂有限公司;MDR-5离心喷雾干燥机 无锡市双和干燥设备有限公司;Agilent 1260高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司;CO₂-80A-IR CO₂培养箱 美国Thermo;TD5A低速离心机 Eppendorf;M200 PRO多功能酶标仪 伯乐生命医学产品有限公司;UV-8000紫外分光光度计 上海元析仪器有限公司;AA-6880原子吸收分光光度计 日本岛津。

1.2 实验方法

1.2.1 鲍鱼水解肽的制备 通过实验室对制备工艺的摸索研究,将整鲜皱纹盘鲍破碎打浆后,以鲍鱼浆为底物,浓度为8%,水浴加热至50℃,调节pH7.0,添加4%的酶,其中酶组成为风味蛋白酶:中性蛋白酶为3:2,酶解4 h,酶解上清液先后经过硅藻土、膜过滤板后进行喷雾干燥,得鲍鱼水解肽(纯度≥90%)备用。

1.2.2 鲍鱼水解肽抗氧化活性评价

1.2.2.1 DPPH自由基清除活性的测定 参考文献方法^[15]。以95%乙醇溶液配制浓度为0.4%(w/v)的DPPH自由基溶液,将不同浓度的鲍鱼水解肽溶液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/mL)与DPPH自由基溶液按1:1比例混合并利用漩涡振荡器混合均匀,在室温中反应30 min后在517 nm处测定吸光值。同时以蒸馏水为空白对照,每组三个平行,其DPPH自由基清除率的计算公式为如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{A_i - A_0}{A_0} \right] \times 100$$

式中, A₀为空白组(DPPH自由基+蒸馏水)的吸光值, A_i为样品组(DPPH自由基+鲍鱼水解肽溶液)的吸光值, A_j为对照组(95%乙醇+鲍鱼水解肽溶液)的吸光值。

1.2.2.2 ABTS自由基清除活性的测定 参考文献方法^[15]。将7 mmol/L的ABTS溶液与2.45 mmol/L的过硫酸钾溶液等比例混合,避光反应12 h,用磷酸盐缓冲溶液(5 mmol/L, pH=7.4)稀释至在734 nm处的吸光值为0.70±0.02。取ABTS自由基稀释液与不同浓度的鲍鱼水解肽溶液(0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16 mg/mL)等体积混合于室温避光反应10 min后,734 nm处测定吸光值,磷酸盐缓冲溶液调零,蒸馏水作为空白。ABTS自由基清除率计算公式为如下:

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$$

式中, A₀为空白组的吸光值, A_s为样品组的吸

光值。

1.2.2.3 超氧阴离子自由基清除活性的测定 参考文献方法[16]。在96孔板孔中依次加入100 μL黄嘌呤(0.4 mmol/L)和NBT(0.24 mmol/L)的混合液(每种各50 μL,溶于0.01 mol/L的磷酸盐缓冲溶液,pH=8.0),100 μL黄嘌呤氧化酶(0.049 U/mL),50 μL不同浓度的鲍鱼水解肽溶液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/mL)混匀后37℃孵育30 min,酶标仪测OD₅₆₀值(扣除OD₈₀₀值)。不加样品溶液作为空白对照,平行测定三次,超氧阴离子自由基清除率计算公式为如下:

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{空白}} - \text{OD}_{\text{样品}}}{\text{OD}_{\text{空白}}} \times 100$$

1.2.3 鲍鱼水解肽主要营养成分含量的测定 采用全自动氨基酸测定分析仪^[17]测定牛磺酸(Tau)、精氨酸(Arg)含量:称取0.0200~0.0300 g样品,用3.5%磺基水杨酸溶液溶解均匀。将样品溶液转移至50 mL容量瓶中,定容,4000 r/min离心5 min,取离心清液用0.45 μm微孔滤膜过滤,滤液转移至50 mL容量瓶中,定容摇匀备用,然后用氨基酸自动分析仪测定其游离氨基酸含量。

采用微波消解-火焰原子吸收分光光度法^[2]测定钙(Ca)、铁(Fe)、锌(Zn)、硒(Se)、镁(Mg)微量元素的含量。

1.2.4 鲍鱼水解肽相对分子质量分布的测定 参考文献[11]的HPLC方法。

高效液相色谱仪:配有紫外检测器和含有GPC数据处理软件的色谱工作站。色谱柱:TSKgel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm。流动相:乙腈:水:三氟乙酸为45:55:0.1(体积比)。检测波长:UV220 nm。流速:0.5 mL/min。柱温:30℃。进样体积:10 μL。

称取样品20.0 mg于10 mL容量瓶中,用流动相定容至刻度,超声振荡10 min,使样品充分溶解混匀,用孔径为0.2~0.5 μm聚四氟乙烯膜过滤后,在上述色谱条件下分析,然后用GPC数据处理软件,将样品的色谱数据代入校正曲线方程中进行计算,即可得到样品中肽的相对分子质量及其分布范围。

1.2.5 鲍鱼水解肽对LPS诱导MH-S细胞分泌IL-1β、IL-6、TNF-α活性的影响 MH-S细胞加入含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养,放置于培养箱中,在37℃、5% CO₂饱和湿度条件下生长。0.25%胰酶-EDTA消化传代,取对数生长期的细胞用于实验。

取对数生长期的MH-S细胞,接种于6孔板中,每孔约2×10⁵个细胞。待细胞贴壁后,将MH-S细胞随机分为空白对照组、LPS模型组(1 μg/mL)、地塞米松阳性对照组(100 μg/mL)、鲍鱼水解肽不同浓度样品组(1、10、50、100 μg/mL)。继续培养24 h后,细胞培养液于4000 r/min离心15 min,上清液用ELISA试剂盒检测IL-1β、IL-6、TNF-α的含量^[18-19]。

1.2.6 鲍鱼水解肽免疫活性的测定

1.2.6.1 动物分组与实验条件 实验前小鼠动物房适应性喂养2 d,合格后开始正式实验。小鼠随机分

为3批,分别进行迟发型变态反应实验、小鼠碳廓清实验、NK-细胞活性测定;每批40只,又随机分为阴性对照组、低、中、高剂量试验组,每组10只小鼠。低剂量组(0.02 g/kg·bw)、中剂量组(0.10 g/kg·bw)及高剂量组(0.20 g/kg·bw)分别相当于人体推荐剂量的1、10倍。配制低、中、高剂量受试液时,分别称取0.10、0.50、1.00 g鲍鱼水解肽,溶解于100 mL蒸馏水中,每10 g体质量灌胃0.2 mL,每天1次,阴性对照组给予等体积的蒸馏水,连续30 d后测各项指标。实验期间各组小鼠正常摄食,自由饮水。

1.2.6.2 脏器/体重比值测定 小鼠在初始(灌胃前)、中期(灌胃15 d)、末期(灌胃30 d)分别称重,记录各组体重的平均值。实验结束后,称体重,脱臼处死小鼠,称取脾脏和胸腺,并计算脏/体比值。

1.2.6.3 鲍鱼水解肽对小鼠迟发型变态反应(DTH)的影响 足跖增厚法^[20]:给小鼠腹腔注射2%(v/v)SRBC(0.2 mL/每鼠)致敏4 d后,测量左后足跖厚度,然后在测量部位皮下注射20%(v/v)SRBC(20 μL/每鼠),于注射后24 h测量左后足跖厚度,同一部位测量三次,取平均值,以攻击前后足跖厚度差值(足跖肿胀度)来表示DTH的程度。

1.2.6.4 鲍鱼水解肽对小鼠单核-巨噬细胞功能的影响 小鼠碳廓清实验^[20]:各剂量组小鼠连续灌胃30 d后,每鼠尾静脉注入4倍稀释的印度墨汁(0.1 mL/10 g·bw)。待墨汁注入,立即计时。注入墨汁后2、10 min,分别从眼内眦静脉丛取血20 μL,并将其加到2 mL 0.1% Na₂CO₃溶液中,用酶标仪在600 nm波长处测定光密度值OD,胸腺、肝、脾称重,利用光密度值、肝重和脾重计算吞噬指数α。

$$K = \frac{\lg \text{OD}_1 - \lg \text{OD}_2}{t_2 - t_1}$$

$$\text{吞噬指数} \alpha = \frac{\text{体重} \times k^{1/3}}{\text{肝重} \times \text{脾重}}$$

式中,OD₁、OD₂分别为2、10 min时样品的吸光度;t₁、t₂分别为2、10 min。

1.2.6.5 鲍鱼水解肽对小鼠NK-细胞活性的影响 乳酸脱氢酶测定法^[20],各剂量组小鼠连续灌胃30 d后,颈椎脱臼法处死小鼠,无菌取脾,置于盛有适量无菌Hank's液的小平皿中,研磨脾脏,制成单细胞悬液,经200目筛网过滤,用Hank's液洗2次,每次离心10 min(1000 r/min),弃上清将细胞浆弹起,加入0.5 mL灭菌水20 s,裂解红细胞后再加入0.5 mL 2倍Hank's液及8 mL Hank's液,离心10 min(1000 r/min),用含10%小牛血清RPMI 1640完全培养液重悬,1%冰乙酸稀释后计数,台盼兰染色计数活细胞数(均在95%以上),用RPMI 1640完全培养液调整细胞浓度为2×10⁷个/mL。

实验前24 h将靶细胞(YAC-1细胞)传代培养,应用前以Hank's液洗3次,用RPMI 1640完全培养液调整细胞浓度为4×10⁵个/mL。取YAC-1细胞和脾细胞各100 μL(效靶比50:1)于U型96孔培养板中,YAC-1细胞自然释放孔加YAC-1细胞和培养液各100 μL,YAC-1细胞最大释放孔加YAC-1细胞和2.5% Triton各100 μL,上述各项均设三个平行

孔,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h,然后将 96 孔培养板以 1500 r/min 离心 5 min,每孔吸取上清液 100 μL 于平底 96 孔培养板中,同时加入 LDH 基质液 100 μL,反应 10 min,每孔加入 30 μL 1 mol/L HCL,在酶标仪 490 nm 处测定光密度值。

$$\text{NK 细胞活性}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{反应孔}} - \text{OD}_{\text{自然释放孔}}}{\text{OD}_{\text{最大释放孔}} - \text{OD}_{\text{自然释放孔}}} \times 100$$

1.2.6.6 结果判定 在迟发性变态反应、单核-巨噬细胞功能、NK 细胞活性三个方面任两个方面结果阳性(其中迟发性变态反应、单核-巨噬细胞功能测定项目中的两个剂量组结果阳性,可判定其结果阳性;NK 细胞活性测定实验的一个以上剂量组结果阳性,可判定其结果阳性),可判定鲍鱼低聚肽具有增强免疫力功能作用。

1.3 统计学处理与结果判定

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以 mean ± SD 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD 法),以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 鲍鱼水解肽的抗氧化活性

2.1.1 鲍鱼水解肽 DPPH 自由基清除活性 如图 1 所示,鲍鱼水解肽 IC₅₀ 值为 0.62 mg/mL,IC₅₀ 值越小,表明清除 DPPH 自由基的能力越强。鲍鱼水解肽浓度在 0.2~1.0 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率随浓度的增高而增长,当浓度为 1.0 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率达到 84.06% ± 0.81%;鲍鱼水解肽浓度在 1.0~4.0 mg/mL 时,由于肽与 DPPH 自由基结合趋于饱和,其对 DPPH 自由基清除率不再升高。

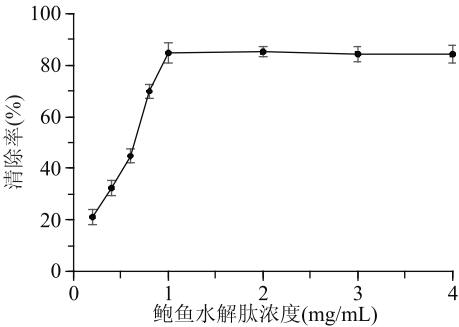


图 1 鲍鱼水解肽对 DPPH 自由基的清除活性
Fig.1 DPPH free radical scavenging activity of AHP

2.1.2 鲍鱼水解肽 ABTS 自由基清除活性 如图 2 所示,鲍鱼水解肽对 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值为 0.063 mg/mL,水解肽浓度在 0.02~0.10 mg/mL 时,ABTS 自由基清除率随浓度的增高而快速增长,当浓度为 0.10 mg/mL 时,ABTS 自由基清除率达到 62.41% ± 0.49%;浓度继续增加时,清除率趋于平稳。

2.1.3 鲍鱼水解肽超氧阴离子自由基清除活性 如

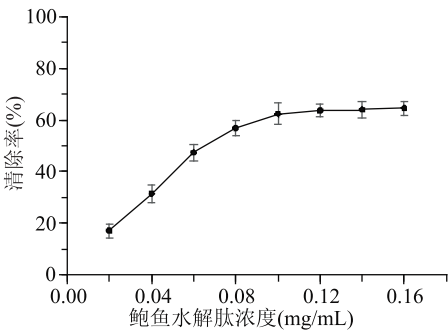


图 2 鲍鱼水解肽对 ABTS 自由基的清除活性
Fig.2 ABTS free radical scavenging activity of AHP

图 3 所示,鲍鱼水解肽对超氧阴离子自由基的 IC₅₀ 值为 0.71 mg/mL,水解肽浓度在 0.2~1.0 mg/mL 时,超氧阴离子自由基清除率随浓度的增高而快速增长,当浓度为 1.0 mg/mL 时,超氧阴离子自由基清除率达到 69.74% ± 0.63%;浓度继续增加时,清除率趋于平稳。

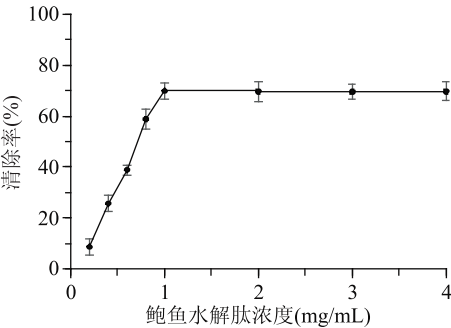


图 3 鲍鱼水解肽对超氧阴离子自由基的清除活性
Fig.3 Superoxide anion free radicals scavenging activity of AHP

2.2 鲍鱼水解肽的主要营养成分

表 1 为制备的鲍鱼水解肽的含量较丰富的 7 种营养成分。牛磺酸是具有广泛生物学活性的 β-氨基酸,分布在人和动物体内的各个组织,具有改善记忆、保护心脏、缓解疲劳、增强免疫、保肝降酶、抑制氧化应激反应和炎症反应等生理功能^[21];铁元素是人体必需的营养素之一,可以改善贫血,并有研究表明,铁元素与中药黄酮类具有协同抗氧化功能^[22];镁几乎参与人体所有的新陈代谢过程,具有抗氧化、保护心脏、改善记忆力等生理活性^[23]。梁杰等^[11]分析了鲍鱼水解肽的氨基酸组成,本研究制备的鲍鱼水解肽,在低聚肽、氨基酸的基础上含有丰富的矿物质,具有更优的营养特性。

2.3 鲍鱼水解肽的相对分子质量分布

采用 HPLC 法测定鲍鱼水解肽的相对分子质量,结果如图 4 所示。相对分子质量在 112~10104 u 范围内呈连续分布,其中小于 1000 u 的低聚肽占比达

表 1 鲍鱼水解肽的营养成分
Table 1 Nutritional components of AHP

样品	牛磺酸(Tau) (mg/100 g)	精氨酸(Arg) (g/100 g)	钙(Ca) (mg/kg)	铁(Fe) (mg/kg)	锌(Zn) (mg/kg)	硒(Se) (mg/kg)	镁(Mg) (mg/kg)
鲍鱼水解肽	2.16 × 10 ³	4.19	1.61 × 10 ³	8.52 × 10 ²	85.60	0.31	4.30 × 10 ³

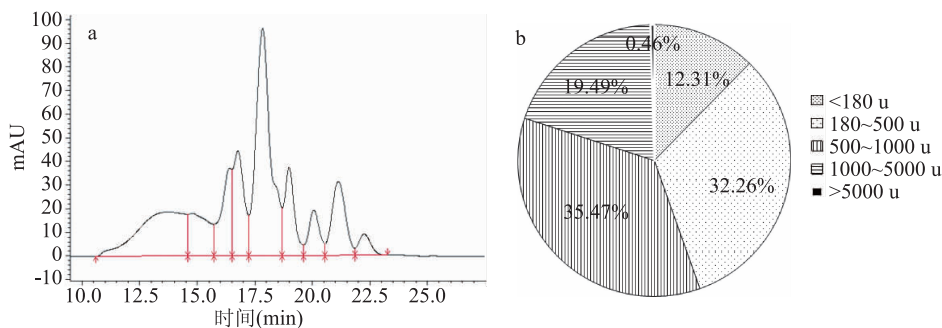


图4 鲍鱼水解肽分子量分析

Fig.4 Molecular weight analysis of AHP

注:a:相对分子质量分布;b:相对分子质量分布统计。

80.04%;相对分子质量在1000~5000 u的肽段占比19.49%;相对分子质量>5000 u的成分较少,仅为0.46%。表明复合酶酶解鲍鱼肉较为完全,水解物中主要成分为低聚肽。

2.4 鲍鱼水解肽的抗炎作用

在正常生理状况下,细胞分泌的细胞因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等参与调节机体固有免疫应答、适应性免疫应答,也可以直接杀伤靶细胞或者介导细胞凋亡,促进损伤组织的修复,参与细胞间的正调控;然而由于微生物感染等因素引起多种细胞因子可在短时期大量分泌,细胞因子又转而刺激免疫细胞,大量的细胞因子爆发,可严重损伤多种组织和器官^[24]。因此,调节巨噬细胞产生的过量细胞因子,对炎症反应的控制有重要意义。

2.4.1 鲍鱼水解肽对LPS诱导MH-S细胞IL-1 β 分泌活性的影响 IL-1 β 是体内作用效果最强的炎症介质之一,而MH-S细胞被认为是致炎细胞因子IL-1 β 最主要的来源之一,在生理条件下IL-1 β 含量较低,但许多疾病如类风湿性关节炎、神经变性疾病等都与IL-1 β 的上调有密切关系^[25]。如图5所示,与空白对照组相比,LPS极显著地促进IL-1 β 的表达($P<0.01$),LPS是革兰氏阴性菌细胞壁外壁的组成成分,由脂质和多糖构成,其可以与MH-S表面的受体TLR4结合,启动免疫应答,同时释放IL-1 β 、IL-6等炎症因子,促进炎症反应,使机体受到损伤^[26];同时,100 $\mu\text{g/mL}$ 地塞米松阳性对照组能极显著降低LPS诱导的MH-S细胞IL-1 β 分泌活性($P<0.01$),相较于模型组降低率73.84%,这表明一定浓度的地塞米松能抑制IL-1 β 分泌,起到良好的抗炎效果。与模型组比较,鲍鱼水解肽能有效抑制MH-S细胞中IL-1 β 的分泌量,其中1 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的AHP抑制率为16.66% ($P>0.05$);10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的AHP抑制效果显著($P<0.05$),抑制率为32.58%;50、100 $\mu\text{g/mL}$ AHP抑制效果极显著,抑制率分别为43.11% ($P<0.01$)、52.37% ($P<0.01$),说明其作用效果与鲍鱼水解肽浓度成正比,具有一定的量效关系。同时说明,一定浓度的鲍鱼水解肽能通过调节炎症因子IL-1 β 的分泌水平从而达到抗炎消炎的作用。

2.4.2 鲍鱼水解肽对LPS诱导MH-S细胞IL-6分泌活性的影响 如图6所示,模型组能够极显著提高MH-S细胞中IL-6的分泌量($P<0.01$);与模型组比

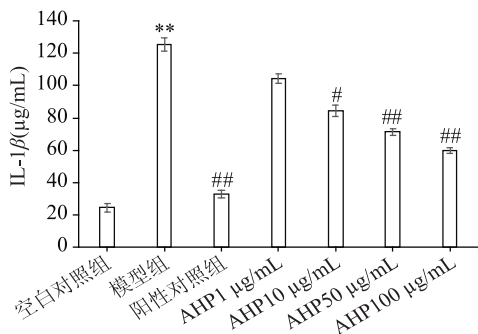


图5 鲍鱼水解肽(AHP)对LPS诱导MH-S细胞分泌IL-1 β 的影响

Fig.5 Effect of AHP on IL-1 β secretion of MH-S cells induced by LPS

注:**与空白对照组比较差异极显著, $P<0.01$;
#与模型组比较差异显著, $P<0.05$;##与模型组比较差异极显著, $P<0.01$;n=3。图6、图7同。

较,鲍鱼水解肽能有效抑制MH-S细胞中IL-6的分泌量,1、10 $\mu\text{g/mL}$ AHP抑制效果显著($P<0.05$),抑制率分别为22.97%、31.08%;50、100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的AHP抑制效果极显著($P<0.01$),抑制率分别为40.99%、47.30%,说明其作用效果与鲍鱼水解肽浓度成正比,具有一定的量效关系。

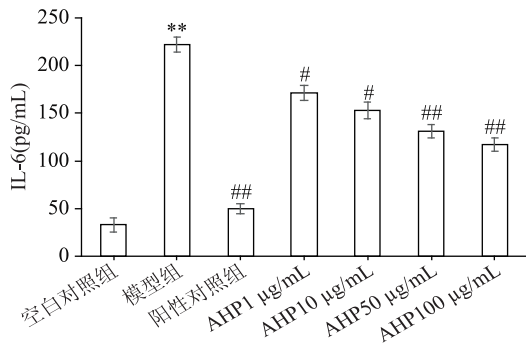


图6 鲍鱼水解肽对LPS诱导MH-S细胞分泌IL-6的影响

Fig.6 Effect of AHP on IL-6 secretion of MH-S cells induced by LPS

2.4.3 鲍鱼水解肽对LPS诱导MH-S细胞TNF- α 分泌活性的影响 由巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子称为TNF- α ,能够诱导炎症反应过程中的其他因子和介质的产生,TNF- α 可以促进T细胞及其他杀伤细胞对肿瘤细胞的杀伤作用,并且可以促进B细胞

表2 受试物对小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effect of test substance on body weight of mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	初始体重(g)	中期体重(g)	末期体重(g)	增加值(g)
阴性对照组	19.6 ± 0.8	27.0 ± 1.3	31.0 ± 1.3	11.4 ± 0.6
低剂量组	20.0 ± 1.0 ^a	27.2 ± 1.1 ^a	30.8 ± 1.4 ^a	10.8 ± 0.7 ^a
中剂量组	19.9 ± 0.9 ^a	27.2 ± 1.4 ^a	30.9 ± 0.9 ^a	11.0 ± 0.7 ^a
高剂量组	19.8 ± 0.7 ^a	27.3 ± 1.0 ^a	30.6 ± 1.0 ^a	10.8 ± 0.8 ^a

注:与阴性对照组相比,a 差异不显著, $P > 0.05$;b 差异显著, $P < 0.05$;c 差异极显著, $P < 0.01$ 。表3~表6 同。

的增殖,但过量的 TNF- α 分泌可能会导致机体局部的炎症反应^[27]。如图7所示,与空白对照组相比,经 LPS 刺激后的 MH-S 细胞中 TNF- α 含量极显著增加($P < 0.01$),说明造模成功,经 LPS 刺激后巨噬细胞表现出炎症反应。与 LPS 模型组相比,在 MH-S 细胞培养过程中加入一定浓度的鲍鱼水解肽后,TNF- α 分泌活性降低,其中 1、10 $\mu\text{g/mL}$ AHP 抑制效果显著($P < 0.05$),抑制率分别为 20.99%、31.49%;50、100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 AHP 抑制效果极显著($P < 0.01$),抑制率分别为 49.25%、62.43%,说明该浓度下的鲍鱼水解肽抗炎效果极显著($P < 0.01$),这与郑佩珊^[28]的研究结果相似,0.13 mg/mL 鲍鱼水提液中性蛋白酶酶解物对 RAW264.7 细胞 TNF- α 分泌活性的抑制作用达到了 60.48%。

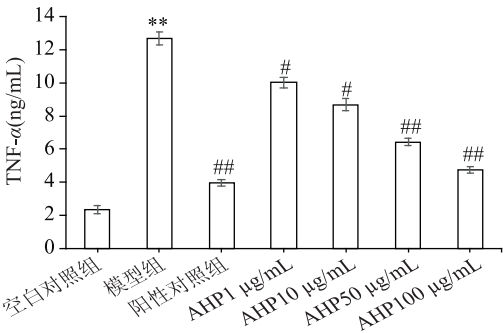


图7 鲍鱼水解肽对 LPS 诱导 MH-S 细胞分泌 TNF- α 的影响
Fig.7 Effect of AHP on TNF- α secretion of MH-S cells induced by LPS

表3 鲍鱼水解肽对小鼠免疫器官的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 3 Effects of AHP on immune organs in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	胸腺/体重(%)	脾脏/体重(%)
阴性对照组	0.21 ± 0.03	0.43 ± 0.03
低剂量组	0.20 ± 0.02 ^a	0.42 ± 0.01 ^a
中剂量组	0.22 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.06 ^a
高剂量组	0.21 ± 0.01 ^a	0.41 ± 0.04 ^a

表4 鲍鱼水解肽对 DNFB 诱导小鼠 DTH 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of AHP on DTH induced by DNFB in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	耳壳增重(g)
阴性对照组	9.37 ± 1.66
低剂量组	10.24 ± 1.58 ^a
中剂量组	12.31 ± 1.93 ^a
高剂量组	12.75 ± 1.87 ^a

力的影响 巨噬细胞参与机体的特异性免疫反应和非特异性免疫反应,是两种免疫反应的桥梁细胞。由表5结果可知,高剂量组小鼠碳廓清吞噬指数(显著高于阴性对照组($P < 0.05$),表明高剂量鲍鱼水解肽可以提高小鼠的单核-巨噬细胞吞噬能力,从而实现免疫调节。

表5 鲍鱼水解肽对小鼠碳廓清能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 5 Effects of AHP on carbon clearance of mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	吞噬指数 α
阴性对照组	4.84 ± 1.60
低剂量组	5.43 ± 0.74 ^a
中剂量组	5.40 ± 0.65 ^a
高剂量组	5.05 ± 1.23 ^b

2.5.5 鲍鱼水解肽对小鼠 NK 细胞活性的影响 NK 细胞是生物体内天然存在的非特异免疫杀伤细胞,它在宿主的免疫监视功能中有着重要的作用。由表6可知,与阴性对照组相比,中剂量鲍鱼水解肽对小鼠的 NK 细胞活性有显著的促进作用($P < 0.05$),高剂量鲍鱼水解肽对小鼠的 NK 细胞活性有极显著的促进作用($P < 0.01$)。鲍鱼水解肽通过提高 NK 细胞活性,使 NK 细胞对 T 淋巴细胞的应答性增强,从而提高机体的非特异性免疫。

3 结论

本研究的鲍鱼水解肽相对分子质量在 112 ~

2.5 鲍鱼水解肽的免疫活性

- 2.5.1 鲍鱼水解肽对小鼠体重的影响 分别测定各组实验小鼠的初始体重、中期体重和末期体重,并计算小鼠增重,由表2可知,在30 d 喂养试验过程中,鲍鱼水解肽各剂量组小鼠各个阶段的体重及最终的体重增加值与阴性对照组相比均无显著差异($P > 0.05$),说明受试物喂养对小鼠体重没有明显影响。
- 2.5.2 鲍鱼水解肽对小鼠脏器/体重比值的影响 由表3结果可知,低、中、高剂量组与阴性对照组比较,免疫器官胸腺、脾脏与体重的比值差异不显著($P > 0.05$),表明鲍鱼水解肽对小鼠免疫器官的影响不显著($P > 0.05$),对机体无明显毒性作用。
- 2.5.3 鲍鱼水解肽对小鼠迟发型变态反应(DTH)的影响 由表4可知,鲍鱼水解肽各剂量组小鼠的耳壳增重与阴性对照组相比无显著差异($P < 0.05$),说明鲍鱼水解肽不会引起小鼠迟发型变态反应。
- 2.5.4 鲍鱼水解肽对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能

表6 鲍鱼水解肽对小鼠 NK 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 6 Effects of AHP on

NK cell activity in mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	NK 细胞活性(%)
阴性对照组	32.92 ± 5.81
低剂量组	38.58 ± 6.33 ^a
中剂量组	42.34 ± 6.47 ^b
高剂量组	45.69 ± 7.38 ^c

10104 范围内呈连续分布,其中小于 1000 u 的低聚肽占比达 80.04%,且含有丰富的牛磺酸、精氨酸、铁、镁等营养物质,同时其具有较强的抗氧化能力,1.0 mg/mL 的鲍鱼水解肽对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基的清除率分别可达到 84.06%、69.74%,0.10 mg/mL 的鲍鱼水解肽对 ABTS 自由基的清除率可达到 62.41%。

除抗氧化功能外,鲍鱼水解肽也可作用于抗炎、调节免疫功能。不同浓度的鲍鱼水解肽对 LPS 诱导 MH-S 细胞分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 活性有不同程度的抑制作用,表明鲍鱼水解肽可以通过影响巨噬细胞炎性因子与肿瘤坏死因子的分泌活性从而起到抗炎与增强免疫的作用,且其作用效果随浓度的升高而增强。同时,鲍鱼水解肽可以通过促进小鼠的单核-巨噬细胞碳廓清功能、增强 NK 细胞活性达到调节免疫的作用,其作用效果也与浓度存在剂量-效应关系。

参考文献

- [1]柯才煊.我国鲍鱼养殖产业现状与展望[J].中国水产,2013(1):27-30.
- [2]刘先进,陈胜军,李来好,等.四种鲍鱼肌肉营养成分分析与品质评价[J].食品与发酵工业,2018,44(5):227-231.
- [3]吕茹倩,陈榕钦,陈小艺,等.鲍鱼内脏中天然牛磺酸的提取研究进展[J].安徽农学通报,2019,25(5):14-16,83.
- [4]鲁文玉,于文静,孙德群.海洋生物活性肽在药物研发中的应用进展[J].有机化学,2017,37(7):1681-1700.
- [5]林端权,郭泽铨,张怡,等.海洋生物活性肽的研究进展[J].食品工业科技,2016,37(18):367-373.
- [6]郭芳,方婷,陈锦权.鲍鱼脏器酶解工艺条件的优化[J].中国酿造,2015,34(12):101-104.
- [7]欧柳舒,沈建东,翁凌,等.鲍鱼性腺小肽的制备及抗氧化活性的初步研究[J].集美大学学报(自然科学版),2014,19(1):13-19.
- [8]田裕心,彭亚博,姚昱锟,等.响应面优化鲍鱼内脏抗氧化肽制备工艺及其活性[J].食品工业,2019,40(4):110-115.
- [9]Park S Y, Je J Y, Hwang J Y, et al. Abalone protein hydrolysates: Preparation, angiotensin I converting enzyme inhibition and cellular antioxidant activity[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2015, 20(3):176-182.
- [10]陈小艺,柯丽娟,方婷,等.鲍鱼内脏胶原 ACE 抑制肽纯化及结构初探[J].食品科技,2017,42(4):212-217.
- [11]梁杰,赵晓旭,汪秀妹,等.鲍鱼水解肽的抗氧化活性评

- 价、组成分析及稳定性研究[J].福州大学学报(自然科学版),2019,47(2):279-284.
- [12]Lee C G, Kwon H K, Ryu J H, et al. Abalone visceral extract inhibit tumor growth and metastasis by modulating Cox-2 levels and CD8 + T cell activity[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2010, 10:60.
 - [13]陈申如,魏配晓,叶燕军,等.鲍鱼肽的制备及其抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖作用[J].食品科学,2018,39(23):120-125.
 - [14]徐姗姗,曹珂璐,刘文颖,等.生物活性肽与非肽活性物质的协同作用研究进展[J].食品工业,2017,38(9):223-226.
 - [15]王惠敏,李茜,蔡甜甜,等.亚麻籽粕抗氧化肽制备工艺的响应面法优化[J].食品工业科技,2018,39(3):220-225.
 - [16]邵秀芝,郑艺梅,黄泽元.食品化学实验[M].郑州:郑州大学出版社,2013:91-121.
 - [17]Wang W L, Chen M S, Wu J H, et al. Hypothermia protection effect of antifreeze peptides from pigskin collagen on freeze-dried *Streptococcus thermophiles* and its possible action mechanism [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(2):878-885.
 - [18]刘春杰,杨丽华,张春,等.复方中药加味四物汤对 LPS 诱导 RAW_{264.7} 细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达的影响[J].中兽医医药杂志,2018,37(5):20-25.
 - [19]蔡艳春,黄倩,危晓莉,等.红景天苷对脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞和 II 型肺泡上皮细胞共培养炎性介质分泌的影响[J].生理学报,2019,71(4):575-580.
 - [20]徐荣,杨朴丽,徐通,等.诺丽果粉增强免疫力功能实验研究[J].食品工业科技,2017,38(24):297-302.
 - [21]李静,杨雅娟,冯艳,等.牛磺酸对实验性肝纤维化大鼠保护作用的研究[J].天津中医药,2017,34(5):336-340.
 - [22]张燕琴,陈锋.浅析中草药中铁元素与总黄酮含量的药效关系[J].医药前沿,2013(3):326.
 - [23]Bertinato J. Magnesium deficiency: prevalence, assessment, and physiological effects[M]//Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation. Cham: Springer International Publishing, 2017:1-21.
 - [24]李伟,朱华伟,陈运娇,等.余甘子不同溶剂提取物抗炎活性的研究[J].天然产物研究与开发,2018,30(3):418-424,443.
 - [25]Zhang P, Bi R Y, Gan Y H. Glial interleukin-1 β upregulates neuronal sodium channel 1.7 in trigeminal ganglion contributing to temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats [J]. Journal of Neuroinflammation, 2018, 15(1):117.
 - [26]Arnold I C, Mathisen S, Schulthess J, et al. CD11c (+) monocyte/macrophages promote chronic *Helicobacter hepaticus* - induced intestinal inflammation through the production of IL-23 [J]. Mucosal Immunology, 2016, 9(2):352-363.
 - [27]Sung N Y, Jung P M, Yoon M, et al. Anti-inflammatory effect of sweetfish-derived protein and its enzymatic hydrolysate on LPS - induced RAW_{264.7} cells via inhibition of NF- κ B transcription [J]. Fisheries Science, 2012, 78(2):381-390.
 - [28]郑佩珊.亚临界水辅助酶解鲍鱼内脏提取物及其体外活性的研究[D].厦门:集美大学,2019.