

沙虫蛋白酶解产物抗氧化与免疫调节活性的研究

孙雪萍¹, 徐艳², 刘布鸣¹, 孙振亮³, 刘新⁴

(1. 广西壮族自治区中医药研究院, 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022) (2. 广西壮族自治区海洋研究所, 海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000) (3. 上海交通大学附属第六人民医院南院, 上海 201499) (4. 山东省科学院生物研究所, 山东省生物传感器重点实验室, 山东济南 250014)

摘要: 采用复合蛋白酶对沙虫(*Sipunculus nudus*)进行酶解, 得到沙虫蛋白酶解产物(SNPH), 并对其氨基酸组成进行了分析。采用高效液相凝胶色谱法对 SNPH 的相对分子质量分布进行了测定。采用紫外分光光度法测定 SNPH 对 DPPH 自由基, 羟基自由基, 超氧阴离子的清除能力及其还原能力。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测 SNPH 在对刀豆蛋白(Con A)和脂多糖(LPS)诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响。结果显示 SNPH 中必需氨基酸和疏水氨基酸含量较高, 小分子肽含量较高, 相对分子质量在 120~1800 之间的物质占 85.11%。抗氧化活性实验显示 SNPH 对 DPPH 自由基, 羟基自由基和超氧阴离子具有较强的清除效果, 且清除率与浓度存在一定的量效关系。免疫调节活性试验表明 SNPH 对 Con A 和 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞的增殖具有协同刺激作用。SNPH 具有较好的抗氧化和免疫调节活性。

关键词: 沙虫; 酶解; 抗氧化; 免疫调节

文章编号: 1673-9078(2017)4-67-72

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.011

Antioxidant and Immunomodulatory Activities of the Protein Hydrolysate from *Sipunculus nudus*

SUN Xue-ping¹, XU Yan², LIU Bu-ming¹, SUN Zhen-liang³, LIU Xin⁴

(1. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences & Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China) (2. Guangxi Institute of Oceanology, Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Beihai 536000, China) (3. Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital South Campus, 6600 Nanfeng Road, Shanghai 201499, China) (4. Biology Institute of Shandong Academy of Sciences & Key laboratory for Biosensors of Shandong Province, Jinan 250014, China)

Abstract: Enzymatic hydrolysis of *Sipunculus nudus* was performed using Protamex to obtain SNPH. Subsequently, the amino acid composition of SNPH was analyzed, and the distribution of relative molecular mass was determined using a high performance gel chromatography method. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, superoxide anion scavenging activity, and reducing power of SNPH were evaluated using ultraviolet (UV) spectrophotometry. The effects of SNPH treatment on the splenic lymphocyte proliferation induced by concanavalin (Con) A and lipopolysaccharide (LPS) in mice were determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The results indicated that SNPH had high contents of essential amino acids and hydrophobic amino acids. The molecular weight distribution showed that SNPH had a high content of oligopeptides, and the substances with a relative molecular mass of 120~1800 accounted for 85.11%. The antioxidant activity experiment revealed that SNPH possessed potent scavenging activities on DPPH free radical, hydroxyl free radical, and superoxide anion in a good dose-effect relationship. The experiment on immunomodulatory activity indicated that SNPH could have a synergistic effect on the splenic lymphocyte proliferation induced by Con A and LPS. SNPH had good antioxidant and immunomodulatory activities.

Key words: *Sipunculus nudus*; hydrolysis; antioxidant; immunomodulatory

收稿日期: 2015-11-19

基金项目: 广西壮族自治区海洋生物技术重点实验室开放课题 (GLMBT-201407); 广西中药质量标准研究重点实验室自主研究课题 (桂中重系 201501); 国家自然科学基金资助项目 (41306133); 上海市奉贤区科委重点项目 (20141001)

作者简介: 孙雪萍 (1982-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物化学

通讯作者: 孙振亮 (1984-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物化学

方格星虫(*Sipunculus nudus*)隶属于星虫动物门,方格星虫纲,方格星虫目,方格星虫科和方格星虫属,俗称沙虫,广泛分布于大西洋、太平洋和印度洋沿岸等海域,在中国沿海大部分地区均有分布,目前以广西北部湾沿岸资源最为丰富^[1]。沙虫肉质脆嫩,味道鲜美,富含蛋白质、多种氨基酸、微量元素,是一种食疗兼优的药膳,也是我国红树林地区重要的底栖动物^[2]。据记载,沙虫性寒、味甘、咸,具有滋阴降火、清肺补虚、活血强身、补肾养颜等功能,可治疗骨蒸潮热,阴虚盗汗、阴虚盗汗和肺虚咳嗽等多种病症^[3]。现代医学研究表明沙虫含有多种活性物质,具有延缓衰老、抗炎镇痛、免疫调节、抗氧化、抗辐射及心血管保护作用等多种生理功能^[3-5]。由于沙虫富含蛋白质和多种氨基酸,已有学者研究发现沙虫经过木瓜蛋白酶水解后获得的酶解产物中含有蛋白质、生物活性肽和游离氨基酸等成分,并具有较强的抗氧化活性^[6-8]。因此采用现代食品技术对沙虫蛋白进行酶解获得生物活性肽,对于提高沙虫相关产品的附加值和延伸沙虫加工的产业链具有重要的现实意义。在前期研究中,我们以采集自广西北海北部湾的沙虫为研究对象,以水解度为指标,采用单因素实验确定了沙虫的水解用酶为复合蛋白酶,通过响应面分析法优选了沙虫酶解的最佳工艺参数^[9]。本文在前期研究的基础上,对按照最佳工艺条件酶解制备的沙虫蛋白酶解产物进行了氨基酸组成分析及相对分子质量分布的表征,并测定其蛋白酶解产物的体外抗氧化活性和免疫调节活性,为沙虫资源的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂

新鲜沙虫采集自广西北海沿岸,用清水洗净泥沙,去除内脏,清洗后用不锈钢剪刀剪碎,用滤纸滤干表面水分,干燥,粉碎成粗粉备用,经测定蛋白含量 $69.37\pm 5.41\%$,脂肪含量 $8.94\pm 0.77\%$,水分含量 $9.39\pm 0.53\%$,灰分含量 $9.46\pm 0.23\%$ 。

复合蛋白酶(Protamxe, 80000 U/g),诺维信生物技术有限公司;RPMI-1640培养液和胎牛血清,Gibco公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、还原型谷胱甘肽(GSH)、刀豆蛋白A(Con A)、脂多糖(LPS)、三羟甲基氨基甲烷和噻唑蓝(MTT),美国Sigma公司;分子量标准品:细胞色素C(12500)、抑肽酶(6500)、杆菌酶(1450)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(451)和乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(189),上海曦玉分析仪器科技有

限公司,其余试剂均为分析纯。

昆明种小鼠,雄性,18~22 g,上海斯莱克实验动物有限公司。

1.1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅:DS-S26型,上海精宏实验设备有限公司;紫外可见分光光度计:TU-1810型,北京普析通用仪器有限责任公司;精密电子天平:ME104型,梅特勒-托利多仪器有限公司;氮磷钙测定仪:NPCa-02型,上海洪纪设备有限公司;氨基酸分析仪:L-8900,日本日立公司;高效液相色谱仪:Agilent 1260 Infinity,美国安捷伦有限公司;多功能酶标仪:infinite M200 Pro,瑞士帝肯公司。

1.2 实验方法

1.2.1 沙虫蛋白酶解产物的制备

在前期研究中,我们通过单因素实验和响应面分析法,以水解度为指标,考察了酶与底物比、酶解时间和酶解温度3个因素对沙虫蛋白酶解的影响,经过优化确定最佳酶解条件,在此条件下,水解度可以达到 24.81% ^[9]。因此本研究中按照前期研究确定的工艺参数制备沙虫蛋白酶解产物。取沙虫粗粉,加入20倍量(m/V)水,50℃保温10 min后,按照酶与底物比7.8%加入复合蛋白酶,不断搅拌酶解4 h,酶解过程中保持pH为7.0,沸水煮沸10 min后,4000 r/min离心10 min,取上清液减压浓缩,冷冻干燥即得沙虫蛋白酶解产物(Protein hydrolysate from *S. nudus*, SNPH)。

1.2.2 一般营养成分分析

采用重量法测定水分含量;采用凯氏定氮法测定蛋白含量;采用高温灰化法测定灰分含量。采用索氏提取法测定脂肪含量。

1.2.3 氨基酸组成的测定

参照GB/T 5009.124-2003《食品中氨基酸的测定》方法对SNPH中的氨基酸进行测定。准确称取10 mg SNPH样品,加6 mol/L盐酸10 mL,真空封存于110℃条件下水解24 h,过滤后定容至10 mL,取1 mL加压蒸干,再加入0.02 mol/L盐酸溶解定容至5 mL,取20 μ L进样,用氨基酸自动分析仪分析样品氨基酸组成^[10]。

1.2.4 相对分子质量分布的测定

采用高效液相凝胶色谱法测定SNPH的分子量分布,色谱柱为TSKgel G2000SWXL(300 \times 7.5 mm),流动相为乙腈:水:三氟乙酸(30:70:0.1),流速0.5 mL/min,检测波长220 nm,进样体积10 μ L。

分别用流动相配制0.1%(质量浓度)的不同分子量的混合标准品,细胞色素C(12500)、抑肽酶(6500)、

杆菌酶(1450)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(451)和乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(189),用孔径为 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样,得到系列标准品色谱图。以相对分子质量的对数($\log M_r$)对保留时间作线性回归,得到相对分子质量校正曲线和方程。用流动相将 SNPH 配制成 1 mg/mL 的样品溶液,微孔滤膜过滤后,进样测定,将样品的色谱数据代入校正曲线方程中进行计算,即可得样品中肽的相对分子质量及其分布范围^[11]。

1.2.5 体外抗氧化活性的测定

1.2.5.1 DPPH 自由基清除能力的测定

取不同浓度的 SNPH 溶液,置于 10 mL 具塞试管中,加入 2×10^4 mol/L DPPH 50% 乙醇溶液 2 mL,充分混匀,室温条件下,避光静置 30 min 后,在 517 nm 下测定吸光度为 A_i ,空白对照组以蒸馏水代替样品测定的吸光值为 A_0 。样品对 DPPH 自由基的清除率(%)按照下式计算,GSH 作为阳性对照^[12]。

$$E(\%) = \left(\frac{A_0 - A_i}{A_0} \right) \times 100\%$$

1.2.5.2 羟基自由基清除能力的测定

取不同浓度的 SNPH 溶液,依次加入 2 mL、6 mmol/L 的硫酸亚铁、2 mL、6 mmol/L 的水杨酸,混匀后静置 10 min,再加入 2 mL、6 mmol/L 的过氧化氢,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min,在 510 nm 处测定吸光值记为 A_i ,用蒸馏水代替水杨酸测定的吸光值为 A_j 。空白对照组以蒸馏水代替样品测定的吸光值为 A_0 。样品对羟基自由基的清除率(%)按照下式计算,GSH 作为阳性对照^[13]。

$$E(\%) = \left[1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_0} \right] \times 100\%$$

1.2.5.3 还原能力的测定

取 1 mL 不同浓度的 SNPH,加入 2.5 mL 的磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 6.6)和 2.5 mL 铁氰化钾溶液(5%, m/m),混匀后,50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 min 后加入 2.5 mL 三氯乙酸(10%, m/m),混合后,以 3000 r/min,离心 10 min,取上清液 2.5 mL,加入 1% 三氯化铁溶液,在 700 nm 处测定吸光值,GSH 作为阳性对照。吸光值越大,表明样品的还原能力越强^[12]。

1.2.5.4 超氧阴离子自由基清除能力的测定

取 2 mL 不同浓度的 SNPH 溶液和 5 mL、50 mmol/L, pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液混合,与 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min,然后加入 0.3 mL、3 mmol/L 的邻苯三酚溶液。4 min 内每 30 s 在 320 nm 处测定一次吸光值,以吸光值对时间制备回归曲线,其斜率即为自氧化速率,超氧阴离子自由基清除率按照下式计算,GSH 作为阳性对照^[13]。

$$E(\%) = \left(\frac{V_0 - V_1}{V_0} \right) \times 100\%$$

式中, V_0 为蒸馏水代替 SNPH 的自氧化速率; V_1 为 SNPH 的自氧化速率。

1.2.6 脾淋巴细胞增殖活性的测定

1.2.6.1 脾淋巴细胞的制备

小鼠颈椎脱臼法处死,放入装有 70% 乙醇的烧杯中浸泡 3~5 min 消毒后,无菌取脾脏置于无菌培养皿中(淋巴细胞分离液),用 0.01 mol/L、pH 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗后,用注射器内芯与 200 目滤网上研磨,磷酸缓冲溶液清洗,收集细胞滤液,2000 r/min 离心 20 min,取淋巴细胞分离层,加入红细胞裂解液(Tris- NH_4Cl),再次冲洗后,2000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用 RPMI-1640 培养液(10% 胎牛血清,100 U/mL 青链霉素)悬浮细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,收集非贴壁脾淋巴细胞。RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 $4 \times 10^6/\text{mL}$,接种于 96 孔板,台盼蓝染色检测细胞生存率大于 95%。

1.2.6.2 SNPH 对 Con A 和 LPS 诱导小鼠脾淋巴细胞增殖能力的影响

小鼠脾淋巴细胞接种于 96 孔板中,每孔加入细胞悬液 100 μL ,不同浓度的 SNPH 溶液,使终浓度达为 100、250、500、1000 和 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刀豆蛋白的终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另设只加 ConA 和 LPS 不加样品的阳性对照孔和仅有细胞悬液的阴性对照组(以生理盐水代替 Con A 和 LPS),整个反应体系最终体积为 200 μL ,ConA 终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,LPS 终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每个浓度设定 3 个复孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 48 h,570 nm 处测定吸光度,MTT 法检测样品对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响^[14]。

1.2.7 统计学分析

所有实验数据均以平均值 \pm 标准偏差表示,用 t 检验法比较差异, $p < 0.05$ 为统计学上的显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 SNPH 的主要营养成分

通过营养成分分析可知,SNPH 的水分含量为 $6.52 \pm 0.87\%$,蛋白含量为 $80.91 \pm 4.59\%$,灰分含量为 $8.07 \pm 0.48\%$,脂肪含量为 $1.15 \pm 0.17\%$ 。

2.2 SNPH 的氨基酸组成分析

由表 1 可知,SNPH 中共检测出 18 中氨基酸,其中谷氨酸含量最高,甘氨酸次之,天冬氨酸、赖氨酸、亮氨酸、丙氨酸、精氨酸和牛磺酸含量也比较高,其

中人体必需氨基酸含量较高, 占总氨基酸比例为 30.39%。这一结果与前人报告基本一致, 谷氨酸和天冬氨酸不仅是鲜味氨基酸, 还是脑营养剂, 是人类消耗最大的氨基酸, 能够促进神经细胞兴奋, 对大脑功能和中枢神经系统的正常活动具有重要意义^[6]。甘氨酸不仅参与机体蛋白质的构成, 而且是很多重要物质如蛋氨酸、胆碱, 一些重要激素和脱氧核糖核酸的基本结构。作为非必需氨基酸, 大量研究表明, 在某些病理情况下甘氨酸可以表现出抗损伤、抗炎、免疫调节和细胞保护等作用^[15]。综上所述, SNPH 特定的氨基酸组成为其生理活性奠定了良好的物质基础。

表 1 SNPH 的氨基酸质量分数

Table 1 Mass fractions of amino acids in SNPH

氨基酸种类	质量分数 (/mg/g)	氨基酸种类	质量分数 (/mg/g)
天冬氨酸(Asp)	59.76±0.48	蛋氨酸(Met)*	15.71±0.25
丝氨酸(Thr)	22.29±0.63	异亮氨酸(Ile)*	24.72±0.18
谷氨酸(Glu)	114.54±0.77	亮氨酸(Leu)*	40.94±0.94
脯氨酸(Pro)	26.54±1.80	酪氨酸(Tyr)	14.77±0.06
甘氨酸(Gly)	76.86±0.55	苯丙氨酸(Phe)*	15.33±0.08
丙氨酸(Ala)	36.60±1.34	赖氨酸(Lys)*	44.57±0.71
胱氨酸(Cys)	6.11±0.72	组氨酸(His)	3.98±1.24
缬氨酸(Val)*	25.85±0.56	精氨酸(Arg)	33.69±0.71
牛磺酸(Tau)	36.08±1.63	苏氨酸(Thr)*	21.18±0.28

注: *为必需氨基酸。

2.3 SNPH 的相对分子质量分布

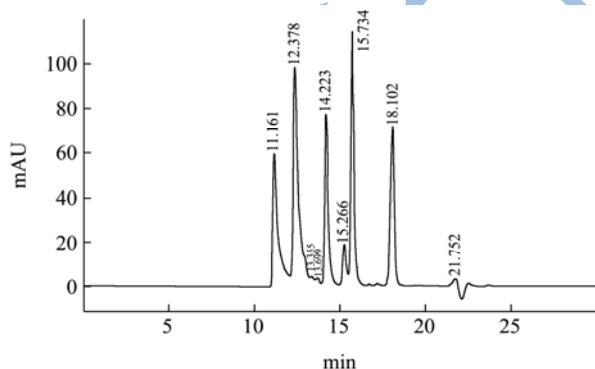


图 1 标准品的相对分子质量分布图

Fig.1 Molecular weight distribution profile of standard samples

注: 1, 细胞色素 C; 2, 抑肽酶; 3, 杆菌酶; 4, 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸; 5, 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸。

图 1 是 5 个不同分子质量的肽标准品的高效液相色谱图, 相对分子质量对数与保留时间的回归方程为 $\log M_r = -0.2742t_R + 7.147$, $R^2 = 0.9782$ 。由图 2 可知, 分子质量在 120~3900 u 之间的物质占 87.63%, 分子质量小于 120 u 占 5.31%, 其中分子质量在 120~1800 u

之间的物质占 85.11%, 这一部分主要由含有 2~10 个氨基酸的小肽(寡肽)组成。据报道, 与游离氨基酸、大分子多肽和蛋白质相比, 寡肽更易被机体吸收而且寡肽具有多种生理活性如抗氧化、抗菌、血管紧张素转化酶抑制和免疫调节等。

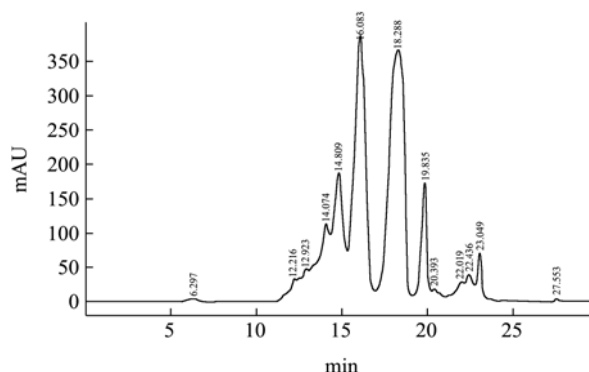


图 2 SNPH 分子质量分布图

Fig.2 The molecular weight distribution profile of SNPH

2.4 抗氧化活性

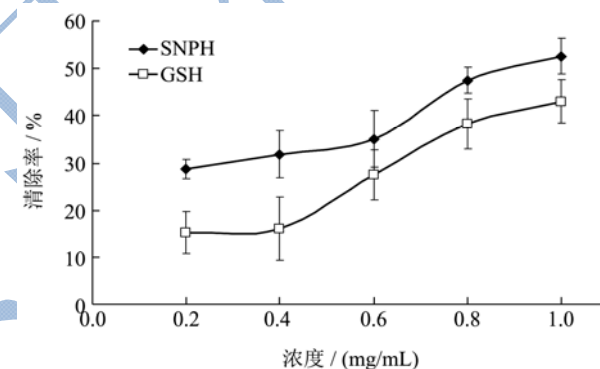


图 3 SNPH 对 DPPH 自由基的清除活性

Fig.3 DPPH radical scavenging activities of SNPH

由图 3 可知, SNPH 表现出较强的 DPPH 自由基清除活性, 且随着浓度的增大, 其清除能力也随着增强, 在 0~1.0 mg/mL 的浓度范围内, 呈现出一定的量效关系, 当浓度为 1 mg/mL 时, 清除率超过 50%。

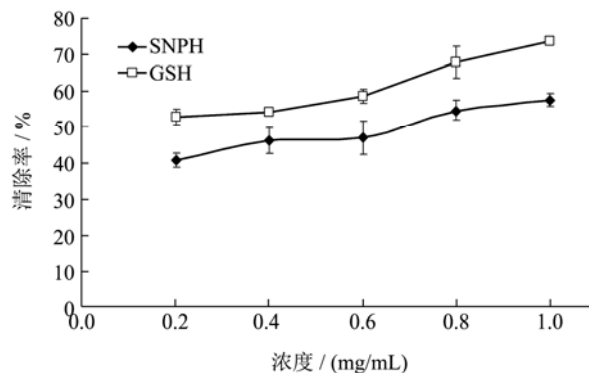


图 4 SNPH 对羟基自由基的清除活性

Fig.4 Hydroxyl radical scavenging activities of SNPH

由图 4 可知, 在 0~1.0 mg/mL 的浓度范围内, 随着 SNPH 浓度的增加, 其清除羟基自由基能力逐渐增强, 且呈现出较好的浓度依赖关系, 但是与阳性对照 GSH 相比, 其对羟基自由基的清除能力稍弱。当 SNPH 浓度大于 0.8 mg/mL 时, 其对羟基自由基的清除率已经超过 50%。

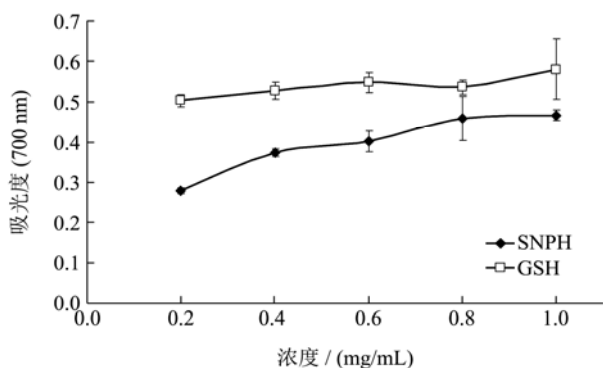


图 5 SNPH 的还原能力

Fig.5 Reducing power of SNPH

样品的还原能力与抗氧化活性有明显相关关系。由图 5 可知, SNPH 具有一定的还原能力, 还原力随着浓度的增加而增加, 当浓度为 1.0 mg/mL 时, SNPH 的吸光度达到 0.47, 在 0~1.0 mg/mL 的浓度范围内, SNPH 的还原能力稍弱于阳性对照 GSH。

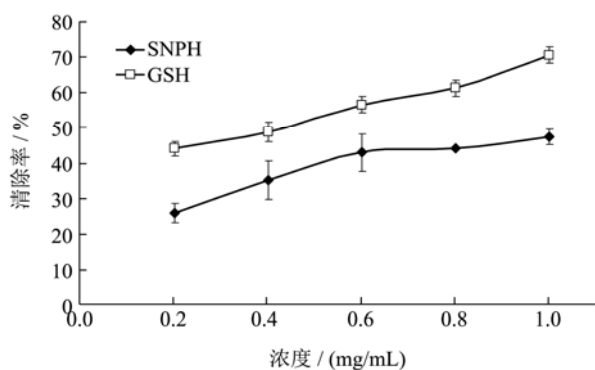


图 6 SNPH 对超氧阴离子的清除能力

Fig.6 Super oxide anion radical scavenging activities of SNPH

超氧阴离子自由基是基态氧接受一个电子后形成的第一个氧自由基, 可以经过一系列反应生成其他氧自由基。抗氧化剂因具有提供氢质子和电子的能力, 能够与氧自由基发生氧化还原反应, 从而能够终止自由基连锁反应, 达到清除或抑制自由基的目的。由图 6 可知, SNPH 对超氧阴离子具有较好的清除活性, 在 0~1.0 mg/mL 的浓度范围内呈现一定的量效关系, 当浓度达到 1.0 mg/mL 时, 对超氧阴离子的清除能力达到 47.19%, 与羟基自由基清除能力相似, 其清除活性弱于 GSH。

2.5 免疫调节活性

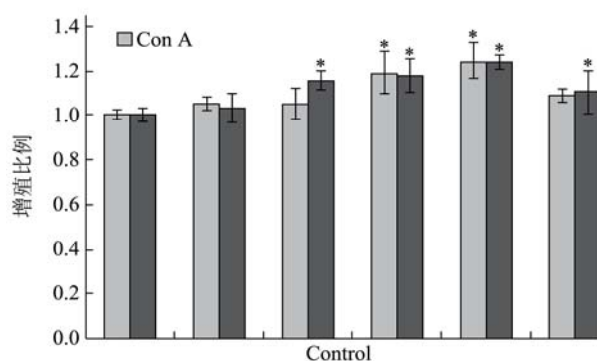


图 7 SNPH 对 Con A 和 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响

Fig.7 Effect of SNPH on the proliferation of mouse splenic lymphocyte induced by Con A and LPS

注: *表示 $p < 0.05$ 。

由图 7 可知, SNPH 在 250~1500 µg/mL 的浓度范围内, 对 Con A 和 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖作用具有显著的协同作用, 且在 100~1000 µg/mL 的浓度范围内, 呈现良好的量效关系, 当浓度在 1000 µg/mL 时, SNPH 对 Con A 和 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖作用分别提高 23.61% 和 24.65%, 但是当浓度超过 1000 µg/mL 时, 其协同作用出现下降趋势。上述结果表明 SNPH 对 Con A 和 LPS 诱导的小鼠的增殖有协同刺激作用。

多肽的抗氧化活性与肽段的疏水性氨基酸有关, 其疏水性部分可阻断自由基的链式反应, 提高自由基的捕捉能力, 根据 SNPH 的氨基酸组成分析, 其疏水性氨基酸约占总氨基酸的 30%, 这可能是 SNPH 具有较强抗氧化活性的重要原因。另外多肽的抗氧化活性与其相对分子质量大小及肽链长短密切相关, 链长为 2~6 个氨基酸的短肽的抗氧化活性要高于蛋白质大分子。张学忠等在研究大豆多肽抑制邻苯三酚自氧化速率的实验中发现抗氧化肽的分子质量主要分布在 100~1300 u 范围内。在本研究中, SNPH 的相对分子质量在 120~1800 u 之间的物质占 85.11%, 表明其所含的肽链较短, 这可能是 SNPH 具有较强抗氧化活性的另一重要原因^[16]。

脾脏淋巴细胞中含有 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞, 它们均是机体的免疫活性细胞, 它们均是机体的免疫活性细胞, 其增殖是反映细胞免疫最直接的指标。本实验研究发现 SNPH 与 Con A、LPS 共同作用对小鼠脾淋巴细胞增殖反应具有明显的促进作用。Con A 作为 T 淋巴细胞有丝分裂原, 主要促进 T 淋巴细胞的增殖, LPS 主要促进 B 淋巴细胞增殖, 由此推测 SNPH 可能是淋巴细胞的致有丝分裂原, 通过突进淋巴细胞增殖, 达到增强机体免疫能力的目的^[17]。肽段的疏水

性氨基酸与免疫活性也有密切联系,较强的疏水作用可能使其肽段促进细胞膜的相互作用,从而增强其免疫活性^[18]。由于SNPH成分复杂,其免疫调节作用可能是多靶点、多途径的作用方式。本研究中SNPH在高浓度下协同作用有所下降,可能与免疫细胞受体饱和或细胞毒活性所致,具体机制有待于体内实验进一步研究。

3 结论

本研究在前期研究的基础上,通过复合蛋白酶水解沙虫得到蛋白酶解产物,该酶解产物蛋白含量高,氨基酸组成合理,分子量较小。体外实验表明该酶解产物具有较强的抗氧化活性,在一定浓度范围内能够协同ConA、LPS促进脾淋巴细胞增殖。基于以上的功能和特点,沙虫蛋白酶解产物具有易制备、活性强、易吸收等特点,有望开发成天然功能性食品,本研究为沙虫资源的开发利用提供理论依据。

参考文献

- [1] 李俊伟,朱长波,颀晓勇,等.方格星虫的繁育、养殖及研究开发进展[J].南方水产科学,2014,10(5):94-98
LI Jun-wei, ZHU Chang-bo, XIE Xiao-yong, et al. Research progress on breeding, aquaculture and development of *Sipunculus nudus* [J]. South China Fisheries Science, 2014, 10(5): 94-98
- [2] 陈细香,林秀雁,卢昌义,等.方格星虫属动物的研究进展[J].海洋科学,2008,32(6):66-70
CHEN Xi-xiang, LIN Xiu-yan, LU Chang-yi, et al. Advances on research of *Sipunculus* [J]. Marine Sciences, 2008, 32(6): 66-70
- [3] Zhang C X, Dai Z R. Immunomodulatory activities on macrophage of a polysaccharide from *Sipunculus nudus* L [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(11): 2961-2967
- [4] 何颖,沈先荣,莫琳芳,等.方格星虫多糖对低剂量中子辐射损伤大鼠的保护作用[J].中国海洋药物,2014,33(3):49-55
HE Ying, SHEN Xian-rong, MO Lin-fang, et al. Protective effects of *Sipunculus nudus* polysaccharides on radiation injury induced by low-dose neutron in rats [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2014, 33(3): 49-55
- [5] Zhang C X, Dai Z R, Cai Q X. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Sipunculus nudus* L. extract [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 137(2): 1177-1182
- [6] 张桂和,赵谋明,巫光宏.方格星虫酶解物成分分析及其抗氧化作用[J].食品与生物技术学报,2007,26(3):80-84
ZHANG Gui-he, ZHAO Mou-ming, WU Guang-hong. The nutritional components of enzymatic hydrolysate from *Sipunculus nudus* and effects on antioxidation [J]. Journal of Food Science and Technology, 2007, 26(3): 80-84
- [7] 朱银玲,刘华忠,李思东,等.酶解法制备方格星虫多肽及其抗氧化作用研究[J].化学研究与应用,2012,24(9):1397-1401
ZHU Yin-ling, LIU Hua-zhong, LI Si-dong, et al. Preparation of polypeptide from *Sipunculus nudus* by enzymolysis and its effects on anti-oxidation [J]. Chemical Research and Application, 2012, 24(9): 1397-1401
- [8] 朱银玲,李思东,方富永.方格星虫多肽的酶解发制备工艺优化与抗氧化作用研究[J].化学通报,2012,75(7):642-647
ZHU Yin-ling, LI Si-dong, FANG Fu-yong. Study on the optimization of preparative process and product's hydroxyl radical cleaning effect for polypeptide from *Sipunculus nudus* [J]. Chemistry Online, 2012, 75(7): 642-647
- [9] 孙雪萍,杨家林,徐艳,等.方格星虫蛋白酶解工艺优化[J].食品与机械,2015,31(2):238-242
SUN Xue-ping, YANG Jia-lin, XU Yan, et al. Study on hydrolysis conditions of *Sipunculus nudus* by response surface methodology [J]. Food and Machine, 2015, 31(2): 238-242
- [10] Liu X, Zhang M, Zhang C, et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidemic activities of protein hydrolysates from *Rhopilema esculentum* [J]. Food Chemistry, 2012, 134: 2134-2140
- [11] 何小庆,曹文红,章超桦,等.波纹巴非蛤蛋白酶解产物的抗氧化活性及分子量分布研究[J].现代食品科技,2014,30(1):74-80
HE Xiao-qing, CAO Wen-hong, ZHANG Chao-hua, et al. Antioxidant activity and molecular weight distribution of hydrolysates from *Paphia Undulate* protein [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(1): 74-80
- [12] Liu X, Zhang M, Guo K, et al. Cellulase-assisted extraction, characterization, and bioactivity of polysaccharides from *Polygonatum odoratum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 75(2): 258-265
- [13] Liu X, Sun Z, Zhang M, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicas* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(4): 1664-1670
- [14] 朱明,欧亮苗,何巧丽,等.破布木果提取物对小鼠脾淋巴细胞的增殖作用[J].新疆医科大学学报,2015,38(1):35-38
ZHU Ming, OU Liang-miao, HE Qiao-li, et al. Proliferative effects of extracts from *Cordia dichotoma* seeds on spleen

- lymphocytes in mice [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2015, 38(1): 35-38
- [15] 袁小娟,吴希茜.甘氨酸的生理作用与应用[J].饮料工业, 2011,14(7):5-8
YUAN Xiao-juan, WU Xi-qian. Physiological role and use of glycine [J]. The Beverage Industry, 2011, 14(7): 5-8
- [16] 范远景,高海成,孟凡莉.抗氧化活性花生肽的氨基酸组成及质谱分析[J].食品科学,2011,32(11):32-36
FAN Yuan-jing, GAO Hai-cheng, MENG Fan-li. Preparation, amino acid composition and UPLC-TOF-MS analysis of peanut-derived antioxidant peptide fractions [J]. Food Science, 2011, 32(11): 32-36
- [17] 朱科学,聂少平,李文娟,等.黑灵芝多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱生细胞因子的影响[J].食品科学,2010,31(19): 351-354
ZHU Ke-xue, NIE Shao-ping, LI Wen-juan, et al. Effect of polysaccharides from *Ganoderma atrum* on spleen lymphocyte proliferation and induction of cytokine in mice [J]. Food Science, 2010, 31(19): 351-354
- [18] Zander A R, Verma D, Spitzer G, et al. Enhancement of hemopoietic recovery after bone marrow transplantation with the addition of nucleated blood cells in mice [J]. Blood, 1980, 56(6): 1132-1135