

不老莓多肽粉提高小鼠免疫力及抗氧化功能特性分析

丛峰松¹, 李兴华², 董舒梅³, 班田震³, 朱甜甜³, 郝善驰³, 孙西玉³, 刘延波^{3*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240) (2. 不老莓生命技术(上海)有限公司, 上海 201700)

(3. 河南牧业经济学院食品与生物工程学院, 河南郑州 450046)

摘要: 该研究以不老莓多肽粉为研究对象, 研究其体外抗氧化功能以及对小鼠免疫功能的影响。通过测定小鼠体内脾淋巴细胞转化、迟发型变态反应、血清溶血素等指标, 结果发现高剂量组与阴性对照组相比, 可以明显提高小鼠的迟发型变态反应 ($P=0.009$)、抗体生成能力 ($P=0.046$)、血清溶血素水平 ($P=0.040$)、碳廓清能力 ($P=0.001$) 和 NK 细胞活性 ($P=0.018$); 中剂量组对小鼠脾淋巴细胞增殖能力有显著增强作用 ($P=0.038$); 低剂量组具有增强小鼠碳廓清能力 ($P=0.042$); 其次通过对 DPPH 自由基测定、羟自由基和超氧阴离子自由基试剂盒的分析, 结果显示半清除浓度 IC_{50} 分别为 0.07、13.91、10.00 mg/mL, 总抗氧化能力为 72.76 U/mL, 且 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基的清除率均与不老莓多肽粉的质量浓度呈量效关系。上述研究结果明确了不老莓多肽粉不仅具有增强小鼠机体免疫功能的作用, 而且具有一定的抗氧化功能。

关键词: 不老莓; 多肽粉; 免疫功能; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2023)03-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0347

The Polypeptide Powder of *Aronia melanocarpa* Improves the Immunity in Mice and Exhibits Anti-oxidant Function

CONG Fengsong¹, LI Xinghua², DONG Shumei³, BAN Tianzhen³, ZHU Tiantian³, HAO Shanchi³, SUN Xiyu³, LIU Yanbo^{3*}

(1. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. Longevity Berry Life Technology Co. Ltd., Shanghai 201700, China) (3. College of Food and Biological Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: In this study, the polypeptide powder of *Aronia melanocarpa* was taken as the research object for investigating its *in vitro* antioxidant function and its effect on the immune function of mice. By measuring the transformation of spleen lymphocytes, delayed-type hypersensitivity, serum hemolysin and other indicators of mice, it was found that compared with the negative control group, the high-dose group had significantly increased delayed-type hypersensitivity ($P=0.009$), antibody-producing ability ($P=0.046$), serum hemolysin level ($P=0.040$), carbon clearance ability ($P=0.001$) and NK cell activity ($P=0.018$); the medium-dose significantly enhanced the proliferation ability of spleen lymphocytes in mice ($P=0.038$); the low-dose could enhance the carbon clearance ability in mice ($P=0.042$); Secondly, through the analyses using the DPPH free radical assay, and hydroxyl radical and superoxide anion radical kits, it was found that the half-scavenging concentrations, IC_{50} values were 0.07 mg/mL, 13.91 mg/mL, and 10.00 mg/mL, respectively, and the total antioxidant capacity was 72.76 U/mL. The scavenging rates for DPPH free radicals, hydroxyl radicals, and superoxide anion free radicals were all dose-dependent with the concentration of berry polypeptide. The research results showed that the polypeptide powder of *Aronia melanocarpa* not only can enhance the immune function

引文格式:

丛峰松, 李兴华, 董舒梅, 等. 不老莓多肽粉提高小鼠免疫力及抗氧化功能特性分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 1-9.

CONG Fengsong, LI Xinghua, DONG Shumei, et al. The polypeptide powder of *Aronia melanocarpa* improves the immunity in mice and exhibits anti-oxidant function [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 1-9.

收稿日期: 2022-03-26

基金项目: 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(202102110130; 192102110075); 河南省重大科技专项(181100211400); 河南牧业经济学院重点学科项目(C3060020)

作者简介: 丛峰松(1970-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: 1142594146@qq.com

通讯作者: 刘延波(1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 微生物学, E-mail: yanbolu@hnuhe.edu.cn

of mice, but also exhibits certain antioxidant function.

Key words: berry polypeptide powder; compound polypeptide powder; immune function; antioxidant

肽是具有特定生物活性的化合物分子,由 α -氨基酸通过缩合而结合在一起形成^[1],是一种蛋白质的结构片段,能起到蛋白质的活性基团作用,是人体新陈代谢、调节活动的重要物质^[2]。多肽的优点:分子量低、结构简单、易溶于水、吸湿性强、乳化性好、热稳定性好、粘度低、免疫原性低、渗透性强、使用效率高、易于改性和转化等^[3],而且多肽药物也广泛应用于疫苗^[4]、抗肿瘤^[5]、抗菌^[6]、内分泌、心血管等医疗领域,具有副作用小、特异性强、效果显著、生物活性高、用药剂量少、不易产生耐药性等诸多优点,但也存在半衰期短、不稳定、易降解、口服吸收率低等不足^[7]。当今多肽产品被广泛应用于医药、保健食品、化妆品、新材料等诸多领域,特别是多肽药物在医学领域发挥着越来越重要的作用^[8]。

不老莓多肽粉是将黑果腺肋花楸果实、大豆肽以及玉米肽等各种有益成分有机结合在一起制备的一种营养价值全面、可增强免疫力的复合多肽粉。其中黑果腺肋花楸(*Aroniamelanocarpa* (Michx.) Ell.),原产于美国东北部,是一种集食用、药用、园林和生态等价值于一身的珍贵经济树种^[9],其浆果(俗称野樱莓、不老莓)富含黄酮、花青素和多酚等物质。不老莓的提取物具有较强的抗氧化、抗炎、抗菌和其他生物效应,对治疗和预防许多疾病,如癌症、心血管疾病、慢性炎症、辐射病、重金属中毒等有重要意义^[10-13]。不老莓是多酚的来源,具有抗氧化潜力,已在许多体外和体内实验中得到证明^[14]。大豆肽也称大豆多肽,是大豆蛋白质的酶解产物,大豆多肽具有抗氧化^[15]、降血压^[16]、降血脂^[17]、抗疲劳^[18]等生物活性功能,具有良好的发展前景^[19]。玉米肽是通过蛋白酶水解或微生物发酵从玉米蛋白质中提取的相对低分子量产品的总称,玉米肽在水相中更易溶解,具有许多生物活性,包括刺激酒精代谢、保护肝脏、抗疲劳、降血糖、抑制血管紧张素转换活性、抗氧化、抗炎和抗癌作用等等^[20-22]。

目前有关大豆肽免疫功能^[23,24]、玉米肽抗氧化^[25]相关功能的研究较多,但将黑果腺肋花楸果实、大豆肽以及玉米肽等成分结合在一起制成的复合粉研究其免疫功能和抗氧化功能尚未见报道。本研究依照《保健食品检验与评价技术规范》中对免疫力增强作用的检测方法,测定不老莓多肽粉对小鼠增强免疫力的作用效果,同时为了研究不老莓多肽粉的体外抗氧化活性,还在一定浓度范围内测定了其 DPPH 自由基清除能力、羟基自由基清除能力、超氧阴离子清除能力和

总抗氧化能力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料

“莓好一添”不老莓多肽粉(又名:不老莓植物复合粉),不老莓生命科学(上海)有限公司。不老莓多肽粉包括以下原料(m/m):黑果腺肋花楸浓缩粉 2%~4%,菊粉 60%~90%,玉米肽 0.5%~3%,大豆肽 10%~20%,甜菊糖苷 0.3%~0.7%,三氯蔗糖 0.05%~0.1%,柠檬酸 3%~5%,苹果酸 1%~2%,柠檬酸钠 0.1%~0.2%。

1.1.2 药品与试剂

刀豆蛋白 A (ConA)、注射用墨汁、2,2-二苯代苦味酰基苯肼自由基 (DPPH·),Sigma 公司;丙酮、SRBC、二硝基氟苯 (DNFB)、麻油、生理盐水、YAC-1 细胞、羊红细胞、甲醇、MTT、鸡红细胞、Giemsa 染液、Hanks 液 (pH 值 7.2~7.4)、RPM11640 完全培养液,北京索莱宝生物科技有限公司;碘硝基氯化四氢唑 (INT)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 8.2)、乳酸锂、1% NP40、NAD、台酚兰、1 mol/L 盐酸、吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS)、酸性异丙醇;抑制与产生超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 试剂盒、羟自由基试剂盒、总抗氧化能力 (T-AOC) 检测试剂盒,南京建成生物工程有限公司。

1.1.3 实验动物

实验动物为 200 只雌性 ICR 小鼠,体质量 18~22 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK (沪) 2017-0005。饲料:从上海的普路腾生物科技有限公司购买,许可证号:沪饲证 (2018) 04001。

1.1.4 仪器

8 mm 直径打孔器、微量血凝试验板、2-16K 通用离心机、酶标仪、96 孔培养板,美国康宁;Co-150 CO₂ 培养箱、UV-1800 紫外可见分光光度计、Olympus IX71 倒置显微镜、FA1104 分析天平(感量为 0.000 1 g),上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.2 生产工艺

将黑果腺肋花楸浓缩粉、菊粉、玉米肽、大豆肽等原料搅拌混合→加入体积分数 80% 的乙醇继续搅拌→造粒→干燥→化验→过筛→包装

1.3 实验方法

小鼠按体重分为五大组, 一组: 脏器指数、溶血素测定、空斑; 二组: 淋转试验、自然杀伤细胞(Natural Killer Cell, NK 细胞) 活性; 三组: 2,4-二硝基氟苯(2,4-Dinitrofluorobenzene, DNFB) 诱导的迟发型变态反应(DTH) 试验; 四组: 小鼠碳廓清试验; 五组: 小鼠通过腹腔巨噬细胞来验证其吞噬鸡红细胞率和吞噬指数。每组动物按体重随机分成4 小组, 每小组10 只小鼠, 小鼠每天按20 mL/kg (按体质量计) 连续灌胃30 d 后, 分别进行以下试验。

1.3.1 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验

参考 Fu 等^[26]的方法, 在适量无菌 Hanks 液的小平皿中放入无菌小鼠脾, 把小鼠脾用镊子撕碎, 用200 目网过滤, 获得单细胞悬浮液。用 Hank's 溶液洗两次, 每次离心10 min, 利用台盼蓝活细胞染色计数将细胞浓度调整为每毫升 3×10^6 个。每个细胞悬液被添加到24 孔板的两个1 mL 的孔中, 一个孔中有75 μ L ConA, 另一个孔中为对照, 在培养箱中培养72 h 时, 并在结束前4 h, 从每个孔中吸出0.7 mL 上清液, 加入0.7 mL 不含小牛血清的 RPMI 1640 和 MTT 50 μ L/孔, 继续培养^[27]。结束后, 向每个孔中加入1 mL 酸性异丙醇, 并混合直至紫色晶体完全溶解。然后将晶体铺到96 孔培养板中做三个平行孔, 在570 nm 处测量光密度。

1.3.2 测定迟发型变态反应(DTH)

用50 μ L DNFB 溶液涂抹在小鼠腹部3 cm \times 3 cm 处脱毛后的皮肤上致敏, 5 d 后攻击小鼠右耳两面涂有10 μ L DNFB 溶液涂抹然后进行攻击^[28]。24 h 后称重被处死小鼠的左右两耳重量, 计算左右耳重量差值^[29]。

1.3.3 血清溶血素的测定

用0.2 mL 2% (V/V) 的 SRBC 悬浮液在小鼠腹腔内进行免疫。5 d 后, 摘除眼睛, 收集血液以检测血清中的溶血素。血清通过2 000 r/min 离心10 min 提取, 然后在微量血凝板每孔内注入100 μ L 用生理盐水倍比稀释的血清, 加入100 μ L 0.5% (V/V) 的 SRBC 悬浮液, 混合均匀, 在37 $^{\circ}$ C 下于带盖的湿润平盘内培养3 h, 观察血球凝集程度^[30]。

1.3.4 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法) 和脏器/体重比值

注射20% (V/V) 鸡红细胞悬液1 mL 于小鼠腹腔。间隔30 min, 将2 mL 生理盐水经腹腔注入处死的正中剪开腹壁的小鼠中。在搪瓷盒内垫上湿纱布将2 片载玻片上均分1 mL 小鼠腹腔洗液后放入, 在37 $^{\circ}$ C 的培养箱内培养30 min。结束后未贴片细胞用生理盐水

漂洗除去, 晾干后用1:1 丙酮甲醇溶液固定, 4% (V/V) Giemsa-磷酸缓冲液染色3 min, 最后蒸馏水漂洗晾干^[31]。计数后计算吞噬率和吞噬指数^[32]。用滤纸吸干血迹后称重, 对胸腺指数和脾指数进行计算。

1.3.5 碳廓清实验测定

用10 mL/kg bw 稀释的印度墨汁从尾静脉向小鼠注射, 以 Na_2CO_3 溶液作为空白, 2、10 min 后从内眦静脉丛抽出20 μ L 血液并立即加入2 mL 0.1% 的 Na_2CO_3 溶液中, 用UV-1800 紫外分光光度计在600 nm 处测量光密度(OD)^[27]。解剖小鼠, 取出肝脏、脾脏, 用滤纸吸干血迹后称重, 计算吞噬指数^[28]。

1.3.6 抗体生成细胞测定

小鼠处死后取脾脏磨碎过滤, 1 000 r/min 离心10 min, 用 Hank's 液洗两遍。把脾细胞在8 mL Hank's 液中悬浮, 将表层培养基加热溶解后在45 $^{\circ}$ C 水浴中保温, 与等量的2 倍浓度、pH 值7.2~7.4 的 Hanks 液混合后在小试管内分装, 各0.5 mL 并将10% (m/V) SRBC 50 μ L、脾细胞悬液25 μ L 加入试管内迅速混合均匀, 倒入在平板上刷有6 cm 的琼脂薄层于 CO_2 培养箱中培养, 1.5 h 后加入 SA 缓冲液稀释的补体(1:8)^[33]。继续温育1.5 h 后, 计数溶血空斑数。

1.3.7 小鼠 NK 细胞活性测定(乳酸脱氢酶 LDH 测定法)

试验前24 h 将靶细胞传代培养, 在使用前用 Hank's 液洗3 次, 用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度为每毫升 4×10^5 个^[33]。在 U 型 96 孔培养板中加入靶细胞和效应细胞各100 μ L (效靶比50:1), 在培养箱中培养加靶细胞+培养液各100 μ L 的孔作为靶细胞自然释放孔, 以加靶细胞+1% NP40 各100 μ L 的孔作为靶细胞最大释放孔, 4 h 后1 500 r/min 离心, 取上清100 μ L 和 LDH 基质液100 μ L 加入96 孔培养板中, 反应3 min 后每孔加入1 mol/L 的 HCl 30 μ L, 在酶标仪490 nm 处测定光密度值(OD)^[34]。计算 NK 细胞活性^[31]。

1.3.8 测定不老莓多肽粉体外抗氧化特性

参考李乐等^[35]的方法对不老莓多肽复合粉进行 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率以及总抗氧化能力的测定与分析, 并通过计算半数清除率(IC_{50} 值) 来判断抗氧化能力。

1.3.9 实验数据统计方法

实验数据以 SPSS 软件进行单因素方差分析。经方差齐性检验, 方差齐的实验数据采用 LSD 法进行统计分析, 方差不齐的实验数据采用 Tamhane 法进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 不同剂量组不老莓多肽粉对小鼠体重的影响

由表 1 可知各组小鼠生长发育情况良好, 体重稳定增加, 与对照组相比, 各剂量组对不同试验组小鼠体重均无显著变化, 表明不老莓多肽粉剂量对小鼠体重的作用效果较小。

表 1 不老莓多肽粉各剂量组对不同小组小鼠体重的影响

Table 1 Effects of different dose groups of berry polypeptide powder on the body weight of mice in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组数	组别	始重/g	终重/g	P 值
一组	高剂量组	18.70±0.50	28.90±2.00	0.681
	中剂量组	18.60±0.50	30.40±2.20	0.057
	低剂量组	18.70±0.50	29.60±1.40	0.263
	阴性对照组	18.80±0.40	28.50±2.80	/
二组	高剂量组	19.40±0.50	29.80±1.50	0.823
	中剂量组	19.50±0.50	28.50±1.80	0.223
	低剂量组	19.60±0.50	29.10±2.80	0.576
	阴性对照组	19.50±0.50	29.60±1.40	/
三组	高剂量组	20.70±0.50	29.20±1.80	0.898
	中剂量组	20.80±0.40	29.20±1.80	0.898
	低剂量组	20.60±0.50	29.20±1.90	0.898
	阴性对照组	20.70±0.50	29.30±1.50	/
四组	高剂量组	21.00±0.00	30.50±2.10	0.916
	中剂量组	21.00±0.00	30.10±2.40	0.752
	低剂量组	21.00±0.00	30.40±1.70	1.000
	阴性对照组	21.00±0.00	30.40±2.20	/
五组	高剂量组	21.70±0.50	31.50±1.80	0.333
	中剂量组	21.60±0.50	31.60±2.20	0.283
	低剂量组	21.50±0.50	29.30±1.80	0.165
	阴性对照组	21.70±0.50	30.60±2.20	/

2.2 不同剂量组不老莓多肽粉对小鼠淋巴器官/比重比值的影响

在人体中脾脏作为最大的淋巴器官参与多种机体免疫, 淋巴器官中 T 淋巴细胞对其发育和免疫是至关重要的, 而 T 淋巴细胞由胸腺产生, 所以胸腺的损伤和退化会导致 T 淋巴细胞的减少从而降低机体免疫力^[36]。表 2 中试验数据可以看出, 各剂量组不老莓多肽粉与阴性对照组相比, 小鼠胸腺/体重比值和脾脏/体重比值无明显变化, 差异较小, 不显著

($P>0.05$), 因此, 不同剂量的不老莓多肽粉对小鼠脏器和体重的影响整体相对较小。张艳珍等^[37]研究发现不同剂量的枸杞西洋参复合物对小鼠淋巴器官和体重的整体影响整体同样相对较小; 陈丽芳等^[38]研究结果表明灵芝孢子粉蜂胶复合物对小鼠脾脏和胸腺的质量无明显影响, 对免疫器官无刺激作用。通过对比发现多项产品复合物对小鼠的淋巴器官和体重基本无显著影响。

2.3 不同剂量组不老莓多肽粉对小鼠脾淋巴细胞转化能力和迟发型变态反应的影响

淋巴细胞的转化可以在体外检测淋巴细胞的应答能力。由表 3 中试验数据可以看出, 与阴性对照组相比, 高、低剂量组均无显著影响 ($P>0.05$), 中剂量组可以明显增强由 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化能力。用耳肿胀法进行 DNFB 诱导的 DTH 实验, 结果表明, 低、中、高剂量组与阴性对照组相比左右耳肿胀度差值均高于对照组, 高剂量组差异显著 ($P<0.01$), 具有统计学意义, 即不老莓多肽粉可以提高小鼠细胞免疫能力。

2.4 不同剂量组不老莓多肽粉对小鼠血清溶血素的影响

由表 4 可知, 增加不老莓肽粉的剂量, 小鼠的血清溶血素 (抗体积数) 逐渐增加, 说明增加不老莓多肽粉的剂量可以有效提高小鼠的血清溶血素水平, 与阴性对照组相比, 高剂量组的抗体积数最高。显著高于阴性对照组 ($P<0.05$), 效果最佳。SRBC 刺激 T 细胞的活化增殖, 在 T 细胞的辅助下, B 细胞活化分泌抗体^[39], 不老莓多肽粉通过抗原作用 T 细胞, 刺激 B 细胞间接产生抗体从而增强小鼠的体液免疫作用。

2.5 不同剂量组不老莓多肽粉对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率和吞噬指数的影响

巨噬细胞又称组织细胞^[36], 主要在体内进行识别、吞噬、消化细胞碎片和病原体。表 5 显示, 阴性对照组只低于高剂量组吞噬率, 其余各剂量组差异不显著, 无统计学意义 ($P>0.05$), 而且由结果显示, 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力并不随不老莓多肽粉的浓度增大而增强, 中剂量组效果相对较差, 可能是不老莓多肽粉对此能力影响较小导致, 具体原因需要进一步实验证实。

表2 不老莓多肽粉各剂量组对小鼠淋巴器官/体重比值的影响

Table 2 Effects of different dose groups of berry polypeptide powder on the ratio of lymphoid organs/body weight in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/kg bw)	动物数/只	胸腺/体重 ($\times 10^{-3}$)	P 值	脾脏/体重 ($\times 10^{-3}$)	P 值
高剂量组	1.50	10.00	0.23 \pm 0.04	0.151	0.39 \pm 0.04	0.415
中剂量组	1.00	10.00	0.21 \pm 0.04	0.701	0.34 \pm 0.07	0.338
低剂量组	0.50	10.00	0.20 \pm 0.04	0.655	0.34 \pm 0.06	0.285
阴性对照组	0.00	10.00	0.20 \pm 0.04	/	0.36 \pm 0.06	/

表3 不老莓多肽粉各剂量组对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化能力及小鼠迟发型变态反应的影响

Table 3 Effects of different dose groups of berry polypeptide powder on the ability of ConA-induced spleen lymphocyte transformation in mice and delayed-type allergic reaction in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/kg bw)	动物数/只	脾淋巴细胞增殖 OD 差值	P 值	DTH 左右耳肿胀度差/mg	P 值
高剂量组	1.50	10.00	0.142 \pm 0.032	0.059	22.50 \pm 2.00	0.009
中剂量组	1.00	10.00	0.144 \pm 0.031	0.038	20.80 \pm 1.70	0.531
低剂量组	0.50	10.00	0.120 \pm 0.006	0.833	21.40 \pm 1.60	0.173
阴性对照组	0.00	10.00	0.122 \pm 0.011	/	20.30 \pm 1.80	/

表4 不老莓多肽粉各剂量组对小鼠血清溶血素水平的影响

Table 4 The effect of different dose groups of berry polypeptide powder on serum hemolysin level in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/kg bw)	动物数/只	血清溶血素 (抗体积数)	P 值
高剂量组	1.50	10.00	76.50 \pm 10.30	0.040
中剂量组	1.00	10.00	65.50 \pm 2.90	0.913
低剂量组	0.50	10.00	64.90 \pm 2.70	1.000
阴性对照组	0.00	10.00	64.90 \pm 2.70	/

表5 不老莓多肽粉各剂量组对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响

Table 5 Effects of different dose groups of berry polypeptide powder on the ability of mouse peritoneal macrophages to phagocytose chicken erythrocytes ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/kg bw)	动物数/只	吞噬百分率/%	P 值	吞噬指数	P 值
高剂量组	1.50	10.00	8.80 \pm 1.40	0.302	0.117 \pm 0.015	0.218
中剂量组	1.00	10.00	7.90 \pm 1.20	0.603	0.103 \pm 0.011	0.103
低剂量组	0.50	10.00	8.10 \pm 1.10	0.862	0.107 \pm 0.007	0.409
阴性对照组	0.00	10.00	8.20 \pm 1.40	/	0.111 \pm 0.009	/

表6 不老莓多肽粉各剂量组对小鼠碳廓清功能的影响

Table 6 Effects of different dose groups of Berry Polypeptide Powder on Carbon Clearance in Mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/kg bw)	动物数/只	吞噬指数 a	P 值
高剂量组	1.50	10.00	3.03 \pm 0.58	0.001
中剂量组	1.00	10.00	2.38 \pm 0.27	0.198
低剂量组	0.50	10.00	2.59 \pm 0.78	0.042
阴性对照组	0.00	10.00	2.02 \pm 0.65	/

表7 不老莓多肽粉各剂量组对小鼠抗体生成细胞功能的影响

Table 7 Effects of different dose groups of berry polypeptide powder on the function of antibody producing cells in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/kg bw)	动物数/只	溶血空斑数/(个/ 10^6 脾细胞)	P 值
高剂量组	1.50	10.00	4.06 \pm 0.50	0.046
中剂量组	1.00	10.00	3.87 \pm 0.46	0.206
低剂量组	0.50	10.00	3.39 \pm 0.46	0.523
阴性对照组	0.00	10.00	3.55 \pm 0.75	/

2.6 不同剂量组不老莓多肽粉对小鼠碳廓清吞噬指数的影响

由表 6 中试验结果可以看出, 小鼠碳廓清吞噬指数在高、低剂量组下可以被显著提高, 差异显著 ($P < 0.05$), 且高剂量组效果最好。这表明, 不老莓多肽粉对小鼠的碳廓清功能有明显的影 响, 吞噬指数 a 得到有效提高, 可以增强血液中的非特异性免疫。

2.7 不同剂量组不老莓多肽粉对小鼠抗体生成细胞的影响

由表 7 可知, 随着不老莓多肽粉剂量的增加, 小鼠抗体生成细胞功能作用不断提升, 与阴性对照组比较, 低、中剂量组的溶血空斑数无显著变化 ($P > 0.05$), 而高剂量组能显著提高抗体生成细胞数量 ($P < 0.05$), 有统计学意义。

2.8 不同剂量组不老莓多肽粉对小鼠 NK 细胞的影响

由表 8 可知, 小鼠 NK 细胞活性随着不老莓多肽粉剂量的增加而被提高, 低、中剂量组对 NK 细胞活性影响相对较小 ($P > 0.05$), 但在高剂量组作用下小鼠 NK 细胞活性明显被提高, 且差异显著 ($P < 0.05$)。

表 8 不老莓多肽粉各剂量组对小鼠 NK 细胞活性的影响

Table 8 Effects of different dose groups of berry polypeptide powder on the activity of NK cells in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/kg bw)	动物数/只	NK 细胞活性/%	P 值
高剂量组	1.50	10.00	6.08±1.41	0.018
中剂量组	1.00	10.00	5.44±0.74	0.185
低剂量组	0.50	10.00	4.87±1.35	0.743
阴性对照组	0.00	10.00	4.68±1.39	/

2.9 体外抗氧化结果分析

但其具有一定的抗氧化活性。

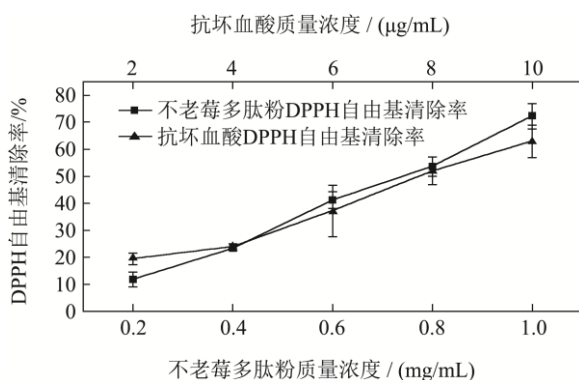


图 1 不老莓多肽粉和抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除率

Fig.1 The scavenging rate of DPPH free radicals by the peptide powder of raspberry and ascorbic acid

由图 1~3 可知, 在一定范围内, 不老莓多肽粉 DPPH 自由基的、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力均随着质量浓度的增大而增强。经测定不老莓多肽粉 DPPH 自由基清除率在浓度为 1.00 mg/mL 时为 72.23%; 羟自由基清除率在浓度为 100.00 mg/mL 时为 92.78%; 超氧阴离子自由基清除率在浓度为 10.00 mg/mL 时为 48.22%。抗坏血酸质量浓度为 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 时 DPPH 自由基清除率为 62.81%; 羟自由基清除率在浓度为 500.00 $\mu\text{g/mL}$ 时为 74.17%; 超氧阴离子自由基清除率在浓度为 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 时为 54.76%。与图 2 抗坏血酸的各项清除能力相比稍弱,

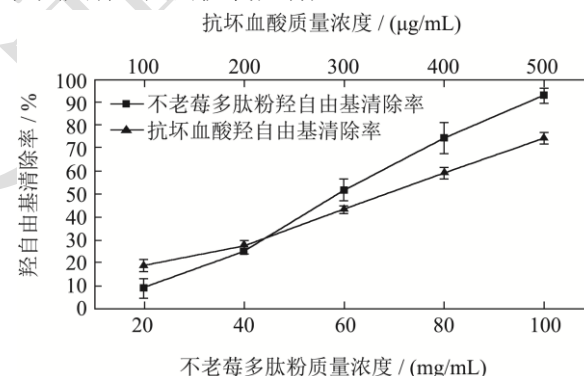


图 2 不老莓多肽粉和抗坏血酸对羟自由基的清除率

Fig.2 The scavenging rate of raspberry polypeptide powder and ascorbic acid to hydroxyl radicals

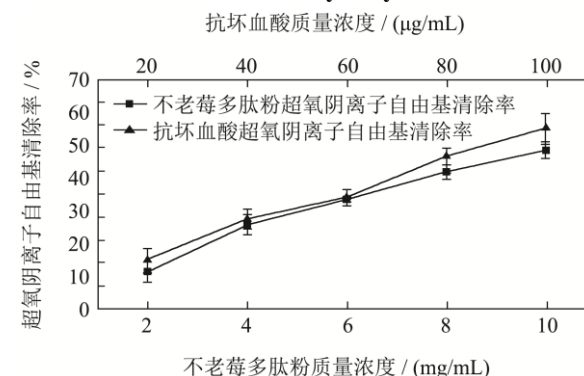


图 3 不老莓多肽粉和抗坏血酸对超氧阴离子自由基的清除率

Fig.3 The scavenging rate of superoxide anion free radicals by berry polypeptide powder and ascorbic acid

通过测定得到的线性回归方程如表 9 可知, 不老莓多肽粉 DPPH 自由基的半清除率 $IC_{50}=0.07$ mg/mL, 羟自由基半清除率 $IC_{50}=13.91$ mg/mL, 超氧阴离子自由基半清除率 $IC_{50}=10.00$ mg/mL, 抗坏血酸 DPPH 自由基的半清除率 $IC_{50}=7.90$ μ g/mL, 羟自由基半清除率 $IC_{50}=337.81$ μ g/mL, 超氧阴离子自由基半清除率 $IC_{50}=89.41$ μ g/mL, 半清除率 (IC_{50}) 也就是半数有效浓度, 是指清除率为 50% 时所需要的抗氧化剂浓度, 浓度越低, 说明抑制能力越强^[33]。其抗氧化结果与刘小芳等^[40]研究的南极磷虾多肽的 DPPH 自由基清除率

表 9 不老莓多肽粉和抗坏血酸 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力分析

Table 9 Analysis of the scavenging ability of raspberry polypeptide powder and ascorbic acid DPPH radical, hydroxyl radical and superoxide anion radical

样品	参考指标	回归方程	R^2	IC_{50}
不老莓多肽粉	DPPH 自由基清除率	$y=75.618x-4.9657$	0.9941	0.07 mg/mL
	羟自由基清除率	$y=1.0861x-14.61$	0.9947	13.91 mg/mL
	超氧阴离子自由基清除率	$y=4.494x+5.06$	0.9766	10.00 mg/mL
抗坏血酸	DPPH 自由基清除率	$y=5.7427x+4.6113$	0.9778	7.90 μ g/mL
	羟自由基清除率	$y=0.1424x+1.896$	0.9910	337.81 μ g/mL
	超氧阴离子自由基清除率	$y=0.494x+5.8327$	0.9922	89.41 μ g/mL

3 结论

本实验结果显示, 与阴性对照组比较, 高剂量组能够增强小鼠 DNFB 诱导的迟发型变态反应、抗体生成能力、血清溶血素水平、碳廓清能力和 NK 细胞活性, 且差异显著 P 均小于 0.05; ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖能力在中剂量组得到显著提高 ($P=0.038$); 小鼠碳廓清能力在低剂量组也可以得到较明显增强 ($P=0.042$)。不老莓多肽粉对细胞和体液免疫功能测定结果均为阳性, 该产品具有增强免疫力的功效。且实验结果显示, 不良反应较少, 不会破坏机体正常的免疫功能, 安全性高, 效果好。体外抗氧化实验结果表明, 不老莓复合多肽粉的 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力随着多肽质量浓度的增加而逐渐增大, 其中 DPPH 自由基清除能力 11.76%~72.23%、羟自由基清除能力 8.89%~92.78% 和超氧阴离子自由基的清除能力 11.31%~48.22%, 半清除率 IC_{50} 分别为 0.07、13.91、10.00 mg/mL, 此外经测定在浓度为 4 mg/mL 时总抗氧化能力为 72.76 U/mL。

不老莓多肽粉是将黑果腺肋花楸果实、大豆肽以及玉米肽等各种有益成分有机结合在一起制备而成的复合多肽粉, 目前有关不老莓多肽粉增强免疫力功能和抗氧化功能的研究未见报道。本研究从细胞免疫功能、体液免疫功能、非特异性免疫和体外抗氧化功能的研究, 体内和体外两方面结合分析, 全方位探索了

16.87%~60.73%, $IC_{50}=5.65$ mg/mL, 羟自由基半清除率 $IC_{50}=4.46$ mg/mL, 且清除能力均随浓度的增加而增大的研究结果一致。与陈树俊等^[41]测定的核桃多肽-苦荞-藜麦复合粉 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基清除率 IC_{50} 分别为 0.67、62.32、13.07 mg/mL, 且清除能力均随浓度的增加而增大和总抗氧化能力 27.63 U/mL 等的研究结果也一致。综上, 表明不老莓多肽粉的清除能力比抗坏血酸的弱, 但具有一定的抗氧化能力。此外经测定在浓度为 4 mg/mL 时不老莓多肽粉总抗氧化能力为 72.76 U/mL。

不老莓多肽粉对小鼠免疫功能和抗氧化功能的影响, 为此类复合多肽粉作为保健产品和化妆品在市场的推广使用提供了可靠的理论支撑。

参考文献

- [1] Wibel R, Friedl J D, Zaichik S, et al. Hydrophobic ion pairing (HIP) of (poly) peptide drugs: Benefits and drawbacks of different preparation methods [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2020, 151: 73-80.
- [2] Henninot A, Collins J C, Nuss J M. The current state of peptide drug discovery: back to the future? [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(4): 1382-1414.
- [3] Wang L, Zhang J, Yuan Q, et al. Separation and purification of an anti-tumor peptide from rapeseed (*Brassica campestris* L.) and the effect on cell apoptosis [J]. *Food & Function*, 2016, 7(5): 2239-2248.
- [4] Strohmaier K, Franze R, Adam K H. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein [J]. *Journal of General Virology*, 1982, 59(2): 295-306.
- [5] Camilio K A, Rekdal Ø, Sveinbjörnsson B. LTX-315 (Oncopore™) a short synthetic anticancer peptide and novel immunotherapeutic agent [J]. *Oncimmunology*, 2014, 3(6): e29181.
- [6] Gan B H, Siriwardena T N, Javor S, et al. Fluorescence

- imaging of bacterial killing by antimicrobial peptide dendrimer G3KL [J]. ACS Infectious Diseases, 2019, 5(12): 2164-2173.
- [7] Nestor J. The medicinal chemistry of peptides [J]. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16(33): 4399-4418.
- [8] Beatriz G de la Torre, Fernando Albericio. Peptide therapeutics 2.0 [J]. Molecules, 2020, 25(10): 2293.
- [9] Balcerek M, Szopa J. Ethanol biosynthesis and hydrocyanic acid liberation during fruit mashes fermentation [J]. Czech Journal of Food Sciences, 2012, 30(2): 144-152.
- [10] Denev P, Čiž M, Kratchanova M, et al. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities [J]. Food Chemistry, 2019, 284: 108-117.
- [11] Sidor A, Drożdżyńska A, Gramza-Michałowska A. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and its products as potential health-promoting factors - An overview [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 89: 45-60.
- [12] Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, et al. Fruits of black chokeberry *Aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases [J]. Molecules, 2017, 22(6): 944.
- [13] Choi H S, Kim J H, Kim S L, et al. Catechol derived from aronia juice through lactic acid bacteria fermentation inhibits breast cancer stem cell formation via modulation Stat3/IL-6 signaling pathway [J]. Molecular Carcinogenesis, 2018, 57(11): 1467-1479.
- [14] Jakobek L, Šeruga M, Medvidović-Kosanović M, et al. Antioxidant activity and polyphenols of *Aronia* in comparison to other berry species [J]. Agriculturae Conspectus Scientificus, 2007, 72(4): 301-306.
- [15] Hu X, Zhang Q, Zhang Q, et al. An updated review of functional properties, debittering methods, and applications of soybean functional peptides [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022: 1-16.
- [16] 张慧娟,付冰冰,王静.基于 Caco-2 细胞模型的 3 种大豆肽降胆固醇能力研究[J].中国食品学报,2021,21(1):44-50.
- [17] Wen L, Jiang Y, Zhou X, et al. Structure identification of soybean peptides and their immunomodulatory activity [J]. Food Chemistry, 2021, 359: 129970.
- [18] Zhang X, He H, Xiang J, et al. Selenium-containing soybean antioxidant peptides: Preparation and comprehensive comparison of different selenium supplements [J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129888.
- [19] Zhang N, Guo Q, Shi Y, et al. Preparation of casein non-phosphopeptide-soybean polypeptide complex, its structure and emulsifying properties' evaluation [J]. European Food Research and Technology, 2019, 245(2): 355-363.
- [20] Liang Q, Chalamaiah M, Ren X, et al. Identification of new anti-inflammatory peptides from zein hydrolysate after simulated gastrointestinal digestion and transport in Caco-2 cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(5): 1114-1120.
- [21] Li J T, Zhang J L, He H, et al. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 51: 297-305.
- [22] Sun S, Zhang G, Mu H, et al. The mixture of corn and wheat peptide prevent diabetes in NOD mice [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 56: 163-170.
- [23] Song Y, Yan L C, Xiao W W, et al. Enzyme-treated soy protein supplementation in low protein diet enhanced immune function of immune organs in on-growing grass carp [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 106: 318-331.
- [24] Chatterjee C, Gleddie S, Xiao C W. Soybean bioactive peptides and their functional properties [J]. Nutrients, 2018, 10(9): 1211.
- [25] Li G, Liu W, Wang Y, et al. Functions and applications of bioactive peptides from corn gluten meal [J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2019, 87: 1-41.
- [26] Fu H, Lin X, Fu H, et al. Effects of compound *Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quel. oral liquid's polysaccharide on the immunologic function of mice [J]. Agricultural Science & Technology, 2015, 16(6): 1290.
- [27] Nakamura T, Saito M, Aso H. Effects of a lactobacilli, oligosaccharide and organic germanium intake on the immune responses of mice [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2012: 1201312783-1201312783.
- [28] 霍丽梅,候桂珍,徐琳霞.血清 P、IGF-II 水平在妊娠早期不良结局预测中的临床应用[J].世界最新医学信息文摘,2019, 19(A1):214-215.
- [29] Hu B, Ren J, Luo Y, et al. Augmentation of antitumor immunity by human and mouse CAR T cells secreting IL-18 [J]. Cell reports, 2017, 20(13): 3025-3033.
- [30] 王萍,邹清华.细菌VI型分泌系统溶血素共调节蛋白研究进展[J].微生物学免疫学进展,2018,46(3):67-71.
- [31] Rane S S, Dearman R J, Kimber I, et al. Adaptation of an ELISA assay for detection of IgG2a responses against therapeutic monoclonal antibodies in a mouse immunization model [J]. Journal of Immunotoxicology, 2022, 19(1): 1-7.
- [32] Tang C, Sun J, Zhou B, et al. Effects of polysaccharides from

- purple sweet potatoes on immune response and gut microbiota composition in normal and cyclophosphamide treated mice [J]. *Food & Function*, 2018, 9(2): 937-950.
- [33] 肖振涛,左玲,聂绍良.血清P物质水平在早期诊断重型颅脑损伤患者急性创伤性凝血病中的临床价值[J].*华南国防医学杂志*,2019,33(8):528-531.
- [34] Rubab I, Ali S. Dried fruit extract of *Terminalia chebula* modulates the immune response in mice [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2016, 27(1): 1-22.
- [35] 李乐,陈树俊,康俊杰,等.沙棘油复合蛋白多肽液抗氧化性研究[J].*山西农业科学*,2016,44(4):474-479.
- [36] 杨妮,李莹,朱嘉文,等.不同剂量的枸杞沙棘配伍对小鼠免疫功能的影响[J].*食品与发酵工业*,2023,49(2):159-165.
- [37] 张艳珍,王菲,单斌,等.枸杞西洋参复合物提高小鼠免疫力效果的研究[J].*青海农林科技*,2021,4:23-29.
- [38] 陈丽芳,王会宾,叶克难.灵芝孢子粉蜂胶复合物对小鼠免疫功能的影响[J].*食品工业科技*,2019,40(6):294-297.
- [39] 任钧国,郝钰,邱全璞,等.清解宁对小鼠免疫功能的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2003,9(3):30-32.
- [40] 刘小芳,颜征,冷凯良,等.南极磷虾多肽的组成及其抗氧化与ACE抑制活性[J].*食品研究与开发*,2020,41(23):7-13.
- [41] 陈树俊,李乐,胡洁,等.核桃多肽-苦荞-藜麦复合粉制备工艺及体外消化和抗氧化功能特性分析[J].*食品科学*,2018, 39(12):254-261.