

# 牛乳酪蛋白体外模拟消化液的 ACE 抑制活性及其肠道吸收

薛海燕<sup>1</sup>, 薛丽欢<sup>1</sup>, 贺宝元<sup>2</sup>, 王战勇<sup>3</sup>, 许淼<sup>1</sup>, 白文卿<sup>1</sup>

(1. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021) (2. 陕西科技大学轻工科学与工程学院, 陕西西安 710021) (3. 中央储备粮西安大明宫直属库, 陕西西安 710016)

**摘要:** 本文对牛乳酪蛋白进行体外模拟消化, 以 ACE 抑制活性为指征, LC-MS/MS 确定水解物肽谱, 并采用大鼠肠道模型对其吸收进行初步研究。结果为人工胃液消化、人工肠液消化、胃肠联合消化三种消化方式的水解度均随时间的延长而增大, 单胃和单肠消化的 ACE 抑制率均随水解时间的延长先快速增加, 随后逐渐降低, 而胃肠联合的 ACE 抑制率则是先降低再增加, 胃肠联合消化产生水解度最高为 25.51%, 其 ACE 抑制率在 2 h 时达到最高值为 68.03%; LC-MS/MS 测定消化液的肽谱, 分析得出模拟消化后可能产生的 ACE 抑制肽有 IPP、RYLGY、LHLPLP、AYFYPEL、RPKHPIKHQ 及 WQVLPNAVPAK; 使用 FITC 标记酪蛋白进行体外模拟消化, SDS-PAGE 和 Tricine-SDS-PAGE 都表明 FITC-酪蛋白经过胃肠消化后荧光标记稳定存在, 且水解物的分子量在 5 ku 以下; 大鼠肠道吸收模型发现标记后的牛乳酪蛋白经模拟消化后在肠道吸收率大小依次为十二指肠吸收>空肠吸收>回肠吸收>结肠吸收, 主要在十二指肠吸收。

**关键词:** 牛乳酪蛋白; ACE 抑制肽; 大鼠肠道吸收模型

文章编号: 1673-9078(2018)06-9-17

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.002

## ACE Inhibitory Activity and Intestinal Absorption of Milk Casein Hydrolysates by in Vitro Simulated Digestion

XUE Hai-yan<sup>1</sup>, XUE Li-huan<sup>1</sup>, HE Bao-yuan<sup>2</sup>, WANG Zhan-yong<sup>3</sup>, XU Miao<sup>1</sup>, BAI Wen-qing<sup>1</sup>

(1. Institute of Food Biotechnology, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)(2. Institute of Light Industry Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)(3. The central reserve grain directly under the Daming Palace in Xi'an, Xi'an 710016, China)

**Abstract:** Milk casein was digested by in vitro simulated gastro-intestinal fluid, and ACE inhibitory activity was used as an indicator in this study. Peptide spectrum of hydrolyzate was determined by LC-MS/MS, and its absorption was studied by intestinal model in rats. The results showed that the digestibility of artificial gastric juice digestion, artificial intestinal juice digestion and the combination of gastrointestinal juice increased with time, the ACE inhibition rates of monogastric and single intestinal digestion increased rapidly with the prolongation of hydrolysis time, followed by a gradual decrease, while the combination of gastric and intestinal digestion ACE inhibitory rate decreased first and then increased. The highest degree of hydrolysis of gastrointestinal combined digestion was 25.51%, and the ACE inhibition rate reached the highest value of 68.03% at 2 h; The peptide profiles of digestive juice were determined by LC-MS/MS. The results showed that ACE inhibitory peptides (including IPP, RYLGY, LHLPLP, AYFYPEL, RPKHPIKHQ and WQVLPNAVPAK) could be produced after simulated digestion. In vitro simulated digestion was performed using FITC labeled casein, SDS-PAGE and Tricine-PAGE showed that the fluorescent labeling FITC-casein was stable after the gastrointestinal digestion, and the molecular weight of the hydrolyzate was under 5kDa. The model of intestinal absorption in the rat showed that the intestinal absorptivity order of the labeled casein in the intestinal tract after digestion was as follows: duodenum absorption > jejunal absorption > ileal absorption > colon absorption, mainly absorbed in the duodenum.

**Key words:** milk casein; ACE inhibitory peptide; intestinal absorption model in rat

收稿日期: 2018-02-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31301405); 陕西省科技统筹计划项目 (2013KTZB02-02-05(2)); 陕西省教育厅专项项目 (16JK1101); 陕西省大学生创新创业训练计划项目 (1344)

作者简介: 薛海燕 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品分子营养与安全

近年食源性活性肽成为食品功能因子研究的热点, 主要研究经过体外可控酶解是否会产生活性肽及活性肽在体外的生理功能。酪蛋白是牛乳中主要的蛋白质, 而牛乳酪蛋白中包含多种人体必需的氨基酸<sup>[1]</sup>。据报道, 酪蛋白经水解可产生如 ACE 抑制肽、抗氧化肽、抗疲劳肽等功能肽段<sup>[2]</sup>, 在众多的生物活性肽中, 具有降血压活性的血管紧张素转化酶抑制剂 (Angiotensin I-converting enzyme inhibitor, ACEI) 已经成为研究热点<sup>[3]</sup>。人体胃肠道存在丰富的胃蛋白酶和胰蛋白酶, 对酪蛋白具有消化作用, 如张艳等<sup>[4]</sup>采用胃蛋白酶水解酪蛋白发现可获得多种 ACE 抑制肽片段, 且具有较强的 ACE 抑制活性, 可发挥较好的抗血压升高作用; 夏镇波<sup>[5]</sup>采用胃蛋白酶、胰蛋白酶分别在各自最适条件下水解酪蛋白, 均可获得 ACE 抑制肽; Maruyama 等<sup>[6]</sup>使用胰蛋白酶水解牛乳酪蛋白, 在水解液中得到三种降血压的二肽其肽段分别为: PP、RP 及 AH; 在胃肠生理环境下, 其水解物中是否存在 ACE 抑制肽, 使酪蛋白除营养功能外也具有降血压的功能有待研究; 另外酪蛋白胃肠水解产生的 ACE 抑制肽要能被人体肠道以完整的形式吸收, 才能发挥其相应的生理功能, Annamaria Perna 等<sup>[7]</sup>通过体外胃肠模拟水解酪蛋白对抗氧化和血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制能力进行研究, 表征 ACE 抑制和抗氧化能力在体外胃肠消化期间活性增强。本文采用荧光标记对其肠道吸收进行了初探。

本研究通过体外模拟胃肠消化牛乳酪蛋白, 检测不同水解时间水解液的 ACE 抑制率, 并对 ACE 抑制率最高的样品进行二级质谱分析, 鉴定水解液中存在的多肽片段, 和已经报道的 ACE 抑制肽进行对比, 得出牛乳酪蛋白的体外模拟消化液中是否存在 ACE 抑制肽; 再通过荧光标记牛乳酪蛋白, 并对其荧光标记酪蛋白进行模拟消化, 通过电泳验证消化物的荧光标记是否稳定; 最后利用肠非翻转模型验证荧光标记消化物在肠道的主要吸收部位。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

牛乳酪蛋白、胃蛋白酶、胰蛋白酶、ACE、HHL 均为美国 sigma 公司; 乙腈, 美国 Fisher 公司; FITC; SD 实验大鼠, 西安交通大学医学院动物饲养中心; 96 孔板, 美国康宁公司; 透析袋, 上海源叶生物科技有限公司; 三甲基甘氨酸 (Tricine), Fluka 进口包装; 低分子量标准蛋白质, 美国 Amresco 公司; 生理盐水, 辰欣药业股份有限公司; N,N-甲叉双丙烯酰胺、丙烯

酰胺, 汕头光华化学试剂公司。

### 1.2 实验仪器

高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 二级质谱仪, 美国 Thermo fisher 公司; 冷冻干燥机, 北京松源华兴生物科技有限公司; 全波长功能读数仪, 赛默飞世尔科技有限公司; 超滤仪, 美国 millipore 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 体外模拟消化牛乳酪蛋白

参照中国药典<sup>[8]</sup>配制人工胃液及人工肠液, 两种消化液均现配现用, 在使用之前置于 37 °C 的水浴中预热。

##### 1.3.1.1 体外模拟人工胃液消化

准确称取 20 g 酪蛋白, 将其充分溶解于 1000 mL pH 9.5 的 PBS 中, 用 4 mol/L 的 HCl 调节溶液的 pH 至 2.0, 置于 37 °C 水浴振荡器中 10 min。按照 E/S=1:50 加入 40 mL 人工胃液, 分别在 0 min、15 min、30 min、45 min、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 取样 50 mL, 2 h 取样 500 mL, 在沸水中加热 10 min 后调节消化液的 pH 至 7.0, 将酶灭活, 所得样品置于 -20 °C 的冰箱中备用。

##### 1.3.1.2 体外模拟人工肠液消化

配制 500 mL 20 mg/mL 酪蛋白溶液, 置于 37 °C 水浴振荡器中 10 min。按照 E/S=1:50 加入 20 mL 的人工肠液进行消化, 分别在 0 min、15 min、30 min、45 min、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 取样 50 mL, 沸水中加热 10 min, 储存条件同上 a。

##### 1.3.1.3 体外模拟胃肠联合消化

取经过体外模拟胃消化 2 h 的样品 450 mL 置于 37 °C 水浴振荡器 10 min, 加入人工肠液 20 mL, 其余操作同上 b<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.2 酪蛋白水解度 (DH) 的测定

采用茚三酮法<sup>[10]</sup>测定酪蛋白模拟胃肠消化过程中水解度变化, 水解度的计算公式如下:

$$\text{水解度 (DH)} = \frac{h}{\text{htot}} \times 100\%$$

式中, h: 水解后每 g 蛋白被裂解的肽键的毫摩尔数 (mmol/g); htot: 为原料蛋白质肽键 (mmol/g), 牛乳酪蛋白 htot 为 8.3 mmol/g。

#### 1.3.3 水解液 ACE 抑制活性的测定

由于动物实验测定 ACE 抑制率的可操作性和重复性较差, 本实验采用 ACE 体外活性的检测方法<sup>[4]</sup>。将 200  $\mu$ L 5 mmol/L 的 HHL 与 100 mL 酪蛋白水解液进行混匀, 在 37 °C 预热 3 min 后加入 20  $\mu$ L 0.1 U/mL ACE 溶液, 在 37 °C 下反应 30 min 后加入 250  $\mu$ L 的 HCl 终止反应。然后再加入 1.7 mL 的乙酸乙酯, 手动

振荡 15 s 后, 静置 5 min, 然后用移液枪吸取 1 mL 上层乙酸乙酯到指定试管中, 并在 120 °C 的烘箱中烘干, 取出后加入 3 mL 的超纯水, 并于 228 nm 处测定其吸光度, ACE 抑制率计算公式为如下:

$$\text{ACE抑制率}\% = \frac{B - A}{B - C} \times 100\%$$

式中: A 为反应中 ACE 抑制剂和 ACE 同时存在的吸光度; B 为反应中不加抑制剂的吸光度, 即对照; C 为 ACE 和 HHL 空白反应的吸光度, 即空白。

### 1.3.4 水解液的 LC-MS/MS 检测

从 BL 侧收集到的样品, 通过 0.45 μm 的滤膜过滤, 用 Spe 柱对样本进行除盐处理, 用 80%乙腈洗脱, 然后真空抽干; 最后再用 30 μL 30%乙腈重溶, 进行质谱鉴定。

#### 1.3.4.1 液相参数

色谱柱信息: (300 μm i.d.×5 mm, 5 μm) RSLC C18; 流动相 A: 0.1%甲酸, 流动相 B: 0.1%甲酸, 80%乙腈; 流速: 300 nL/min; 每个组分分析时间: 60 min。洗脱条件如下: 0 min: B 相 5%; 5 min: 5%; 50 min, B 相 90%; 55 min, B 相 90%; 58 min, B 相 5%; 60 min, B 相 5%。

#### 1.3.4.2 质谱参数

分离后的肽段进入质谱仪 Thermo Scientific Q Exactive 进行在线检测, 具体参数如下: 一级质谱参数 Resolution: 70000; AGC target: 3e6; Maximum IT: 40 ms; Scan range: 50 to 750 *m/z* (3 号样本), 50 to 1800 *m/z* (1 号样本)。二级质谱参数; Resolution: 17500; AGC target: 1e5; Maximum IT: 60 ms; TopN: 20; NCE/stepped NCE: 27。

#### 1.3.4.3 数据库检索

质谱原始文件经过 MM File Conversion 软件处理转换, 得到 MGF 格式文件, 然后用 Mascot 软件检索。

### 1.3.5 荧光标记牛乳酪蛋白<sup>[11]</sup>

称取牛乳酪蛋白 20.0 g, 溶于 1000 mL pH 9.5 的 PBS 缓冲液中, 超声 30 min 后于磁力搅拌器上搅拌 1 h 至酪蛋白完全溶解, 向酪蛋白溶液中添加 0.2 mg 的 FITC, 超声 30 min 后于磁力搅拌器上搅拌 1 h, 静置于 4 °C 冰箱中反应 24 h, 调节其 pH 至 4.6, 5000 r/min 离心弃去上清液, 除去没有与酪蛋白结合 FITC, 将样品再次溶解, 通过 1 ku 的超滤膜超滤再次去除残留 FITC, 此过程重复三次, 使用透析袋透析 24 h, 每 4 h 换一次透析液, 宽度 36 mm, MW: 8000~14000, 将所得样品进行冷冻干燥后, 保存于 4 °C 的冰箱中。

### 1.3.6 SDS-PAGE 分析 FITC-酪蛋白水解液

FITC-酪蛋白的体外模拟消化具体过程见 1.3.1。

取 200 μL 不同消化时间水解液与同体积样品缓冲液进行混匀, 在 100 °C 加热 3 min 后置于离心机上离心 5 min, 备用。

#### 1.3.6.1 水解液 SDS-PAGE 电泳检测<sup>[12]</sup>

分别配制 12.5%和 15%的分离胶, 以及 3%的浓缩胶, 分析单胃和单肠的水解样品。上样量为 10 μL。溴酚蓝进入上层胶时电压设置为 50 V, 待溴酚蓝到达下层胶时电压设置为 150 V, 当溴酚蓝到达距胶底 1 cm 时结束电泳, 使用考马斯 R-250 染色 1 h, 最后脱色至背景干净。

#### 1.3.6.2 水解液 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测<sup>[13,14]</sup>

经过胃肠联合水解后样品的分子量在 7 ku 以下, 用 SDS-PAGE 已不能分辨水解样品, 因此采用分辨率更高 Tricine-SDS-PAGE 电泳进行分析, 胶的浓度为 16.5%分离胶, 10%夹层胶, 4%浓缩胶。溴酚蓝在上层胶和夹层胶时电压设置 60 V, 到达分离胶时设置 140 V, 当溴酚蓝到达距胶底 1 cm 时结束电泳, 剥胶后浸泡在固定液 (50%乙醇和 10%乙酸) 中固定 30 min, 考马斯 R-250 染色 1 h, 脱色液脱色至背景干净。

### 1.3.7 FITC-酪蛋白水解液在肠非翻转模型中的通透性检测

台氏液配制见参考文献<sup>[15]</sup>。

将购得 6 只 SD 雄性大鼠适应性饲养一周, 体重 250 kg±20 kg, 实验前禁食 24 h, 可自由饮水, 向腹腔注射 10%的水合氯醛 1.5 mL 进行麻醉, 3 min 后夹住老鼠脚趾, 没有知觉方可进行解剖, 打开腹腔, 取出小肠, 剥离小肠上的粘附物, 分别取十二指肠、空肠、回肠、结肠各 5 cm, 用针管吸取台氏液缓慢冲洗四节肠段, 直到没有内容物流出, 一端扎口, 向肠囊内添加 0.5 mL 20 mg/mL 的 FITC-酪蛋白, 放入小烧杯中, 加入 10 mL 的台氏液, 此过程快速进行, 避免肠道失去活性<sup>[16]</sup>。实验过程在 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中进行, 保持 37 °C 恒温, 并通入 95%O<sub>2</sub> 和 5%CO<sub>2</sub>。分别在 0 min、30 min、60 min、90 min、120 min 取样 200 μL, 并补加相同体积的台氏液。吸取 100 μL 的各个样品于 96 孔板中, 使用全波长功能读数仪于最佳波长处检测样品的荧光强度。待实验结束时, 测量所用各个肠段的长度, 用剪刀将肠道剪开, 测定其宽度后, 计算出肠道的面积。

肠囊非翻转模型中 FITC-酪蛋白的表观渗透系数  $P_{app}$ <sup>[17]</sup>用如下公式计算:

$$P_{app} = dQ/dt / (A \cdot C_0)$$

式中:  $dQ/dt$  为以 FITC-酪蛋白累积吸收量对时间作积分;  $A$  为肠段的面积;  $C_0$  为肠囊外 FITC-酪蛋白的初始浓度。

### 1.3.8 数据统计分析

用 Origin 软件作图并用 SPSS 9.0 进行统计学分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酪蛋白水解度 (DH) 的变化

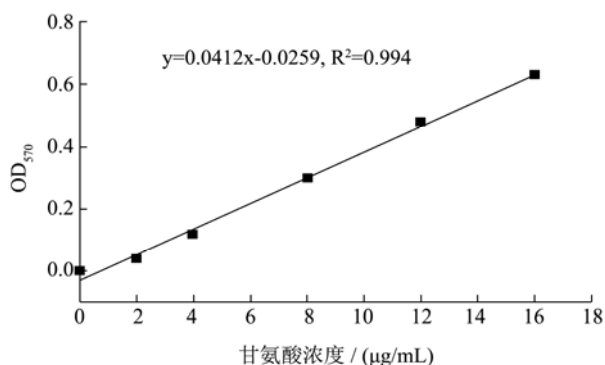


图 1 甘氨酸的标准曲线

Fig.1 The standard curve of glycine

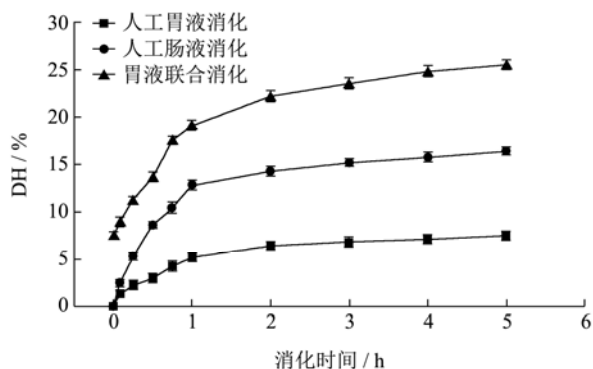


图 2 消化时间对水解度影响

Fig.2 Effects of digestion time on the degree of hydrolysis

从图 2 中可知, 随着水解时间的延长, 三种消化液的水解度均明显增加, 在反应开始 1 h 内, 酶切位点较多, 酪蛋白被很快水解, 水解度迅速增加, 胃消化、肠消化和胃肠联合消化分别增加了 5.19%、12.85% 和 19.15%。1 h 后随着酶切位点减少, 蛋白酶的活性达到饱和, 水解度增加缓慢。三种消化方式中, 胃肠联合消化产生水解度最高为 25.51%, 其原因是两种酶消化使得酪蛋白的酶切位点增加, 因此其水解度最高。庞广昌等人研究表明: 蛋白经过人体消化不仅可以产生氨基酸为人体提供营养, 还会产生小分子的功能肽, 这些功能肽进入人体, 可对发挥其相应的生理功能<sup>[18]</sup>。因此将水解液的生理活性进行进一步的分析。

### 2.2 酪蛋白水解物的 ACE 抑制率分析

由图 3 可知, 单胃和单肠消化的 ACE 抑制率均随着水解时间的延长先快速增加, 随后逐渐降低; 而胃肠联合的 ACE 抑制率则是先降低再增加, 在 2 h 时,

ACE 抑制活性达到最高值 68.03%, 其 ACE 抑制率明显高于两种单独消化方式, 说明联合消化有利于产生更多具有 ACE 抑制活性的肽段, 并且经过联合消化后也可使消化物中活性肽的分子量大大降低, 这有利于活性肽进入体内发挥其降血压的功效。人工胃液消化物的 ACE 抑制活性明显高于人工肠液的消化物, 这是由于人工胃液主要作用于 Phe-, Glu-, Leu- 疏水氨基酸, 而 C 末端为 Phe-, Glu-, Leu-, Pro- 等时具有较高的 ACE 抑制活性<sup>[19]</sup>。李东平<sup>[20]</sup>等人通过酶解水牛乳蛋白制备 ACE 抑制肽也得出胃蛋白酶酶解产物 ACE 抑制率较胰蛋白酶等五种酶的酶解产物高。

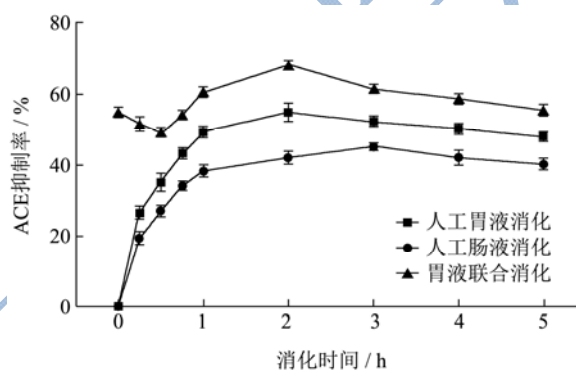


图 3 消化时间对 ACE 抑制率的影响

Fig.3 Effects of digestion time on the ACE inhibition rate

### 2.3 酪蛋白水解物的 LC-MS/MS 结果分析

表 1 2 h 胃肠消化液与  $\alpha$ s1-酪蛋白的二级质谱检测结果

Table 1 Detection results of 2 h gastrointestinal digestive juices with  $\alpha$ s1-casein by LC-MS/MS

来源	浓度 ( $10^{-6}$ )	肽段
	6.12	YKVPQL
	4.82	YPELFR
	7.61	LGYLEQL
	5.66	VAPFPEVF
	5.27	PFPEVFGK
	9.33	APFPEVFGK
	6.38	GYLEQLLR
	6.16	LGYLEQLRY
	5.61	VAPFPEVFGK
	6.33	LGYLEQLLR
	7.07	AYFYPELFR
	6.48	FVAPFPEVLNENL
$\alpha$ s1-酪蛋白	5.79	FVAPEPEVFGK
	4.73	YPELFRQFY
	6.10	HQQLPQEVNENL
	6.41	EPMIGVNQELAYF

转下页

接上页

9.57	HPIKHQGLPQEVLENENL
6.96	PMIGVNQELAYFYPEL
8.12	HPIKHQGLPQEVLENENLL
5.66	FVAPFPEVF
5.53	FYPELFR
9.33	APFPEVFGK
6.16	RYLGYLEQL
7.07	AYFYPELFR
7.56	FVAPFPEVFGK
4.73	YPELFRQFY
4.86	RYLGYEQLLR
5.34	HIQKEDVPSER
6.15	HQGLPQEVLENENLL
6.34	HPIKHQGLPQEVNENL
6.96	EPMIGVNQELAYFYPEL
5.91	HPIKHQGLPQEVLENENLLR

表 2 2 h 胃肠消化液与  $\beta$ -酪蛋白的二级质谱检测结果

Table 2 Detection results of 2 h gastrointestinal digestive juices

with  $\beta$ -casein by LC-MS/MS

来源	浓度 ( $10^{-6}$ )	肽段
	4.74	LHLPLPL
	4.97	HLPLPLL
	5.13	NLHLPLPL
	6.01	HLPLPLLQ
	6.26	DMPIQAFI
	6.53	HLPLPLLQS
	5.99	NLHLPLPLL
	6.27	VYFPFGPIPN
	7.07	VIPPFLQPEV
	6.15	WENLHLPLPL
	6.02	GPVVRGPFPIV
$\beta$ -酪蛋白	7.90	YPVEPFTESQ
	5.72	LVYFPFGPIPN
	0.78	VIPPFLQPEVM
	5.04	DVENLHLPLP
	5.87	SLVYFPFGPIPN
	6.76	YPVEPSQSLFT
	13.20	VVPPFLQPEVM
	4.58	QSLVYFPFGPIPN
	5.52	PVVVPPFLQPEVM
	5.51	TLDVENLHLPLPL
	6.02	QEPVLGPVRGPFPIV
	6.71	AQTQSLVYFPFGPIPN
	6.19	MHQPHQLPPTVMFPPQSVL

通过对 2 h 胃肠模拟消化酪蛋白的消化液进行二级质谱分析, 其结果见表 1~表 4, 从表中可知牛乳酪蛋白中  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白、 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白及  $\kappa$ -酪蛋白被胃肠消化后分别产生的多肽片段数目为 32 个、6 个、24 个及 7 个, 其中最短的有 6 个氨基酸, 最长的有 20 个氨基酸。

从  $\beta$ -酪蛋白的表中分析发现这四个多肽片段 LHLPLPL、YPVEPFTESQ、VIPPFLQPEVM、SLVYFPFGPIPN 是水解后的主要存在形式。 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白水解后的主要片段有 LGYLEQL、APFPEVFGK、AYFYPELFR、HQGLPQEVLENENL。

表 3 2 h 胃肠消化液与  $\alpha_{s2}$ -酪蛋白的二级质谱检测结果

Table 3 Detection results of 2 h gastrointestinal digestive juices with  $\alpha_{s2}$ -casein by LC-MS/MS

来源	浓度 ( $10^{-6}$ )	肽段
	5.96	FALPQYLK
	6.12	ALNEINQFY
	7.53	YQGPIVLNPW
$\alpha_{s2}$ -酪蛋白	6.35	LYQGPIVLNPW
	5.91	QKFPQYLQYL
	6.21	QGPIVLNPWDQVK

表 4 2 h 胃肠消化液与  $\kappa$ -酪蛋白二级质谱检测结果

Table 4 Detection results of 2 h gastrointestinal digestive juices with  $\kappa$ -casein by LC-MS/MS

来源	浓度 ( $10^{-6}$ )	肽段
	4.97	AKPAAVR
	6.66	SPAQILQW
	6.38	YPSYGLNYY
$\kappa$ -酪蛋白	6.49	INNQFLPYPY
	6.04	VRSPAQILQWQVL
	6.76	SPAQILQWQVLPNAVPAK
	5.65	YQKPVALINNQFLPYPY

$\alpha_{s2}$ -酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白水解后的主要片段如上表 3 和表 4。通过分析上面的主要片段与已经报道的 ACE 抑制肽<sup>[21]</sup>做比对发现, 模拟消化后可能产生的 ACE 抑制肽有 IPP、RYLGY、LHLPLP、AYFYPEL、RPKHPIKHQ 及 WQVLPNAVPAK。

## 2.4 FITC 标记酪蛋白的标记率检测

FITC 可于酪蛋白中的氨基结合形成稳定的共价键, 从而实现对酪蛋白的荧光标记。

由图 4 可进一步知道计算出酪蛋白的荧光标记率为 13.91%, 据报道 FITC 标记抗体的最大标记率为 17.44%<sup>[22]</sup>, 对比分析可知本实验的荧光标记率比较高。

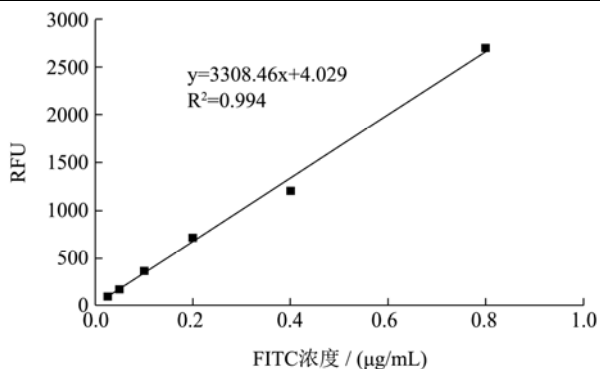


图4 FITC 的标准曲线

Fig.4 The standard curve of FITC

## 2.5 FITC-酪蛋白在人工胃液及人工肠液中的

### 稳定性分析

由于动物胃肠消化体系比较复杂,酪蛋白经动物空腹胃肠水解后,以多肽形式在肠道内的吸收情况难以检测。因此采取对酪蛋白进行 FITC 标记后,追踪酪蛋白水解物的吸收,而在动物体内是否能稳定标记就需通过体外实验进行初步验证。体外模拟胃肠消化 FITC-酪蛋白,对其水解液用 SDS-PAGE 电泳进行分析。电泳分析的条件如下:人工胃液和人工肠液消化 1 h 以内样品采用 12.5% 的分离胶进行分离,2~5 h 时采用 15% 的分离胶进行分离,胃肠联合消化后由于分子量太小,用一般的电泳条件已经不能检测出条带,因此使用 Tricine 电泳进行分离。

### 2.5.1 胃液消化物的电泳分析

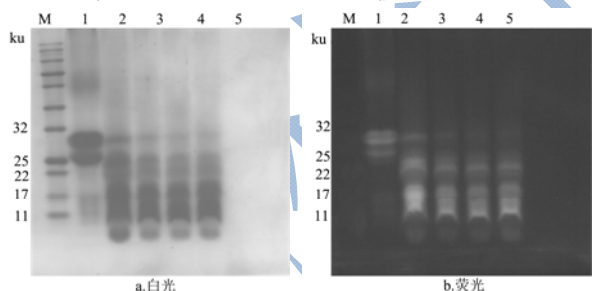


图5 人工胃液消化 1 h 样品 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE electrophoretograms of artificial gastric juice sample digested within 1 h

注: M 为 Marker, 1 为 FITC-酪蛋白, 2~5 分别为胃液水解 15 min、30 min、45 min 和 1 h 时的样品。

由图 5 可知, a 图中 FITC-酪蛋白的分子量分布于 25~32 ku 之间,经胃液水解 15 min 后,大部分的 FITC-酪蛋白被迅速分解,蛋白条带的分子量主要集中在 25 ku 以下,荧光条带在相同位置出现。随着水解时间的延长,分子量在 22~25 ku 的条带逐渐模糊,而分子量

在 17 ku 条带颜色逐渐加深,且荧光条带随着蛋白条带的迁移而变化。由此说明随着消化时间的延长, FITC-酪蛋白被消化成小分子的蛋白质或多肽,但荧光的标记却依然存在。

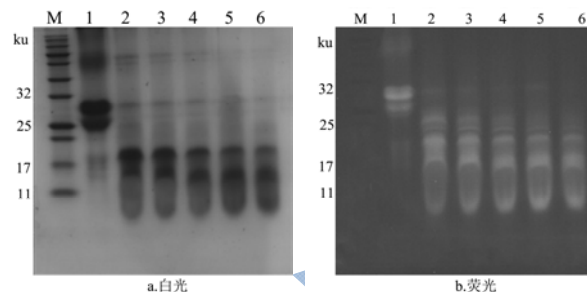


图6 人工胃液消化 1~5 h 样品 SDS-PAGE 电泳图

Fig.6 SDS-PAGE electrophoretograms of artificial gastric juice sample digested from 1 h to 5 h

注: M 为 Marker, 1 为 FITC-酪蛋白, 2~6 分别为胃液水解 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 时的样品。

由图 6 可知,在胃水解 2 h 时蛋白条带主要集中在 17 ku 左右,随着水解的时间的延长,5 h 时分子量为 17 ku 的蛋白条带逐渐变浅,11 ku 的蛋白条带逐渐加深,在此过程中,对应的荧光条带也一直清晰,由此说明经过人工胃液消化, FITC-酪蛋白被水解为分子量稍小的蛋白质或多肽且荧光标记依然存在。

### 2.5.2 肠液消化物的电泳分析

由图 7 可知,经人工肠液水解 15 min 后,大部分的 FITC-酪蛋白被水解,蛋白条带主要分布于 17 ku 左右,且荧光条带依然清晰。

由图 8 可知,水解 2 h 后,蛋白条带主要的分布于 11 ku 以下,荧光条带在相同的位置出现,随着水解时间的延长,5 h 后蛋白条带和荧光条带逐渐变得模糊。由人工胃液和人工肠液电泳结果对比可知,在相同的消化时间内 FITC-酪蛋白更容易被人工肠液所消化。

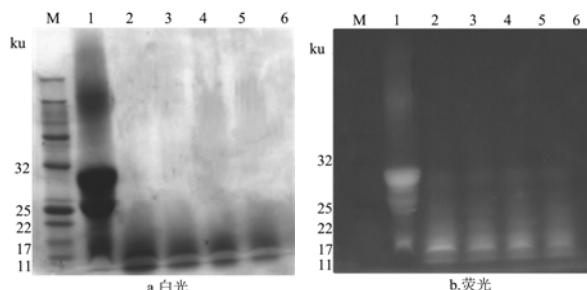


图7 人工肠液消化 1 h 样品 SDS-PAGE 电泳图

Fig.7 SDS-PAGE electrophoretogram of artificial intestinal juice sample digested within 1 h

注: M 为 Marker, 1 为 FITC-酪蛋白, 2~6 分别为胃液水解 15 min、30 min、45 min 和 1 h 时的样品。

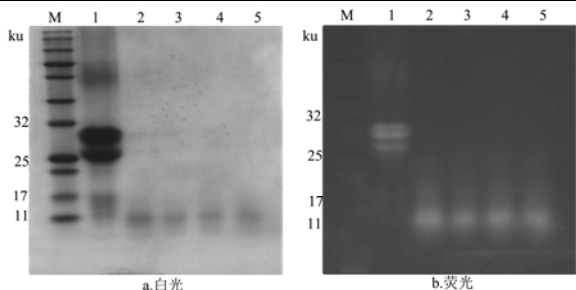


图8 人工肠液消化 2~5 h 样品 SDS-PAGE 电泳图

Fig.8 SDS-PAGE electrophoretograms of artificial intestinal juice sample digested from 2 h to 5 h

注: M 为 Marker, 1 为 FITC-酪蛋白, 2~5 分别为胃液水解 2 h、3 h、4 h 和 5 h 时的样品。

### 2.5.3 胃肠联合消化物的电泳分析

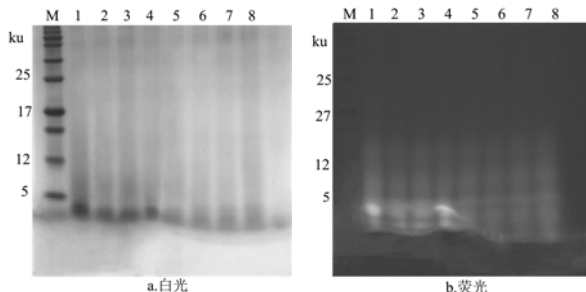


图9 人工胃肠联合消化 15 min~5 h 样品 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

Fig.9 Tricine-SDS-PAGE electrophoretograms of artificial gastrointestinal juice sample digested from 15 min to 5 h

注: M 为 Marker, 1~8 分别为胃肠联合水解 15 min、30 min、45 min、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 时的样品。

由图 9 可知, 经过胃肠液消化 15 min 后, FITC-酪蛋白的分子量主要分布于 5 ku 左右, 经水解 2 h 后, 蛋白条带主要集中于 5 ku 以下, 随着时间的延长, 蛋白条带和荧光条带都逐渐变得模糊, 且更小分子量的条带没有观察到, 可能原因是由于水解产生了分子量太小, 难于固定在凝胶中; 也可能是因为分子量变小, 在染色的过程中不易于染料结合, 再经过脱色很容易发生逸散, 所以不容易看到条带出现。综合以上电泳结果可知, FITC-酪蛋白经胃肠水解 2 h 仍保持有较强的荧光强度, 可用于动物实验对小分子多肽的肠吸收追踪。

### 2.6 不同肠段对 FITC-酪蛋白水解液的通透性分析

图 10 是不同肠段肠囊外液中的荧光强度, 在  $\text{Em}=520 \text{ nm}$  处均有最大的荧光强度, 因此选择 520 nm 处的荧光强度进行下面实验的分析。由于不同肠段外液中均检测出荧光, 可以初步判断, 不同肠段均可吸

收胃肠消化 2 h FITC-酪蛋白水解液, 但在不同肠段外液的荧光强度均存在一定的差异。结合图 3~13 可知在 2 h 时, 十二指肠的肠囊外液荧光强度最强为 216.12, 显著高于回肠和结肠两个肠段 ( $p<0.05$ ), 由此说明在 2 h 时十二指肠对 FITC-酪蛋白水解液具有最大吸收作用。而整个吸收过程看荧光强度的变化可知, 十二指肠吸收>空肠吸收>回肠吸收>结肠吸收, 而该结果与一般药物或食物在小肠的吸收情况基本一致<sup>[23]</sup>。出现该结果的原因可能是因为在 P-糖蛋白在十二指肠、空肠、回肠及结肠中的含量依次增加, 从而降低了食物在肠道的转运量<sup>[24]</sup>。张倩利用肠翻转模型检测 FITC-鹿茸蛋白是否可以透过肠道, 检测结果为小于 45 ku 的分子可透过肠粘膜吸收, 而酪蛋白水解液的分子量均在 5 ku 以下, 因此也完全有可能通过肠道粘膜被吸收<sup>[25]</sup>。

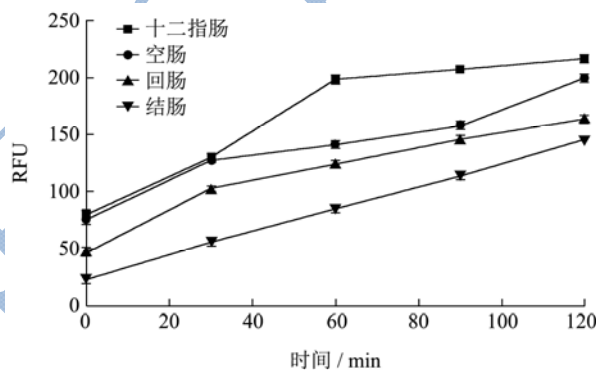


图10 胃肠水解液在不同肠段外液的荧光强度

Fig.10 Fluorescence intensity of gastrointestinal digestive juices in the different intestines truncation outside liquid

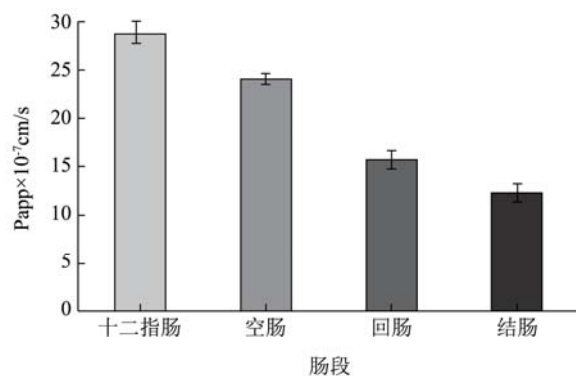


图11 2 h 胃肠消化液在不同肠段外液的表现渗透系数

Fig.11 Apparent permeability coefficient of 2 h gastrointestinal digestive juices in the different intestines truncation outside liquid

由图 11 可知, 120 min 时十二指肠 Papp 显著高于其它三个肠段 ( $p<0.05$ ), 表明 FITC-酪蛋白水解液主要在十二指肠被吸收, 下来依次为空肠、回肠和结肠, 再次验证了 FITC-酪蛋白水解液在整个肠道都能被吸收, 且在小肠可能存在特定吸收的部位。FITC-

酪蛋白水解液在各个肠段的表观渗透系数均小于  $Papp < 1.8 \times 10^{-4} \text{ cm/min}$ , 而低于该值表示化合物在体内较难吸收<sup>[26]</sup>, 由此推断, 与一般化学药物相比, FITC-酪蛋白水解液不易被人体吸收, 其原因可能是因为酪蛋白水解液中多肽的分子量太大, 受到肠道的屏障作用。

### 3 结论

综上所述, 研究结果表明, 通过体外模拟胃肠消化牛乳酪蛋白, 随着水解时间的延长, 人工胃液消化、人工肠液消化、胃肠联合消化三种消化方式的水解度均随时间的延长而增大, 单胃和单肠消化的 ACE 抑制率均随着水解时间的延长先快速增加, 随后逐渐降低, 而胃肠联合的 ACE 抑制率则是先降低再增加, 胃肠联合消化产生水解度和 ACE 抑制率均为最高, 使用二级质谱对多肽进行片段鉴定, 得出确实存在 ACE 抑制肽, 其多肽片段为 IPP、RYLGY、LHLPLP、AYFYPEL、RPKHPIKHQ 及 WQVLPNAVPAK; 体外模拟消化荧光标记酪蛋白, SDS-PAGE 和 Tricine-SDS-PAGE 都表明 FITC-酪蛋白经过胃肠消化后荧光标记稳定存在, 且水解物的分子量在 5 ku 以下, 并可被大鼠肠道吸收, 由肠非翻转模型结果得出酪蛋白消化液主要在十二指肠被吸收, 下来, 依次为空肠、回肠和结肠。牛乳酪蛋白消化后具有 ACE 抑制活性, 可能发挥一定的生理作用。

### 参考文献

- [1] Plank J, Andres P, Krause I, et al. Gram scale separation of casein proteins from whole casein on a Source 30Q anion-exchange resin column utilizing fast protein liquid chromatography (FPLC) [J]. *Protein Expression & Purification*, 2008, 60(2): 176-181
- [2] Silva S V, Malcata F X. Caseins as source of bioactive peptides [J]. *International Dairy Journal*, 2005, 15(1): 1-15
- [3] 赵肖蓉. 牛乳酪蛋白降血压肽的制备及活性研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2011  
ZHAO Xiao-rong. Study on the preparation and activity on antihypertensive peptide from casein protein [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2011
- [4] 张艳, 胡志和, 闫星, 等. 胃蛋白酶水解酪蛋白制备 ACE 抑制肽的条件[J]. *食品科学*, 2010, 31(14): 42-46  
ZHANG Yan, HU Zhi-he, YAN Xing, et al. Pepsin hydrolysis of casein for the preparation of ACE inhibitory peptides [J]. *Food Science*, 2010, 31(14): 42-46
- [5] 夏镇波. 酪蛋白源血管紧张素转换酶抑制肽制备及分离纯化研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008  
XIA Zhen-bo. Research on production and purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from casein [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008
- [6] Maruyama S, Mitachi H, Tanaka H, et al. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I - converting enzyme inhibitors derived from casein [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1987, 51(6): 1581-1586
- [7] Annamaria Perna, Amalia Simonetti, Emilio Gambacorta. Short communication: Effect of casein haplotype on angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant capacities of milk casein from Italian Holstein cows before and following in vitro digestion with gastrointestinal enzymes [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(9): 6922-6926
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第二版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005  
National Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia (Second Edition) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2005
- [9] 顾浩峰, 张富新, 张怡. 羊奶婴儿配方奶粉中蛋白质体外模拟消化研究[J]. *食品科学*, 2013, 34(19): 302-305  
GU Hao-feng, ZHANG Fu-xin, ZHANG Yi. In vitro digestion of proteins in goat milk formula [J]. *Food Science*, 2013, 34(19): 302-305
- [10] 杨文博, 张英华. 蛋白质水解度的测定方法研究[J]. *中国调味品*, 2014, 39(3): 88-90  
YANG Wen-bo, ZHANG Ying-hua. Study on the determination methods for hydrolysis degree of protein [J]. *China Condiment*, 2014, 39(3): 88-90
- [11] 谢瑛. 生物大分子药物的标记及其药代动力学研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010  
XIE Ying. Label of biomacromolecular drugs and their pharmacokinetic studies [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2010
- [12] 张歌. 牛乳和羊乳蛋白质差异比较及检测方法的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2013  
ZHANG Ge. Detection methods and comparison on protein difference of cow and goat milk [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2013
- [13] 张锐昌, 王绮, 张应龙, 等. Tricine-SDS-PAGE 测定小麦蛋白酶解物分子量分布[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(12): 168-171  
ZHANG Rui-chang, WANG Qi, ZHANG Ying-long, et al. Study on molecular weight distribution of wheat protein



- enzymolysate by Tricine-SDS-PAGE [J]. Food Research and Development, 2012, 33(12): 168-171
- [14] 孙波,迟玉杰,徐宁,等. Tricine-SDS-PAGE 电泳检测蛋清肽分子量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 385-388  
SUN Bo, CHI Yu-jie, XU Ning, et al. Study on tricine-SDS-PAGE method detecting albumen polypeptides molecular weight [J]. Food Science, 2008, 29(5): 385-388
- [15] 董宇,张英丰,杨庆,等. 黄连提取物在大鼠肠外翻实验中的吸收研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(9): 1056-1060  
DONG Yu, ZHANG Ying-feng, YANG Qing, et al. Absorption of extractive Rhizoma Coptidis in rat everted gut sacs [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2008, 33(9): 1056-1060
- [16] 武慧超,陆洋,杜守颖,等. 新旧工艺仙灵骨葆胶囊中淫羊藿大鼠肠吸收特性对比研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2648-2652  
WU Hui-chao, LU Yang, DU Shou-ying, et al. Comparative study on absorption kinetics in intestines of rats of Epimedii Folium of Xianlinggubao capsules prepared by different processes [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(19): 2648-2652
- [17] 吴军,翁春梅,刘晓东,等. 外翻肠囊法研究灵仙新苷肠吸收动力学[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(5): 601-605  
WU Jun, WENG Chun-mei, LIU Xiao-dong, et al. Intestinal absorption of clematichinenoside AR in rat everted gut sacs [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2014, 23(5): 601-605
- [18] 庞广昌,陈庆森,胡志和,等. 蛋白质的消化吸收及其功能评述[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 375-391  
PANG Guang-chang, CHEN Qing-sen, HU Zhi-he, et al. Bioactive peptides: absorption, utilization and functionality [J]. Food Science, 2013, 34(9): 375-391
- [19] 贾俊强. 超声对酶法制备小麦胚芽 ACE 抑制肽的影响及其作用机理[D]. 镇江: 江苏大学, 2009  
JIA Jun-qiang. Effect and mechanism of ultrasound on enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2009
- [20] 李东平. 酶解水牛乳蛋白制备降血压肽的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012  
LI Dong-ping. Study on preparing ACE inhibitory peptides from buffalo milk protein with enzymatic hydrolysis [D]. Nanning: Guangxi University, 2012
- [21] 祝倩,郭宇星,潘道东. 利用 Caco-2 细胞模型评价乳源 ACE 抑制肽小肠吸收机制的研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 330-335  
ZHU Qian, GUO Yu-xing, PAN Dao-dong. Progress in research on intestinal absorption mechanism of Milk-derived ACE inhibitory peptides using Caco-2 cell model [J]. Food Science, 2013, 34(9): 330-335
- [22] 刘文涛,于盼盼,李泽鸿. 抗狂犬病毒单克隆抗体的纯化及标记[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(4): 5-8  
LIU Wen-tao, YU Pan-pan, LI Ze-hong. Purification and application of the rabies viral monoclonal antibody [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(4): 5-8
- [23] 曹颖,李永吉,吕邵娃. 大鼠在体肠灌流模型在中药研究中的应用[J]. 中医学报, 2010, 38(3): 134-136  
CAO Ying, LI Yong-ji, LV Shao-wa. Application of rat intestinal perfusion model in traditional chinese medicine research [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2010, 38(3): 134-136
- [24] Maclean C, Moenning U, Reichel A, et al. Closing the gaps: a full scan of the intestinal expression of p-glycoprotein, breast cancer resistance protein, and multidrug resistance-associated protein 2 in male and female rats [J]. Drug Metabolism and Disposition, 2008, 36(7): 1249-1254
- [25] 张倩. 中药大分子活性成分示踪及鹿茸蛋白的示范性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2012  
ZHANG Qian. The establishment of active compound tracing method and its application in the research of pilose antler protein [D]. Changchun: Jilin University, 2012
- [26] Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. Pharmaceutical Research, 1996, 13(9): 1336-1342