

灰树花多肽-锌螯合物对孕期缺锌鼠后代的改善作用

张凤丽, 李静茹, 彭培植, 黄文琪, 赵立娜*

(福建农林大学国家菌草工程技术研究中心, 福建农林大学生命科学学院, 福建福州 350002)

摘要: 灰树花多肽-锌螯合物 (*Grifola frondosa* Polypeptide Zinc Chelate, GPs-Zn) 是灰树花多肽 (*Grifola frondosa* Polypeptide, GPs) 和锌离子的螯合产物, 利用电镜扫描、X-射线粉末衍射技术、红外光谱和紫外光谱等技术对 GPs-Zn 进行结构分析; 通过构建 ICR 母鼠缺锌模型, 进一步探究 GPs-Zn 对孕期缺锌鼠后代的影响。表征结果表明, GPs 和锌离子螯合成一种新的物质; 红外光谱对比图发现肽链上的氨基和羧基都参与了锌离子的配位反应; 紫外光谱图发现, GPs-Zn 中多肽的羧基原子和锌离子结合, 诱导紫外光谱的红移, 表明 GPs 与锌离子结合形成 GPs-Zn。动物实验表明: GPs-Zn 可将缺锌仔鼠胸腺指数提高 78.69% (雌鼠) 和 87.55% (雄鼠); 脾脏指数提高 40.28% (雌鼠) 和 43.22% (雄鼠); 体质量提高 89.98% (雌鼠) 和 88.30% (雄鼠); 且血清的超氧化物歧化酶 (SOD) 活力提高了 108.07% (雌鼠) 和 26.16% (雄鼠); 锌浓度提高 14.74% (雌鼠) 和 29.33% (雄鼠); 碱性磷酸酶 (AKP) 水平降低 52.28% (雌鼠) 和 62.48% (雄鼠)。综上可知, GPs-Zn 对孕期缺锌鼠后代仔鼠的胸腺指数、脾脏指数、超氧化物歧化酶活力、锌浓度和碱性磷酸酶水平有一定改善作用。

关键词: 灰树花多肽-锌螯合物 (GPs-Zn); 结构表征; 小鼠

文章编号: 1673-9078(2024)04-18-26

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.4.0394

Improvement Effects of *Grifola frondosa* Polypeptide-Zinc Chelate on the Offspring of Zinc-deficient Pregnant Mice

ZHANG Fengli, LI Jingru, PENG Peizhi, HUANG Wenqi, ZHAO Lina*

(National Engineering Research Center of JUNCAO Technology, College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Grifola frondosa* polypeptide-zinc chelate (GPs-Zn) is the chelation product of *Grifola frondosa* polypeptides (GPs) and zinc ions. GPs-Zn was subjected to structural characterization using scanning electron microscopy, X-ray powder diffraction, infrared spectroscopy, and ultraviolet spectroscopy. The effects of GPs-Zn on the offspring of zinc-deficient pregnant mice were explored by constructing an adult female ICR mouse model of zinc deficiency. Characterization results showed that GPs and zinc ions formed a novel substance through chelation; IR spectral comparison revealed that both amino

引文格式:

张凤丽,李静茹,彭培植,等.灰树花多肽-锌螯合物对孕期缺锌鼠后代的改善作用[J].现代食品科技,2024,40(4):18-26.

ZHANG Fengli, LI Jingru, PENG Peizhi, et al. Improvement effects of *Grifola frondosa* polypeptide-zinc chelate on the offspring of zinc-deficient pregnant mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(4): 18-26.

收稿日期: 2023-04-03

基金项目: 福建省重大专项项目 (2021NZ029009); 福建省科学技术厅对外合作项目 (2021H0008); 福建农林大学学科交叉融合推动菌草科学及产业高质量发展项目 (XKJC-712021030); 福建农林大学科技创新专项基金项目 (KFb22115XA)

作者简介: 张凤丽 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: z17111314z@163.com

通讯作者: 赵立娜 (1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: zln20002000@163.com

and carboxyl groups on the peptide chain participated in the coordination reaction of zinc ions. The UV spectrum of GPs-Zn exhibited a red shift attributed to the binding of the carbonyl atoms of the peptides to zinc ions, indicating that GPs bound to zinc ions to form GPs-Zn. Animal experiments showed that GPs-Zn increased the thymus index of zinc-deficient offspring by 78.69% (female rats) and 87.55% (male rats), the spleen index by 40.28% (female rats) and 43.22% (male rats), the body weight by 89.98% (female rats) and 88.30% (male rats), the superoxide dismutase (SOD) activity in serum by 108.07% (female rats) and 26.16% (male rats), and the zinc concentration by 14.74% (female rats) and 29.33% (male rats), but decreased the serum alkaline phosphatase (AKP) activity by 52.28% (female rats) and 62.48% (male rats). GPs-Zn can improve the thymus index, spleen index, SOD activity, zinc concentration, and AKP activity of the offspring of zinc-deficient pregnant mice.

Key words: *Grifola frondosa* polypeptide-zinc chelate (GPs-Zn); structural characterization; mice

灰树花 (*Grifola frondosa*) 是一种具有食用和药用价值的真菌^[1,2], 主要含碳水化合物、维生素、蛋白质和有多种生物活性的甾醇等^[3]。灰树花因其具有独特的药用及营养价值而受到广泛关注^[4], 在全球菌类产量中位居第二^[5]。灰树花蛋白质质量分数为 25.20%, 人体所需氨基酸质量分数为 18.68%, 其中必需氨基酸占总氨基酸质量分数的 45.50%。灰树花蛋白质因具有营养价值和平衡机体所需的氨基酸而备受关注^[6]。灰树花还有多种生理活性, 如抗肿瘤^[7,8]、免疫调节, 抑菌、抗病毒、抗糖尿病、降血糖^[9]等。作为灰树花的活性成分之一, 灰树花多肽也具有抗氧化、抗菌、免疫调节、降血脂和降血糖等活性^[10]。

锌是人体内不可缺少的微量元素, 大多分布在骨骼、肌肉、血浆和头发^[11], 对人体健康及生长发育有重要的生物学作用^[12]。缺锌会造成生长发育缓慢, 食欲不振等现象; 锌参与众多蛋白质组成和酶的合成, 缺锌会影响人体维生素 A 的代谢, 影响还原酶活性, 使维生素 A 的利用率降低^[13]; 锌对人体新陈代谢至关重要, 有多种生物学作用, 包括催化和调节功能, 它还是多种酶合成的辅助因子^[14]。锌元素是免疫器官胸腺发育的营养素, 只有锌元素充足才能有效保证胸腺发育, 正常分化 T 淋巴细胞, 促进机体细胞免疫功能。孕期胎儿生长发育需要摄入较多锌元素, 因此孕妇是易缺锌人群, 已经有研究表明, 大部分孕妇均有锌缺乏的情况, 特别是孕早期, 孕妇必须通过生理调节来补充锌元素, 以此来维持自身锌及胎儿的锌需求^[15]。郭洪辉等^[16,17]的研究表明罗非鱼鳞胶原肽螯合锌有抗氧化及抑菌活性, 河豚鱼皮胶原寡肽螯合锌在体内外都有抗氧化活性, 故选灰树花多肽作为锌螯合的原料。

近年来, 关于灰树花多糖活性的研究已有较大突破, 而对于灰树花多肽及其螯合物的研究相对较

少, 故本文对灰树花多肽-锌螯合物进行研究, 并对其结构表征, 进一步研究灰树花多肽-锌螯合物对孕期缺锌鼠后代的影响, 为灰树花多肽进一步的研究利用提供理论根据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

灰树花, 庆元县宏亿农业发展有限公司提供。

1.1.2 试剂

复合蛋白酶 (活力 ≥ 120 U/mg), 北京索莱宝科技有限公司; 无水乙醇 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、氢氧化钠 (NaOH)、二硫脲、氯化锌 (ZnCl_2)、碳酸氢铵 (NH_4HCO_3)、乙腈、甲酸等试剂均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司; 锌离子检测试剂盒、碱性磷酸酶 (AKP) 测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒等购于南京建成生物工程研究所。

1.1.3 仪器

低速离心机, 湖南凯达科学仪器有限公司; pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 冷冻干燥机, 河北国辉实验仪器有限公司; 水浴恒温振荡器, 常州精达仪器制造有限公司; 红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; X-射线粉末衍射机, 荷兰飞利浦公司; SEM 场发射扫描电子显微镜, 美国 FEI 公司; 冷冻离心机, 艾本德中国有限公司; 离心浓缩仪, 上海辅泽商贸有限公司。

1.1.4 试验动物

由福州吴氏动物中心提供, 动物许可证号:

SCXK(沪)2017-0005), 选取8周龄, 体质量为(30±2)g, SPF级的ICR成年雌鼠, (每组8只, 同批次雄鼠每组8只(仅供雌鼠受孕), 一周适应期小鼠可以自由饮食饮水。生活环境温度20~25℃, 湿度45%~55%, 昼夜12h节律均衡。仔鼠每组随机选取雌雄仔鼠各8只。

1.2 GPs-Zn 的制备

按照熊煜等^[10]的方法提取得到GPs, 配制GPs溶液(1g/100mL), ZnCl₂溶液(0.02mol/L), GPs溶液和ZnCl₂溶液体积比为2.5:1, 充分混合后调节pH值为6.7, 将GPs与ZnCl₂混合溶液置于47℃恒温水浴摇床中充分反应35min。反应结束冷却至室温, 加入体积分数95%乙醇洗涤静置过夜后离心(4000r/min, 20min)弃上清, 将沉淀冷冻干燥得到GPs-Zn。用火焰原子吸收光谱仪测得GPs-Zn的锌离子质量分数为9.41%。

1.3 GPs-Zn 的结构表征

1.3.1 电镜扫描(SEM)观察

扫描电子显微镜观察时, 用导电胶将4个GPs或GPs-Zn样品粘到样品观察台, 在高真空环境下用金喷溅镀膜, 并分别用5000×和10000×的扫描电镜观察拍照。

1.3.2 X-射线粉末衍射(XRD)

取适量GPs和GPs-Zn分别磨成粉, 以4°/min的扫描速度从5°扫描到90°, 发射狭缝0.3mm, 防散射狭缝1°, 然后通过X射线衍射进行分析。

1.3.3 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)扫描

将1mg冻干的样品与100mg干燥的溴化钾(KBr)混合加载至红外光谱仪上, 通过FT-IR光谱红外分光光度计记录波长4000cm⁻¹至550cm⁻¹红外光谱扫描图。

1.3.4 紫外(UV)光谱扫描

通过紫外分光光度计记录GPs和GPs-Zn在202~800nm波长范围的紫外光谱。

1.4 GPs-Zn 对小鼠后代的影响

1.4.1 动物分组及造模

动物实验中, 正常饮食组饲料中锌离子质量分数30mg/kg; 缺锌饮食组饲料中锌离子质量分数0mg/kg。根据中国营养学会推荐的锌离子摄入量及体表面积折算的等效剂量比值, 结合实验前期的预

实验结果, 故拟定如下分组和仔鼠的灌胃剂量:

组1(CO): 正常孕鼠分娩的仔鼠, 正常饮食, 灌胃超纯水;

组2(ZD): 缺锌孕鼠分娩的仔鼠, 缺锌喂养, 灌胃超纯水;

组3(ZD+): 缺锌孕鼠分娩的仔鼠, 正常饮食, 灌胃超纯水;

组4(ZS1): 缺锌孕鼠分娩的仔鼠, 缺锌喂养, 灌胃高质量浓度GPs-Zn(150mg/mL);

组5(ZS2): 缺锌孕鼠分娩的仔鼠, 缺锌喂养, 灌胃低质量浓度GPs-Zn(50mg/mL);

组6(PF1): 正常孕鼠分娩的仔鼠, 正常饮食, 灌胃高质量浓度GPs-Zn(150mg/mL);

组7(PF2): 正常孕鼠分娩的仔鼠, 正常饮食, 灌胃低质量浓度GPs-Zn(50mg/mL)。

1.4.2 生长发育的变化

记录实验小鼠的体重变化, 饲喂7周, 从第3周小鼠单独喂养, 开始称重。

1.4.3 血清指标的测定

小鼠禁食12h后, 对其进行眼球取血, 并将血液保存至含有抗凝剂的2mL离心管中, 静置2h后置于4℃条件下离心10min(3000r/min), 取上清液于-20℃冰箱保藏, 用于测定血清中锌浓度, 碱性磷酸酶活性和超氧化物歧化酶水平。

1.4.4 小鼠脏器指数的测定

小鼠麻醉处死后, 取出胸腺和脾脏, 去除其他组织, 擦拭干净, 称重并计算胸腺指数和脾脏指数。计算公式如下:

$$T = \frac{M_1}{M_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$S = \frac{M_2}{M_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

T—胸腺指数, %;

S—脾脏指数, %;

M₀—小鼠体质量, g;

M₁—胸腺质量, g;

M₂—脾脏质量, g。

1.5 数据统计分析

试验数据以平均值±标准差表示, 采用SPSS 11.0软件对数据进行方差分析(ANOVA), 同时进行LSD检验。以P<0.05为有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 扫描电子显微镜 (SEM) 观察分析

扫描电子显微镜能够实现材料从纳米到毫米的跨尺度显微组织表征,因此,常用于元素组成的形态观察和定量分析^[18]。SEM在5000×和10000×条件下观察GPs和GPs-Zn的表面结构结果如图1所示。在5000×或10000×两种倍数下,图中1a和1b所示,灰树花多肽与锌离子螯合前均呈片状结构,物质结构表面相对光滑,有孔状结构。而螯合后,如图1c和1d所示,GPs-Zn的表面呈块状结构,物质结构呈大颗粒状聚集,表面粗糙且有小颗粒,可能是锌离子晶体,这与王晴晴等^[19]蛋清多肽-铁螯合后表面粗糙不平并形成了团状颗粒聚集,组织结构更加紧密结果相一致。加锌螯合反应后,物质的微观结构发生了改变。除了离子结合和配位结合外,螯合还被认为具有一定的吸附作用^[20]。

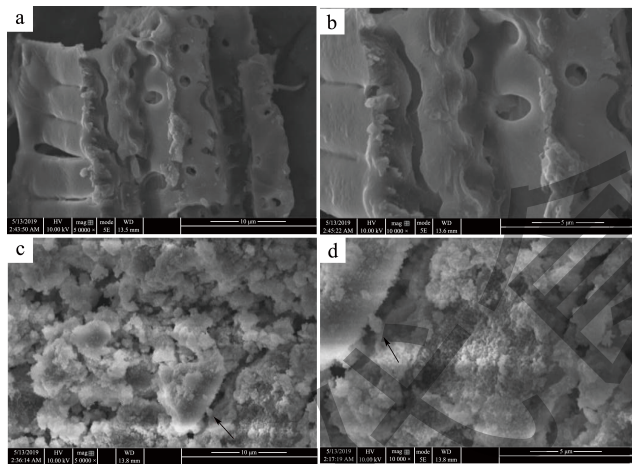


图1 GPs和GPs-Zn的扫描电镜图

Fig.1 SEM images of GPs and GPs-Zn

注:(a) GPs 5000×;(b) GPs 10000×;(c) GPs-Zn 5000×;(d) GPs-Zn 10000×。

2.2 X-射线粉末衍射分析

图2为GPs和GPs-Zn的X-射线衍射图谱。结果显示,GPs和GPs-Zn均有明显衍射峰,与GPs相比,GPs-Zn图谱在衍射峰的角度和相对强度都存在明显差异,说明多肽与锌螯合后结构发生了改变。散射的X射线的相位将在某些方向上增强,显示出与晶体结构相对应的独特衍射现象^[21]。螯合后GPs衍射峰相对强度与角度发生改变,可能是GPs的COO⁻、-NH₂与Zn²⁺以离子键和配位键的形式结合导致晶体结构改变^[22]。

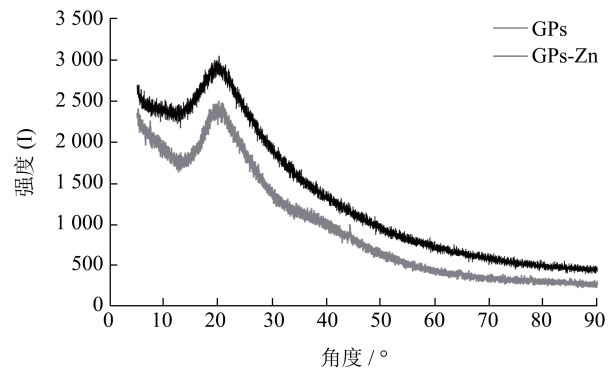


图2 GPs和GPs-Zn的X-衍射图谱

Fig.2 XRD patterns of GPs and GPs-Zn

2.3 红外光谱分析

由图3可知GPs-Zn的红外光谱图不同于GPs,表明了GPs与Zn²⁺结合后结构发生了改变。与GPs红外光谱相比,GPs-Zn在3388cm⁻¹处有明显的波动。在红外光谱检测中,通常会通过1650cm⁻¹附近是否有吸收峰,来判断吸收峰中是否存在C=O伸缩振动,以1235cm⁻¹附近是否有吸收峰来判断羧酸的伸缩振动,以此说明金属螯合肽中是否含有-COOH结构^[23]。由上图可以看出在1662cm⁻¹和1244cm⁻¹处均有较强的吸收峰,表明多肽和锌离子之间相互作用的位点是C=O和-COOH,这与杨静等^[24]多肽螯合物的螯合反应推测相似。GPs-Zn在1088cm⁻¹处也有明显的吸收峰,这种吸收峰位移和强度发生变化,可能是GPs中的一些键与锌离子结合成GPs-Zn的结果。

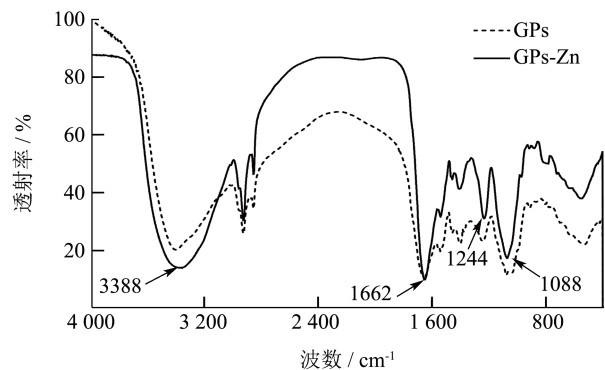


图3 GPs和GPs-Zn的红外光谱

Fig.3 Infrared spectra of GPs and GPs-Zn

2.4 紫外光谱分析

图4表明,GPs和GPs-Zn的紫外吸收光谱显示出明显的带移位。用紫外分光光度法可以分析物质的结构特征,螯合后样品的差异可以从位错和紫外吸收光谱强度的变化中进行分析^[25]。紫外吸收光

谱是由于价电子的跃迁产生的,用以推断物质的组成和结构等,当多肽与矿物质离子形成配合物的过程中,改变了产物跃迁所需的能量,从而影响其波长和吸收程度。GPs 和 GPs-Zn 的紫外吸收光谱在波长 250 nm 附近处均有一个吸收峰;GPs 的最大吸收峰在波长 410 nm 附近,而 GPs-Zn 最大吸收峰发生了转移,在波长 250 nm 附近。这意味着 GPs 与 Zn 离子结合可能是由于 GPs 中的 C=O, -COOH 和 -OH, -NH₂ 与锌离子结合,诱导强度变化和紫外光谱中的红移,这与刘腾飞等^[26]鸡皮胶原蛋白多肽锌发生螯合反应后,螯合物的最大紫外吸收波长发生了红移结果一致。波段红移和强度变化表明 GPs 与锌离子结合形成 GPs-Zn^[27,28]。

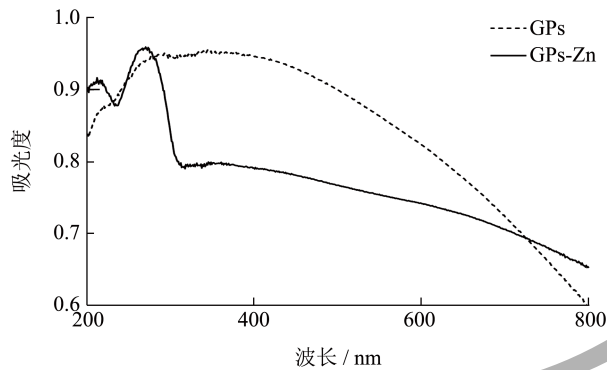


图 4 GPs和GPs-Zn的紫外光谱
Fig.4 UV of GPs and GPs-Zn

2.5 仔鼠体质量分析

由表 1 和表 2 看出在仔鼠出生 3~7 周时雌雄仔鼠中 ZD 组、ZD+ 组与空白组体质量相比有显著性差异。当仔鼠出生第 7 周时雌鼠中,相比于空白组,ZD 组、ZD+ 组、ZS1 组体质量显著降低,雄鼠中 ZD 组、ZD+ 组和 ZS2 组体质量显著降低。相比于 ZD 组,GPs-Zn 可将缺锌仔鼠体质量提高 89.98% (雌鼠) 和 88.30% (雄鼠)。由表 1 和表 2 可知,雌鼠与雄鼠 ZD 组体质量均低于 CO 组、ZS 组和 PF 组,ZS 组体质量均高于 ZD 组体重,雄鼠平均体质量普遍高于雌鼠平均体质量。雌雄仔鼠中,灌胃 GPs-Zn 对雌鼠体质量的增强效果更为显著,推测可能是雌鼠更能通过 GPs-Zn 来缓解因缺锌而导致的体质量下降。通过灌胃 GPs-Zn 可以改善仔鼠体质量,且相对于 CO 组体质量改善效果显著。GPs-Zn 质量浓度为 150 mg/mL 时效果最好,对仔鼠的体质量改善情况更加显著,GPs-Zn 质量浓度为 50 mg/mL 时,仔鼠体质量虽有改善,但与正常仔鼠体质量仍存在显著差异。当正常饮食仔鼠灌胃 GPs-Zn 体质量会明显异常于正常仔鼠。因此本实验说明,母鼠孕期缺锌,仔鼠出生后灌胃 GPs-Zn 高剂量组可以改善仔鼠体质量,帮助其恢复到正常水平,低剂量组体质量与 CO 组仍存在显著差异。

表 1 雌仔鼠体质量变化表

Table 1 Weight change of female offspring

时间/周	体质量/g						
	CO	ZD	ZD+	ZS1	ZS2	PF1	PF2
3	20.15 ± 0.41 ^c	8.24 ± 0.68 ^f	8.02 ± 0.32 ^f	15.91 ± 0.44 ^d	12.34 ± 0.38 ^c	21.47 ± 0.38 ^b	23.16 ± 0.61 ^a
4	22.94 ± 0.79 ^c	9.61 ± 1.07 ^f	14.54 ± 1.06 ^c	17.24 ± 0.66 ^d	17.84 ± 1.09 ^d	24.39 ± 0.52 ^b	25.78 ± 0.64 ^a
5	23.90 ± 1.04 ^b	10.02 ± 1.00 ^c	19.11 ± 0.61 ^d	19.29 ± 0.49 ^d	21.04 ± 0.50 ^c	25.70 ± 0.45 ^a	26.57 ± 0.85 ^a
6	26.89 ± 1.02 ^a	9.57 ± 1.26 ^d	23.07 ± 0.69 ^c	24.55 ± 0.35 ^b	25.47 ± 1.09 ^b	27.30 ± 0.53 ^a	27.11 ± 0.81 ^a
7	28.78 ± 1.27 ^{ab}	13.59 ± 1.40 ^d	25.54 ± 0.87 ^c	25.82 ± 0.65 ^c	25.79 ± 0.38 ^b	27.90 ± 0.61 ^b	29.46 ± 0.74 ^a

注:同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 (P<0.05)。下表同。

表 2 雄仔鼠体质量变化表

Table 2 Weight change of male offspring

时间/周	体质量/g						
	CO	ZD	ZD+	ZS1	ZS2	PF1	PF2
3	23.22 ± 0.93 ^b	9.21 ± 0.84 ^e	9.47 ± 0.40 ^e	16.03 ± 0.90 ^c	13.17 ± 0.78 ^d	27.22 ± 1.41 ^a	26.65 ± 0.64 ^a
4	26.08 ± 1.58 ^c	10.17 ± 1.00 ^f	15.50 ± 2.56 ^c	20.91 ± 0.21 ^d	20.11 ± 0.97 ^d	32.22 ± 0.26 ^a	29.82 ± 0.58 ^b
5	30.24 ± 0.61 ^b	10.63 ± 0.82 ^e	21.57 ± 0.38 ^d	24.58 ± 1.13 ^c	24.25 ± 2.05 ^c	33.41 ± 0.72 ^a	31.26 ± 0.54 ^b
6	32.28 ± 0.59 ^b	10.53 ± 1.28 ^e	27.97 ± 1.01 ^{cd}	28.93 ± 0.70 ^c	27.13 ± 1.64 ^d	36.39 ± 1.09 ^a	32.04 ± 0.69 ^b
7	34.13 ± 0.58 ^{ab}	17.37 ± 2.91 ^e	30.55 ± 0.42 ^d	32.71 ± 1.06 ^{bcd}	31.17 ± 2.11 ^{cd}	36.64 ± 2.16 ^a	33.57 ± 0.67 ^{bc}

2.6 仔鼠血清 AKP 结果分析

如图 5 所示, 对仔鼠进行不同的灌胃处理, 仔鼠血清 AKP 会发生变化。锌是合成 AKP 必需的金属离子, 也是 AKP 活性中心的组成成分和激活因子, 其活性在一定范围内与锌含量密切相关^[29], 是锌水平评价的敏感指标^[30]。在缺锌状态时, AKP 释入血清, 促使血清 AKP 活性增加。用 GPs-Zn 灌胃的 ZS1 组和 ZS2 组, 缺锌仔鼠血清中的 AKP 恢复至接近正常水平, 与 ZD 组相比, GPs-Zn 可将碱性磷酸酶 (AKP) 水平降低 52.28% (雌鼠) 和 62.48% (雄鼠)。雌雄仔鼠中, 灌胃 GPs-Zn 对雌性仔鼠血清 AKP 水平的影响更为显著, 推测可能是雌鼠更能通过 GPs-Zn 来缓解因缺锌而导致的血清 AKP 水平的升高。母鼠缺锌仔鼠正常饮食的 ZD+ 组可以显著改善血清中 AKP, 但雄鼠与正常饲养仔鼠仍有显著性差异。结果表明, GPs-Zn 可以改善小鼠体内 AKP 水平; 通过摄入不同质量浓度的 GPs-Zn 可以促使小鼠血清的 AKP 恢复到正常水平, 进一步说明 GPs-Zn 具有良好的恢复仔鼠血清 AKP 水平的作用, 杨杰等^[30]研究发现, 小肽螯合锌可将缺锌小鼠血清 AKP 活力降低约 29.91%。因锌与 AKP 合成密切相关, 缺锌仔鼠血清 AKP 活力增加, 灌胃 GPs-Zn 后, 血清 AKP 活力降低, 表明 GPs-Zn 可改善缺锌仔鼠血清 AKP 水平。

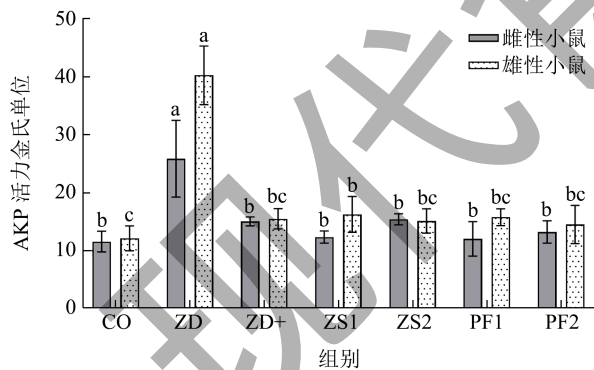


图 5 各组血清 AKP 对比图

Fig.5 Comparison of serum AKP content in each group

注: 图中小写字母表示显著性差异 $P < 0.05$ 。下图同。

2.7 仔鼠血清 SOD 活力结果分析

如图 6 所示, 与 CO 组相比, ZD 组和 ZD+ 组血清 SOD 活力显著降低, 并且雄鼠与雌鼠间也有显著差异, GPs-Zn 喂养的仔鼠血清中 SOD 活力显著提高, 且与正常组相比, 无显著差异。与 ZD 组相比, GPs-Zn 可将缺锌仔鼠血清的超氧化物歧化

酶 (SOD) 活力提高 108.07% (雌鼠) 和 26.16% (雄鼠)。雌雄仔鼠中, 灌胃 GPs-Zn 对雌性仔鼠血清 SOD 活力的影响更为显著, 推测可能是雌鼠更能通过 GPs-Zn 来缓解因缺锌而导致的血清 SOD 活力的降低。超氧化物歧化酶存在于所有生物细胞中, 能够催化超氧化物转化, 通过摄入不同质量浓度的 GPs-Zn 可以增加机体的 SOD 活力, 从而增强机体的抗氧化效果, 蒋丽等^[31]研究发现, 多肽可将小鼠血清 SOD 活力提高约 11.72%, 进一步说明 GPs-Zn 具有良好的提高机体抗氧化效果的作用。

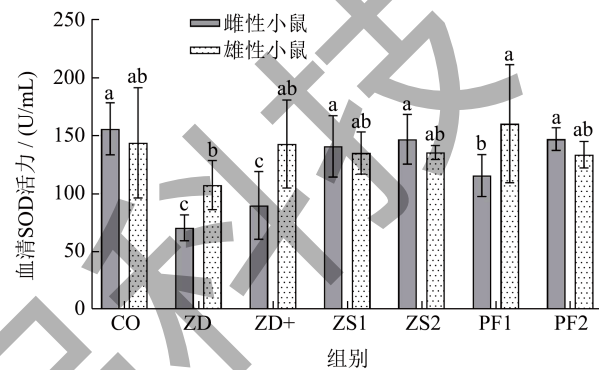


图 6 各组血清 SOD 活力对比图

Fig.6 Comparison of serum SOD activity in each group

2.8 仔鼠血清锌浓度结果分析

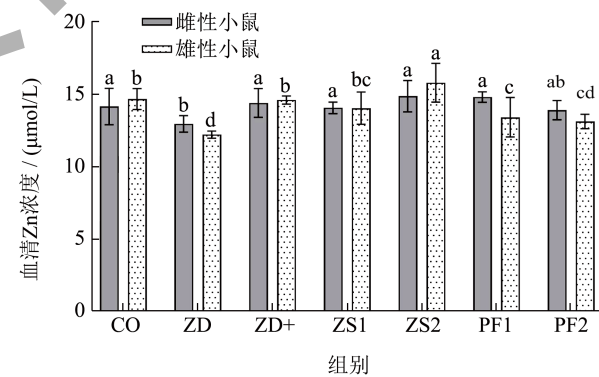


图 7 各组小鼠血清锌浓度对比图

Fig.7 Comparison of serum zinc content of mice in each group

如图 7 所示, 与 CO 组相比, ZD 组小鼠血清锌浓度显著降低, 并且雄性仔鼠锌浓度降低更加显著, 表明母鼠孕期缺锌对雄性仔鼠的血清锌浓度影响更大。用 GPs-Zn 喂养仔鼠可使仔鼠血清中锌浓度显著提高, 且对孕期缺锌导致的仔鼠缺锌补锌效果非常显著, 且无明显性别差异。与 ZD 组相比, GPs-Zn 可将缺锌仔鼠血清的超氧化物歧化

雄性仔鼠血清锌浓度的影响更为显著,推测可能是雄鼠更能通过 GPs-Zn 来补充锌离子,缓解缺锌饮食而导致的血清锌浓度的降低。当 GPs-Zn 质量浓度为 50 mg/mL 时,雄性仔鼠血清的锌浓度显著增强,且明显高于其他各组,低质量浓度 GPs-Zn 对缺锌仔鼠补锌效果较好,这与陈铭^[32]灌胃低质量浓度蛋白肽螯合钙的大鼠中血钙浓度高于灌胃中质量浓度的结果相一致,推测可能是低剂量螯合物更利于机体吸收;而高、低质量浓度对雌性小鼠锌浓度水平的改善作用无显著性差异,可以看出,螯合锌对于缺锌仔鼠的补锌效果优于正常喂养的仔鼠。进一步表明, GPs-Zn 具有很好的补锌效果,这与王紫旭^[33]的海参锌螯合多肽可促锌吸收作用的研究结果一致,表明肽螯合锌对缺锌幼鼠补锌效果较为显著。

2.9 仔鼠脾脏指数结果分析

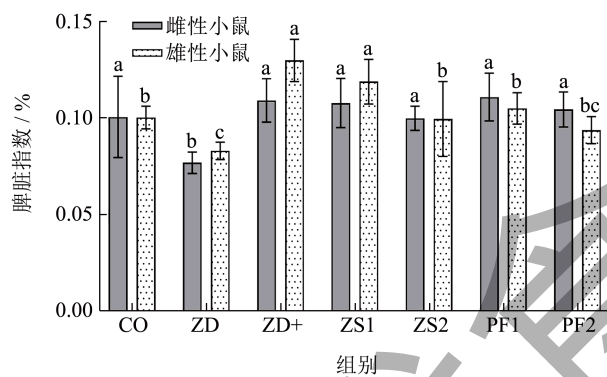


图 8 仔鼠脾脏指数分析图

Fig.8 Analysis of spleen index of offspring

由图 8 可以看出,相比 CO 组, ZD 组雌雄仔鼠的脾脏指数均显著降低,表明缺锌会对仔鼠脾脏的正常发育造成影响,而脾脏是机体的免疫器官,对机体的免疫力有很大影响^[34]。缺锌影响脾脏的正常发育,从而进一步影响机体免疫力。孕期缺锌导致的仔鼠缺锌,仔鼠的脾脏指数显著降低,机体免疫力受到影响,灌胃 GPs-Zn 可显著提高仔鼠的脾脏指数。与 ZD 组相比, GPs-Zn 可将缺锌仔鼠脾脏指数提高 40.28% (雌鼠) 和 43.22% (雄鼠),这优于刘银媛等^[35]的大豆多肽可将小鼠脾脏指数提高约 16.67%。雌雄仔鼠中,灌胃 GPs-Zn 对雄性仔鼠脾脏指数的影响更为显著,推测可能是雄鼠更能通过 GPs-Zn 来促进脾脏发育,缓解缺锌饮食而导致的脾脏发育受损。质量浓度为 150 mg/mL 时,雄性仔鼠的脾脏指数显著高于 CO 组,相对于 ZD 组, GPs-Zn

可提高仔鼠脾脏指数,且与仔鼠正常饮食的脾脏指数无显著差异。

2.10 仔鼠胸腺指数结果分析

由图 9 可知,相对于 CO 组, ZD 组雌雄仔鼠的胸腺指数显著下降,胸腺也是机体较大的免疫器官,缺锌喂养也会对机体的胸腺发育造成影响。而对仔鼠灌胃 GPs-Zn 可以显著增强仔鼠的胸腺指数,且高于正常仔鼠的胸腺指数水平,表明 GPs-Zn 对仔鼠胸腺的正常发育有一定促进作用。与 ZD 组相比, GPs-Zn 可将缺锌仔鼠胸腺指数提高 78.69% (雌鼠) 和 87.55% (雄鼠),这优于刘银媛^[35]的大豆多肽可将小鼠胸腺指数提高约 42.86%。雌雄仔鼠中,灌胃 GPs-Zn 对雄性仔鼠胸腺指数的影响更为显著,推测可能是雄鼠更能通过 GPs-Zn 来促进胸腺发育,缓解缺锌饮食而导致的胸腺发育受损。在不同分组的雌雄仔鼠中,相对于雌性仔鼠,雄性仔鼠的胸腺指数整体较低。对于雌雄仔鼠而言, GPs-Zn 均能将其胸腺指数恢复至正常水平。相对于 ZD 组, GPs-Zn 可提高仔鼠胸腺指数,且与仔鼠正常饮食的胸腺指数无显著差异。

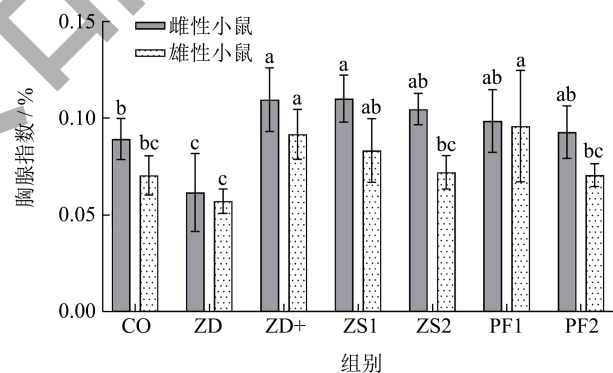


图 9 仔鼠胸腺指数分析图

Fig.9 Analysis of thymus index of offspring

3 结论

X-射线粉末衍射和扫描电镜结果表明了多肽和锌离子螯合成一种新的物质;红外谱图的对比发现肽链上的氨基和羧基参与了锌离子的配位;紫外光谱图发现, GPs-Zn 中多肽的羰基原子和锌离子结合,诱导紫外光谱的红移,表明 GPs 与锌离子结合形成 GPs-Zn。动物实验结果表明,在母鼠怀孕期间缺锌会对出生后的仔鼠造成一定的影响, GPs-Zn 可显著 ($P < 0.01$) 提高母鼠怀孕期间因缺锌导致减少的仔鼠血清中锌离子浓度和超氧化物歧化酶 (SOD) 活

力,降低碱性磷酸酶(AKP)水平。此外,GPs-Zn还能显著($P<0.01$)提高仔鼠的脾脏指数和胸腺指数。

参考文献

- [1] YU J S, SEUNG C L. Antioxidant activity and β -glucan contents of hydrothermal extracts from maitake (*Grifola frondosa*) [J]. Food Science & Biotechnology, 2014, 23(1): 277-282.
- [2] WANG C E, ZENG F, LIU Y L, et al. Coumarin-rich *Grifola frondosa* ethanol extract alleviate lipid metabolism disorders and modulates intestinal flora compositions of high-fat diet rats [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 85: 104649.
- [3] CHEN S D, YONGT Q, XIAO C, et al. Pyrrole alkaloids and ergosterols from *Grifola frondosa* exert anti- α -glucosidase and anti-proliferative activities [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 43: 196-205.
- [4] CHENY Q, LIU D, WANGD Y, et al. Hypoglycemic activity and gut microbiota regulation of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa* in type 2 diabetic mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 126(4): 295-302.
- [5] 杨冰峰.灰树花的生理功能和栽培技术研究进展[J].安徽农业科学,2017,567(26):126-128.
- [6] YUAN B, ZHAO C, CHENG C, et al. A peptide-Fe (II) complex from *Grifola frondosa* protein hydrolysates and its immunomodulatory activity [J]. Food Bioscience, 2019, 32: 100459.
- [7] 陈沛,刘会平,孙娜新,等.灰树花多糖的分离纯化及其体外抗肿瘤活性[J].现代食品科技,2018,34(6):107-114.
- [8] 张桂春,刘玉静,解卫海,等.响应面法优化灰树花发酵全液多糖提取工艺及其抗肿瘤活性[J].食品科学,2013, 34(24):30-35.
- [9] XIAO C, JIAO C W, XIE Y Z, et al. *Grifola frondosa* GF5000 improves insulin resistance by modulation the composition of gut microbiota in diabetic rats [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 77(913-916): 104313.
- [10] 熊煜,张凤丽,刘斌,等.灰树花多肽-钙螯合物对小鼠衰老性骨质疏松的改善作用[J].中国食品学报,2022, 22(2):169-177.
- [11] 林谢凤.鱼类副产物胶原肽螯合锌的制备及其性质研究[D].厦门:集美大学,2015.
- [12] 康份红.不同水平锌缺乏对大鼠胚胎心脏发育的影响及其可能机制的探讨[D].福州:福建医科大学,2009.
- [13] YU X D, REN T H, YU X G. Disruption of calmodulin-dependent protein kinase II α /brain-derived neurotrophic factor (α -CaMKII/BDNF) signalling is associated with zinc deficiency-induced impairments in cognitive and synaptic plasticity [J]. British Journal of Nutrition, 2013, 110(12): 2194-2200.
- [14] FENG Y N, JIANG S S, WANG Z, et al. Oyster hydrolysate-zinc complex ameliorates carrageenan-induced rat prostatitis via an anti-inflammatory mechanism and reduced oxidative stress [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 72: 104066.
- [15] 宗璐,郭玉琳,苟文丽,等.孕期补锌对胎儿生长受限仔鼠学习记忆能力改变的研究[J].中国儿童保健杂志,2015, 23(10):1047-1050.
- [16] 郭洪辉,陈晖,赵雪,等.罗非鱼鳞胶原肽螯合锌抗氧化及抑菌活性研究[J].食品与发酵工业,2021,47(20):120-125.
- [17] 郭洪辉,张怡评,洪专,等.河豚鱼皮胶原寡肽螯合锌的体内体外抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2021,42(5): 66-71.
- [18] MANASA N, UMA M K, SWAMINATHAN S. PLGA nano fibers blended with designer self-assembling peptides for peripheral neural regeneration [J]. Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications, 2016, 62: 329-337.
- [19] 王晴晴,蔡为荣,汪玉玲,等.蛋清多肽-铁螯合物的制备、表征及对Caco-2细胞的促增殖作用[J].食品与发酵工业, 2024,50(4):197-203.
- [20] LI B, HE H, SHI W, et al. Effect of duck egg white peptide ferrous chelate on iron bioavailability *in vivo* and structure characterization [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(4): 1834-1841.
- [21] NAHEED A, SEEMA S, MD K A, et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 81(1): 81-86.
- [22] 刘会云,席宇,戈士文,等.胶原蛋白金属配合物的合成、表征及抗菌性能[J].郑州大学学报(医学版),2010,45(2): 301-304.
- [23] 阚文翰,纪晓雯,王玉婷,等.酪蛋白磷酸肽锌螯合肽的分离及结构性质表征[J].食品与发酵工业,2017,43(7): 93-97.
- [24] 杨静,石景,邹焯,等.鸡血多肽亚铁螯合物的制备工艺优化及结构表征[J].江苏农业学报,2022,38(6):1678-1685.
- [25] YOLANDA H, GUNILLA H, INGER O W. Risks of using membrane filtration for trace metal analysis and assessing the dissolved metal fraction of aqueous media-A study on zinc, copper and nickel [J]. Environmental Pollution, 2011, 159(5): 1144-1150.
- [26] 刘腾飞,邹莉芳,吴磊,等.鸡皮胶原蛋白多肽锌螯合物结构表征及生物利用率评价[J].合肥工业大学学报(自然

- 科学版),2023,46(3):415-418,432.
- [27] 李同刚,陈康健,洪鹏志,等.罗非鱼下脚料复合酶水解物锌螯合盐的制备[J].包装与食品机械,2013,31(3):13-17.
- [28] 祝德义,李彦春,靳丽强,等.胶原多肽与钙结合性能的研究[J].中国皮革,2005,34(3):26-29.
- [29] 王学琳,孙淑萍.生命元素与微量元素[J].微量元素与健康研究,2000,17(3):76-77.
- [30] 杨杰,赵洪雷,徐淑芬,等.鱼蛋白小肽螯合锌对小鼠的补锌效果及抗氧化作用[J].华中农业大学学报,2011,30(4):516-520.
- [31] 蒋丽,卢悦,买迪娜木·阿布力米提,等.新疆伊吾县野山杏多肽对衰老模型小鼠的抗氧化作用[J].现代食品科技,2022,38(2):46-55,11.
- [32] 陈铭.扁舵鲈鱼蛋白肽螯合钙的制备及其对大鼠骨骼生长影响[D].湛江:广东海洋大学,2019.
- [33] 王紫旭.海参锌螯合多肽的制备和鉴定及其促锌吸收作用的研究[D].大连:大连工业大学,2021.
- [34] ZHANGX, ZHANG L L, XIA K D, et al. Effects of dietary selenium on immune function of spleen in mice [J]. Journal of Functional Foods, 2022, 89: 104914.
- [35] 刘银媛,王寒梅,逯良忠,等.鳀鱼蛋白肽和大豆蛋白肽的多肽组成和小肠黏膜免疫调节活性比较[J].食品科学,2023,44(19):107-117.