

# 珍珠母肽酶解工艺的优化及对人肝癌细胞HepG2能量代谢的影响

李冬冰<sup>1</sup>, 兰梦<sup>1</sup>, 王跃龙<sup>1</sup>, 刘璐<sup>1</sup>, 申嘉明<sup>1</sup>, 李晶峰<sup>2\*</sup>, 张辉<sup>1\*</sup>, 孙佳明<sup>1\*</sup>

(1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林长春 130117) (2. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117)

**摘要:** 该研究以水解度为指标, 仿生酶用量、提取时间、提取温度为条件因素, 设计 Box-Behnken 响应方案, 对珍珠母肽酶解条件进行优化; 同时研究其不同质量浓度的珍珠母肽对 HepG2 肝癌细胞的抑制作用的影响。最佳酶解工艺条件为: 温度 55 ℃, 调节 pH 值为 2.0, 加入胃蛋白酶质量分数 1%, 酶解 2.6 h 后, pH 值调节为 8.0, 加入胰蛋白酶质量分数 1.7%, 酶解 3 h, 此时珍珠母肽水解度为 31.21%; 基于此酶解条件获得珍珠母肽进行对肝癌细胞抑制作用, 研究实验结果显示不同质量浓度珍珠母肽 (12.5、25、50、100、200 μg/mL) 与氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>) 诱导的 HepG2 肝癌细胞缺氧模型相比较, 均可抑制细胞存活率, 珍珠母肽中氨基酸结果显示, 精氨酸可能参与抑制肝癌细胞增殖, 从能量代谢的角度说明珍珠母肽可通过减少三磷酸腺苷的生成和降低乳酸、己糖激酶、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶能量代谢关键酶活力达到抑制 HepG2 细胞增殖的目的, 可为珍珠母肽的制备工艺提供参考, 为其开发利用提供一定的理论基础。

**关键词:** 珍珠母肽; 仿生酶解; 响应面优化; 肝癌; 能量代谢

文章编号: 1673-9078(2024)05-92-101

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0607

## Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Nacre Peptide and Its Effects on Energy Metabolism of Human Hepatoma Cells (HepG2)

LI Dongbing<sup>1</sup>, LAN Meng<sup>1</sup>, WANG Yuelong<sup>1</sup>, LIU Lu<sup>1</sup>, SHEN Jiaming<sup>1</sup>, LI Jingfeng<sup>2\*</sup>,  
ZHANG Hui<sup>1\*</sup>, SUN Jiaming<sup>1\*</sup>

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

(2. Changchun University of Chinese Medicine College of Pharmacy, Changchun 130117, China)

**Abstract:** With the aim of enhancing the enzymatic hydrolysis of nacre peptide, we optimized enzymatic hydrolysis conditions, including the amount of biomimetic enzymes added and the extraction time and temperature, employing a Box-Behnken response design based on the degree of hydrolysis. The inhibitory effects of different mass concentrations of nacre peptide on HepG2 cells were studied. The results showed that different concentrations of nacre peptide (12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mL) could inhibit cell survival rate compared with the hypoxia model induced by cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>). The results of amino acid analysis showed that arginine may be involved in inhibiting the proliferation of liver cancer cells. From the perspective of energy metabolism, it is explained that nacre peptide can reduce the generation of ATP and reduce the activity of key enzymes such as hexokinase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase to achieve the purpose of inhibiting HepG2 cell proliferation. This study can provide a reference for the preparation process of nacre peptide and provide a certain theoretical basis for its development and utilization.

李冬冰, 兰梦, 王跃龙, 等. 珍珠母肽酶解工艺的优化及对人肝癌细胞HepG2能量代谢的影响[J]. 现代食品科技, 2024, 40(5):92-101.

LI Dongbing, LAN Meng, WANG Yuelong, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of nacre peptide and its effects on energy metabolism of human hepatoma cells (HepG2) [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(5): 92-101.

收稿日期: 2023-05-22

基金项目: 国家中医药公益性行业科研专项 (201507002-4); 吉林省发改委产业技术研究与开发 (2022C42-5)

作者简介: 李冬冰 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药与复方药效物质基础和质量标准, E-mail: 1932837310@qq.com

通讯作者: 李晶峰 (1989-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药与复方药效物质基础和质量标准, E-mail: lijingfeng8161@163.com;

共同通讯作者: 张辉 (1958-), 男, 教授, 研究方向: 中药与复方药效物质基础和质量标准, E-mail: zhanghui\_8080@163.com; 孙佳明

(1976-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药与复方药效物质基础和质量标准, E-mail: sun\_jiaming2000@163.com

peptide on HepG2 hepatoma cells were also investigated. The established optimal enzymatic hydrolysis conditions were as follows: a temperature of 55 °C, pH adjusted to 2.0, and the addition of 1% (*m/m*) pepsin. Following enzymatic hydrolysis for 2.6 h, the pH was adjusted to 8.0 and 1.7% (*m/m*) trypsin was added for further enzymatic hydrolysis for 3 h. Under these conditions, percentage nacre peptide hydrolysis values of up to 31.21% were achieved. The nacre peptides obtained under the aforementioned conditions were assessed for their inhibitory effects on hepatoma cells. Experimental results revealed that nacre peptides, at different mass concentrations (12.5, 25, 50, 100, and 200 µg/mL), could reduce the rate of cell survival compared with the cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>)-induced hypoxia model of HepG2. Furthermore, results of an analysis of nacre peptide amino acids revealed that arginine might be involved in inhibiting the proliferation of hepatoma cells. From the perspective of energy metabolism, nacre peptides inhibited the proliferation of HepG2 cells by reducing the production of adenosine triphosphate and lactate, as well as by suppressing the activities of key energy metabolism-related enzymes, namely, hexokinase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase. These findings can serve as a reference for the preparation of nacre peptides and provide a theoretical basis for their further development and utilization.

**Key words:** nacre peptide; biomimetic enzymatic hydrolysis; response surface optimization; liver cancer; energy metabolism

珍珠母为蚌科动物三角帆蚌 *Hyriopsis cumingii* (Lea)、褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* (Leach) 或珍珠贝科动物马氏珍珠贝 *Pteria martensii* (Dunker) 的贝壳<sup>[1]</sup>, 具有平肝潜阳、安神定惊、清肝明目的功效, 归肝、心经, 用于治疗头眩、心悸失眠等症, 临床上常用于肝硬化等病症。珍珠母有 90% 以上的碳酸钙成分, 还含有少量蛋白以及肽类成分。生物活性肽是近年来研究的热点, 而生物活性肽具有抗癌、抗糖尿病和抗炎等作用, 在医药行业具有优良的应用前景<sup>[2]</sup>, 刘冬等<sup>[3]</sup>研究发现珍珠母蛋白具有镇静、催眠作用。肽类化合物广泛存在于自然界中, 易于吸收, 具有抗氧化、抗癌、抑菌和维持体内血糖平衡等作用<sup>[4]</sup>。邹仙果等<sup>[5]</sup>发现珍珠母贝蛋白肽具有抗氧化、抗炎、降血压等生物活性。关于珍珠母活性肽的报道较少, 其对抗肝癌的活性机制尚不明确, 有待进一步深入研究。

肝癌 (Liver Cancer) 在我国发病率位列居高<sup>[6]</sup>, 在中医理论中, 从肝癌的发病及临床表现看, 多为虚实夹杂之证, 其症状为肝区疼痛、食欲减退、乏力, 重症患者会有肝硬化腹水、脾大、黄疸等症状, 对人体的生命健康造成极大影响<sup>[7]</sup>。在中医理论指导下合理使用中药, 可以帮助患者补气养气、活血化瘀、疏肝理气、清热解毒, 不断加强患者自身的免疫力和免疫功能, 以达到改善和预防肝癌的功效<sup>[8]</sup>。黄海福等<sup>[9]</sup>发现参桃软肝方能显著抑制人肝癌细胞 HepG2 的活性及 LDH 的释放, 增加细胞毒性, 对肝癌细胞具有较好地杀伤作用; 鲁琴等<sup>[10]</sup>研究发现解毒消癥饮通过抑制细胞糖酵解的过程, 调整整个能量代谢重编程过程, 进而可以有效的抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、转移。肝癌通过改变营养物

质的正常吸收和代谢, 进而影响新陈代谢, 无法正常生长, 增殖收到抑制<sup>[11]</sup>。肿瘤细胞代谢与所处的状态具有密切联系, 细胞功能得以正常发挥需要适当的能量供给, 为靶向能量代谢治疗肝癌的方法提供基础<sup>[12]</sup>。

在肽的制备工艺中, 常见的蛋白提取方法包括, 酶解法、酸提法、碱提法。由于酶的专一性特点, 若用单酶水解蛋白, 只能分解其中一些具有特定结构的肽键<sup>[13]</sup>。因此, 水解程度受限, 所得胶原肽的分子量一般较大, 仿生酶解技术是模拟人体胃肠道酸碱环境 (胃蛋白酶-胰蛋白酶) 将蛋白质酶解成小分子肽的一项酶解新技术, 与其它酶解法相比条件温和, 易于人体吸收<sup>[14]</sup>。郭志宏等通过双酶法提取鹿皮胶原蛋白肽的唇膏保湿效果远高于普通唇膏, 双酶法提取率极高<sup>[15]</sup>。与本实验以珍珠母为原料, 采用仿生酶解法, 以水解度为响应值, 结合单因素实验, 通过响应面法优化珍珠母肽的酶解工艺<sup>[16]</sup>。并应用 MTT 法检测珍珠母肽对肝癌细胞 (HepG2) 活性的影响, 结合能量代谢探讨珍珠母抗肝癌的作用, 为仿生酶解制备生物活性肽以及珍珠母的进一步开发利用提供理论依据<sup>[17]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

珍珠母, 吉林省敖东科技开发有限公司; 肝癌细胞 (HepG2), 中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; 茚三酮, 特斯科化工有限公司; DMEM 培养基, 美国 HyClone 公司; 胎牛血清, 美国 Gibco 公司; 噻唑蓝 (MTT), 美国 Amersco 公司; 胃蛋白酶 (1:3 000), 南京欧凯生物; 胰蛋白酶

(1:250), 山东萍聚生物; 己糖激酶 (HK) 试剂盒、三磷酸腺苷 (ATP) 含量测定试剂盒、丙酮酸激酶 (PK) 试剂盒、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒、乳酸 (LD) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 其他试剂均为国产分析纯。

pH 值计, 上海仪博仪器有限公司; DF101-S 磁力加热搅拌器, 上海恩生科技有限公司; Alpha 1-2LDplus 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; CKX41 倒置显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; CO<sub>2</sub> 培养箱, 日本三洋公司; 680 型酶标仪, 上海摩速科学器材有限公司, L-8900 型氨基酸自动分析仪, 日本日立公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 珍珠母蛋白制备

取 1 kg 珍珠母, 洗净, 晾干, 粉碎过 40~60 目筛, 按料液比 1:10 放置于水中浸提 12 h, 重复 3 次, 合并滤液, 3 600 r/min 离心 15 min, 取上清液, 冷冻干燥, 得到珍珠母蛋白冻干粉 1 g 备用。

### 1.2.2 珍珠母肽仿生酶解工艺

采用胃蛋白酶和胰蛋白酶进行仿生酶解, 酶解过程使用恒温磁力搅拌器搅拌。称取珍珠母蛋白冻干粉加入蒸馏水 (1:10 g/mL), 调节 pH 值至酸性, 加入胃蛋白酶, 一定时间后, 调节 pH 值至碱性, 加入胰蛋白酶, 灭酶 10 min, 离心 3 600 r/min, 10 min 后取上清液, 冷冻干燥, 得珍珠母肽冻干粉。

### 1.2.3 酶解条件单因素实验

以珍珠母肽的水解度为指标, 分别考察蛋白酶温度 (30、40、50、60、70 °C)、用量 (0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%, 质量分数)、时间 (1、2、3、4、5 h) 对珍珠母肽水解度的影响, 在考察不同梯度时, 酶解固定温度选择 50 °C, 胃蛋白酶用量选择 1%, 时间 2 h, 胰蛋白酶用量选择 1.5%, 时间 3 h, 在此条件下依次考察不同梯度因素对水解度的影响。

### 1.2.4 响应面试验设计

通过 Design-Expert 13.0.11 进行数据整理与分析, 开展三因素三水平的响应面试验设计试验因素水平如表 1 所示。

## 1.3 水解度的测定

### 1.3.1 完全水解蛋白液的制备

取珍珠母蛋白 20 mg, 加入 20 mL 6 mol/L 浓度盐酸于水解管中, 氮气填充管内, 密封, 于 130 °C

烘箱中水解 24 h, 结束后回收 HCl, 用 1 mol/L 浓度 NaOH 中和残余 HCl, 调节 pH 至中性, 双蒸水定容至 20 mL, 配置成质量浓度为 1 mg/mL 的完全水解蛋白液, 待用。

表 1 Box-Behnken 试验因素与水平

Table 1 Box-Behnken experimental test factors and levels

水平	因素		
	A 胃蛋白酶 酶解温度/°C	B 胃蛋白酶 酶解时间/h	C 胰蛋白酶 用量/%
-1	40	2	1
0	50	3	1.5
1	60	4	2

### 1.3.2 标准曲线的制备

分别量取完全水解液 0.2~1.0 mL 并补充添加双蒸水调节体积至 1.0 mL (使其质量浓度为 0.2~1.0 mg/mL), 加 0.5 mL pH 值 8 缓冲溶液, 0.5 mL 2% (m/V) 茚三酮溶液, 混匀, 95 °C 加热 15 min, 冷却, 稀释至 15.0 mL。在 570 nm 处测吸光度 (水作参比)。另取珍珠母蛋白质量浓度 1 mg/mL 未水解液, 相同条件测定吸光度, 相同体积样品的吸光之差与蛋白质量做工作曲线, 取线性部分做标准曲线。

并根据下列公式计算水解度 (DH)<sup>[18]</sup>:

$$D = \frac{A \times V_1 \times 100}{1000 \times W \times V_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$D$ ——水解度, %;

$A$ ——供试品溶液 (样液) 中的蛋白质量, mg;

$V_1$ ——水解液的总体积, mL;

$V_2$ ——至显色所需稀释液的体积, mL;

$W$ ——称样质量, g。

## 1.4 珍珠母肽氨基酸组成

取珍珠母肽 10 mg 加入 10 mL 6 mol/L 浓度盐酸, 于 130 °C 烘箱中水解 24 h, 得到珍珠母肽完全水解液, 在热水浴中蒸干, 残留物用 2 mL 水反复蒸干 3 次, 溶于 1 mL 0.02 mol/L 浓度的盐酸, 氨基酸自动检测仪中检测氨基酸含量。

## 1.5 珍珠母肽对 HepG2 细胞存活率的影响及其能量代谢的研究

### 1.5.1 珍珠母肽对 HepG2 细胞存活率的影响

#### 1.5.1.1 细胞培养

将冻存的 HepG2 细胞在 37 °C 水浴中使其复

苏<sup>[19]</sup>, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清后再加入含  $\varphi=10\%$  胎牛血清 DMEM 培养基, 于  $\varphi=5\% \text{CO}_2$ , 37 °C 培养箱中培养。

### 1.5.1.2 MTT法测定细胞存活率

(1) 设置实验组为空白组、模型组和给药组, 以每孔  $4 \times 10^3$  个细胞接种 96 孔板, 每孔体积 200  $\mu\text{L}$  的含 10% 胎牛血清培养液配制成细胞悬液; (2) 将以下质量浓度 (12.5、25、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的样品分别 5 个复孔设为给药组); (3) 24 h 后, 在每个孔内加入 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ , 进行 4 小时的孵育, 结束培养, 除去上清液。每孔加 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分融解; (4) 选择 490 nm 波长, 测定各孔吸光度值, 记录结果。计算公式如下<sup>[20]</sup>:

$$B = \frac{A_d}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$B$ ——细胞存活率, %;

$A_d$ ——给药组吸光度;

$A_0$ ——空白组吸光度。

## 1.5.2 珍珠母肽对 LD、ATP、PK、HK、LDH 含量测定

### 1.5.2.1 细胞培养

细胞培养方法同 1.4.1.1, 给药组质量浓度 (12.5、25、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 细胞缺氧模型组加入质量浓度 1.3  $\text{mg}/\text{mL}$  氯化钴溶液处理 24 h, 后续操作按不同试剂盒操作进行。

### 1.5.2.2 LD含量测定

按 1.4.1.1 与 1.4.2.1 进行细胞培养、分组及用药, 根据 LD 试剂盒说明, 测定含量。

### 1.5.2.3 ATP含量测定

按 1.4.1.1 与 1.4.2.1 细胞分组前处理, 收集细胞悬液, 取上清液, 按照 ATP 试剂盒说明代入蛋白含量, 得到结果<sup>[21,22]</sup>。

### 1.5.2.4 PK活力测定

按 1.4.1.1 与 1.4.2.1 细胞分组前处理, 根据试剂盒说明书, 测定活力。

### 1.5.2.5 HK活力测定

按 1.4.1.1 与 1.4.2.1 细胞分组前处理, 收集细胞悬液, 取上清液, 根据试剂盒说明书代入蛋白含量, 测定活力。

### 1.5.2.6 LDH活力测定

按 1.4.1.1 与 1.4.2.1 细胞分组前处理, 根据试

剂盒说明书, 测定活力。

## 1.6 数据处理

通过 SPSS 21.0 软件, 对试验数据平均值进行显著性分析, 以  $\bar{x} \pm s$  来反映已经获得的计量数据, 采用单因素分析方差、 $t$  检验等方式开展组间比较, 使得试验结果更具直观性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验结果

根据 1.3.2 得到标准曲线回归方程:  $y=0.031x+0.0057$ ,  $R^2=0.9975$ , 并结合水解度计算公式得到单因素实验结果如下。

#### 2.1.1 蛋白酶量对珍珠母蛋白水解度的影响

如图 1 所示, 采用仿生酶解后, 生物体水解度已经得到了显著的提升。当水解度达到最大值时, 胃蛋白酶质量分数临界点为 1%, 水解度达 29.04%, 而胰蛋白酶质量分数临界点为 1.5%, 水解度最大为 47.09%, 随着酶用量逐渐增大, 加入过多的酶会抑制体系反应, 蛋白质减少, 逐渐水解成氨基酸, 底物逐渐达到饱和状态, 从而导致水解度随着酶的用量增加而逐渐减少, 可能预示着增加酶的用量对蛋白的水解不再发生促进作用, 甚至可能发生阻碍作用。因此胃蛋白酶最佳质量分数在 0.5%~1.5%, 胰蛋白酶质量分数在 1%~2% 之间。

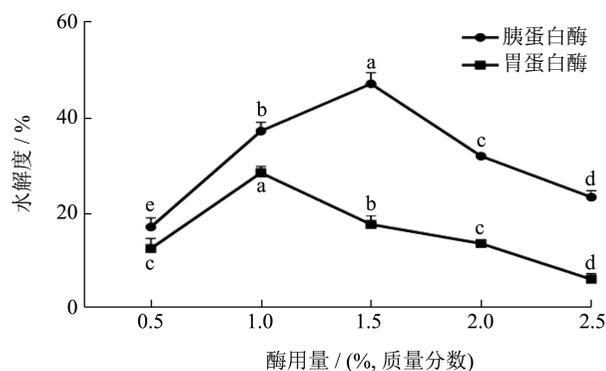


图 1 酶用量对水解度的影响

Fig.1 Effect of enzyme dosage on hydrolysis degree

注: 图中数据显著性差异用字母表示 ( $P < 0.05$ ); 下同。

#### 2.1.2 酶解时间对珍珠母肽水解度的影响

酶解时间是影响珍珠蛋白含量的重要因素, 在酶解时间持续增加的条件下, 其水解度呈现先升后降的变化趋势<sup>[23]</sup>。其中, 在水解度达到最大时, 胃蛋白酶对水解度的最高临界点是 2 h, 而胰蛋白酶

为 3 h, 此时水解度分别达到 22.31%、21.23%, 如图 2。酶解时间未达到临界点时, 反应不充分而无法达到最佳水解度; 随着酶解时间的增加, 酶解时间超过临界点时, 底物达到饱和状态, 酶活力逐渐丧失, 继续酶解对水解度产生抑制作用, 从而水解度逐渐降低<sup>[24]</sup>。

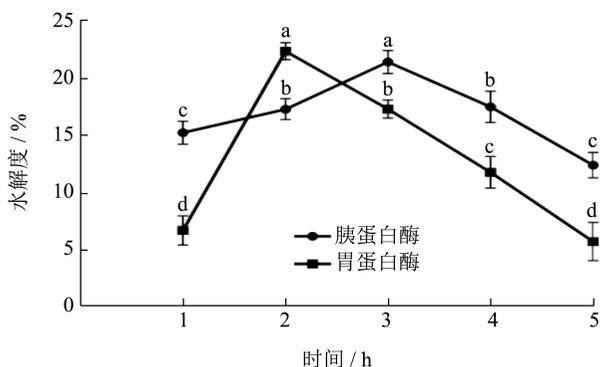


图 2 酶解时间对水解度的影响

Fig.2 Effect of enzyme dosage on hydrolysis degree

### 2.1.3 酶解温度对珍珠母肽水解度的影响

酶解温度对珍珠母蛋白含量的变化有一定的影响, 随着温度的逐步提高, 水解度呈现先升后降的趋势, 胃蛋白酶和胰蛋白酶均在 50 °C 时达到最大的水解度, 水解度分别为 44.01%、23.09%, 见图 3。这是由于在一定温度下酶解状态达到饱和, 持续升温会破坏蛋白结构, 酶活性逐降低至丧失, 因此酶解温度范围均在 40~60 °C 之间。

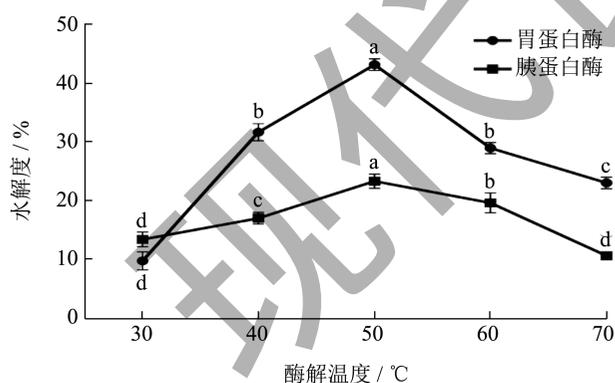


图 3 酶解温度对水解度的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis temperature on hydrolysis degree

## 2.2 响应面试验结果与分析

### 2.2.1 响应面模型的建立与分析

根据单因素结果显著性可知, 胃蛋白酶用量、胰蛋白酶酶解时间和胰蛋白酶酶解温度对水解度影响较弱, 因此选择胃蛋白酶酶解温度 (A) 胃蛋白

酶酶解时间 (B) 以及胰蛋白酶用量 (C) 为变量, 采用响应面方法来进行优化与验证, 将水解度设计成响应值, 构建响应面模型, 如表 2。同时, 通过 Design-Expert 13.0.11 软件来处理数据, 得到珍珠母肽水解度 (Y) 预测值对自变量三因素的回归方程:

$$Y=33.26-1.84A-4.34B-1.36C+1.53AB+0.98AC-0.77BC-7.73A^2-4.95B^2-6.65C^2$$

ANOVA 方差分析得到表 3 结果。

表 2 响应面优化试验设计及结果

Table 2 Response surface experiment design and results

试验号	A 胃蛋白酶酶解温度	B 胃蛋白酶酶解时间	C 胰蛋白酶酶用量	水解度/%
1	0	0	0	33.23
2	0	1	1	14.57
3	0	1	-1	18.45
4	-1	-1	0	27.32
5	1	0	1	16.3
6	-1	0	-1	23.42
7	1	0	-1	17.46
8	0	-1	1	26.41
9	-1	1	0	17.21
10	1	-1	0	20.89
11	0	0	0	31.62
12	0	0	0	34.54
13	0	-1	-1	27.12
14	0	0	0	31.89
15	0	0	0	35.02
16	1	1	0	16.89
17	-1	0	1	18.35

从表 2、表 3 可以看到, 回归方程的决定系数  $R^2=0.9817$ ,  $R^2_{adj}=0.9583$ , 二次多项式回归模型项极显著 ( $P<0.001$ ), 失拟项  $P$  是 0.5507, 不显著 ( $P>0.05$ ), 可以说明本试验方程拟合度较好, 且对酶解效果的影响顺序依次为胃蛋白酶酶解时间 (B) > 酶解温度 (A) > 胰蛋白酶用量 (C)。A 对水解度的影响高度显著 ( $P<0.01$ ), B、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对水解度的影响极显著 ( $P<0.001$ ), 表明通过响应面试验设计所得结果与实际情况拟合较好, 可运用此模型进行预测及分析<sup>[25,26]</sup>。

表 3 回归模型显著性检验及方差分析

Table 3 Regression model significance test and analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	809.60	9	89.96	42.10	<0.000 1	***
A 胃蛋白酶酶解温度	27.23	1	27.23	12.74	0.009 1	**
B 胃蛋白酶酶解时间	149.82	1	149.82	70.11	<0.000 1	***
C 胰蛋白酶用量	14.63	1	14.63	6.85	0.034 0	*
AB	9.33	1	9.33	4.37	0.075 0	
AC	3.82	1	3.82	1.79	0.222 9	
BC	2.51	1	2.51	1.18	0.314 2	
A <sup>2</sup>	250.86	1	250.86	117.40	<0.000 1	***
B <sup>2</sup>	103.74	1	103.74	48.55	0.000 2	***
C <sup>2</sup>	186.69	1	186.69	87.37	<0.000 1	***
残差	14.96	7	2.14			
失拟项	5.65	3	1.88	0.81	0.550 7	不显著
纯误差	9.30	4	2.33			
总和	824.56	16				

注: \* 表示差异显著  $P < 0.05$ ; \*\* 表示差异极显著  $P < 0.01$ ; \*\*\* 表示差异高度显著  $P < 0.001$ 。

### 2.2.2 响应面交互作用分析与优化

本文通过 Design Expert 13.0.11 软件, 构建响应面三维图, 直观展现出水解度与胃蛋白酶酶解温度、胃蛋白酶酶解时间、胰蛋白酶用量的相互影响作用。如图 4b 所示, 水解度先升高后降低, 等高线形状可以反应因素之间交互程度, 等高线椭圆形表示因素之间交互作用较强, 圆形表示两个因素之间作用较弱<sup>[27]</sup>。

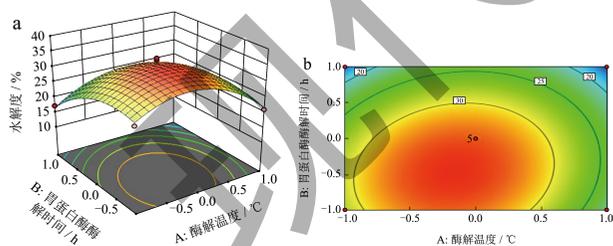


图 4 胃蛋白酶酶解时间与胃蛋白酶酶解温度交互作用的响应曲面和等高线图

Fig.4 Response surface and contour map of the interaction between pepsin enzymolysis and enzymolysis temperature

如图 4a 可知, 酶解温度和胃蛋白酶酶解时间响应曲面走势最陡峭, 进而对水解度的影响较大, 等高线呈椭圆形, 说明胃蛋白酶酶解时间与酶解温度交互程度较强, 从图 5a、图 6a 可知, 胰蛋白酶用量与酶解温度、胃蛋白酶酶解时间和胰蛋白酶用量

曲面坡度较为平缓, 进而对水解度影响较小, 等高线近似圆形, 说明 AC、BC 交互作用不明显。

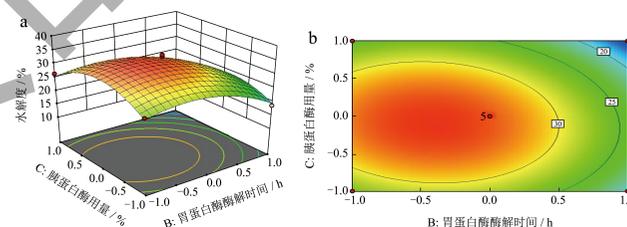


图 5 胰蛋白酶用量与胃蛋白酶酶解温度交互作用的响应曲面和等高线图

Fig.5 Response surfaces and contour plots of the interaction between trypsin dosage and pepsin digestion temperature

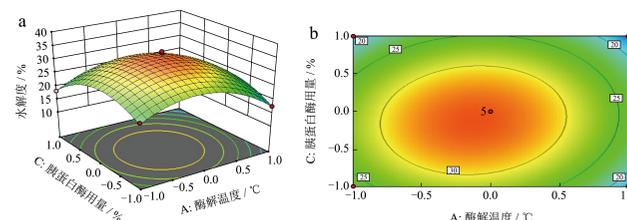


图 6 胃蛋白酶酶解时间与胰蛋白酶用量交互作用的响应曲面和等高线图

Fig.6 Response surfaces and contour plots of the mutual interaction with trypsin dosage during pepsin digestion

### 2.2.3 验证实验

采用 Design Expert 13.0.11 计算, 得到水解度

达到最大值时的最优酶解工艺条件为：在料液比一定时，酶解温度 55 ℃，调节 pH 值为 2.0，加入胃蛋白酶质量分数 1%，酶解 2.6 h 后，pH 值调节为 8.0，加入胰蛋白酶质量分数 1.7%，酶解 3 h，在此条件下重复三次验证实验，取平均值，得珍珠母肽水解度为 31.21%，与预测值相接近，该条件为珍珠母蛋白酶解的最优工艺条件，为接下来珍珠母开发提供了技术支持。

### 2.3 珍珠母酶解肽氨基酸含量分析

结果如表 4 所示，精氨酸含量占总氨基酸含量的 22.94%，占比最高，这表明珍珠母肽可能通过精氨酸调控肝癌细胞蛋白质合成异常<sup>[28]</sup>，支链氨基酸即亮氨酸（4.40%）、异亮氨酸（5.05%）和缬氨酸（6.08%）为体内必需氨基酸，与蛋白质的生物合成有关，具有增强免疫防护的作用<sup>[29]</sup>。甘氨酸和谷氨酸占比仅次于精氨酸，分别占氨基酸总含量的 15.71%、10.91%，研究证实<sup>[30]</sup>谷氨酰胺代谢过程中的部分关键酶和中间代谢物在肿瘤代谢过程中发挥作用，并进一步影响肿瘤的生长。

表 4 珍珠母肽氨基酸组成及含量

Table 4 Amino acid composition and content of mother-of-pearl peptide

氨基酸种类	珍珠母肽氨基酸含量/%
天冬氨酸 (Asp)	3.39
苏氨酸 (Thr)*	1.28
丝氨酸 (Ser)	1.10
谷氨酸 (Glu)	10.91
甘氨酸 (Gly)	15.71
丙氨酸 (Ala)	8.20
半胱氨酸 (Cys)	4.29
缬氨酸 (Val)*	6.08
蛋氨酸 (Met)*	0.25
异亮氨酸 (Ile)*	5.05
亮氨酸 (Leu)*	4.40
酪氨酸 (Tyr)	5.20
苯丙氨酸 (Phe)*	1.04
赖氨酸 (Lys)*	0.24
组氨酸 (His)	2.03
精氨酸 (Arg)	22.94
脯氨酸 (Pro)	0.30

注：\* 为必须氨基酸。

### 2.4 珍珠母酶解肽对 HepG2 细胞增殖抑制的影响

不同质量浓度珍珠母肽对 HepG2 细胞存活率的影响结果见图 7。在不同质量浓度的珍珠母肽给药条件下，HepG2 细胞存活率显著下降，其中给药组在 200 μg/mL 质量浓度时，HepG2 细胞存活最低，有极显著差异 ( $P < 0.001$ )。但在 12.5 μg/mL 质量浓度下，给药组无显著影响 ( $P > 0.05$ )，故接下来对 50~200 μg/mL 质量浓度珍珠母肽进行能量代谢相关酶含量测定。

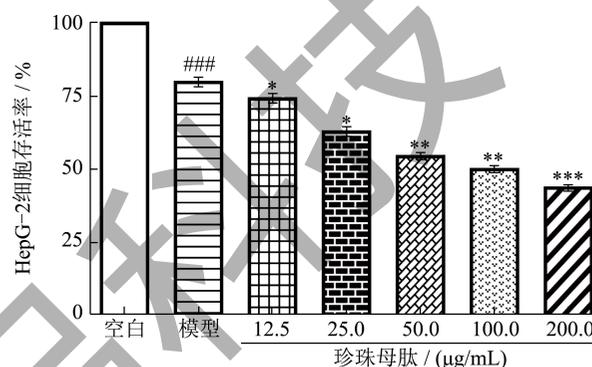


图 7 不同质量浓度珍珠母肽对 HepG2 细胞存活率的影响  
Fig.7 Effect of different concentrations of mother-of-pearl peptides on the survival rate of HepG2 cells ( $x \pm s, n=3$ )

注：\* 表示  $P < 0.05$ ，\*\* 表示  $P < 0.01$ ，\*\*\* 表示  $P < 0.001$  (与模型组相比较)；### 表示  $P < 0.01$ ，#### 表示  $P < 0.001$  (与空白组相比)；下同。

### 2.5 珍珠母肽对 HepG2 细胞能量代谢指标的影响

#### 2.5.1 HepG2 细胞培养液中 LD (乳酸) 生成量分析

肿瘤细胞通常利用乳酸作为生长增殖和线粒体代谢的物质，乳酸可以通过影响肿瘤微环境中免疫细胞的功能来达到促进肿瘤细胞生长和转移的目的<sup>[31]</sup>，根据图 8 可知不同质量浓度的珍珠母肽对 LD 生成量结果，与空白组相比，模型组含量极显著降低 ( $P < 0.001$ )，给药质量浓度在 200 μg/mL，LD 乳酸生成量最低，与模型组有极显著差异 ( $P < 0.001$ )，在 50 μg/mL 与 100 μg/mL 质量浓度下，与模型组有显著差异 ( $P < 0.05$ )，这说明随质量浓度增加，乳酸生成量随之降低，HepG2 细胞生长受阻，效果最佳。

#### 2.5.2 HepG2 细胞培养液中 ATP 生成量分析

肿瘤细胞主要依赖糖酵解产生 ATP 来满足自身能量代谢的需要，即便在供给充足的条件下也是

如此，这是肿瘤细胞恶变过程中最基础的代谢变化<sup>[32,33]</sup>，如图 9，氯化钴诱导的模型组与空白组有显著差异 ( $P < 0.001$ )，珍珠母肽与模型组比，差异性显著，随着给药组剂量升高 ATP 生成量随之升高，在 50  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度时 ATP 含量下降，具有极显著差异 ( $P < 0.001$ )，此时 ATP 生成量达到最低 3 235  $\mu\text{mol/mg prot}$ ，由此推测，细胞异常代谢是造成肿瘤细胞死亡的重要因素。

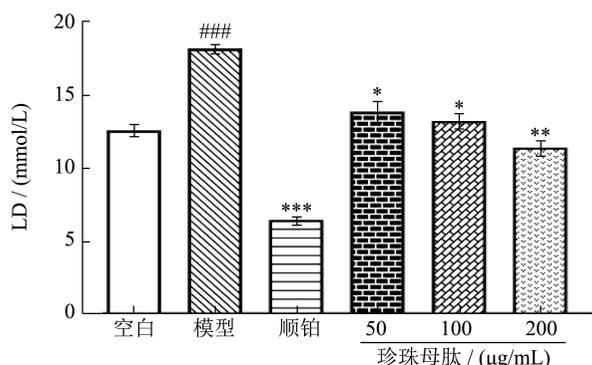


图 8 珍珠母肽对 HepG2 细胞培养液中 LD (乳酸) 生成量的影响

Fig.8 Analysis of the production of LD (lactic acid) by different concentrations of mother-of-pearl peptide in HepG2 cell culture ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

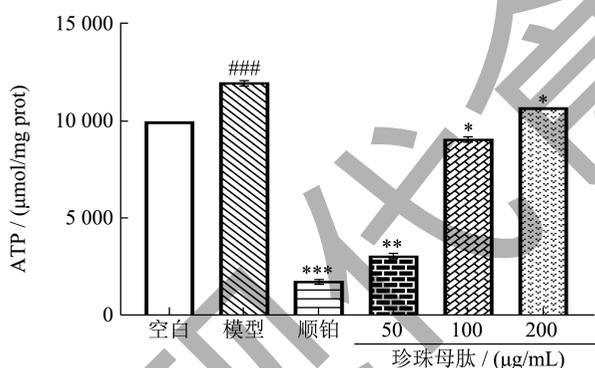


图 9 不同质量浓度珍珠母肽对 HepG2 细胞培养中 ATP 的生成量分析

Fig.9 Analysis of ATP production of different concentrations of mother-of-pearl peptide in HepG2 cell culture ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 2.5.3 对HepG2细胞液中PK活力分析

调控肿瘤细胞中 PK 活力，是控制肿瘤细胞增长的重要因素，结果见图 10，与模型组比较，PK 酶活力在给药组均不同程度降低，其中质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ，具有极显著差异 ( $P < 0.01$ )，说明此质量浓度下给药组效果最明显，当质量浓度过高或过低时，差异无显著影响 ( $P < 0.05$ )。

### 2.5.4 对HepG2细胞中HK活力检测

肿瘤细胞产生能量的方式是糖酵解，己糖激酶活性下调是致使能量供给不足的因素之一<sup>[34]</sup>。如图 11 可知，与模型组相比，给药组 HK 活力均不同程度的降低，50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度与模型组比较具有显著差异 ( $P < 0.01$ )，而 200  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度时 HK 活力达到了最低 3.98 U/mg prot，具有极显著差异 ( $P < 0.001$ )，这说明给药组处理后的肿瘤细胞中 HK 活力下降将会直接影响肿瘤细胞活性。

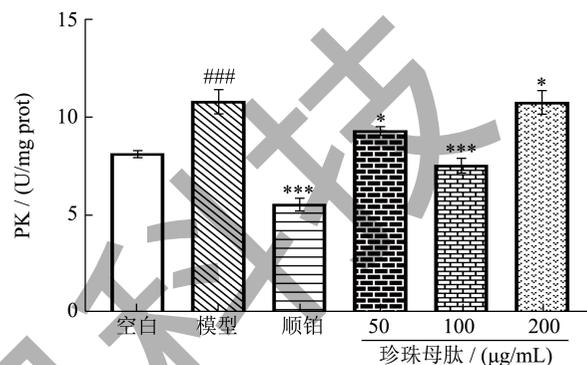


图 10 不同质量浓度珍珠母肽对 HepG2 细胞培养中 PK 活力分析

Fig.10 Analysis of PK activity of different concentrations of mother-of-pearl peptide in HepG2 cell culture ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

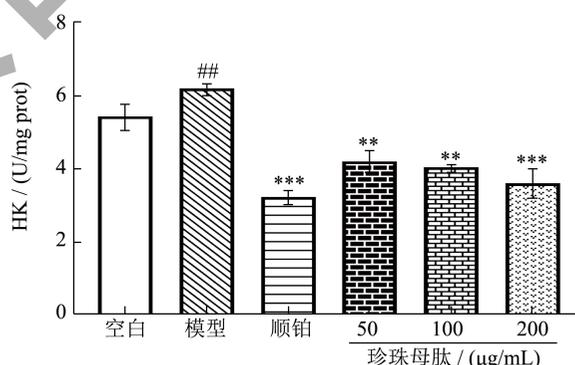


图 11 珍珠母肽对 HepG2 细胞培养液中 HK 活力的影响

Fig.11 Effect of different concentrations of mother-of-pearl peptide on HK activity in HepG2 cell culture ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 2.5.5 对HepG2细胞中LDH活力检测

乳酸脱氢酶催化丙酮酸产生乳酸<sup>[35]</sup>，因此乳酸的生成量与乳酸脱氢酶含量密切相关，如图 12，在给药组质量浓度达到 200  $\mu\text{g/mL}$  时，乳酸脱氢酶的表达最低 8.21 U/L，活性明显下降，具有极显著差异 ( $P < 0.001$ )，相比质量浓度 50  $\mu\text{g/mL}$  时下降了 64.41%，结果说明珍珠母肽可以降低 LDH 活力，从而使乳酸含量降低，达到抑制 HepG2 细胞增殖的。

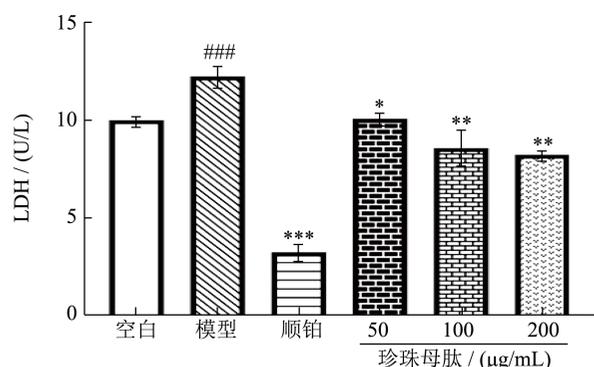


图 12 珍珠母肽对 HepG2 细胞培养液中 LDH 活力的影响

Fig.12 Effect of mother-of-pearl peptide on LDH activity in HepG2 cell culture medium ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

### 3 结论

本研究以珍珠母为原料,通过仿生酶解法制备珍珠母肽,采用响应面建模方法优化试验设计,得到最佳酶解工艺:在料液比一定时,酶解温度 55 °C,加入胃蛋白酶质量分数 1%,调节 pH 值为 2.0,酶解 2.6 h 后,加入胰蛋白酶质量分数 1.7%,pH 值调节为 8.0,酶解 3 h,在此条件下进行重复三次验证实验,取平均值,得珍珠母肽水解度为 31.21%,与响应面试验预测值相近,验证了该工艺的合理性。

恶性肿瘤(癌症细胞)主要通过有氧糖酵解的方式进行代谢,而相关抑制酶可以防止细胞异常代谢而产生恶性肿瘤。HK、PK 是抑制细胞糖酵解的关键酶,本研究通过对给药后 HepG2 肝癌细胞代谢过程中产生的 ATP 和 LD 进行含量测定,对 PK、HK、LDH 重要酶表达,表明不同质量浓度珍珠母肽可以抑制 HepG2 细胞的增殖,与模型组相比,随着质量浓度由 50 μg/mL 升高至 200 μg/mL,LD、HK、LDH 含量显著降低,LDH 含量决定 LD 生成量,推测其通过降低 HepG2 肝癌细胞的糖酵解来抑制肿瘤细胞生长。ATP 是细胞生长的供能物质,在 50 μg/mL 时供能急剧降低,HK 是葡萄糖代谢的第一个限制酶,它的活力决定了糖的分解速率和分解方向。在质量浓度 100 μg/mL 时,PK 具有显著差异,PK 是糖酵解中的一个重要环节,它能促进 PKM2 在 HepG2 肝癌细胞中的高水平的表达,使糖酵解的速度加快,从而抑制 HepG2 细胞的增殖。珍珠母肽中精氨酸含量最高,可这说明珍珠母肽可能通过精氨酸参与调控肝癌细胞增殖,珍珠母肽具有抑制肝癌细胞增殖作用,其作用机制可能是干扰癌症细胞的能量代谢异常从而抑制其增殖活性,其具体的作用方式还有待进一步研究。本实验的研究结果可以

为以后珍珠母肽产品及其它生物活性肽的开发应用提供新思路。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中国药典1部[M].北京:化学工业出版社,2010.
- [2] 闫洪波,楚英珂,李雯慧,等.海洋生物活性肽生物学和功能特性的研究进展[J].食品科学,2023,44(7):18-28.
- [3] 刘冬,代婷婷,查荣博,等.珍珠母镇静催眠作用及其不同炮制品对小鼠脑内5-羟色胺浓度的影响[J].吉林中医药,2014,34(1):61-63.
- [4] CICERO A, FOGACCI F, COLETTI A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(11): 1378-1394.
- [5] 邹仙果,费洁羽,郝贵杰,等.珍珠和珍珠母贝蛋白肽提取分离、生物活性及其在营养与健康领域的应用研究进展[J].食品工业科技,2023,44(12):455-460.
- [6] LIU C Y, SHEN S Y, WANG K L, et al. Alkaloids from traditional Chinese medicine against hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109543.
- [7] TANG K Y, DU S L, WANG Q L, et al. Traditional Chinese medicine targeting cancer stem cells as an alternative treatment for hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Integrative Medicine, 2020, 18(3): 196-202.
- [8] 黄安民,杨斯佳,虞璐琳,等.中药免疫治疗原发性肝癌研究进展[J].浙江中西医结合志,2018,28(5):433-435.
- [9] 黄海福,付艳丽,符必谦,等.参桃软肝方抑制人肝癌细胞 HepG2 活性的作用机制研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2023,25(7):2353-2364.
- [10] 鲁琴,关建华,曾建伟,等.解毒消癥饮通过hIF-1/miR-210 调节葡萄糖能量代谢抑制肝癌细胞增殖的生物学机制研究[J].福建中医药,2022,53(11):34-41.
- [11] 柳卓,田雪飞,谭小宁,等.固脾消积饮对肝星状细胞共培养条件下HepG2细胞氨基酸代谢和能量代谢的影响[J].中国中医药信息杂志,2023,30(4):94-99.
- [12] 刘亚平,李鑫,郭子琦,等.肿瘤发生过程中髓源性抑制细胞能量代谢的特点[J].生命科学研究,2019,23(4):263-269.
- [13] 张崑,郭思亚,熊伟,等.胶原蛋白酶解制备肽工艺研究进展[J].中国调味品,2018,43(2):89-95.
- [14] 黄镇林,曹唯仪,何亮颖,等.仿生酶解法提取土鳖虫的工艺研究[J].中医药信息,2013,30(2):20-24.
- [15] 郭志宏,刘琳琳,廖子晗,等.鹿皮胶原蛋白多肽的双酶法提取工艺及其在唇膏中的应用[J].经济动物学报,2023, 27(4):244-250.
- [16] 赵峻露,李春楠,尹馨雪,等.响应面法优化鹿鞭肽酶解工艺及体外补肾健骨活性分析[J].食品工业科技,2023, 44(2):213-221.

- [17] 黄雨,刘魏红,王洪阳,等.裙带菜孢子叶仿生酶解工艺优化及酶解肽的抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2022,43(13):180-189.
- [18] 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.
- [19] ADENINA S, LOUISA M, SOETIKNO V, et al. The effect of alpha mangostin on epithelial-mesenchymal transition on human hepatocellular carcinoma hepg2 cells surviving sorafenib via TGF- $\beta$ /Smad pathways. [J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2020, 10(4): 648-655.
- [20] 彭信言.红霉素对香烟刺激人巨噬细胞U-937细胞产生氧化物的影响[D].南宁:广西医科大学,2010.
- [21] YIN W, SHI L, MAO Y. MicroRNA-449b-5p suppresses cell proliferation, migration and invasion by targeting TPD52 in nasopharyngeal carcinoma [J]. The Journal of Biochemistry, 2019, 166(5): 433-440.
- [22] HASANZADEH R, MOJAVER P, AZDAST T, et al. Developing gasification process of polyethylene waste by utilization of response surface methodology as a machine learning technique and multi-objective optimizer approach [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2023, 48(15): 5873-5886.
- [23] LUO X B, XING G H, QIAO L, et al. Multi-objective optimization of the mix proportion for dune sand concrete based on response surface methodology [J]. Construction and Building Materials, 2023, 366(22): 129928.
- [24] PAKZAD S, SIAMAK P, MAHSA H. A study on the beech wood machining parameters optimization using response surface methodology [J]. Axioms, 2022, 12: 12010039.
- [25] KOBUS Z, BUCZAJ A, PECYNA A, et al. Application of response surface method in pulsed ultrasound-assisted extraction of complex plant materials-a case study on *Cannabis sativa* L [J]. Applied Sciences, 2023, 13(2): 760.
- [26] THITHUYVAN N, GASPILLO P A, THANH H G T, et al. Cellulose from the banana stem: optimization of extraction by response surface methodology (RSM) and characterization [J]. Heliyon, 2022, 8(12): e11845.
- [27] GAO X, CHEN Y, WANG Y, et al. Study on different factors affecting the bionic enzymatic hydrolysis of icariin [J]. Journal of Pharmacy, 2013, 48(11): 1716-1721.
- [28] SAFRHANSOVA L, HLOZKOVA K, STARKOVA J. Targeting amino acid metabolism in cancer [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2022, 373: 37-79.
- [29] WANG J, WANG W, ZHU F, et al. The role of branched chain amino acids metabolic disorders in tumorigenesis and progression [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113390.
- [30] BOON R, KUMAR M, TRICOT T, et al. Amino acid levels determine metabolism and CYP450 function of hepatocytes and hepatoma cell lines [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1393.
- [31] AN M J, SHIN G S, LI H M, et al. Ablation of SMUG1 reduces cell viability and increases UVC-mediated apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cells [J]. Genes (Basel), 2021, 12(2): 201.
- [32] 杨柳,金晶,罗雪.乳酸对肿瘤微环境中免疫细胞的影响[J].健康研究,2022,42(4):437-441.
- [33] SU JJ, WALL ST, HEALY KE, et al. Scleral reinforcement through host tissue integration with biomimetic enzymatically degradable semi-interpenetrating polymer network [J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(3): 905-916.
- [34] MOHAN CD, KIM C, SIVEEN KS, et al. Crocetin imparts antiproliferative activity via inhibiting STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma [J]. IUBMB Life, 2021, 73(11): 1348-1362.
- [35] LIN J, ZHANG H L, LI D D, et al. Regulation of glycolytic metabolism by autophagy in liver cancer involves selective autophagic degradation of HK2 (hexokinase 2) [J]. Autophagy, 2018, 14(4): 671-684.