

蝉蛹肽的制备及其免疫调节活性变化

孙明哲^{1,2}, 孙亚琴¹, 闫琳¹, 徐淑妹¹, 张宇航¹, 王朝阳¹, 李晓燕^{1*}

(1. 石家庄以岭药业股份有限公司, 络病理论创新转化全国重点实验室, 河北石家庄 050035)

(2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 该文对蝉蛹肽 (*Cryptotympana Atrata* Peptide, CA-Peptide) 的制备工艺进行优化, 并比较 CA-Peptide 和蝉蛹蛋白 (*Cryptotympana Atrata* Protein, CA-Protein) 的免疫调节活性。最佳工艺: 碱性蛋白酶 37071 和胰蛋白酶复合酶解, 加酶量各 4% (*m/m*), 底物浓度 5% (*m/m*)、初始 pH 值 10.5、酶解温度 50 °C, 两种蛋白酶先后酶解 1.5 h。动物试验显示, CA-Peptide 和 CA-Protein 均能不同程度改善环磷酰胺所致免疫低下小鼠的相关指标。相同剂量下, CA-Peptide 组小鼠的脾脏指数和脾淋巴细胞增值率分别为 2.40 mg/g 和 51.07%, 显著 ($P < 0.05$) 高于 CA-Protein 组; CA-Peptide 组小鼠的血清免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 M、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素-4 和白细胞介素-10 含量分别为 701.67、299.19、239.88、20.11、33.86 和 71.15 ng/L, 显著 ($P < 0.05$) 高于 CA-Protein 组; CA-Peptide 组小鼠的胸腺指数和血清 γ 干扰素含量分别为 1.36 mg/g 和 36.26 ng/L, 显著 ($P < 0.05$) 低于 CA-Protein 组; CA-Peptide 组小鼠的自然杀伤细胞活性及血清白细胞介素-2 含量与 CA-Protein 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。研究表明, 酶解工艺显著改变了 CA-Protein 的免疫调节活性, 产物 CA-Peptide 对多项免疫指标的改善作用优于 CA-Protein。

关键词: 蝉蛹; 肽; 免疫调节; 酶解

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.9.0714

Preparation of Peptides from *Cryptotympana atrata* and Its Immunomodulatory Activity Changes

SUN Mingzhe^{1,2}, SUN Yaqin¹, YAN Lin¹, XU Shumei¹, ZHANG Yuhang¹, WANG Zhaoyang¹, LI Xiaoyan^{1*}

(1. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., State Key Laboratory for Innovation and Transformation of Luobing Theory, Shijiazhuang 050035, China)(2. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this paper, the preparation process of *Cryptotympana Atrata* Peptide (CA-Peptide) was optimized, and the immunomodulatory activities of CA-Peptide and *Cryptotympana Atrata* Protein (CA-protein) were compared. The optimal preparation process: 4% alkaline proteinase 37071 and 4% trypsin enzymolysis (*m/m*), 5% substrate concentration (*m/m*), initial pH 10.5, enzyme temperature 50 °C, two kinds of protease enzymolysis for 1.5 hours respectively. Animal experiments showed that the related indexes of immunocompromised mice induced by cyclophosphamide all could be improved in different degrees by CA-Peptide and CA-Protein. At the same dose, the spleen index and proliferation rate of splenic lymphocytes in CA-Peptide group (2.40 mg/g and 51.07%, respectively) were significantly ($P < 0.05$) higher than those of CA-Protein group. The immunoglobulin G, immunoglobulin A, immunoglobulin M, tumor necrosis factor- α , interleukin-4 and interleukin-10 in CA-Peptide group (701.67, 299.19, 239.88, 20.11, 33.86 and 71.15 ng/L, respectively) were significantly ($P < 0.05$) higher than those of CA-Protein group. The thymus index and serum interferon- γ in CA-Peptide group (1.36 mg/g and 36.26 ng/L, respectively) were significantly ($P < 0.05$) lower than those of CA-Protein group. There was no significant difference in natural killer cell activity and serum interleukin-2 level between CA-Peptide group and CA-Protein group ($P > 0.05$). In conclusion, the enzymatic hydrolysis process significantly changes immunomodulatory activity of CA-Protein, and the product CA-Peptide has better improvement on many immune indexes than CA-Protein.

Key words: *Cryptotympana atrata*; peptide; immunomodulatory; enzymolysis

收稿日期: 2024-05-23; 修回日期: 2024-08-26; 接受日期: 2024-08-29

基金项目: 国家重点研发计划重点专项 (2023YFC3504300)

作者简介: 孙明哲 (1987-), 男, 博士, 工程师, 研究方向: 保健食品研发, E-mail: mingzhe_s@163.com

通讯作者: 李晓燕 (1974-), 女, 硕士, 正高级工程师, 研究方向: 保健食品研发, E-mail: li_xiaoyan@yiling.cn

蝉蛹, 又名知了猴, 为黑蚱蝉 (*Cryptotympana Atrata* (Fabricius, 1775)) 若虫, 是一种典型的高蛋白昆虫, 其蛋白质含量高达 72%^[1]。蝉蛹体内存积着丰富的蛋白质、氨基酸和脂肪, 且含有人体必需的多种微量元素, 如锌、硒等元素, 其营养价值可与鱼、肉、禽、蛋相媲美, 常被人们当作滋补身体的良品^[2,3]。宋少华^[4]对蝉蛹营养成分含量和质量的研究也表明蝉蛹是一种营养价值很高的新食品资源, 其蛋白酶解物还具有较强的体外抗氧化活性, 具有较高的利用价值及开发潜力。

免疫系统可以抵御外来病原体的入侵, 在预防和治疗疾病上具有重要作用。一些天然蛋白质在调节人体免疫功能方面表现突出^[5]。蝉蛹高蛋白的特点提示蝉蛹蛋白 (*Cryptotympana Atrata Protein*, CA-Protein) 在免疫调节方面可能具有一定的开发潜力。但是, 蛋白质在人体中的消化利用受食物特性及食物摄取人群差异等因素的影响, 一般须经胃肠道消化分解后才能被吸收或发挥特定生物活性^[6]。潘蕾蔓等^[7]用酶对玛咖蛋白进行体外预处理, 产物的免疫免疫调节活性得到了明显提高。另有研究显示, 蚕蛹蛋白^[8]和 CA-Protein^[4]的酶解产物抗氧化活性也高于蛋白本身。这与大分子蛋白降解为肽后的结构变化有关, 肽的氨基酸序列、末端氨基酸种类、肽链长度等结构都会影响其免疫调节活性^[9]。疏水氨基酸和带电氨基酸可增强肽和免疫细胞膜上相关受体的相互作用, 从而调节下游信号通路增强机体免疫力^[10-12]; 相对分子质量小于 2 000 Da 的短肽在溶解性及肠道吸收方面更具优势, 更易与免疫相关酶活性位点和免疫细胞相互作用^[13]。

生物活性肽的制备方法有物理法、化学法及生物法。物理法和化学法通常使用高温、机械及酸碱处理, 缺点是效率低产量少、活性肽段结构容易被破坏等, 因此不经常使用。生物法包括酶解法、微生物发酵法及基因重组法等, 其中酶解法以其高效率、低能耗、无残留有机有害成分及反应条件温和等优点被广泛采用^[14]。

巨噬细胞是免疫细胞的一种, 几乎存在于所有的身体组织中, 是通过先天性和适应性免疫反应影响机体免疫系统功能的关键^[15]。本研究以 CA-Protein 为研究对象, 采用酶解法, 以水解度和小鼠单核巨噬细胞 (Mouse Monocyte-macrophage Leukemia Cells, RAW264.7) 增殖率为指标, 进行酶解工艺的优化, 并制备蝉蛹肽 (*Cryptotympana Atrata Peptide*, CA-Peptide)。进一步采用免疫低下小鼠模型对 CA-Peptide 的体内免疫调节活性进行探索。为蝉蛹的高效开发和利用奠定基础, 同时也为探索和发现免疫调节活性肽新资源提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞

3~4 周龄, 雄性 ICR 小鼠, SPF 级, 体重 18~22 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司。动物许可证号: SCXK (京) 2019-0008; 动物实验伦理批准号: TN2022004; 饲养条件: 光照 12 h/d, 温度 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%。RAW264.7, 购于上海酶研生物科技有限公司。

1.1.2 材料与试剂

CA-Protein (蛋白含量 86.75 g/100 g), 实验室自制; 碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L、碱性蛋白酶 37071 和风味蛋白酶 1 000 L, 诺维信 (中国) 生物技术有限公司; 碱性蛋白酶 Multifect PR 6L、酸性蛋白酶 2.5X 和碱性蛋白酶 3 L, 杜邦; 中性蛋白酶 Protex 7 L, 杰能科; 胰蛋白酶, 南宁庞博生物工程有限公司; NaOH 和 NaCl (分析纯), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CTX), 上海麦克林生化科技有限公司; Hank's 液、RPMI-1640 营养液 (Roswell Park Memorial Institute Culture Medium-1640, RPMI-1640) 和刀豆凝集素 A (Concanavalin A, ConA), 碧云天生物技术研究。检测试剂盒: 噻唑蓝 (3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide, MTT)、乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH)、免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG)、免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM)、 γ 干扰素 (Interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-4 (Interleukin-4, IL-4) 和白细胞介素-10 (Interleukin-10, IL-10), 南京建成生物工程研究所。

1.1.3 主要仪器设备

BPN-80CW (UV) 二氧化碳培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; TDL-40B 台式低速离心机, 上海安亭科学仪器厂; SCIENTZ-10N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; XDS-8KY 倒置生物显微镜, 上海启步生物科技有限公司; AirGuard 1000 超净工作台, 上海润度生物科技有限公司; PE20K pH 计和 ML304 T02 电子天

平, 梅特勒托利多集团; DK-S26 电热恒温水浴锅, 上海森信实验仪器有限公司; R-100 旋转蒸发仪, 步琦实验室设备贸易(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CA-Peptide 制备工艺优化

蛋白酶筛选, 选用 7 种蛋白酶, 加酶量 (m/m) 4%、温度 50 °C、时间 3 h 及底物浓度 (m/m) 5%, 其他参数按照表 1 所列, 以水解度为指标, 筛选适用于 CA-Protein 的蛋白酶; 选取水解度较高的蛋白酶, 温度 50 °C 及底物浓度 (m/m) 5%, 其他参数按照表 2 所列, 以水解度和产物对 RAW264.7 的相对增殖率为指标, 筛选蛋白酶。酶解条件优化, 选则碱性蛋白酶 37071 为关键酶, 以水解度和 RAW264.7 相对增殖率为指标, 参考余虹等^[16]对龙须菜蛋白的酶解条件, 确定对以下参数变量范围进行考察: 初始 pH 值设置 8.5、9.0、9.5、10.0、10.5 和 11.0; 底物浓度 (m/m) 设置 1%、2%、3%、4% 和 5%; 酶-底物比 (m/m) 设置 1%、2%、3%、4% 和 5%; 酶解温度设置 35、40、45、50 和 55 °C; 酶解时间设置 1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 h。

1.2.2 CA-Peptide 的制备

采用优化后的酶解条件对 CA-Protein 进行酶解, 酶解结束后, 将反应液升温至 90 °C 保持 10 min, 灭酶; 将灭酶后的反应液于室温下冷却, 4 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液; 减压浓缩、冷冻干燥, 即得 CA-Peptide 样品。采用 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》和 GB/T 22729—2008《海洋鱼低聚肽粉》中的方法对 CA-Peptide 的蛋白质含量和肽含量进行测定。

1.2.3 动物分组及处理

CA-Peptide 的免疫调节活性参考文诗雨等^[17]的方法并略作修改。将 60 只雄性 ICR 小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别为正常组、模型组、CA-Protein (250 mg/kg bw) 组和 CA-Peptide 低、中、高剂量 (125 mg/kg bw、250 mg/kg bw、500 mg/kg bw) 组。正常组腹腔注射生理盐水, 其它各组腹腔注射 CTX (100 mg/kg bw), 连续 3 d, 造模。第 4 d 起, 灌胃给予各组动物相应受试物, 持续 15 d。造模第 1 d 称量小鼠体重, 此后每隔 2 d 称量 1 次。末次灌胃受试物后禁食 24 h, 摘眼球取血、处死, 无菌环境下解剖、取胸腺和脾脏, 用生理盐水洗净后称量, 计算各组小鼠的胸腺及脾脏指数。

1.2.4 脾淋巴细胞转化增殖实验

小鼠脾淋巴细胞制备参考 Huyan 等^[18]的方法并略作修改。脾脏称量后用 Hank's 液清洗, 切成小块并研磨成匀浆, 在 75 μ m 的细胞筛上冲洗, 收集含细胞的滤液, 反复离心 3 次后用 1 mL RPMI-1640 营养液重悬细胞, 并计数。将细胞以每孔约 1×10^5 个的密度接种于 96 孔板, 于 CO₂ 培养箱中孵育 4 h, 吸去培养液, 换用含有 ConA 的培养液继续培养 8 h, 使用 MTT 试剂盒检测各组细胞活力。同时做空白, 脾淋巴细胞增殖率由式 (1) 计算。

$$SLIR = \frac{OD_{TM} - OD_B}{OD_N - OD_B} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

SLIR——为脾淋巴细胞增殖率, %;

OD_{TM}——为实验组或模型组在 570 nm 处吸光度值;

OD_B——为不添加脾细胞悬液的 RPMI-1640 在 570 nm 处吸光度值;

OD_N——为正常组在 570 nm 处吸光度值。

1.2.5 自然杀伤细胞 (Natural Killer Cell, NK) 活性实验

小鼠 NK 活性的测定参考 Mao 等^[19]的方法并略作修改。通过检测小鼠 NK 释放的 LDH 评估 NK 活性。将小鼠 YAC-1 细胞和脾淋巴细胞调整到合适密度, 实验组为 YAC-1 细胞和脾淋巴细胞混合培养 (细胞比例为 1:50)。同时设置自然释放组和最大释放组, 自然释放组使用完全培养液孵育, 最大释放组额外加入 LDH 孵育, 每组细胞 3 个复孔。培养 4 h 后离心 10 min, 依据 LDH 试剂盒说明测定各组上清液 490 nm 处 OD 值, NK 活性由式 (2) 计算。

$$NKA = \frac{OD_T - OD_{NR}}{OD_{MR} - OD_{NR}} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

NKA ——自然杀伤细胞活性, %;

OD_T ——为实验组在 440 nm 处吸光度值;

OD_{NR} ——为自然释放在 440 nm 处吸光度值;

OD_{MR} ——为最大释放在 440 nm 处吸光度值。

1.2.6 血清免疫球蛋白和细胞因子含量测定

灌胃周期结束后, 采用眼眶采血法, 将血液盛放于洁净离心管内, 离心 (3 000 r/min, 15 min), 收集血清, 暂存于 -20 °C 冰箱。使用相应试剂盒测定血清中的免疫球蛋白 (IgG、IgA 和 IgM) 和细胞因子 (NF- α 、IL-2、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10) 浓度。

1.2.7 酶解反应水解度测定

参考《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定 (GB5009.235-2016)》中“第一法 酸度计法”测定水解产物中氨基酸态氮的含量。参考《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定 (GB5009.5-2016)》中“第一法 凯氏定氮法”测定水解产物中总氮的含量。CA-Protein 的水解度由式 (3) 计算。

$$HD = \frac{(V_1 - V_2) \times c_{NaOH}}{(V_3 - V_4) \times c_{H_2SO_4} \times 2} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

HD ——为水解度, %

V_1 ——为氨基酸态氮测试组消耗的 NaOH 标准溶液体积, mL;

V_2 ——为氨基酸态氮空白组消耗的 NaOH 标准溶液体积, mL;

V_3 ——为总氮测试组消耗硫酸标准溶液体积, mL;

V_4 ——为总氮空白组消耗硫酸标准溶液体积, mL。

1.2.8 RAW264.7 相对增值率测定

将冻存的 RAW264.7 用 37 °C 水浴快速融化, 并重悬至 3 mL PBS 中, 以 800 r/min 离心 4 min, 沉淀细胞重悬于 5 mL 含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 中, 混匀后接种到 T25 培养瓶中, 置 5% CO₂ 的 37 °C 细胞培养箱中进行培养。当培养瓶中贴壁细胞达到 80% 左右时, 按 1:3 比例进行传代。取对数生长期的 RAW264.7, 按 3×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 培养, 细胞贴壁后弃去原培养基, 加入 100 μ L 各受试物溶液, 使其终浓度为 100 μ g/mL, 以不加受试物组为对照组, 以不加细胞组为空白组。培养 24 h 后, 使用 MTT 试剂盒检测各组细胞活力。同时做空白实验。RAW264.7 相对增值率由式 (4) 计算。

$$RPR = \frac{OD_T - OD_B}{OD_C - OD_B} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

RPR ——RAW264.7 细胞相对增值率, %;

OD_T ——为实验组在 570 nm 处吸光度值;

OD_B ——为空白组在 570 nm 处吸光度值;

OD_C ——为对照组在 570 nm 处吸光度值。

1.3 数据处理

使用 IBM SPSS Statistics 22 数据处理软件进行统计学分析, 实验结果以“均值 \pm 标准偏差”表示。统计模型采用单因素方差分析 (One-way-analysis of Variance, ANOVA)、邓肯斯多重比较检验和 t 检验进行。 $P < 0.05$ 表示两组之间具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 CA-Peptide 的制备工艺

2.1.1 不同蛋白酶对产物水解度和 RAW264.7 相对增殖率的影响

蛋白酶大多具有底物专一性, 不同种类蛋白酶的酶切位点不同, 酶解产物的理化性质及生物活性也可能存在

较大差异。不同蛋白酶酶解 CA-Protein 的水解度见表 1, 其中, 4 种碱性蛋白酶的水解度均明显高于中性或酸性蛋白酶。可能是由于 CA-Protein 等电点为 pH 4.0, 在碱性条件下溶解度较大^[20]。相比于中性或酸性蛋白酶, 碱性蛋白酶酶切位点较多, 易于打开疏水性氨基酸肽键^[21]。后续选用碱性蛋白酶来进一步优化酶解工艺。

表 1 不同蛋白酶产物的水解度

Table 1 Degree of hydrolysis of different protease products

酶种类	初始 pH 值	水解度/%
碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L	9.5	15.92±1.02
风味蛋白酶 1000 L	6.0	10.07±2.41
酸性蛋白酶 2.5X	4.0	7.33±0.79
中性蛋白酶 Protex 7 L	6.5	9.21±0.92
碱性蛋白酶 Multifect PR 6 L	9.5	16.26±1.53
碱性蛋白酶 37071	9.5	17.29±1.36
胰蛋白酶	9.0	15.28±1.72

采用不同碱性蛋白酶或不同组合酶对 CA-Protein 进行酶解, 并测定产物的水解度和 RAW264.7 相对增殖率。结果 (表 2) 显示, CA-Protein 所有酶解产物 (CA-Peptide) 的 RAW264.7 相对增殖率均明显高于 CA-Protein (113.23%)。其中, 碱性蛋白酶 37071+胰蛋白酶复合酶解产物的水解度和 RAW264.7 相对增殖率均最高, 分别为 22.71% 和 163.94%。方佳茂等^[22]制备蚕蛹功能性寡肽时也发现多酶复合可显著提高水解度及寡肽得率。因此, 选定这两种酶为 CA-Peptide 制备的工具酶。另外, 单一碱性蛋白酶 37071 酶解产物的 RAW264.7 增殖活性仅次于复合酶解法 (表 2), 说明该酶在 CA-Peptide 的制备中起关键作用。因此, 后续对碱性蛋白酶 37071 的酶解条件进行优化。

表 2 不同碱性蛋白酶对水解度和 RAW264.7 相对增殖率的影响

Table 2 Effects of different alkaline proteases on the degree of hydrolysis and the relative proliferation rate of RAW264.7

酶种类	加酶量 (m/m) /%	初始 pH 值	时间/h	水解度/%	RAW264.7 相对增殖率/%
空白	—	—	—	—	99.72±3.90
CA-Protein	—	—	—	—	113.23±2.57
碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L	4	10.5	3.0	17.38±1.45	139.44±4.10
碱性蛋白酶 Multifect PR 6 L	4	10.5	3.0	16.42±0.46	143.17±2.71
碱性蛋白酶 37071	4	10.5	3.0	18.03±1.80	155.64±2.89
胰蛋白酶	4	9.0	3.0	17.55±0.74	142.52±3.62
碱性蛋白酶 3 L	4	10.5	3.0	16.84±0.73	149.69±3.96
碱性蛋白酶 37071+胰蛋白酶	4+4	10.5	1.5+1.5	22.71±1.81	163.94±4.95
碱性蛋白酶 37071+风味蛋白酶 1000 L	4+4	10.5	1.5+1.5	19.36±0.95	151.42±2.62
碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L+胰蛋白酶	4+4	10.5	1.5+1.5	20.17±1.30	158.73±4.59

2.1.2 酶解条件优化

2.1.2.1 初始 pH 值对水解度和 RAW264.7 相对增殖率的影响

由图 1A 可知, 随着初始 pH 值增加, 水解度和 RAW264.7 相对增殖率都呈现升高趋势, 但两者达到最大值时的初始 pH 值不同。初始 pH 值为 10.5 时 RAW264.7 相对增殖率达到最大值 154.2%, 初始 pH 值为 11.0 时水解达到最大值 18.8%。对于水解度来说, 由于 CA-Protein 为碱性蛋白, 且酶为碱性蛋白酶, 环境 pH 值越高酶解效果越好, 因此水解度随 pH 值升高而增大。对于 RAW264.7 相对增殖率来说, 当 pH 值过高时酶解效果过强, 导致活性多肽被分解, 从而影响酶解产物的活性。因此综合水解度和 RAW264.7 相对增殖率两个指标, 选取的酶解初始 pH 值为 10.5。

2.1.2.2 底物浓度对水解度和 RAW264.7 相对增殖率的影响

由图 1B 可知, 底物浓度 (m/m) 小于 4% 时, 随底物浓度升高, 酶解产物的水解度逐渐增高, RAW264.7 相对增殖率逐渐增强; 当底物浓度 (m/m) 超过 4% 时, 酶解产物的水解度和 RAW264.7 相对增殖率均呈下降趋势。底物浓度未达到饱和前, 底物浓度越高, 水解速度越快, 水解度逐渐增大, 暴露的活性位点逐渐增多, 酶解产物

的 RAW264.7 增殖能力也逐渐增强；底物浓度过大时，会导致体系黏度升高，从而使酶分子与底物扩散不充分，致使水解度下降，活性位点暴露减少。因此，形成水解度和酶解产物活性随底物浓度先升高后降低的趋势，本研究选用最适底物浓度 (m/m) 为 4%。

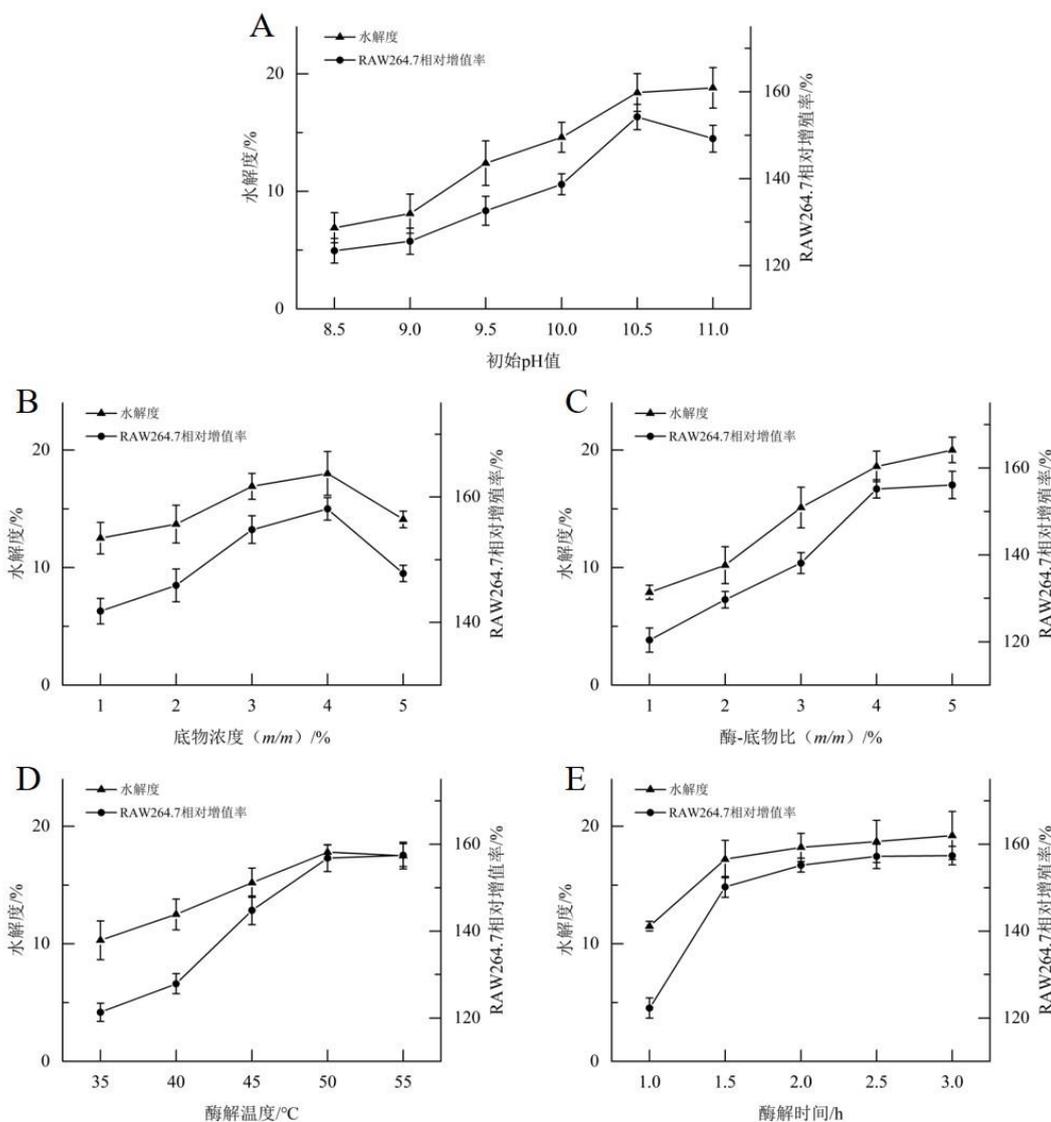


图 1 不同参数对水解度及 RAW264.7 相对增殖率的影响

Fig.1 Effects of different parameters on the degree of hydrolysis and the relative proliferation rate of RAW264.7

注：A，初始 pH 值；B，底物浓度；C，酶-底物比；D，酶解温度；E，酶解时间。

2.1.2.3 酶-底物比对水解度和 RAW264.7 相对增殖率的影响

由图 1C 可知，当酶-底物比 (m/m) 从 1% 增加到 4% 时，水解度和 RAW264.7 相对增殖率都随着酶-底物比的增加而提高，酶-底物比 (m/m) 从 4% 增加到 5% 时增加趋势变缓，基本保持一致。从水解度考虑，增加酶-底物比可以提高酶与底物的结合，从而加快酶促反应速率，当酶-底物比增加到一定值后，酶分子趋向饱和，此时继续增大酶/底物比对反应速率贡献不大。从 RAW264.7 相对增殖率考虑，当酶-底物比 (m/m) 从 1% 增加到 4% 时，RAW264.7 相对增殖率增幅显著（从 120.4% 提高到 155.2%），但是当酶-底物比 (m/m) 从 4% 增加到 5% 时，增殖率的增幅很小（仅提高了 1.1%）。这可能是由于当酶-底物比过量时，虽然肽键继续被裂解，但是产生的肽段无 RAW264.7 增殖活性或者活性较低，也有可能本身具有活性的肽段被继续水解。因此综合水解度和 RAW264.7 相对增殖率两个指标，同时考虑到酶的成本因素，适宜的酶-底物比 (m/m) 定为 4%。

2.1.2.4 酶解温度对水解度和 RAW264.7 相对增殖率的影响

酶解温度从 30 °C 增大到 50 °C 时，水解度随着酶解温度的提高而增大（图 1D），这是由于温和的热处理能促

使蛋白质发生解折叠化,从而增强蛋白质和酶作用的敏感性,更多的肽键被水解^[23]。当酶解温度继续升温到 55 °C 时,水解度有下降趋势,这可能是由于温度继续升高,蛋白酶结构遭到破坏导致酶活减弱^[24]。对于 RAW264.7 相对增殖率来说,随着温度的升高,RAW264.7 相对增殖率呈上升趋势,其变化趋势与水解度的变化趋势相似。综合考虑增殖率和水解度两个指标,适宜的酶解温度为 50 °C。

2.1.2.5 酶解时间对水解度和 RAW264.7 相对增殖率的影响

由图 1E 可知,酶解 1.0 h 后,水解度和 RAW264.7 相对增殖率迅速升高,酶解大于 1.5 h 后,水解度和 RAW264.7 相对增殖率的增幅随酶解时间的延长而趋于平缓。综合考虑水解度和 RAW264.7 相对增殖率两个指标,适宜的酶解时间为 1.5 h。

2.1.3 CA-Peptide 的最优制备工艺验证

综合酶种类的筛选和工艺条件的优化,确定 CA-Protein 的最优酶解工艺为:碱性蛋白酶 37071 和胰蛋白酶复合酶解,加酶量各 4% (m/m),底物浓度 5% (m/m)、初始 pH 值 10.5、酶解温度 50 °C,两种蛋白酶先后各酶解 1.5 h。在最优酶解工艺条件下,制得的 CA-Peptide 蛋白含量为 88.05 g/100 g,蛋白回收率为 94.50%,肽含量为 81.35%。

2.2 CA-Peptide 和 CA-Protein 的体内免疫调节活性

2.2.1 CA-Peptide 和 CA-Protein 对小鼠体重的影响

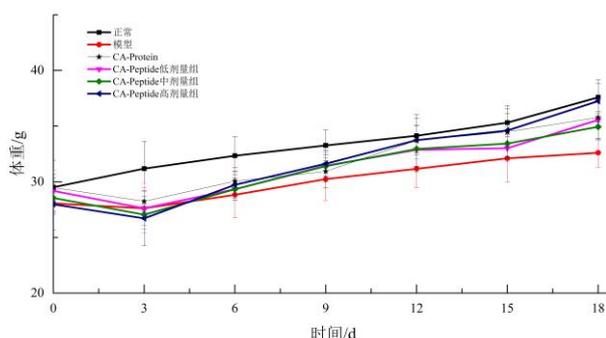


图 2 CA-Protein 和 CA-Peptide 对小鼠体重的影响

Fig.2 Effects of CA-Protein and CA-Peptide on mouse body weight

体重是小鼠的重要生理指标,与小鼠的生理状态息息相关。实验期间小鼠体重的变化情况如图 2 所示,开始时各组小鼠的体重差异不大 ($P>0.05$)。连续 3 d 腹腔注射 CTX 使小鼠的体重显著低于正常组 ($P<0.05$),且表现出精神不佳的状态,这是免疫低下造模成功的表现之一。在第 4 d 开始给予 CA-Protein 或 CA-Peptide 后体重增加开始大于模型组,且随着给药时间的延长,越来越接近正常组,给药末期 CA-Peptide 高剂量组小鼠的体重与正常组持平。在第 15 d 和 18 d 时,各干预组小鼠体重均显著高于模型组 ($P<0.05$),这说明 CA-Protein 和 CA-Peptide 对 CTX 造成的小鼠体重下降均有良好的改善作用。

2.2.2 CA-Peptide 和 CA-Protein 对小鼠免疫指标的影响

胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官,可为机体提供大量免疫细胞,胸腺和脾脏指数的变化是机体免疫功能的最直接反映^[25]。脾脏中淋巴细胞增殖能力是反应机体特异性免疫的一项重要指标^[26]。NK 在影响先天性和适应性免疫反应中发挥着重要作用^[27]。此外,免疫反应中的各种细胞因子,如 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IgG、IgA 及 IgM 等,还参与了免疫细胞的增殖、激活及杀灭体内肿瘤细胞等过程^[28]。模型组小鼠的胸腺指数、脾脏指数和 NK 活性分别为 1.14、1.67 mg/g 和 40.03%,均显著低于正常组的 1.67 和 2.81 mg/g 和 62.75% (图 3A、C),脾淋巴细胞增值率仅为正常组的 43.08% (图 3B);模型组小鼠血清中 IgG、IgA、IgM、TNF- α 、IL-2、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 的含量分别为 533.45、186.06、118.14、13.39、46.39、24.89、24.05 和 51.17 ng/L,显著低于正常组的 1116.83、420.29、329.42、27.73、87.62、54.40、45.94 和 98.46 ng/L (图 3D、E),这说明连续腹腔注射 3 d 的 CTX 成功构建了免疫低下小鼠模型。

与模型组相比,CA-Protein 组和 CA-Peptide 中、高剂量组小鼠的胸腺指数(图 3A);CA-Protein 组和 CA-Peptide 低、中、高剂量组小鼠的脾脏指数(图 3A);CA-Peptide 中、高剂量组小鼠的脾淋巴细胞增值率(图 3B);CA-Protein

组和 CA-Peptide 低、中、高剂量组小鼠的 NK 活性 (图 3C); CA-Protein 组和 CA-Peptide 低、中、高剂量组小鼠的血清 IgG、IgA、IgM、TNF- α 、IL-2、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 含量 (图 3D 和 E) 均显著提高。此外, CA-Peptide 的剂量与活性正相关。这表明, CA-Peptide 和 CA-Protein 均能不同程度改善 CTX 所致免疫低下小鼠的相关指标, 具有较好的免疫调节活性。食源性免疫调节肽的来源广泛, 多种动植物肽类均具有免疫调节活性, 不同来源的免疫调节肽在对小鼠免疫指标的影响上也略有不同。厚壳贻贝肽 (400 mg/kg bw) 可提高免疫低下小鼠的脾脏和胸腺指数, 增强免疫低下小鼠脾淋巴细胞和自然杀伤细胞活性, 并提高小鼠血清中 IgA、IgG、IgM、TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 的水平^[29]。大米免疫活性肽 (100 mg/kg bw) 可通过影响细胞因子的表达, 介导信号转导通路来发挥免疫调节作用^[17]。藻蓝蛋白肽 (100 mg/kg bw) 不仅能够改善 CTX 所致免疫抑制小鼠的体重、免疫器官指数及巨噬细胞的吞噬功能, 同时, 还可显著提高小鼠血清中 IL-2、IL-6、TNF- α 、IgA 和 IgG 水平^[30]。鲍鱼肽 (500 mg/kg bw) 可显著提高免疫低下小鼠的白细胞数和 NK 活性^[31]。甲鱼肽 (1500 mg/kg bw) 能显著提升免疫低下小鼠的脾淋巴细胞转化能力、NK 增殖能力、血液白细胞及淋巴细胞总数, 提高小鼠血液中 IL-2 和 IFN- γ 和 TNF- α 的含量, 并促进小鼠血清 IgA 的分泌^[32]。可见, 免疫调节肽的有效剂量大多在 100~1 500 mg/kg bw 之间。250 mg/kg bw 的免疫调节有效剂量赋予了 CA-Peptide 较大的开发潜力。

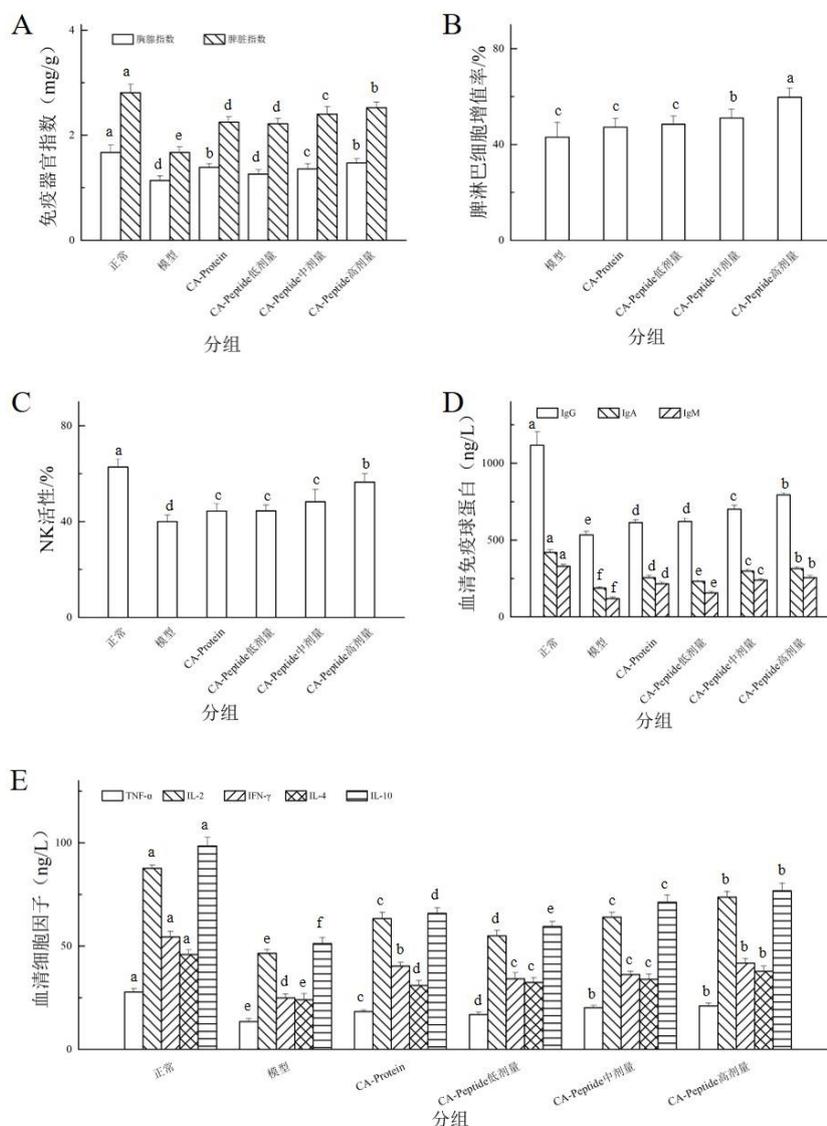


图 3 CA-Protein and CA-Peptide 对受试小鼠免疫功能的影响

Fig.3 The impact of CA-Protein and CA-Peptide on the immune function of mice

注: A, 免疫器官指数; B, 脾淋巴细胞增值率; C, NK 活性; D, 血清中免疫球蛋白; E, 血清中细胞因子。不同字母有显著性差异 ($P < 0.05$)。

此外,比较相同剂量(250 mg/kg bw)下 CA-Peptide 和 CA-Protein 对 CTX 所致免疫低下小鼠各项免疫指标的调节作用。可见,CA-Peptide 组小鼠的脾脏指数和脾淋巴细胞增值率分别为 2.40 mg/g 和 51.07%,显著高于 CA-Protein 组的 2.25 mg/g 和 47.24% (图 3A 和 B); CA-Peptide 组小鼠的血清 IgG、IgA、IgM、TNF- α 、IL-4 和 IL-10 含量分别为 701.67、299.19、239.88、20.11、33.86 和 71.15 ng/L,显著高于 CA-Protein 组的 613.86、255.34、214.79、18.24、30.93 和 65.87 ng/L (图 3D 和 E); CA-Peptide 组小鼠的胸腺指数和血清 IFN- γ 含量分别为 1.36 mg/g 和 36.26 ng/L,显著低于 CA-Protein 组的 1.39 mg/g 和 40.29 ng/L (图 3A 和 E); CA-Peptide 组小鼠的 NK 活性及血清 IL-2 含量分别为 48.33%、63.95 ng/L,与 CA-Protein 组的 44.43% 和 63.29 ng/L 无显著性差异 (图 3C 和 E)。蛋白质的降解产物——肽的生物活性可能增强或不变。例如:相同剂量(1 500 mg/kg BW)下乳清蛋白肽在增加血清免疫球蛋白浓度和增强巨噬细胞吞噬能力方面的作用显著优于乳清蛋白^[33]; 玛咖蛋白的酶解产物与其本身的免疫调节活性则无显著差异^[7]。相同剂量的 CA-Peptide 对免疫低下小鼠的多项免疫调节指标的改善作用优于 CA-Protein,说明酶解工艺增强了肽产物的免疫调节活性;然而,也有少数免疫相关指标的改善程度不同,这说明两者的免疫调节机理可能存在差异,有待进一步研究。

3 结论

蝉蛹是一种极具营养价值的天然蛋白质资源,其蛋白质干重占比 72.93%,且氨基酸种类丰富。CA-Peptide 的最佳制备工艺为:底物浓度(m/m) 5%、初始 pH 值 10.5、酶解温度 50 °C,先用碱性蛋白酶 37071 酶解 1.5 h,接着加入胰蛋白酶酶解 1.5 h,加酶量(m/m)均为 4%。该工艺下,CA-Peptide 的蛋白含量为 88.05 g/100 g,蛋白回收率为 94.50%,肽含量为 81.35%。CA-Peptide 具有良好的体内免疫调节活性,可显著改善 CTX 造成的免疫低下小鼠体重、脾脏指数和胸腺指数的下降,对免疫抑制小鼠的脾淋巴细胞增殖和 NK 活性有促进作用,其免疫增强活性可能与调节小鼠血清中免疫球蛋白和细胞因子含量相关。CA-Peptide 对机体的免疫调节作用优于 CA-Protein。CA-Peptide 和 CA-Protein 在发挥免疫调节作用的方式或途径上可能存在差异,具体机制有待进一步研究;另外,本研究中 CA-Peptide 是一种混合物,可能包含多种类型的肽或氨基酸,探究 CA-Peptide 中免疫调节活性肽段的种类及结构也需要进行更深入的分离纯化及活性验证。

参考文献

- [1] 朱巽.湖南食用昆虫资源及开发利用[J].林业科技开发,2003,17(2):12-14.
- [2] 兰英,王泽胤,赵秀梅,等.可食性昆虫的营养价值和食用安全性研究进展[J].食品安全质量检测学报,2024,15(12):27-33.
- [3] 王灿楠,从宁.蚱蝉幼虫的营养成分研究[J].营养学报,2002,24(4):447-448.
- [4] 宋少华.蝉蛹蛋白质的提取及酶解物抗氧化活性测定[D].郑州:郑州大学,2012.
- [5] 杨月欣.中国食物成分表[M].北京:北京大学医学出版社,2004.
- [6] 肖长辉,安东平,张斌成,等.促老年人蛋白质消化吸收方法的研究进展[J].食品科学,2023,44(9):306-312.
- [7] 潘蕾蔓,张祎,贺萍,等.预酶解对玛咖蛋白胃肠消化及免疫调节活性的影响[J].现代食品科技,2023,39(2):253-263.
- [8] 陈嘉敏,黄颂源,梅甜甜,等.蚕蛹抗氧化肽的制备及其体内外活性评价[J].现代食品科技 2024,40(8):189-198.
- [9] LEE J H, PAIK H D. Anticancer and immunomodulatory activity of egg proteins and peptides: a review [J]. Poultry Science, 2019, 98(12): 6505-6516.
- [10] SANTIAGO-LÓPEZ L, HERNÁNDEZ-MENDOZA A, VALLEJO-CORDOBA B, et al. Food-derived immunomodulatory peptides [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(11): 3631-3641.
- [11] LI W, XU C, ZHANG C H, et al. The purification and identification of immunoregulatory peptides from oyster (*Crassostrea hongkongensis*) enzymatic hydrolysate [J]. RSC Advances, 2019, 9(56): 32854-32863.
- [12] LI Z Y, ZHAO S, XIN X D, et al. Purification, identification and functional analysis of a novel immunomodulatory peptide from *Silkworm Pupa* protein [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(1): 243-249.
- [13] XING J, ZHANG M D, LIN S Y. The research progress of immunomodulatory peptides[C]//Proceedings of the 2016 4th International Conference on Machinery, Materials and Computing Technology. Atlantis Press, Amsterdam, 2016:1480-1484.
- [14] 王姗姗,左阮靖,张玉红.生物活性肽制备方法的研究进展[J].食品科技,2024,49(2):255-262.
- [15] ZHANG M Y, LIU S Q, YANG X M, et al. Immunomodulatory effects of different molecular weight *sporisorium reilianum*

- polypeptides on LPS-induced RAW264.7 macrophages [J]. Food Bioscience, 2021, 43: 101322.
- [16] 余虹,操德群,何艳丽,等.龙须菜蛋白酶解制备 ACE 抑制肽的工艺优化[J].食品与生物技术学报,2019,38(2):133-139.
- [17] 文诗雨,张芷萌,吴昊,等.大米免疫活性肽在小鼠体内的作用机制[J].食品与机械,2024,40(3):141-148+240.
- [18] HUYAN X H, LIN Y P, GAO T, et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice [J]. International Immunopharmacology, 2011, 11(9): 1293-1297.
- [19] MAO R X, WU L, ZHU N, et al. Naked Oat (*Avena nuda* L.) oligopeptides: Immunomodulatory effects on innate and adaptive immunity in mice via cytokine secretion, antibody production, and the cells stimulation [J]. Nutrients, 2019, 11(4): 927.
- [20] 孙明哲,李亚梅,邓新焕,等.碱法提取蝉蛹蛋白及其免疫调节功能研究[J].食品质量与安全检测学报,2024,15(13):133-141.
- [21] 胡学佳,戴志远,金仁耀,等.不同蛋白酶对红娘鱼蛋白水解物的结构特性和生物活性的影响[J].中国食品学报,2023,23(10):81-89.
- [22] 方佳茂,刘偲琪,庄楚周,等.复合酶水解蚕蛹蛋白制备功能性寡肽的工艺研究[J].现代食品科技,2012,28(3):323-328.
- [23] 王彦惠,吴清浊,孙瑜彤,等.热处理对杏仁分离蛋白结构及热稳定性的影响[J].食品工业,2023,44(12):140-146.
- [24] 张典,李龄佳,崔春,等.牡蛎酶解工艺的响应面优化研究[J].中国调味品,2019,44(5):12-16.
- [25] WILSON-FRANK C. Toxicology and analytical chemistry [J]. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2023, 39(1): 157-164.
- [26] CHEN F M, LI T L, ZHANG HJ, et al. Acid-ionizable iron nanoadjuvant augments STING activation for personalized vaccination immunotherapy of cancer [J]. Advanced Materials, 2023, 35(10): 2209910.
- [27] SHI F D, VAN K L. Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells [J]. Nature Reviews Immunology, 2006, 6(10): 751-760.
- [28] BEVERS S, KOOIJMANS S A A, VAN DE VELDE E, et al. mRNA-LNP vaccines tuned for systemic immunization induce strong antitumor immunity by engaging splenic immune cells [J]. Molecular Therapy, 2022, 30(9): 3078-3094.
- [29] 田恒群,何康,郑平安,等.厚壳贻贝低分子量肽对免疫抑制小鼠免疫调节作用[J].广东海洋大学学报,2022,42(2):112-119.
- [30] 张廷新.藻蓝蛋白免疫肽的酶解制备、结构鉴定及功效评价[D].济南:齐鲁工业大学,2023.
- [31] 江新辉,江敏,谢永灿,等.酶解鲍鱼肽特性及其抗氧化与调节免疫的研究[J].食品与发酵工业,2024,50(9):23-28.
- [32] 庄嘉辰.甲鱼肽肠道黏膜免疫调节活性研究[D].杭州:浙江大学,2023.
- [33] 韩晓峰,姚孟丽,韩小伟,等.乳清蛋白肽对小鼠免疫应答和过敏性鼻炎的改善作用研究[J].食品与发酵工业,2025,51(2):160-167.