

# 核桃蛋白抗炎成分的筛选及其活性比较

胡霞<sup>1,2</sup>, 弘子姗<sup>1</sup>, 代晶晶<sup>3</sup>, 解静<sup>1,2\*</sup>, 田洋<sup>1,2\*</sup>

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 食药同源资源开发与利用教育部工程研究中心, 云南昆明 650201)

(2. 云南省精准营养与个性化食品制造重点实验室, 云南昆明 650201)

(3. 普洱学院茶叶咖啡学院, 云南普洱 665000)

**摘要:** 研究核桃蛋白中最具有抗炎活性的组分及胃肠消化对其性质和抗炎活性的影响。利用 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 模型, 研究 6 种核桃蛋白酶解物的抗炎活性; 利用超滤技术将抗炎活性最强的酶解物进行分级提取, 研究不同分子量超滤组分的抗炎活性; 建立体外模拟胃肠消化模型, 评价体外模拟消化对活性最好组分水解度、多肽含量和抗炎活性的影响。研究发现, 6 种蛋白酶解物均可抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞的 NO 释放, 其中碱性蛋白酶解物抑制效果最好, 当其剂量为 800  $\mu\text{g/mL}$  时 NO 释放抑制率为 18.33%; 碱性蛋白酶解物中, 分子量 <1 ku 组分对 NO 释放抑制效果最好, 当其剂量为 800  $\mu\text{g/mL}$  时 NO 释放抑制率为 25.25%; 与未消化组相比, <1 ku 胃肠模拟消化组的多肽含量从 5.56 g/100 g 增加到 10.93 g/100 g, 水解度从 1.82% 增加到 7.54%, NO 释放抑制率从 24.75% 增加到 46.50%。结果表明, 核桃碱性蛋白酶解物中, 分子量 <1 ku 组分具有最强的抗炎活性, 经胃肠消化后其抗炎活性增加。研究结果可为核桃抗炎成分分离纯化的研究奠定基础, 也为核桃副产物高值化利用提供理论依据。

**关键词:** 核桃多肽; 碱性蛋白酶; RAW264.7 巨噬细胞; 一氧化氮; 抗炎

文章编号: 1673-9078(2024)06-29-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0780

## Screening and Activity Comparison of Anti-inflammatory Components of Walnut Proteins

HU Xia<sup>1,2</sup>, HONG Zishan<sup>1</sup>, DAI Jingjing<sup>3</sup>, XIE Jing<sup>1,2\*</sup>, TIAN Yang<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Engineering Research Center of Development and Utilization of Food and Drug Homologous Resources, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2.Yunnan Key Laboratory of Precision Nutrition and Personalized Food Manufacturing, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)(3.School of Tea and Coffee, Pu'er College, Pu'er 665000, China)

**Abstract:** The fractions of walnut proteins with the highest anti-inflammatory activity and the effect of gastrointestinal digestion on their properties and anti-inflammatory activity were studied. Six walnut protein protease hydrolysates were investigated for their anti-inflammatory activity using the lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cell model. The

引文格式:

胡霞,弘子姗,代晶晶,等.核桃蛋白抗炎成分的筛选及其活性比较[J].现代食品科技,2024,40(6):29-42.

HU Xia, HONG Zishan, DAI Jingjing, et al. Screening and activity comparison of anti-inflammatory components of walnut proteins [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 29-42.

收稿日期: 2023-06-28

基金项目: 云南省重大科技专项计划项目 (202102AE090027-2); 云南省万人计划产业技术领军人才项目 (YNWR-CYJS-2020-010); 云南省省市一体化专项 (202302AN360002); 云南省农业基础研究联合专项项目 (202101BD070001-120)

作者简介: 胡霞 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: 1965353992@qq.com

通讯作者: 解静 (1988-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 功能食品, E-mail: jingxie0624@163.com; 共同通讯作者: 田洋 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品, E-mail: tianyang1208@163.com

protease hydrolysate demonstrating the strongest anti-inflammatory activity underwent fractionation using ultrafiltration technology, and the anti-inflammatory potential of fractions with different molecular weights was investigated. An *in vitro* simulated gastrointestinal digestion model was established to evaluate the effects on the degree of hydrolysis, peptide content, and anti-inflammatory activity of the most active fraction. Results indicated that all six protease hydrolysates inhibited nitric oxide (NO) release from LPS-induced RAW 264.7 cells. Notably, the alkaline protease hydrolysate exhibited the highest inhibitory effect, achieving an inhibition rate of 18.33% at a dose of 800  $\mu\text{g/mL}$ . Within the alkaline protease hydrolysate, the fraction with molecular weight <1 ku demonstrated the most effective inhibition of NO release, with an inhibition rate of 25.25% at the same dose. Comparative analysis revealed that the peptide content of the <1 ku-simulated gastrointestinal digestion group increased from 5.56 g/100 g to 10.93 g/100 g. Likewise, the degree of hydrolysis increased from 1.82% to 7.54%, with an increase in the NO release inhibition rate from 24.75% to 46.50%. These results underscore the highest anti-inflammatory activity observed in the alkaline protease hydrolysate of walnuts with molecular weight <1 ku, which was further enhanced post-gastrointestinal digestion. This study provides foundational insights for the isolation and purification of anti-inflammatory peptides from walnuts, and offers a theoretical basis for the valorization of walnut by-products.

**Key words:** walnut peptide; alkaline protease; RAW 264.7 macrophages; nitric oxide; anti-inflammatory

炎症是身体为保护我们免受有害刺激物（如病原体、刺激物或感染）伤害所引发的自身免疫反应<sup>[1]</sup>。免疫系统中的炎症细胞通过产生不同的炎症介质来响应外来物质的入侵和 / 或炎症刺激<sup>[2]</sup>。这些介质具有复杂的多效性，并与许多细胞类型相互作用以放大炎症反应。慢性炎症与多种疾病有关，包括哮喘<sup>[3]</sup>、炎症性肠病（包括溃疡性结肠炎和克罗恩病）<sup>[4]</sup>、癌症<sup>[5]</sup>、2型糖尿病<sup>[6]</sup>和心血管疾病<sup>[7]</sup>，这些慢性炎症性疾病的发病率逐年增加，已经成为全世界普遍关注的健康问题。因此，开发具有抗炎功能的生物活性物质已成为科学研究的热点。

核桃 (*Juglans regia* L.) 是胡桃科胡桃属的植物，又被称为胡桃、万岁子等。中国是世界上最大的核桃生产地，拥有多种类型的核桃资源<sup>[8]</sup>。核桃是药食两用果实，富含蛋白质、脂肪，还含有多酚类、糖类、黄酮类及矿物质，其种仁含油量高，可以生食也可以榨油食用。现代研究表明，核桃可以帮助大脑发育、延缓皮肤的衰老、预防心脑血管疾病、抗癌症、降血脂和血糖和缓解疲劳等作用<sup>[9]</sup>。核桃油提取的副产物核桃粕的蛋白质含量高，核桃蛋白富含多种人体必需氨基酸。但富含蛋白的核桃粕常常被废弃，不仅浪费资源，还污染环境。如果对其加以利用，将这一废弃物变为有用的资源，可以达到保护环境和增加果农经济收入的双重目的。

多肽介于氨基酸和蛋白之间，是蛋白质水解的中间产物，一般是指少于 100 个氨基酸通过肽键连接而成的化合物，其相对分子质量低于 10 ku<sup>[10]</sup>。由于多肽药物具有副作用小、使用剂量小、不产生

耐药性等特点，被广泛应用于医药、化妆品、保健品等行业中<sup>[11]</sup>。核桃肽由核桃蛋白处理得到，有优于核桃蛋白的理化特性，所以在加工优质食品时也更有优势<sup>[12]</sup>。此外核桃肽的生物活性潜力巨大，相关研究证明核桃肽具有抗氧化活性、降血压活性、提高免疫活性、抗疲劳活性和改善记忆活性等功效<sup>[13]</sup>。但是关于核桃蛋白中最具有抗炎活性的组分研究较少，核桃肽在体内消化情况的相关报道也较少，消化后核桃多肽是否被消化吸收，抗炎活性如何变化等问题都有待验证。

因此，本研究以云南大理漾濞核桃粕为原料，通过对比 6 种蛋白酶酶解物，研究最具有抗炎活性的酶解物；经过不同截留分子量的超滤膜进行超滤分级制备得不同分子量的核桃肽，研究不同分子量核桃肽对 RAW 264.7 的 NO 释放量影响；再对活性最好的组分进行体外模拟消化，测定胃肠模拟消化对水解度和多肽含量和 RAW 264.7 的 NO 释放量影响，从而为开发核桃抗炎活性肽功能性食品的研发提供一定依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

核桃粕云南省大理云上普瑞农业有限责任公司；小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 中国科学院昆明动物研究所。

NaOH、HCl 国药集团化学试剂有限公司；碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、木

瓜蛋白酶、风味蛋白酶、谷胱甘肽、噻唑蓝、磷酸缓冲液 (Phosphate Buffer Saline, PBS), 北京索莱宝科技有限公司; 超滤膜, 上海摩速科学; 透析袋, 上海源叶生物; 胃蛋白酶、L-亮氨酸, 麦克林生化科技有限公司; 茚三酮, 源叶生物科技有限公司; 邻苯二甲醛 (O-Phthalaldehyde, OPA), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DMEM 高葡萄糖培养基、胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS), 沃卡威北京生物技术有限公司; 脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS), Sigma-Aldrich 公司; Griess Reagent System 一氧化氮检测试剂盒, Promega 公司。

## 1.2 仪器与设备

800Y 高速多功能粉碎机, 武义海纳电器有限公司; FA1004 电子天平, 上海舜宇恒平有限公司; FE28-CNpH 计, 梅特勒-托利多有限公司; VL-7F 落地式低速冷冻离心机, 长沙市百诺克离心机仪器有限公司; FD-1A-50 冷冻干燥机, 上海比朗仪器制造有限公司; HH-11-2 电热恒温水浴锅, 常州诺基仪器有限公司; THZ-300 恒温培养摇床, 上海一恒科学仪器有限公司; BPG-9156A 精密鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; EPOCH2 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 核桃蛋白的提取

将核桃粕磨碎用石油醚脱脂 3 h, 脱脂核桃蛋白粉在通风橱中干燥, 在室温 (25±2) °C 下放置 24 h。然后将脱脂核桃蛋白粉以 1:15 (m/V) 的比例分散在 NaOH 溶液中 (pH 值 9.0), 并在 45 °C 搅拌 1 h 萃取。萃取结束后用 HCl 将上清液 pH 值准确调节到 4.5, 离心机 4 000 r/min 离心 20 min, 离心后留沉淀物进行冻干处理, 并保存在 -20 °C 的冰箱中。

### 1.3.2 核桃蛋白酶解物的制备

参照 Kong 等<sup>[14]</sup>的方法做适量调整后制备核桃蛋白酶解物。将核桃蛋白以质量分数为 5% 的比例溶于超纯水中, 在水浴锅中进行 100 °C 沸水浴 15 min, 用 NaOH、HCl 将 pH 调至 10, 并在合适温度下添加酶水解 4 h, 根据表 1 不同蛋白酶最适条件进行酶解。接着, 在 100 °C 下的沸水浴中加热 15 min, 使酶失活, 并以 4 000 r/min 的速度离心 15 min。取上清液调至中性, 将上清液以 4 000 r/min 离心 15 min, 然后将上清液冷冻干燥, 保存在 -20 °C 的冰箱中。

表 1 不同蛋白酶的最适酶解条件

Table 1 The condition of hydrolysis with each proteolytic enzyme

酶	pH 值	温度/°C	时间/h	酶-蛋白质比例(m/m)
碱性蛋白酶	10	50	4	2%
中性蛋白酶	7	50	4	2%
胰蛋白酶	8	37	4	2%
糜蛋白酶	8	55	4	2%
木瓜蛋白酶	6	40	4	2%
风味蛋白酶	6	50	4	2%

### 1.3.3 超滤分级分离

超滤分级是一种膜分离技术, 在压力差的推动下, 将核桃蛋白酶解液中的溶剂和小分子物质, 通过膜表面的微孔结构选择性的分离物质, 小分子溶质透过膜, 大分子物质被膜截留, 从而实现分离、纯化<sup>[15]</sup>。采用超滤膜对核桃蛋白酶解液进行分级、分离, 得到 6 个组分 (>50、10~50、5~10、3~5、1~3 和 <1 ku) 的核桃多肽, 将超滤膜的出口压力控制在 5 Bar 以下。收集所得的不同分子量段的核桃多肽组分, 冷冻干燥后测定各组分抗炎活性。

### 1.3.4 体外模拟胃肠消化

配制质量分数为 5% 的核桃多肽进行体外胃肠模拟消化。

胃消化: 将酶解液在 37 °C 的条件下预热 30 min, 预热处理后的样品需用 HCl 调节最适 pH 值到 1.5 再加入胃蛋白酶, 胃蛋白酶的加入量为样品量的 2%, 然后使用恒温振荡器在 37 °C 条件下振荡孵育 2 h, 孵育结束后沸水浴 10 min 灭酶, 冷却后调 pH 值至 7.0, 再以 12 000 r/min 离心 10 min。

胃肠消化: 在胃消化的基础上, 调 pH 值至 7.5, 加入体积分数 2% 的 (E/S) 胰酶于 37 °C 温度下振荡孵 4 h, 再沸水浴 10 min 终止消化, 冷却, 调 pH 值至 7.0 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 保存上清液备用。对照试验用蒸馏水替代核桃多肽, 其他条件不变。

### 1.3.5 水解度的测定

水解度测定用茚三酮比色法, 参照颜小捷等<sup>[16]</sup>的方法略作修改。用 0、1、5、10、20、40、80、100、200、400、800 和 1 000 μg/mL L-亮氨酸做出标准曲线图。样品水解度检测: 分别将 0.5 mL 茚三酮显色剂、1 mL 蛋白样品、0.5 mL PBS 加入比色管中, 全部加入后充分摇匀。在水浴锅中 15 min

把比色管沸水浴, 冷却, 加入蒸馏水至 25 mL, 测吸光度前静置 10 min, 酶标仪设置波长 570 nm。

### 1.3.6 多肽含量测定

样品的肽含量测定采用 OPA 法<sup>[17]</sup>。

标准曲线绘制: 配制质量浓度为 0.3~0.8 mg/mL 的氧化型谷胱甘肽溶液各 1 mL, 取不同浓度的谷胱甘肽溶液 375  $\mu$ L, 加入 15 mL OPA 肽溶液。室温下反应 4 min 后, 用酶标仪在 340 nm 波长下测量吸光值, 用超纯水代替样品测量吸光值作为空白调零组。

配制 800  $\mu$ g/mL 的超滤组分样品溶液, 取 300  $\mu$ L 的待测样品, 然后添加 15 mL 的 OPA 溶液。在室温下反应 4 min 后, 立即用酶标仪在 340 nm 波长下测量吸光值。用超纯水代替样品测量吸光值作为空白调零组。

### 1.3.7 细胞毒性试验

用 MTT 法检测细胞存活率<sup>[18]</sup>。首先接种细胞, 把对数生长期的 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞接种于 96 孔板, 每毫升  $1 \times 10^5$  个, 每孔 200  $\mu$ L。培养细胞, 将接种完成的 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中使用含 10% FBS (体积分数) 的 DMEM 培养基在 37  $^{\circ}$ C 下培养 24 h。24 h 培养完成后弃

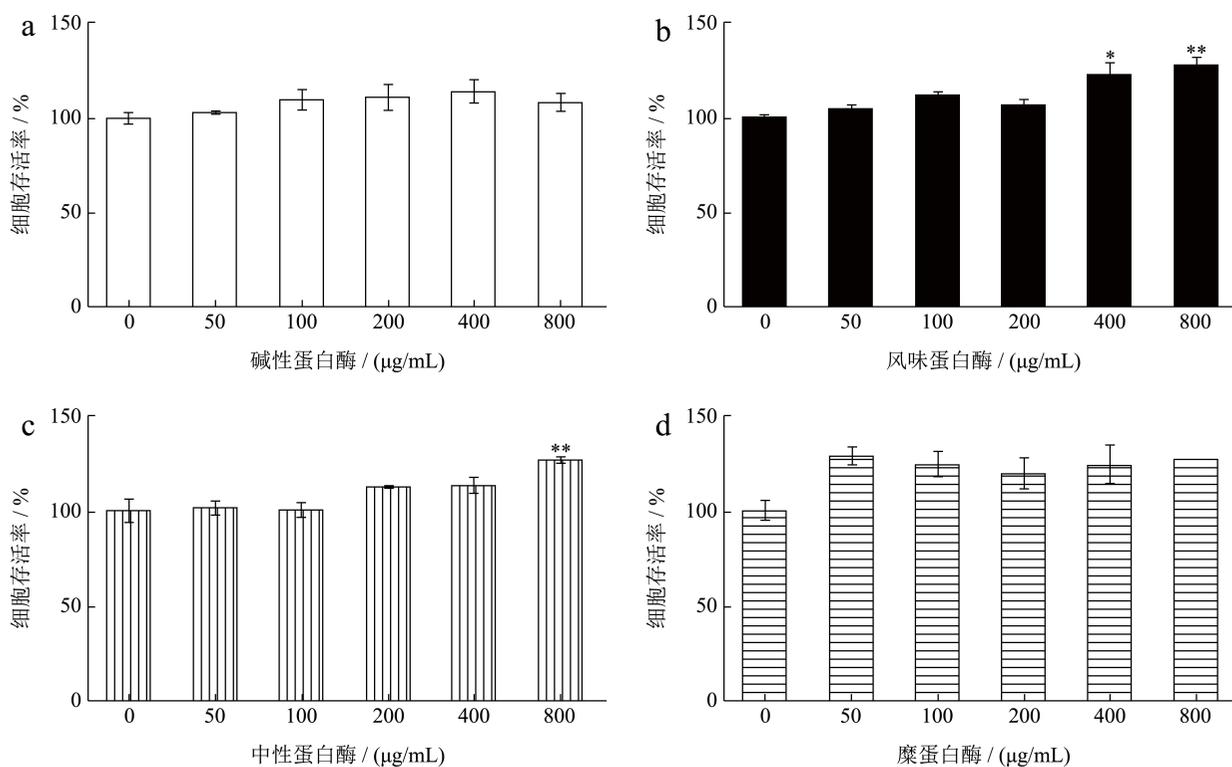
DMEM 培养基, 加入不同质量浓度药物 (50、100、200、400 和 800  $\mu$ g/mL) 继续培养 24 h, 每组设 3 个复孔用 MTT 法检测细胞存活率。样品对 LPS (0.5  $\mu$ g/mL) 诱导 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞的毒性试验, 重复上述操作进行。

### 1.3.8 Griess法检测NO的释放量

参照刘鹏飞等<sup>[19]</sup>的方法用 Griess 法测定 NO 的含量。把 RAW 264.7 细胞接种于细胞 96 孔板, 每毫升  $1 \times 10^5$  个, 每孔 200  $\mu$ L。接种好的细胞贴壁后, 去掉多余的培养基, 用梯度稀释的药物 (50、100、200、400 和 800  $\mu$ g/mL) 处理 2 h。2 h 后, 除阴性对照组外, 每组分别添加 0.5  $\mu$ L LPS (0.5  $\mu$ g/mL), 培养 18 h 后, 吸取 50  $\mu$ L 细胞培养上清液, 加入 Griess Resgent I 50  $\mu$ L 和 Griess Resgent II 50  $\mu$ L, 充分反应, 酶标仪波长设置 550 nm 检测吸光度。

## 1.4 数据分析

使用 Excel 2010 进行数据的整理和分析, 使用 SPSS 19.0 进行方差显著性分析, 然后用 Graphpad Prism 6.0 进行绘图。全部实验都重复 3 次以上, 并求其平均值。



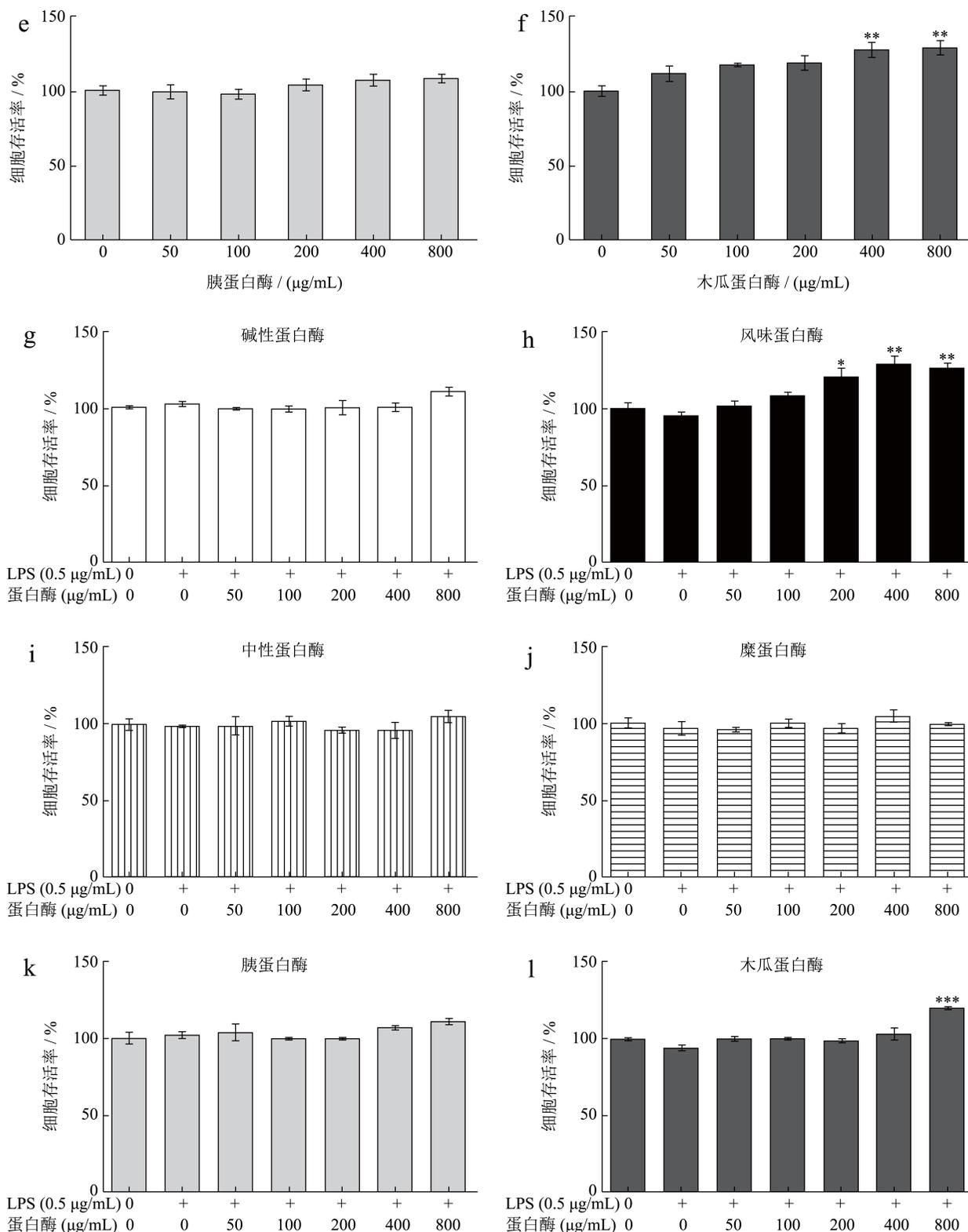


图 1 不同蛋白酶酶解物对 RAW 264.7 巨噬细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of different protease digests on the survival rate of RAW 264.7 macrophages

注:(a~f) 未经处理的 RAW 264.7 巨噬细胞;(g~l) 用 LPS 处理 24 h 的 RAW 264.7 巨噬细胞。图中标注“\*”表示与空白组比较 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 6种蛋白酶酶解物对RAW 264.7细胞和LPS诱导的RAW264.7细胞毒性的影响

使用MTT法来研究不同质量浓度的6种蛋白酶（碱性蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、糜蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶）酶解物对RAW 264.7细胞毒性的影响。如图1a~1f所示，6种蛋白酶在质量浓度为50~800 μg/mL时对RAW 264.7巨噬细胞生长均无抑制作用。特别是，当风味蛋白酶质量浓度在400~800 μg/mL、中性蛋白酶质量浓度为800 μg/mL、木瓜蛋白酶质量浓度在400~800 μg/mL时对RAW 264.7巨噬细胞的生长有促进作用，最大存活率分别为126.50%、127.00%、129.30%。因此，可用质量浓度为50~800 μg/mL的蛋白酶进行下一步实验。

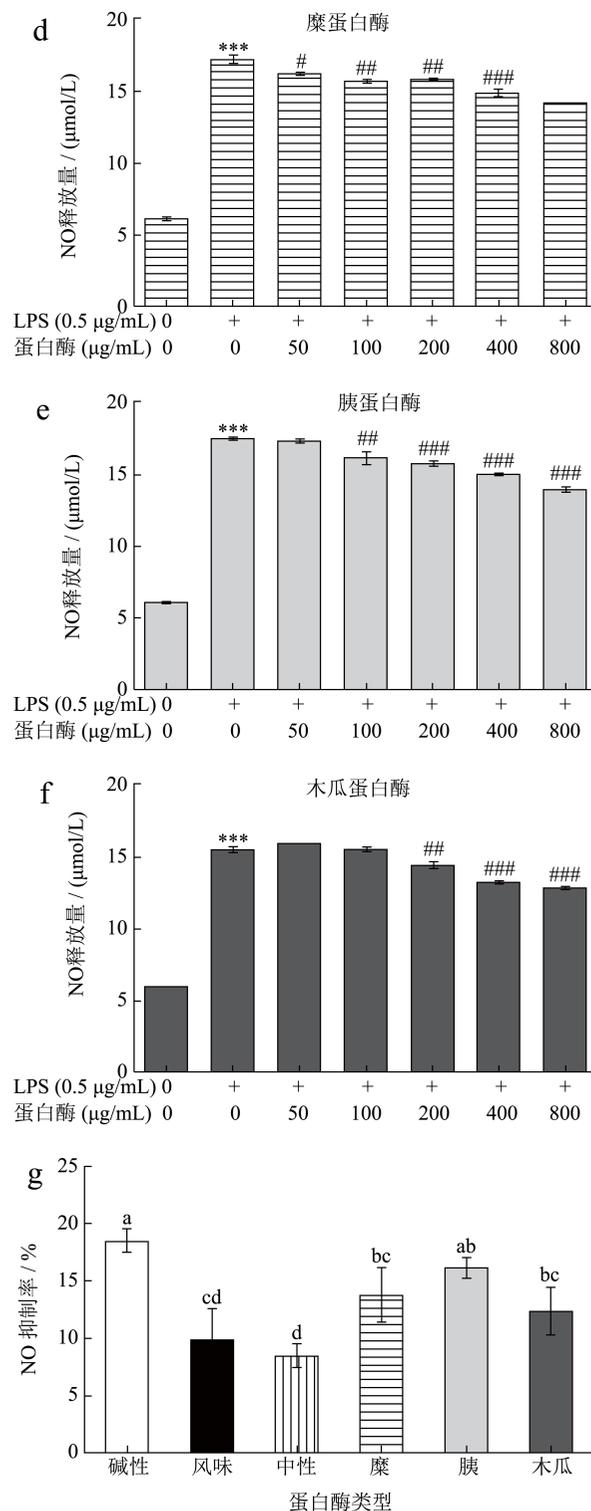
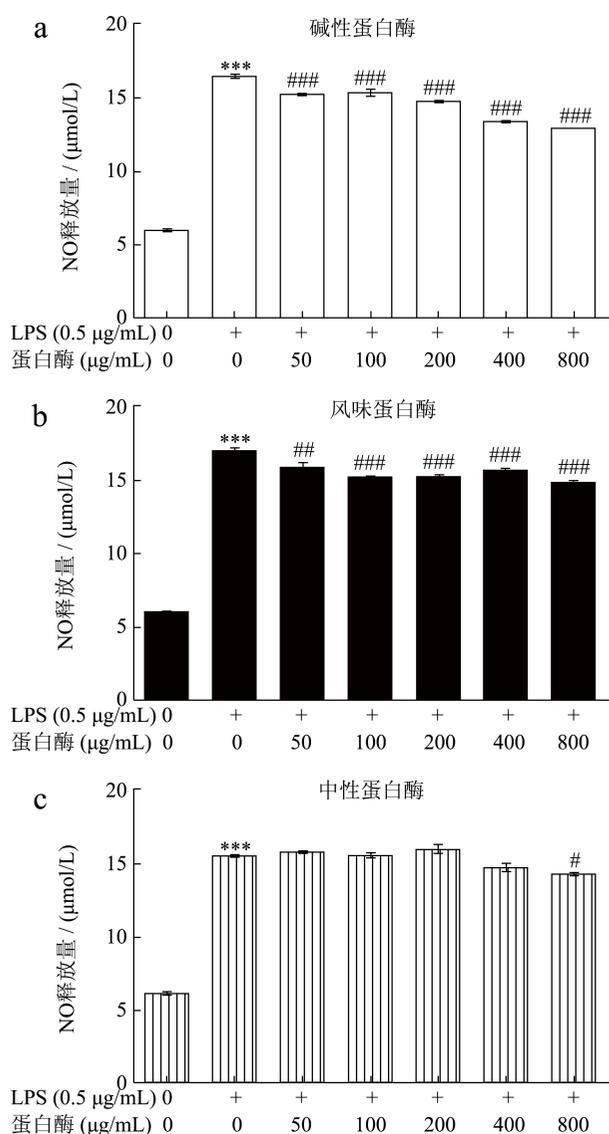


图2 6种蛋白酶酶解物对LPS诱导的RAW264.7细胞NO释放量(a~f)和释放率(g)的影响  
Fig.2 Effect of six protease digests on the amount of NO release concentration (a~f) and release rate (g) from LPS-induced RAW264.7 cells

注：图中标注“#”表示与LPS组比较（# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ ），字母表示有显著性差异（ $P < 0.05$ ）下同。

巨噬细胞 RAW 264.7 是参与形成和维持炎症的主要细胞类型之一, 参与炎症的形成和维持<sup>[20]</sup>。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁上的主要组成成分, 它通过 LPS 刺激巨噬细胞分化, 产生炎症细胞因子, 引起炎症反应<sup>[21]</sup>。因此, 通过 MTT 法来确定 6 种蛋白酶酶解物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞毒性的影响。如图 1g~1l 所示, 6 种蛋白酶在质量浓度为 50~800  $\mu\text{g/mL}$  时对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞生长均无抑制作用。但当风味蛋白酶质量浓度在 200~800  $\mu\text{g/mL}$ 、木瓜蛋白酶质量浓度为 800  $\mu\text{g/mL}$  时对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞的生长有促进作用, 最大存活率分别为 129.00% 和 120.50%。因此, 可用质量浓度为 50~800  $\mu\text{g/mL}$  的蛋白酶进行下一步细胞实验。

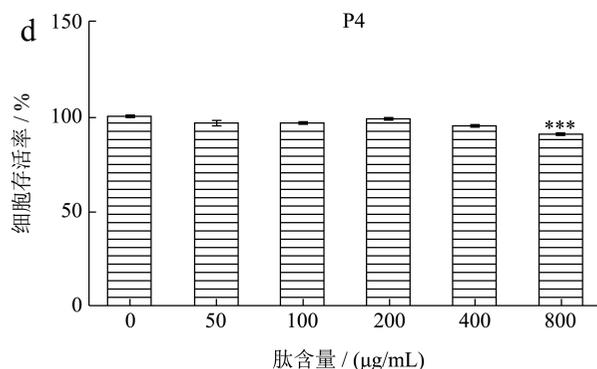
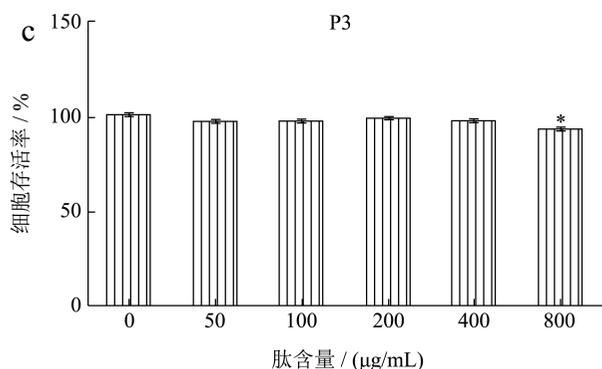
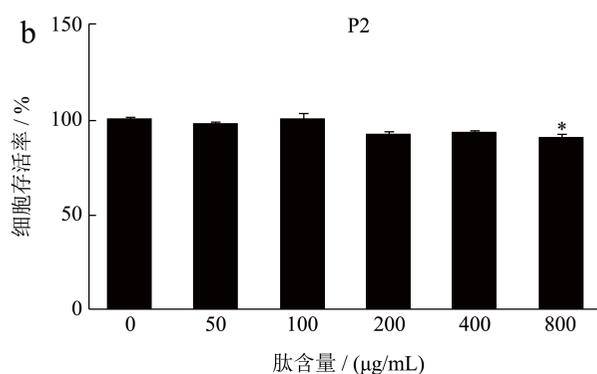
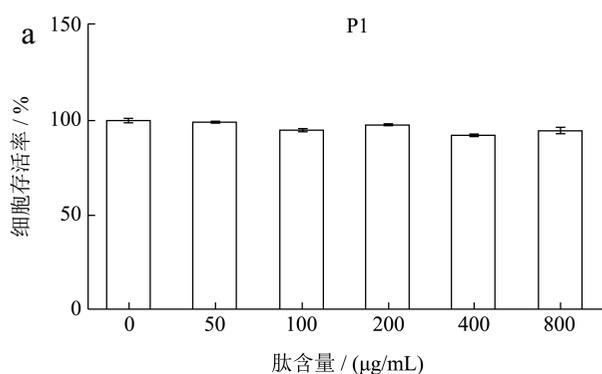
## 2.2 6 种蛋白酶酶解物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放量的影响

一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 是一氧化氮合酶产生的具有活性的信使分子, 能激活炎症通路, 促进多种炎症因子的产生。因此, 作为炎症反应中关键部分, 活性化合物对 NO 表达的影响可以作为判断其抗炎活性的评估标准之一<sup>[22]</sup>。采用 Griess 法检测 6 种蛋白酶酶解物对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 细胞 NO 产生的影响。如图 2a~2f 所示,

质量浓度为 50~800  $\mu\text{g/mL}$  的 6 种蛋白酶都能抑制 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 细胞 NO 的产生, 且呈剂量依赖性。经过统计分析, 如图 2g 所示, 6 种蛋白酶在质量浓度为 800  $\mu\text{g/mL}$  时对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 最高抑制率依次为: 碱性蛋白酶 (18.33%) > 胰蛋白酶 (16.00%) > 糜蛋白酶 (13.67%) > 木瓜蛋白酶 (12.33%) > 风味蛋白酶 (9.67%) > 中性蛋白酶 (8.33%)。因此, 选用碱性蛋白酶酶解物进行下一步的研究。

## 2.3 不同分子量超滤组分对 RAW 264.7 细胞和 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞毒性的影响

基于 2.2 的结果, 选用核桃蛋白的碱性蛋白酶酶解物, 使用超滤技术将酶解物分离成不同分子量, 再通过 MTT 法确定不同分子量的超滤组分对 RAW 264.7 细胞毒性的影响。如图 3a~3f 所示, 分子量 < 1 ku (P1)、10~50 ku (P5) 和 > 50 ku (P6) 的超滤组分对 RAW 264.7 细胞生长无影响。如图 3b~3d 所示, 分子量分别为 1~3 ku (P2)、3~5 ku (P3) 和 5~10 ku (P4) 的超滤组分, 当质量浓度达到 800  $\mu\text{g/mL}$  时, 对 RAW 264.7 细胞产生毒性, 抑制细胞生长, 细胞存活率分别为 90.8%、93.4% 和 90.2%。由于其存活率大于 90%<sup>[23]</sup>, 因此, 可选用质量浓度为 50~800  $\mu\text{g/mL}$  的超滤组分进行下一步实验。



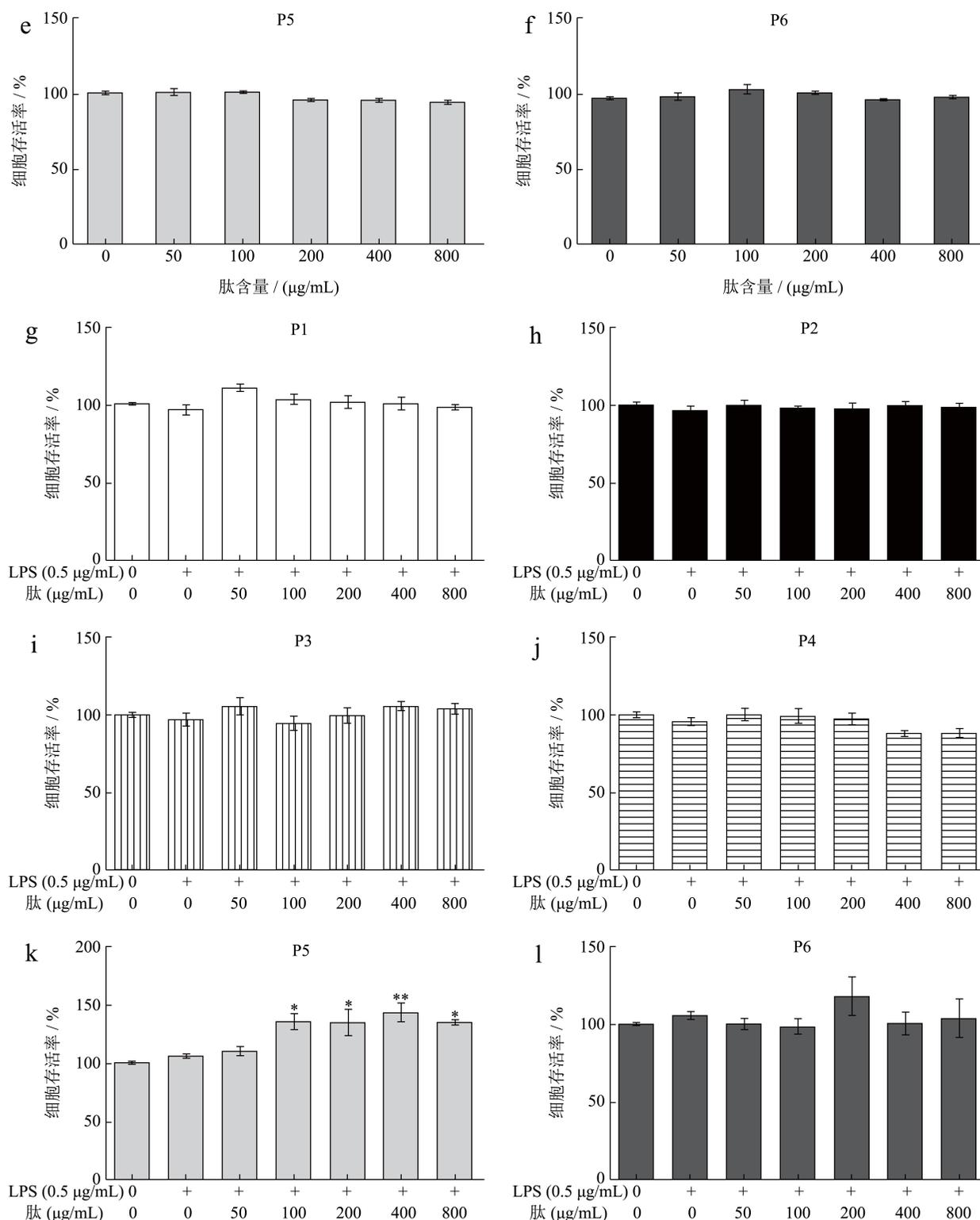


图 3 不同分子量超滤组分对 RAW264.7 巨噬细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of different molecular weight ultrafiltration fractions on the survival rate of RAW 264.7 macrophages

注：(a-f) 未经处理的 RAW 264.7 巨噬细胞，(g-l) 用 LPS 处理 24 h 的 RAW 264.7 巨噬细胞。P1~P6 分别表示：分子量 < 1 ku、1~3 ku、3~5 ku、5~10 ku、10~50 ku、> 50 ku 的组分，下同。

通过 MTT 法确定不同分子量超滤组分对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞毒性的影响。由图 3g~3l 所示，LPS 诱导对 RAW 264.7 细胞的存活率无显著影

响，不同质量浓度的超滤组分对 LPS 诱导的巨噬细胞的毒性无显著影响。此外，分子量为 10~50 ku 的超滤组分在质量浓度  $\geq 100 \mu\text{g/mL}$  后可促进巨噬细

胞增殖，细胞最大存活率为 142.80%。因此，不同分子量超滤组分对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞存活率无影响，可进行下一步实验。

### 2.4 不同分子量超滤组分对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响

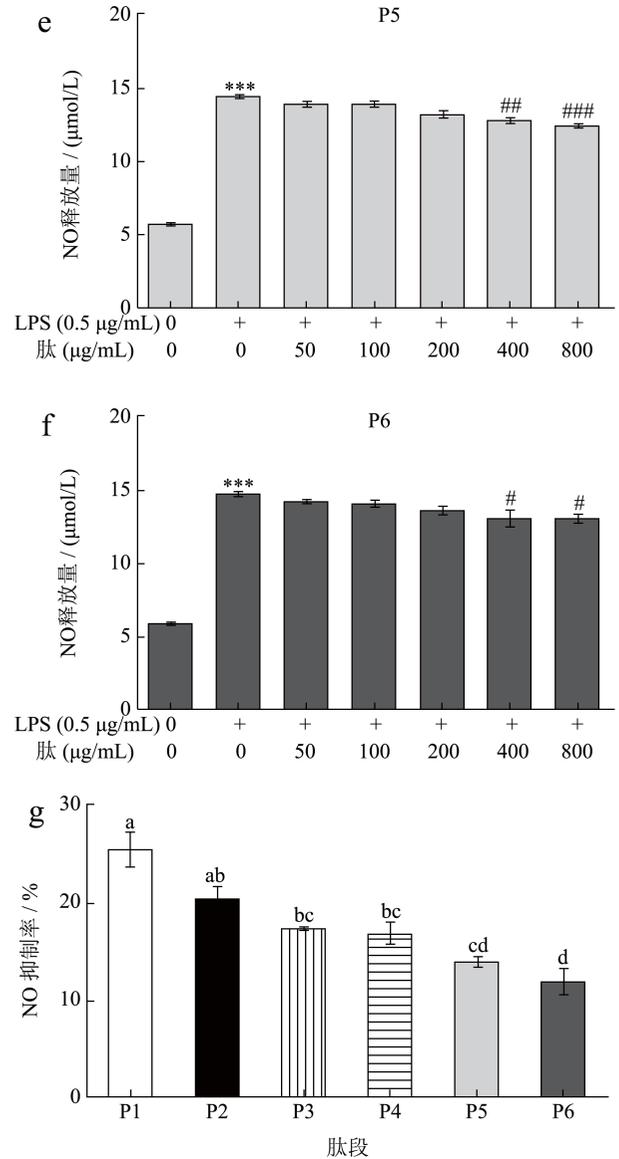
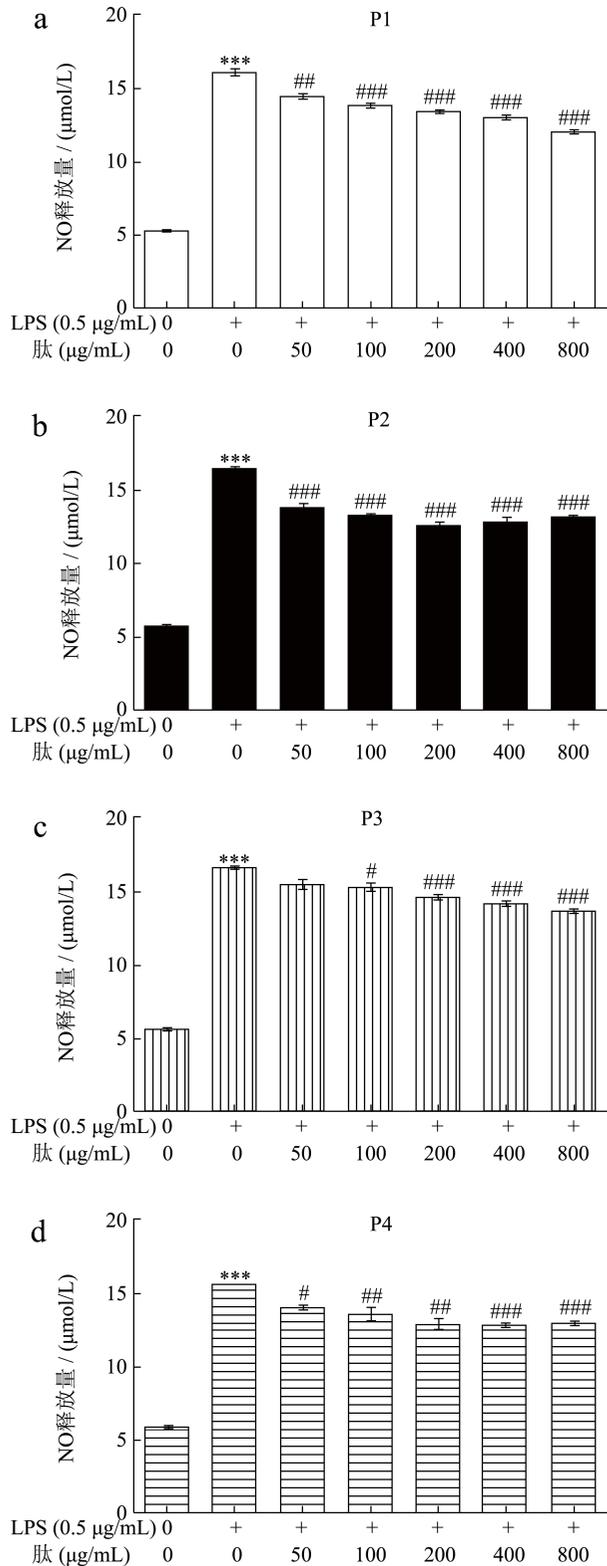


图 4 不同分子量超滤组分对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放量 (a-f) 和释放率 (g) 的影响

Fig.4 Effect of different molecular weight ultrafiltration fractions on LPS-induced NO release concentration (a-f) and release rate (g) from RAW 264.7 cells

如图 4a~4f 所示，与对照组相比较，LPS 对细胞的刺激作用明显提高了上清液中 NO 的分泌，与 LPS 组相比较，不同质量浓度的不同分子量超滤组分均可显著抑制细胞中 NO 的释放，且呈剂量依赖性。统计分析结果如图 4g 所示，不同分子量的超滤组分均能显著抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放量，各组分质量浓度为 800 μg/mL 时的最高抑制率分别为：P1 (25.25%) > P2 (20.25%) > P3 (17.25%) > P4 (16.75%) > P5 (13.75%) > P6 (11.75%)。分子量 < 1 ku 的酶解产物对 NO 的抑制效果最为明显，比碱性蛋白酶酶解物增加了

27.41%，表明超滤后小分子量的组分具有较好的抗炎活性。因此，选用<1 ku 的组分进行后续实验。

## 2.5 模拟胃肠道消化对P1多肽含量和水解度的影响

将获得的<1 ku 的组分进行体外模拟消化，以评估其在胃肠道消化后的可用性。如图 5a 所示多肽含量随消化程度的增加呈现逐渐上升的趋势，且有差异性显著。未消化的 P1 (P1) 的多肽含量为 5.56 g/100 g，经过胃模拟消化的 P1 (Gastric Digestion-P1, GD-P1) 的多肽含量为 8.06 g/100 g，与此同时，经过胃肠道模拟消化后的 P1 (Gastro-Intestinal Digestion-P1, GID-P1) 的多肽含量为 10.93 g/100 g。GID-P1 与 GD-P1 相比多肽含量增加且有差异性显著。综上实验结果可得，随模拟消化的进行样品多肽含量逐渐增多，在模拟胃肠消化过程中核桃蛋白<1 ku 的大分子蛋白多肽被逐渐消化分解成更多的小分子多肽。

使用茚三酮比色法研究胃肠模拟对<1 ku 组分水解度的影响。如图 5b 所示，P1 的水解度为 1.82%，GD-P1 的水解度为 3.17%，GID-P1 的水解度为 7.54%。与 P1 相比，GD-P1 和 GID-P1 水解度显著升高。与 GD-P1 比较，GID-P1 水解度也显著升高。

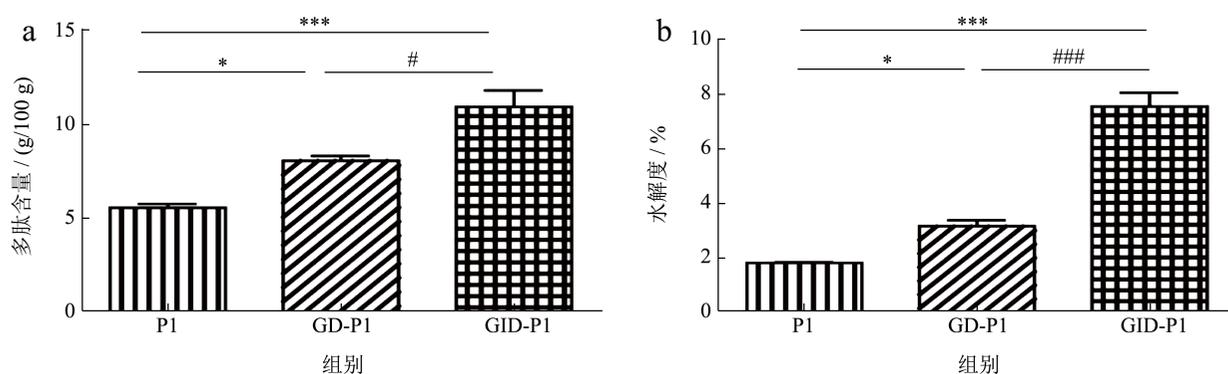
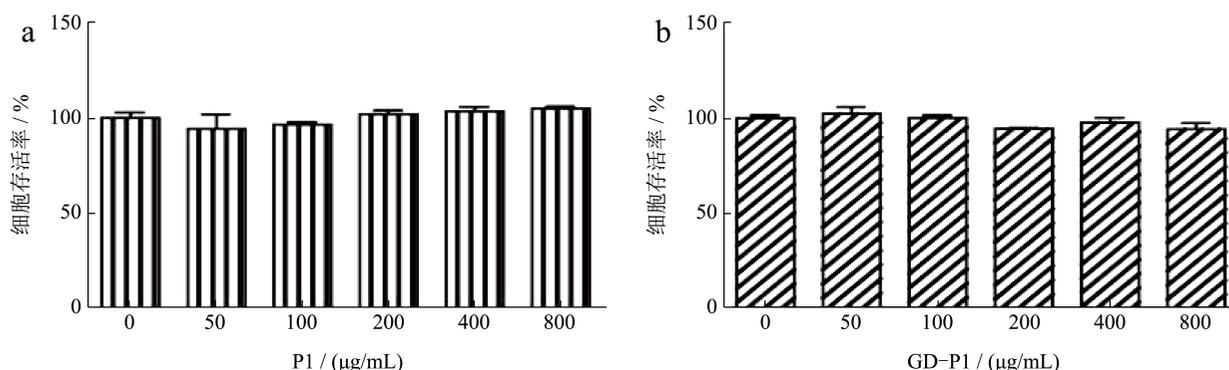


图 5 模拟胃肠道消化对 P1 水解度和多肽含量的影响

Fig.5 Effect of simulated gastrointestinal digestion on the degree of hydrolysis and peptide content of walnut proteolytes

注: (a) 肽含量; (b) 水解度。P1、GD-P1、GID-P1 分别表示未消化、胃消化、胃肠消化的核桃蛋白<1 ku 的组分。



综上实验结果可得<1 ku 组分经胃消化后水解度提高，经胃肠消化后水解度极显著提高，说明胃肠道对核桃蛋白酶解物有一定的水解消化能力。

## 2.6 模拟胃肠道消化P1对RAW264.7细胞和LPS诱导的RAW264.7细胞毒性的影响

使用 MTT 法探究胃肠模拟消化核桃蛋白<1 ku 组分对 RAW 264.7 细胞毒性。如图 6a~6c 所示，使用 MTT 法检测不同浓度模拟消化前后的<1 ku 的酶解物对 RAW 264.7 细胞存活率的影响。结果表明，在质量浓度为 50~800 µg/mL 的范围内，P1、GD-P1 和 GID-P1 对小鼠巨噬细胞 RWA 264.7 的存活率均无影响。因此，可用 50~800 µg/mL 的 P1、GD-P1 和 GID-P1 进行下一步实验。

使用 MTT 法探究胃肠模拟消化核桃蛋白<1 ku 组分对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞毒性。如图 6d~6f 所示，与空白组相比，加入 LPS 对细胞活性无影响，在 50~800 µg/mL 的范围内，GD-P1、GID-P1 对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RWA 264.7 的存活率无影响。P1 质量浓度在 200~400 µg/mL 时对细胞活性有显著的促进作用，细胞最大存活率为 121.3%。因此，可用 50~800 µg/mL 的 P1、GD-P1 和 GID-P1 进行下一步实验。

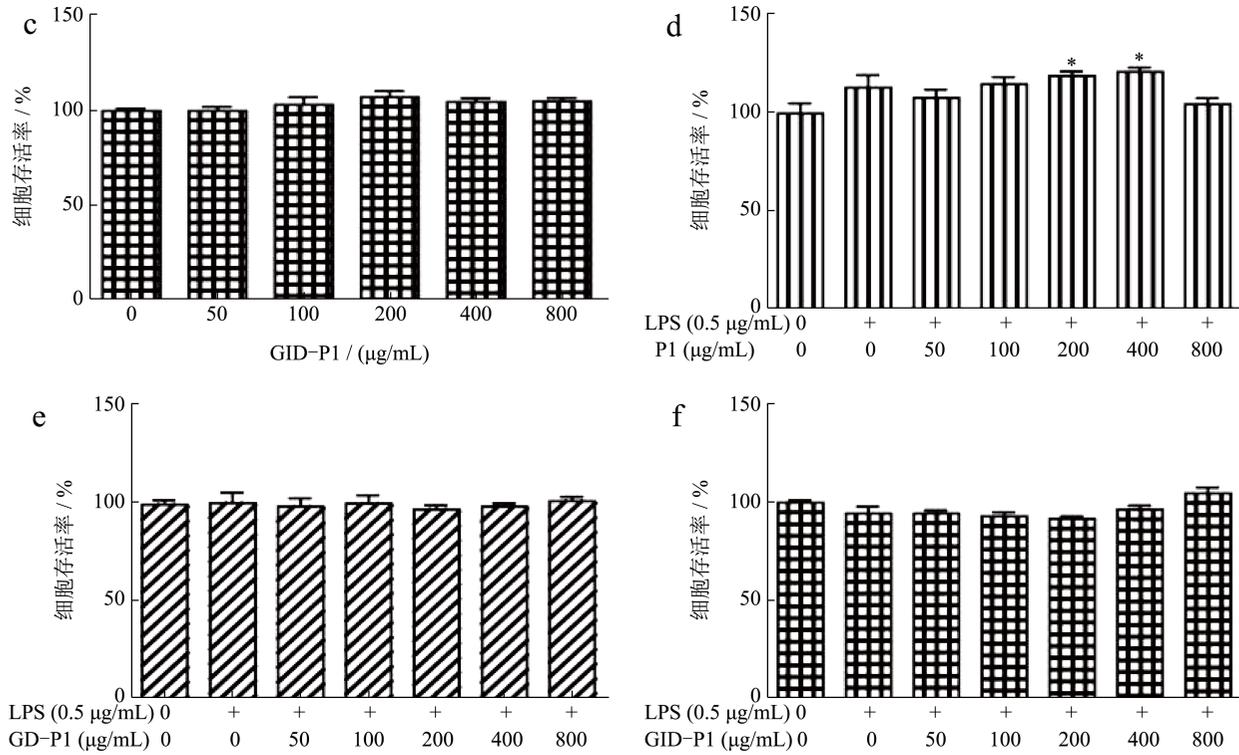


图 6 模拟胃肠道消化核桃蛋白酶解物对 RAW 264.7 细胞毒性的影响

Fig.6 Effect of simulated gastrointestinal digestion of walnut proteolytic on RAW 264.7 cytotoxicity

注: (a~c) 未经处理的 RAW 264.7 巨噬细胞, (d~f) 用 LPS 处理 24 h 的 RAW 264.7 巨噬细胞。

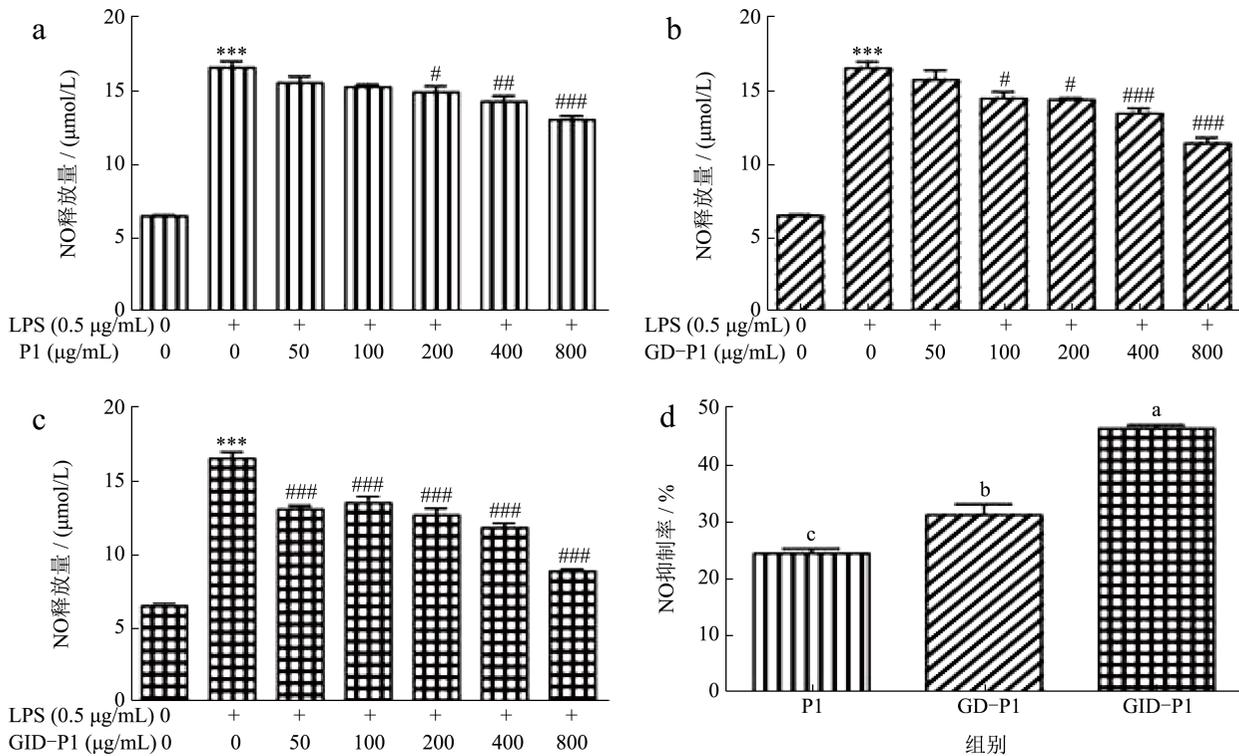


图 7 模拟胃肠道消化核桃蛋白 <1 ku 组分对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放量 (a~c) 和释放率 (d) 的影响

Fig.7 Effect of simulated gastrointestinal digestion of nucleoprotein <1 ku fraction on LPS-induced NO release concentration (a~c) and release rate (d) from RAW 264.7 cells

## 2.7 模拟胃肠道消化P1对LPS诱导的RAW264.7细胞NO释放量的影响

图 7a~7c 显示, 经 LPS 刺激以后, 细胞上清液中 NO 的分泌显著增加。与 LPS 组比较, 不同质量浓度的 P1、GD-P1 和 GID-P1 都能显著抑制细胞中 NO 的释放, 并呈剂量依赖性。在 1~16  $\mu\text{g/mL}$  的范围内, 经 LPS 诱导后 RAW 264.7 细胞上清液的 NO 释放量随着 P1 质量浓度的增加呈下降的趋势, 在质量浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时差异显著。在 50~800  $\mu\text{g/mL}$  的范围内, 经 LPS 诱导后 RAW 264.7 细胞上清液的 NO 释放量 GD-P1 质量浓度的增加呈下降趋势, 在质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  时差异显著。在 50~800  $\mu\text{g/mL}$  的范围内, 经 LPS 诱导后 RAW 264.7 细胞 NO 释放量受 GID-P1 抑制, 在质量浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  时差异极显著。经过统计分析, 在质量浓度为 800  $\mu\text{g/mL}$  时, NO 最高抑制率为 GID-P1 (46.50%) > GD-P1 (31.25%) > P1 (24.75%), GD-P1 和 GID-P1 对 NO 抑制率分别增加了 20.80% 和 46.77%。结果表明, P1 经胃肠消化, 可显著降低 NO 的释放量。

## 3 讨论

核桃粕作为优质的植物蛋白资源, 已被证明具有多种生物活性。然而, 关于核桃蛋白中最具有抗炎活性的组分及胃肠消化对其性质和抗炎活性的影响研究较少。在本研究中, 发现碱性蛋白酶酶解核桃蛋白的抗炎活性最强, 碱性蛋白酶酶解物中 <1 ku 的组分抗炎活性最强, <1 ku 的组分经过胃肠模拟消化后可增强抗炎活性。

碱性蛋白酶被广泛用于各种蛋白质的水解, 已经利用碱性蛋白酶从动植物蛋白中产生具有显著抗炎作用的水解物。本研究结果表明, 碱性蛋白酶酶解的核桃蛋白抗炎活性最强, 这与之前的研究一致。Hye 等<sup>[24]</sup>分别用碱性蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶酶解沙鱼蛋白, 发现碱性蛋白酶酶解产生的肽具有更高的 NO 抑制活性。此外, Cheng 等<sup>[25]</sup>用三种商业酶、风味蛋白酶和碱性蛋白酶水解金枪鱼蒸煮汁, 研究其水解物对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的炎症介质的影响, 发现碱性蛋白酶水解物表现出最有效的抑制作用。Worrapanit 等<sup>[26]</sup>用碱性蛋白酶和风味蛋白酶制备金枪鱼水解物, 分别通过 LPS 刺激的 RAW 264.7 巨噬细胞产生 NO 和 RBL-2H3 肥大细胞释放 b- 己氨基苷酶的能力来研究其抗炎和抗过敏活性, 结果显示, 碱性蛋

白酶水解物比风味蛋白酶水解物表现出更好的抗炎和抗过敏活性。此外, 用碱性蛋白酶水解的羽扇豆蛋白, 可防止视网膜色素上皮细胞的炎症损伤<sup>[27]</sup>。据报道, 疏水性氨基酸残基的存在可以增加肽的抗炎<sup>[28]</sup>和抗氧化<sup>[29]</sup>特性。碱性蛋白酶专门切割羧基端疏水氨基酸残基旁的肽键, 如 Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Pro、Trp 和 Met<sup>[30]</sup>。因此, 碱性蛋白酶水解蛋白质时可以产生大量含有疏水性氨基酸的肽, 从而表现出较高水平的 NO 抑制性活性。

肽链的分子量和长度在其生物活性中起重要作用。为筛选碱性蛋白酶酶解物中具最有抗炎作用的组分, 对酶解物进行了超滤。结果发现, <1 ku 的组分具有最强的抗炎活性。可能是因为与较大的肽相比, 小肽更容易被肠道吸收并渗透到细胞中, 同时, 低分子量肽在运输时不需要能量消耗, 因此可以较好的保存抗炎活性片段<sup>[31]</sup>。各种研究表明, 低分子量肽具有更高的抗炎活性<sup>[32]</sup>。在用碱性蛋白酶酶解获得蛋清中卵黏蛋白水解物, 脱盐处理后增加了低分子量肽的比例, 这些低分子量肽表现出较强的抗炎活性<sup>[33]</sup>。Tanatorn 等<sup>[34]</sup>将蜂花粉蛋白水解物根据分子量分成 6 个组分, 结果发现, 最小的级分 (<0.65 ku) 具有最高的 NO 抑制活性。从食用螺旋藻的酶水解物中获得抗炎肽, 水解产生的两种氨基酸序列为 L<sub>2</sub>DAVNR (686 u) 和 M<sub>1</sub>MLDF (655 u) 的肽, 结果发现, 两种肽都显著抑制了组胺刺激的 EA.hy926 内皮细胞中 IL-8 的产生和表达。

经体外模拟胃肠模拟消化后的核桃蛋白小分子量肽的抗炎活性显著增加, 可能是由于胃肠模拟消化后肽组分进一步被分解。这与之前的研究一致。奇亚籽的总蛋白和不同分子量的蛋白组分经过胃肠模拟消化后, 增强了其抗氧化、抗炎和抗动脉粥样硬化的作用<sup>[35]</sup>。另一项研究也表明, 体外胃肠模拟消化奇亚籽产生的肽级分可抑制 5-LOX、COX-1-2 和 iNOS 促炎酶活性<sup>[36]</sup>。此外, 经胃肠模拟消化后的谷子蛋白, 低分子量肽 (<3 ku) 含量增加, 显著抑制了 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的 NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6<sup>[37]</sup>。为确定沙丁鱼蛋白水解物的抗炎活性, 研究了分子量低于 10 ku 的组分对内皮细胞系 (EA.hy926) 与肠道细胞系 (Caco-2) 共培养的细胞模型 NO、ROS、MCP-1、VEGF、IL-8 和 ICAM-1 的影响, 结果发现, 经肠模拟消化后, 沙丁鱼蛋白水解物处理显著降低了所有炎症标志物<sup>[38]</sup>。

## 4 结论

本研究以云南漾濞核桃粕为原料,通过6种蛋白酶酶解核桃蛋白,利用超滤技术从碱性蛋白酶酶解物中制备不同分子量的超滤组分,研究不同分子量超滤组分对RAW 264.7巨噬细胞的毒性作用及其体外抗炎活性,利用体外模拟胃肠消化模型探究了核桃蛋白酶解物在不同消化阶段的水解度、多肽含量变化和体外抗炎活性。实验结果表明,碱性蛋白酶酶解物具有最强的抗炎活性,分子量<1 ku的核桃粕超滤组分具有较好的抗炎活性,经胃肠消化后<1 ku的组分的水解度和多肽含量增加。此外,胃肠消化可提高核桃蛋白酶解物的抗炎活性。研究结果为核桃抗炎肽的分离纯化及抗炎机制的深入研究奠定基础,也为核桃副产物高值化利用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] MCINNES I B, GRAVALLESE E M. Immune-mediated inflammatory disease therapeutics: past, present and future [J]. *Nature Reviews. Immunology*, 2021, 21(10): 680-686.
- [2] LEE D, NISHIZAWA M, SHIMIZU Y, et al. Anti-inflammatory effects of dulse (*Palmaria palmata*) resulting from the simultaneous water-extraction of phycobiliproteins and chlorophyll a [J]. *Food Research International*, 2017, 100: 514-521.
- [3] LABIB M B, SHARKAWI S M Z, EI-DALY M. Design, synthesis of novel isoindoline hybrids as COX-2 inhibitors: anti-inflammatory, analgesic activities and docking study [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2018, 80: 70-80.
- [4] BORGES A, CASOTI R, E SILVA M L A, et al. COX inhibition profiles and molecular docking studies of the lignan hinokinin and some synthetic derivatives [J]. *Molecular Informatics*, 2018, 37(12): e1800037.
- [5] KUMAR R, SAHA N, PUROHIT P, et al. Cyclic enaminone as new chemotype for selective cyclooxygenase-2 inhibitory, anti-inflammatory, and analgesic activities [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 182: 111601.
- [6] YU W, FIELD C J, WU J. Purification and identification of anti-inflammatory peptides from spent hen muscle proteins hydrolysate [J]. *Food Chemistry*, 2018, 253: 101-107.
- [7] AHN C B, JE J Y, CHO Y S. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis [J]. *Food Research International*, 2012, 49(1): 92-98.
- [8] 陆俊,赵安琪,成策,等.核桃营养成分与生理活性及开发利用[J].*食品与机械*,2014,30(6):238-242.
- [9] 李俊南,习学良,熊新武,等.核桃的营养保健功能及功能成分研究进展[J].*中国食物与营养*,2018,24(5):60-64.
- [10] 多肽是什么?[J].*质量指南*,2001(S2):43.
- [11] 王嘉佳,李晓倩,高山,等.核桃多肽复配核桃乳对小鼠抗疲劳及抗氧化作用研究[J].*食品与发酵工业*,2020,46(19):84-91.
- [12] 姜莉,徐怀德,陈金海.核桃多肽功能特性的研究[J].*食品科技*,2013,38(1):228-231.
- [13] 李丽琪.核桃生物活性评价及其乳剂制备工艺研究[D].武汉:武汉工程大学,2017.
- [14] KONG X Z, ZHANG L, SONG W G, et al. Separation, identification and molecular binding mechanism of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides derived from walnut (*Juglans regia* L.) protein [J]. *Food Chemistry*, 2021, 347: 129062.
- [15] 黄家利,陈元勇,唐庆九,等.七种食(药)用菌的超滤分级分离[J].*食用菌学报*,2009,16(4):64-65.
- [16] 颜小捷,刘幼娴,郑立浪,等.胃蛋白酶和木瓜蛋白酶水解核桃蛋白工艺研究[J].*广西植物*,2014,34(2):183-188.
- [17] 刘扬,张占雄.多肽含量的测定方法的比较[J].*内蒙古石油化工*,2008,5:65.
- [18] 边兴艳.MTT比色法及其应用[J].*国外医学(临床生物化学与检验学分册)*,1998,2:83-85.
- [19] 刘鹏飞,朱伟,万进,等.人参多糖对LPS诱导小鼠巨噬细胞炎症因子生成的抑制作用及其机制[J].*中国实验方剂学杂志*,2018,24(14):102-107.
- [20] AYAZ F, YUZER A, INCE T, et al. Anti-cancer and anti-inflammatory activities of bromo-and cyano-substituted azulene derivatives [J]. *Inflammation*, 2020, 43(3): 1009-1018.
- [21] 余功旺,黄文浩,刘爱梅,等.小鼠腹腔巨噬细胞炎症模型的建立[J].*广东药学院学报*,2014,30(6):766-770.
- [22] 张庆然.鹅不食草中倍半萜内酯类成分的体外抗炎活性研究[D].烟台:烟台大学,2021.
- [23] SHI Z, DUAN Y, ZHU X, et al. Dual functional NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup>@NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>, Nd<sup>3+</sup> core-shell nanoparticles for cell temperature sensing and imaging [J]. *Nanotechnology*, 2018, 29(9): 094001.
- [24] HYE L J, ANDREA M L, KYUNG Y Y. Isolation and characteristics of anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysates of sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2017, 26(2): 234-244.
- [25] CHENG M L, WANG H C, HSU KC, et al. Anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysates of tuna cooking juice [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2015, 26(6): 770-781.
- [26] CHANSUWAN W, YUPANQUIC T, CHINACHOTI P.

- Anti-inflammatory and anti-allergic activities of Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle hydrolysates evaluated in cell culture model [J]. *Functional Foods in Health and Disease*, 2019, 9(7): 446-465.
- [27] MILLAN-LINARES MC, TOSCANO R, LEMUS-CONEJO A, et al. GPETAFLR, a biopeptide from *Lupinus angustifolius* L., protects against oxidative and inflammatory damage in retinal pigment epithelium cells [J]. *Journal Food Biochemistry*, 2019, 43(11): e12995.
- [28] NANKAR S A, PANDE A H. Properties of apolipoprotein E derived peptide modulate their lipid-binding capacity and influence their anti-inflammatory function [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2014, 1841(4): 620-629.
- [29] MA Y, LIU J, SHI H, et al. Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(9): 6902-6912.
- [30] CEREND D, AYSUN Y, FUNDAK G, et al. Angiotensin-I-Converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants [J]. *Nutrients*, 2017, 9(4): 316.
- [31] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion [J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(4): 991-1014.
- [32] CRAIK DJ, FAIRLIE DP, LIRAS S, et al. The future of peptide-based drugs [J]. *Chemical Biology Drug Design*, 2013, 81(1): 136-147.
- [33] SUN X, CHAKRABARTI S, FANG J, et al. Low-molecular-weight fractions of alcalase hydrolyzed egg ovomucin extract exert anti-inflammatory activity in human dermal fibroblasts through the inhibition of tumor necrosis factor-mediated nuclear factor  $\kappa$ B pathway [J]. *Nutrition Research*, 2016, 36(7): 648-657.
- [34] SAISAVOEY T, SANGTANOO P, CHANPEN C, et al. Identification of novel anti-inflammatory peptides from bee pollen (*Apis mellifera*) hydrolysate in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2020, 60(1): 1-10.
- [35] GRANCIERI M, MARTINO H S D, GONZALEZ DE MEJIA E. Digested total protein and protein fractions from chia seed (*Salvia hispanica* L.) had high scavenging capacity and inhibited 5-LOX, COX-1-2, and iNOS enzymes [J]. *Food Chemistry*, 2019, 289: 204-214.
- [36] JAKUBCZYK A, SZYMANOWSKA U, KARAS M, et al. Potential anti-inflammatory and lipase inhibitory peptides generated by *in vitro* gastrointestinal hydrolysis of heat treated millet grains [J]. *CyTA-Journal of Food*, 2019, 17(1): 324-333.
- [37] HU S, YUAN J, GAO J, et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of peptides derived from *in vitro* gastrointestinal digestion of germinated and heat-treated foxtail millet (*Setaria italica*) proteins [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2020, 68(35): 9415-9426.
- [38] VIEIRA E F, VAN C J, FERREIRA I, et al. Protein hydrolysate from canned sardine and brewing by-products improves TNF- $\alpha$ -induced inflammation in an intestinal-endothelial co-culture cell model [J]. *European Journal Nutrition*, 2018, 57(6): 2275-2286.