

文章编号:1673-1689(2007)05-0031-04

超滤处理对大豆肽体外免疫功能的影响

黄文凯, 华欲飞, 贺大伟, 国明明

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 考察了不同 pH 值(4.0、7.0、9.0)条件下采用不同截留相对分子质量(MWCO)的 8 000 复合膜(醋酸纤维+聚砜)和 5 000 PES(聚醚砜)的超滤膜对大豆肽处理前后对小鼠体外免疫功能的影响。通过体外培养白细胞实验,比较了大豆肽超滤处理前后对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能和脾细胞增殖能力的影响。结果表明,所有大豆肽均能提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力,促进小鼠脾淋巴细胞增殖,而经过超滤处理后的大豆肽免疫功能有所提高,且以 pH4.0 条件下 MWCO 为 5 000 超滤膜处理后所得的大豆肽活性最强。

关键词: 大豆肽;超滤;膜分离;吞噬指数;刺激指数;免疫功能

中图分类号: Q 514.3

文献标识码: A

Effects of Soybean Peptide Treated by Fore-and-Aft Ultrafiltration on Immune Functions of Mice in vitro

HUANG Wen-kai, HUA Yu-fei, HE Da-wei, GUO Ming-ming

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this paper, the effects of soybean peptide treated by fore-and-aft ultrafiltration with MWCO 8 000 complex membrane and 5 000 PES membrane under different pH(4.0, 7.0, 9.0) on immune functions of mice in vitro were investigated. Neutral red and MTT were used to determined the effects of different peptides on phagocytosis of mouse peritoneal macrophage and proliferation of mouse splenic lymphocytes. All of the peptides improved quadratically the phagocytic index of macrophage and the stimulation index of splenic lymphocytes significantly and after treated by ultrafiltration, peptides' immune function were higher than that of before. The results indicated that, all of the peptides could enhance immune function in mice; ultrafiltration treatment on peptide can improve the immune function of peptide effectively and the peptide which was treated by MWCO 5 000 under pH4.0 has the highest activity.

Key words: soybean peptide; ultrafiltration; membrane filtration; phagocytic index; stimulation index; immune function

大豆肽具有特殊的生理功能,已引起食品和保健食品生产厂家以及制药公司的广泛关注。膜分

离方法用于蛋白及肽的分离在近年来取得了很大进展,Paule 等(2004)采用纳滤膜处理 β -乳球蛋白

收稿日期:2006-09-04.

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA501A02B).

作者简介:黄文凯(1984-),男,湖北洪湖人,粮食、油脂及植物蛋白硕士研究生.

通讯作者:华欲飞(1962-),男,江苏无锡人,教授,博导,主要从事粮食、油脂及植物蛋白领域研究.

Email: wfhua@jiangnan.edu.cn

的胰蛋白酶水解产物来除去其中的肽聚集体,使需要的肽得到富集^[1],Jianping Wu(2002)使用超滤膜制备对 ACE 具有抑制性的活性大豆肽^[2],卢蓉蓉等(2002)采用超滤法预分离初乳中的乳铁蛋白^[3]。阶段实验研究已知^[4],膜分离操作在免疫活性大豆肽研究开发过程中具有应用价值,它不仅能按分子量对水解大豆蛋白进行分级,而且还能富集带正电荷的具有功能活性的碱性肽组分。因此,本文在前期研究基础上,采用超滤膜处理大豆肽,考察其超滤处理前后对小鼠体外免疫功能的影响,为膜分离方法在生理活性大豆肽上的应用研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

膜分离装置及超滤膜:MWCO 为 8 000 复合膜(醋酸纤维+聚砜)和 5 000 PES 膜(聚醚砜)购自赛普膜科技发展有限公司;脱脂豆粉(山东谷神蛋白有限公司提供);Alcalase 2.4L 由诺和诺德公司提供;RPMI-1640(Gibco)、胎牛血清、中性红(NR)、PBS 液(按常规配制)、细胞裂解液(乙醇和乙酸按 1:1 体积混合)、ConA(Sigma)、噻唑蓝(MTT)(Amresco)、酸性异丙醇等。

1.2 大豆肽的制备

低温脱脂豆粉经酸洗后离心除去上清液得酸洗大豆蛋白,添加 2.4L Alcalase 蛋白酶(E/S=2.5%),在 pH 值 8.0,1:10(W/V),温度 55℃条件下水解,当水解度达到 20%时,调 pH 至 4.0(使用 1.0 mol/L HCL)灭酶,终止水解反应,将水解液在 2 000 r/min 下离心 15 min 得粗肽液。将粗肽液经硅藻土过滤后喷雾干燥得到大豆肽粉末。

1.3 大豆肽超滤处理

称取 12 g 大豆肽粉末,溶于 300 mL 蒸馏水中,将溶液调 pH 值 4.0、7.0、9.0(使用 1.0 N NaOH)条件下进行超滤实验(超滤压力为 0.6 MPa),将所得到的滤液进行冷冻干燥得到超滤处理后大豆肽粉末。

1.4 大豆肽相对分子质量分布及带正电荷组分含量测定 见参考文献[4]。

1.5 腹腔巨噬细胞吞噬试验——吞噬中性红试验

按常规制备细胞浓度约 2×10^6 个/mL 的小鼠腹腔巨噬细胞悬液。96 孔细胞培养板中加细胞悬液 100 μ L/孔,对照组加不完全 PRMI1640 培养液 50 μ L/孔,实验组加质量浓度为 0.4 mg/mL 的不同大豆肽液 50 μ L/孔,且每个处理设 3 个重复,混匀后置 37℃、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培

养 24 h,加 0.107 2%中性红 100 μ L/孔并继续培养 30 min,PBS 液洗板 3 次,加细胞裂解液 200 μ L/孔,置 4℃冰箱过夜,酶标仪测 540 nm 的 OD 值。结果以吞噬指数(phagocytic index,PI)表示:PI=实验孔 OD₅₄₀值/对照孔 OD₅₄₀均值^[5]。

1.6 脾淋巴细胞增殖实验——MTT 法

按常规制备细胞浓度约 2×10^6 个/mL 的小鼠脾细胞悬液。96 孔细胞培养板中加细胞悬液 100 μ L/孔,对照组加不完全 PRMI1640 培养液 90 μ L/孔,实验组加质量浓度为 0.4 mg/mL 的不同大豆肽液 80 μ L/孔,再在实验组的无有丝分裂原诱导组和 ConA 诱导组分别加不完全 PRMI1640 培养液 10 μ L/孔、ConA 液 10 μ L/孔,且每个处理设 3 个重复,混匀后置 37℃、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 68 h,轻轻吸弃上清液 100 μ L/孔,加 MTT 液 10 μ L/孔并继续培养 4 h,然后加酸性异丙醇 100 μ L/孔并充分振荡 2 min,静置 20 min 后用酶标仪测 570 nm 的 OD 值。结果以刺激指数(stimulation index,SI)表示:SI=实验孔 OD₅₇₀值/对照孔 OD₅₇₀均值^[5]。

1.7 数据处理

用 SPSS 软件(10.0 版)进行邓肯氏方差分析。结果以($\bar{X} \pm s$)表示。

2 结果与讨论

2.1 大豆肽超滤前后相对分子质量分布及正电荷肽含量

由大豆肽 SEC-HPLC 图谱分析得到大豆肽超滤前后的各相对分子质量区段所占面积比例如图 1 所示。根据标准分子量计算得各大豆肽平均相对分子质量见表 1。表 1 同时还包括大豆肽超滤前后正电荷肽含量。

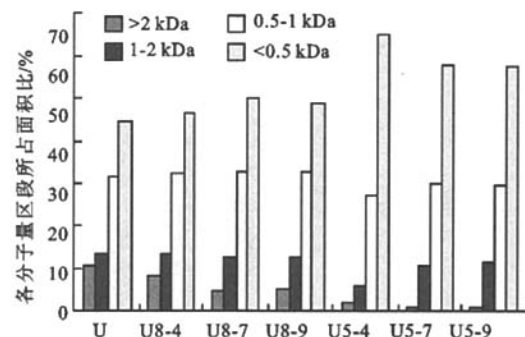


图1 不同大豆肽相对分子质量分布

Fig. 1 Molecular weight distribution of different soybean peptide

从图 1 可见,经过超滤处理后,相对分子质量 $>2\,000$ 的组分含量经过膜分离后都有明显的降低;而相对分子质量 $<1\,000$ 的组分含量则有不同程度的升高,与前期实验结果相符^[4]。由表 1 可看出,大豆肽超滤后平均相对分子质量有所降低,碱性肽含量则提高,前期实验结果表明,截流相对分子质量与被分离物的平均相对分子质量接近时,膜的电荷选择性更强,在本次研究中也得到了证实。而本次实验出现一个比较奇怪的现象就是 MWCO5000 超滤膜处理后的大豆肽,其正电荷肽含量在 pH4.0 时最大,而并非随 pH 值上升到中性

时上升,这说明除超滤膜 MWCO 外,超滤膜材料对大豆肽的超滤处理也有较大影响。

2.2 大豆肽对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响

由表 2 可以看出,与对照组相比,不同的大豆肽均能提高小鼠腹腔巨噬细胞的 PI,各种大豆肽的 PI 均极显著($P<0.01$)高于对照组。比较超滤处理前后大豆肽的 PI 发现,PI 大小顺序为: $U_{5-4}>U_{8-9}>U_{5-9}>U_{5-7}>U_{8-7}>U_{8-4}>U>$ 对照,其中, U_{5-4} 的 PI 显著($P<0.05$)高于其它的 PI,而 U_{8-9} 、 U_{5-9} 、 U_{5-7} 、 U_{8-7} 四者间的 PI 差异并不大,但均显著($P<0.05$)高于 U_{8-4} 的 PI; U_{8-4} 的 PI 显著($P<0.05$)高于 U。

表 1 大豆肽超滤前后平均相对分子质量及碱性肽含量

	超滤前 U	MWCO 8 000 超滤膜处理后			MWCO 5 000 超滤膜处理后		
		U_{8-4}	U_{8-7}	U_{8-9}	U_{5-4}	U_{5-7}	U_{5-9}
平均相对分子质量	757.65	633.44	490.19	498.80	333.02	389.27	395.64
正电荷肽含量(%)	31.00	36.51	43.91	45.11	50.58	44.89	46.03

注:U 为超滤前大豆肽; U_{x-y} 为在 MWCO 为 x kDa, pH 为 y 的条件下超滤所得大豆肽。

表 2 不同大豆肽对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力(PI)的影响($n=3,\bar{X}\pm s$)

对照组	超滤处理前 U	MWCO 8 000 超滤膜处理后			MWCO 5 000 超滤膜处理后		
		U_{8-4}	U_{8-7}	U_{8-9}	U_{5-4}	U_{5-7}	U_{5-9}
1.00 ^{Aa} ± 0.02	1.07 ^{Bb} ± 0.02	1.13 ^{Bc} ± 0.06	1.20 ^{Cd} ± 0.04	1.22 ^{Cd} ± 0.03	1.29 ^{De} ± 0.03	1.21 ^{Cd} ± 0.03	1.22 ^{Cd} ± 0.02

注:U 为超滤前大豆肽; U_{x-y} 为在 MWCO 为 x kDa, pH 为 y 的条件下超滤所得大豆肽。

同行数据肩注不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

本实验发现,大豆肽能提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬异物(中性红)的能力,这与大豆蛋白酶解产物中一些多肽具有提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬人红细胞的能力的报道相一致^[6]。Hee-Guk Byun 等人的研究表明,肽中正电荷肽有着较强的功能性^[7],而对比表 1 和表 2 可以看出,大豆肽的正电荷肽含量越高,其提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬异物的能力更强。结果表明,超滤膜处理对大豆肽的提高机体吞噬细胞的吞噬能力有显著促进的作用。其中,在 pH4.0 条件下采用 MWCO5 000 超滤膜处理后的大豆肽促进巨噬细胞吞噬异物的能力最强。

2.3 大豆肽对小鼠脾细胞增殖能力的影响

由表 3 可以看出,与对照组相比,不同的大豆肽均能极显著($P<0.01$)的促进小鼠脾细胞增殖的功能。比较在无有丝分裂源刺激下,超滤处理前后的大豆肽的 SI 发现,SI 大小顺序均为: $U_{5-4}>U_{5-9}>U_{8-9}>U_{8-7}>U_{5-7}>U_{8-4}>U>$ 对照。其中, U_{5-4} 的 SI 极显著($P<0.01$)高于其它的 SI,而 U_{5-9} 、 U_{8-9} 、 U_{8-7} 、 U_{5-7} 四者间的 SI 差异很小,但均显著($P<0.05$)高于 U_{8-4} 的 SI; U_{8-4} 的 SI 极显著($P<0.01$)高于 U。在 ConA 刺激下,大豆肽 SI 的变化与无刺激条件下基本相同,只是差异较之无刺激条件下要小一些。

表 3 不同大豆肽对小鼠脾淋巴细胞增殖能力(SI)的影响($n=3,\bar{X}\pm s$)

处理	对照组	超滤处理前 U	MWCO 8 000 超滤膜处理后			MWCO 5 000 超滤膜处理后		
			U_{8-4}	U_{8-7}	U_{8-9}	U_{5-4}	U_{5-7}	U_{5-9}
无	1.00 ^{Aa} ± 0.02	1.06 ^{Bb} ± 0.03	1.12 ^{Bbc} ± 0.02	1.18 ^{Dcd} ± 0.04	1.19 ^{Dcd} ± 0.01	1.31 ^{Ee} ± 0.02	1.17 ^{Cd} ± 0.04	1.20 ^{Dd} ± 0.02
ConA	1.00 ^{Aa} ± 0.02	1.07 ^{Bb} ± 0.02	1.12 ^{Bcb} ± 0.03	1.14 ^{CDe} ± 0.02	1.15 ^{Dcd} ± 0.03	1.23 ^{Dd} ± 0.05	1.15 ^{Cd} ± 0.05	1.16 ^{Dd} ± 0.04

注:U 为超滤前大豆肽; U_{x-y} 为在 MWCO 为 x kDa, pH 为 y 的条件下超滤所得大豆肽。

同行数据肩注不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

本实验发现,无论有无有丝分裂原的刺激,大豆肽超滤处理前后都有促进小鼠脾淋巴细胞增殖的作用,对比表1和表3可看出,正电荷肽含量高的大豆肽其促进脾淋巴细胞增殖的效果更好,这与大豆蛋白和乳清蛋白酶解物中带正电荷组分具有免疫调节作用的结论相吻合^[8-9]。Jinshui Wang等(2006)对小麦麸质进行水解和超滤提高了原物质的功能性质^[10],本实验也表明超滤膜分离对肽的生理功能有增强的作用。有丝分裂原 ConA 能分别激活 B、T 细胞,促进 B、T 细胞增殖^[11]。本实验发现,大豆肽超滤处理前后均能与 ConA 协同并分别促进 B、T 细胞增殖,但协同促进 B、T 细胞增殖能力的大小有差异。表明大豆肽不仅本身具有有丝分裂原活性,而且还能与有丝分裂原 ConA 协同促进淋巴细胞增殖,从而提高机体免疫力的能力,这种能力在经过超滤膜处理后得到有效提高。其中,在 pH4.0 条件下采用 MWCO 5 000 超滤膜处理后的大豆肽促进小鼠淋巴细胞增殖能力最强。

2.4 大豆肽超滤膜处理后活性增强机理探讨

由于碱性肽(带正电荷)的生理活性较之酸性肽(带负电荷)要强,本研究旨在通过超滤膜富集带正电荷的肽。本研究所采用的超滤膜为截留分子

量(MWCO) 8 000 复合膜(醋酸纤维+聚砜)和 5 000 PES(聚醚砜)的超滤膜,它们均为表面带有电荷的超滤膜。由于大豆肽自身带有一定电荷,在超滤处理过程中,会与超滤膜发生作用,碱性肽(带正电荷)组分透过速率要比酸性肽(带负电荷)及中性肽组分透过速率快,从而使滤液中的碱性肽组分得到一定程度的富集,使其活性得到增强;而又由于复合膜和 PES 膜两者膜表面所带电荷不同,表现在前者超滤透过液中碱性肽含量随 pH 值升高而上升,而后者超滤透过液中碱性肽含量随 pH 值升高而下降。

3 结 语

本研究发现,大豆肽本身具有免疫增强作用,而经过一定条件的超滤膜处理后,大豆肽的免疫增强作用得到了显著提高。由此可见,采用超滤膜对大豆肽进行处理,能有效提高大豆肽中的免疫活性成分的含量,不同条件下(膜截留相对分子质量、材料及 pH 值)超滤处理后所得到的大豆肽其免疫增强作用也不同,而其中机理还有待研究。总的来说,本研究为免疫活性大豆肽的制备研究提供了一条新的探索途径。

参考文献(References):

- [1] Paule E G, Jean-F L, Sylvie F G, et al. Effect of aggregating peptides on the fractionation of β -LG tryptic hydrolysate by nanofiltration membrane[J]. *Journal of Membrane Science*, 2004, 234: 121-129.
- [2] WU Jian-ping, DING Xiao-lin. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides[J]. *Food Research International*, 2002, 35: 367-375.
- [3] 卢蓉蓉,许时婴,王璋,等. 预分离初乳中乳铁蛋白的超滤工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2002, 21(1): 67-70.
LU Rong-rong, XU Shi-ying, WANG Zhang, et al. Preliminary Isolation of Lactoferrin from Colostrum by Ultrafiltration [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2002, 21(1): 67-70. (in Chinese)
- [4] 华欲飞,国明明,黄文凯,等. 水解大豆蛋白膜法分级特性的研究[J]. 中国油脂, 2005, 12: 33-36.
HUA Yu-fei, GUO Ming-ming, HUANG Wen-kai, et al. Membrane fractionation characteristics of soy protein hydrolysates[J]. *China Oils and Fats*, 2005, 12: 33-36. (in Chinese)
- [5] 毛跟年. 功能食品生理特性与检测技术[M]. 化学工业出版社, 2005, 390-391.
- [6] Tsuruki T, Kishi K, Takahashi M, et al. Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean β -conglycinin, is an fMLP agonist[J]. *FEBS Letters*, 2003, 540: 206-210.
- [7] Hee-Guk Byun, Se-Kwon Kim. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin[J]. *Process Biochemistry*, 2001, 36: 1155-1162.
- [8] Yasuyuki T, Yoshikawa M. Introduction of enterostatin (VPDPR) and a related sequence into soybean proglycinin AlaB1b subunit by site directed mutagenesis[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64: 2731-2733.
- [9] Mercier A, Gauthier S F, Fliss I. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests[J]. *International Dairy J*, 2004, 14: 175-183.
- [10] WANG Jin-shui, ZHAO Mou-ming, YANG Xiao-quan, et al. Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration[J]. *Journal of Cereal Science*, 2006, 44: 93-100.
- [11] Otani H, I Hata. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk casein and their digests[J]. *Journal of Dairy Research*, 1995, 62: 339-438.

(责任编辑:杨 萌)