

亚麻籽蛋白酶解肽的降胆固醇作用研究

侯一峰, 李雪馨, 包小兰

(内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018)

摘要:旨在为亚麻籽蛋白的深加工利用提供参考,以低温压榨亚麻籽饼为原料,采用碱溶酸沉法制备亚麻籽蛋白,再采用酶解法制备亚麻籽蛋白酶解肽。采用超滤分离降胆固醇活性最高的亚麻籽蛋白酶解肽,并以其为原料进行动物实验探究其降胆固醇作用。结果表明:在酶解时间为4 h时,亚麻籽蛋白酶解肽的胆固醇胶束溶解度抑制率最高,为47.57%;分子质量不大于3 kDa的超滤组分的胆固醇胶束溶解度抑制率最高,为70.96%;与高胆固醇饮食组相比,亚麻籽蛋白酶解肽不大于3 kDa的超滤组分能够增加小鼠的摄食量和体质量,降低血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,提高血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平,降低肝脏指数和肝脏中TC、TG水平,改善肝脏脂肪变性程度,增加粪便总胆汁酸(TBA)的排泄量,并且可以通过降低丙二醛(MDA)水平,提高超氧化物歧化酶(SOD)活力来减轻高胆固醇饮食导致的氧化应激反应。综上,亚麻籽蛋白酶解肽不大于3 kDa的超滤组分具有一定的降胆固醇作用,有望成为新型的降胆固醇功能性成分。

关键词:亚麻籽蛋白;酶解肽;小鼠;降胆固醇作用

中图分类号:TS229;TS201.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)09-0028-08

Cholesterol – lowering effect of flaxseed protein hydrolysate peptides

HOU Yifeng, LI Xuexin, BAO Xiaolan

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: To provide a reference for the deep processing and utilization of flaxseed protein, the flaxseed protein was prepared by alkali – soluble and acid – precipitation method from low – temperature pressed flaxseed cake, and then the flaxseed peptides were prepared by enzymatic hydrolysis. Ultrafiltration membranes were used to isolate flaxseed peptides with the highest cholesterol – lowering activity *in vitro*, and animal experiments were conducted to explore its cholesterol – lowering effects. The results showed that when the enzymatic hydrolysis time was 4 h, the cholesterol micelle solubility inhibition rate of flaxseed peptide was the highest (47.57%), and the cholesterol micelle solubility inhibition rate of the ultrafiltration fraction with a molecular weight of no more than 3 kDa was the highest (70.96%). Compared with the high – cholesterol diet group, the ultrafiltration fraction (≤ 3 kDa) could increase the food intake and body weight of mice, reduce the serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low – density lipoprotein cholesterol (LDL – C) levels, increase the serum high – density lipoprotein cholesterol (HDL – C) level, reduce liver index and TC and TG levels in the liver, improve the degree of hepatic steatosis, increase fecal total bile acid (TBA) excretion, and reduce the oxidative stress caused by high – cholesterol diet by reducing malondialdehyde (MDA) level and increasing superoxide dismutase (SOD) activity. In conclusion, the ultrafiltration

fraction (≤ 3 kDa) of flaxseed peptides has a certain cholesterol – lowering effect, and is expected to become a new cholesterol – lowering functional component.

Key words: flaxseed protein; enzymatic peptides; mice; cholesterol – lowering effect

收稿日期:2023-05-20;修回日期:2024-04-15

基金项目:内蒙古自治区科技计划项目(2020GG0064);国家自然科学基金地区科学基金(31860423)

作者简介:侯一峰(1998),女,硕士研究生,研究方向为粮油及植物蛋白工程(E-mail)hyf1543304266@163.com。

通信作者:包小兰,教授,博士(E-mail)xl06@163.com。

高胆固醇饮食会导致心血管疾病(CVD)等相关疾病的发生和发展,而CVD是人类死亡的主要原因之一^[1]。目前,他汀类药物是降低血清胆固醇的首选药物,但他汀类药物可能会引起疲劳、肝功能紊乱、胃肠道疾病等不良症状^[2],因此近年来专家们致力于在药物治疗的基础上,从天然产物中获取降胆固醇活性因子,以达到降低胆固醇的目的。目前,酶解植物蛋白所获得多肽的降胆固醇活性被广泛研究,如大豆多肽已被证明可以抑制Caco-2细胞对胆固醇的吸收^[3],大麻籽多肽可降低高脂饮食喂养大鼠的胆固醇水平^[4],苦荞活性肽不仅有效改善HepG2细胞内胆固醇异常,而且可抑制脂质聚集^[5]。

亚麻籽是一种重要的油料作物,我国亚麻籽种植主要分布在华北和西北地区,年产量在40万t左右^[6]。内蒙古自治区属于纬度高、温差大的高寒地区,所种植的亚麻籽不仅产量高、油脂含量高,还含有丰富的蛋白质。亚麻籽蛋白含有所有的人体必需氨基酸,易被人体消化吸收,是一种优质的植物蛋白资源。然而目前内蒙古自治区的亚麻籽主要用于榨油,榨油后的亚麻籽饼大多被加工成动物饲料,其含有的蛋白质并未被充分利用,造成了大量优质植物蛋白资源的浪费。近年来“植物蛋白基食品”发展热潮不断兴起,植物蛋白资源的高效利用成为全球食品行业关注的焦点^[7]。因此,将区域特色优质植物蛋白资源亚麻籽蛋白进行深加工利用势在必行。

近年来学者们对亚麻籽蛋白酶解肽的生理活性进行了大量研究,发现其具有抗氧化、降血糖、降血压等生理活性^[8-10],而亚麻籽蛋白酶解肽在降胆固醇方面的研究还鲜有报道。本研究以低温压榨亚麻籽饼为原料,采用碱溶酸沉法制备亚麻籽蛋白,再对亚麻籽蛋白进行酶解,分析其酶解产物亚麻籽蛋白酶解肽及其超滤分离组分的体外降胆固醇活性,并进一步选择活性较高的超滤组分进行动物实验以探究其在机体内的降胆固醇作用,以期为亚麻籽蛋白的深加工利用提供一定的基础理论依据,并为探究内蒙古特色植物蛋白资源的营养品质和生理功能提供科学依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

低温压榨亚麻籽饼(残油4.30%,粗蛋白质含量40%左右),内蒙古丰吉妙农业产品科技开发有限公司;Protease M(51.50 AU/g),日本天野酶制剂株式会社;正己烷、氢氧化钠、盐酸等,国药集团化学试剂有

限公司;牛磺胆酸钠、胆固醇,美国Sigma公司。

40只6周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠[体质量为18~22g,许可证号为SCXK(京)2019-0010],斯贝福(北京)生物技术有限公司;普通饲料和高胆固醇饲料(组成成分见表1),江苏省协同医药生物工程有限责任公司;总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、总胆汁酸(TBA)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,南京建成生物技术有限公司。

表1 饲料组成成分 %

成分	普通饲料	高胆固醇饲料
酪蛋白	18.96	22.29
L-胱氨酸	0.28	0.33
玉米淀粉	36.61	23.63
麦芽糖糊精	11.85	7.91
蔗糖	18.96	13.86
纤维素	4.74	5.57
大豆油	2.37	2.79
猪油	1.90	17.27
混合矿物质	0.47	0.56
磷酸氢钙	1.23	1.45
碳酸钙	0.52	0.61
柠檬酸钾	1.56	1.84
氯化钠	0.25	0.29
混合维生素	0.10	0.11
酒石酸氢胆碱	0.19	0.22
胆固醇	0	1.25

1.1.2 仪器与设备

UPW-N15UV型纯水机,上海仪电科学仪器股份有限公司;HJ-6电热恒温水浴锅,上海福玛实验设备有限公司;PHSJ-4A酸度计,上海雷磁仪电科学仪器股份有限公司;HJ-1磁力搅拌器,江苏金坛荣华仪器有限公司;TDL-5-A离心机,上海安亭科学仪器厂;FDU-2200真空浓缩冷冻干燥机,东京理化器械株式会社;GT15E高速离心机,日立建机株式会社;Millipore 8200超滤杯,美国Millipore公司;日立L-8900氨基酸自动分析仪,日立公司;Nikon Eclipse E100正置光学显微镜,日本尼康公司;Chemray 800全自动生化分析仪,深圳雷杜生命科技;UV-2300紫外分光光度计,北京中西远大科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 亚麻籽蛋白的制备

根据郑睿^[11]的方法并稍作修改制备亚麻籽蛋白。将低温压榨亚麻籽饼粉碎、脱脂、干燥处理后准

准确称取 20 g, 按料液比 1:35 加入蒸馏水混合均匀, 调 pH 至 8.5 后于 50 °C 下恒温水浴 2 h, 离心(4 500 r/min, 15 min)取上清液, 调 pH 至 4.0, 静置 1 h, 离心(4 500 r/min, 15 min)取沉淀物, 用蒸馏水洗涤沉淀物 2 次后, 加水溶解沉淀, 调 pH 至 7.0, 冷冻干燥即得亚麻籽蛋白。

1.2.2 亚麻籽蛋白酶解肽的制备

参照刘晓静^[12]的方法制备亚麻籽蛋白酶解肽。准确称取一定量亚麻籽蛋白于烧杯中, 按料液比 1:50 加入蒸馏水混合均匀, 调 pH 至 3.0, 加入亚麻籽蛋白质量 1% 的 Protease M, 在 50 °C 恒温水浴条件下酶解一定时间。酶解结束后于 95 °C 灭酶 15 min, 冷却至室温后离心(4 500 r/min, 20 min), 取上清液调 pH 至 7.0, 得到亚麻籽蛋白酶解液, 冷冻干燥后得亚麻籽蛋白酶解肽。

1.2.3 具有降胆固醇作用的亚麻籽蛋白酶解肽的超滤分离

取 1.2.2 中的亚麻籽蛋白酶解液, 分别采用截留分子质量为 10、5、3 kDa 的超滤膜过滤, 收集超滤组分, 经截留分子质量为 500 Da 的透析袋除盐后, 冷冻干燥得到超滤组分, 测定不同超滤组分的胆固醇胶束溶解度抑制率。

1.2.4 胆固醇胶束溶解度抑制率的测定

参照廖坤梅等^[13]的方法测定样品的胆固醇胶束溶解度抑制率。取 8 mL 不同浓度梯度的胆固醇标准溶液, 加入 4 mL 铁矾显色剂, 振荡均匀并静置 30 min 后, 使用紫外分光光度计在 560 nm 波长处测定吸光度, 以吸光度(x)为横坐标, 胆固醇浓度(y)为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线回归方程 $y = 7.362x - 0.191$, $R^2 = 0.9976$ 。

称取 25 mg 样品于 5 mL 的胶束溶液(15 mmol/L pH 为 7.4 的磷酸钠缓冲液, 包含 10 mmol/L 牛磺胆酸钠、1 mmol/L 油酸、132 mmol/L NaCl 和 0.4 mmol/L 胆固醇)中, 使用均质机乳化 20 min, 在 37 °C 恒温培养箱中温育 24 h 后, 以 10 000 r/min 离心 60 min, 取上清液, 采用紫外分光光度计在 560 nm 波长处测定吸光度, 再根据标准曲线方程计算胆固醇浓度, 同时以不加样品为空白组, 按下式计算样品的胆固醇胶束溶解度抑制率(R)。

$$R = \frac{S_0 - S_1}{S_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: S_0 为空白组的胆固醇浓度, mmol/L; S_1 为样品组的胆固醇浓度, mmol/L。

1.2.5 氨基酸组成分析

称取 0.5 g 样品于水解管中, 加入 10 mL 6 mol/L 的 HCl 溶液, 于真空状态下迅速封管, 110 °C 下水解 24 h, 冷却后转移至 25 mL 容量瓶中, 加水定容。将定容的水解液用滤纸过滤后取 5 mL 进行真空干燥, 再溶于 2 mL pH 为 2.2 的柠檬酸钠缓冲液中, 振荡混匀后用 0.22 μ m 滤膜过滤, 转移至进样瓶中, 采用氨基酸自动分析仪分析氨基酸组成。

1.2.6 动物实验设计

小鼠饲养条件: 环境温度(22 \pm 2)°C, 相对湿度 60%, 12 h 光/暗循环。实验开始前, 先适应性喂养 1 周, 单笼、普通饲料饲养, 可自由进食和饮水, 要求笼内保持清洁干燥, 保证动物房以及周围环境的安静, 遵守实验动物伦理道德标准。

40 只 6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周后, 被随机分为 4 组, 即对照组(NC)、高胆固醇饮食组(HC)、亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分高剂量组(FPs-H)、亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分低剂量组(FPs-L), 每组 10 只。NC 组饲喂普通饲料, 同时灌胃生理盐水; HC 组饲喂高胆固醇饲料, 同时灌胃生理盐水; FPs-H 组饲喂高胆固醇饲料, 同时灌胃 200 mg/kg 亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分溶液; FPs-L 组饲喂高胆固醇饲料, 同时灌胃 50 mg/kg 亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分溶液。4 组灌胃剂量均为 0.1 mL/(kg·d)。实验共持续 6 周, 实验过程中每周记录一次小鼠摄食量, 于第 42 天收集每组小鼠粪便, 同时记录实验初始和第 42 天小鼠体质量。

1.2.7 小鼠相关指标测定

1.2.7.1 血清指标的测定

动物实验期结束后, 禁食 12 h, 从小鼠眼球取出全血, 将采集的小鼠血液样品在室温下静置 30 min 后离心(3 000 r/min, 10 min)以分离血清和血浆, 分析前在 -80 °C 冰箱中储存。使用全自动生化分析仪对采集的小鼠血清样品中 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 进行测定。

1.2.7.2 肝脏组织病理学观察

将取全血的小鼠颈椎脱臼处死, 解剖取出小鼠肝脏, 用磷酸缓冲盐溶液冲洗干净后用滤纸吸干其表面水分, 观察其形态, 称质量。取小鼠部分肝脏组织, 在 4 g/100 mL 的多聚甲醛组织固定液中固定 24 h 后, 进行脱水、石蜡包埋切片、苏木精和伊红(HE)染色处理, 再在 400 倍光学显微镜下观察肝脏组织形态学变化。

1.2.7.3 肝脏指数的测定

按照文献[14]的方法计算肝脏指数(肝脏指数为小鼠肝脏质量与其体质量的比值)。

1.2.7.4 肝脏 TC、TG、MDA、SOD 的测定

取小鼠肝脏样品,按料液比 1:9 加入生理盐水,冰水浴匀浆破碎,以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明书测定肝脏中 TC、TG、MDA、SOD 水平,其中 MDA、SOD 水平以每毫克蛋白质计。

1.2.7.5 粪便 TBA 的测定

取小鼠粪便,按料液比 1:9 加入生理盐水,冰水浴匀浆破碎,以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明书测定粪便中 TBA 水平。

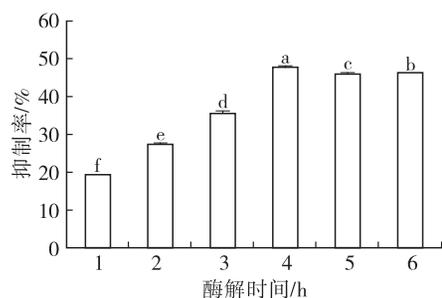
1.2.8 数据处理

实验数据均以“平均值 ± 标准差”表示。多组间比较采用单因素方差分析, $p < 0.05$ 为显著性检验标准。

2 结果与分析

2.1 亚麻籽蛋白酶解时间的确定

按 1.2.2 的方法,在亚麻籽蛋白分别酶解 1、2、3、4、5、6 h 时,测定亚麻籽蛋白酶解肽的胆固醇胶束溶解度抑制率,结果如图 1 所示。



注:不同字母表示具有显著性差异($p < 0.05$)。下同

图 1 不同酶解时间下亚麻籽蛋白酶解肽的胆固醇胶束溶解度抑制率

由图 1 可知,随着酶解时间的延长,亚麻籽蛋白酶解肽的胆固醇胶束溶解度抑制率先上升后下降,在酶解时间为 4 h 时,亚麻籽蛋白酶解肽的胆固醇胶束溶解度抑制率最高,为 47.57%。因此,选择酶解时间为 4 h。

2.2 具有降胆固醇作用的亚麻籽蛋白酶解肽的超滤分离

按 1.2.3 方法采用超滤技术将酶解 4 h 的亚麻籽蛋白酶解肽分为 4 个组分,测定各组分的得率和胆固醇胶束溶解度抑制率,结果如表 2 所示。

由表 2 可见,分子质量不大于 3 kDa 的超滤组分 D 的得率最高,为 36.28%,并且其胆固醇胶束溶

解度抑制率也最高,为 70.96%。

表 2 不同亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分的得率和胆固醇胶束溶解度抑制率

组分	分子质量/kDa	得率/%	胆固醇胶束溶解度抑制率/%
A	≥10	22.09 ± 0.72 ^c	51.37 ± 1.52 ^b
B	[5 ~ 10)	9.41 ± 0.64 ^d	36.53 ± 1.80 ^d
C	(3 ~ 5)	28.93 ± 0.58 ^b	42.28 ± 2.22 ^c
D	≤3	36.28 ± 0.47 ^a	70.96 ± 1.30 ^a

注:同列不同字母表示具有显著性差异($p < 0.05$)。下同

2.3 亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分的氨基酸组成

不同亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分的氨基酸组成如表 3 所示。

表 3 不同亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分的氨基酸组成

氨基酸	组分的氨基酸组成 g/100 g			
	组分 A	组分 B	组分 C	组分 D
疏水性氨基酸(非极性氨基酸)				
丙氨酸(Ala)	2.92	5.63	2.67	6.09
缬氨酸(Val)	3.18	3.89	1.90	4.67
蛋氨酸(Met)	0.90	2.05	3.09	1.72
异亮氨酸(Ile)	2.69	1.38	2.38	4.64
亮氨酸(Leu)	3.39	2.21	1.29	4.15
苯丙氨酸(Phe)	3.22	3.90	4.96	4.23
脯氨酸(Pro)	2.21	4.79	2.79	3.45
合计	18.51	23.85	19.08	28.95
极性非带电氨基酸				
苏氨酸(Thr)	6.14	4.59	7.52	3.23
丝氨酸(Ser)	9.03	6.62	8.50	2.80
甘氨酸(Gly)	3.35	2.90	3.73	4.45
酪氨酸(Tyr)	5.52	3.81	1.86	3.41
半胱氨酸(Cys)	6.28	1.31	1.28	3.03
合计	30.31	19.23	22.89	16.93
极性带负电(酸性)氨基酸				
天冬氨酸(Asp)	6.89	8.54	8.35	8.28
谷氨酸(Glu)	13.63	15.59	15.02	15.07
合计	20.52	24.14	23.37	23.35
极性带正电(碱性)氨基酸				
赖氨酸(Lys)	3.96	5.24	4.27	2.77
精氨酸(Arg)	7.29	8.86	8.95	11.52
组氨酸(His)	6.34	5.65	4.64	2.57
合计	17.59	19.75	17.86	16.86
合计	86.93	86.97	83.20	86.09

由表 3 可知,超滤组分 D 的疏水性氨基酸含量最高,为 28.95%。此外,4 个超滤组分的赖氨酸/精氨酸比值分别为 0.54、0.59、0.48、0.24,其中超滤组分 D 的赖氨酸/精氨酸比值明显低于其他超滤组

分。研究表明,肽的降胆固醇活性与其疏水性氨基酸的含量^[15-16]和赖氨酸/精氨酸比值^[17]密切相关,在赖氨酸/精氨酸比值较低,且疏水性氨基酸含量较高时,降胆固醇效果显著^[18]。因此,选择超滤组分D进行后续的实验。

2.4 亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠各项指标的影响

2.4.1 对小鼠摄食量和体质量的影响

亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠摄食量和体质量的影响如表4所示。

表4 亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠摄食量和体质量的影响

组别	初始体质量/g	最终体质量/g	摄食量/(g/d)
NC	21.53 ± 0.47 ^a	24.25 ± 0.85 ^a	4.12 ± 0.41 ^a
HC	21.84 ± 0.85 ^a	22.12 ± 0.47 ^c	3.18 ± 0.38 ^c
FPs-H	22.03 ± 0.82 ^a	23.10 ± 0.76 ^b	3.68 ± 0.21 ^b
FPs-L	21.88 ± 0.60 ^a	22.82 ± 0.37 ^{bc}	3.57 ± 0.27 ^b

注:摄食量为实验期间的平均值

由表4可知,4组小鼠初始体质量基本一致,无显著性差异($p > 0.05$)。HC组小鼠的摄食量显著低于NC组($p < 0.05$),并且其最终体质量也显著低于NC组($p < 0.05$)。高兴州^[19]建立的高胆固醇血症大鼠模型实验结果显示,模型组大鼠的体质量较正常组显著降低($p < 0.05$),与本研究结果类似。这可能是由于高胆固醇饮食导致小鼠摄食量下降所致。本研究发现,在动物实验过程中,HC组小鼠出现了掉毛、活动量减少、精神萎靡不振等现象。与HC组相比,FPs-H组小鼠摄食量和体质量显著增加($p < 0.05$),FPs-L组小鼠的体质量与HC组没有显著性差异($p > 0.05$),但呈一定的增长趋势。通过每日观察发现,与HC组相比,FPs-H组和FPs-L组小鼠更好动,精神状态更好,毛发更有光泽。Lapphanichayakool等^[20]研究显示,实验开始前各组间小鼠体质量无显著差异($p > 0.05$),4周实验期结束后,高胆固醇饮食组和来源于蚕茧的丝胶肽高、中、低剂量组小鼠的体质量显著低于正常组,而丝胶肽高、中、低剂量组小鼠体质量较高胆固醇饮食组显著增加($p < 0.05$),与本研究结果类似。

2.4.2 对小鼠血清指标的影响

机体胆固醇水平过高的临床表现是血清或血浆中TC、TG、LDL-C水平异常升高,HDL-C水平异常降低^[21]。亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠血清TC、TG、LDL-C、HDL-C的影响如表5所示。

表5 亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠血清TC、TG、LDL-C、HDL-C的影响 mmol/L

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
NC	3.52 ± 0.94 ^b	0.53 ± 0.05 ^b	0.36 ± 0.05 ^b	1.89 ± 0.01 ^a
HC	4.05 ± 0.24 ^a	0.69 ± 0.06 ^a	0.44 ± 0.03 ^a	1.66 ± 0.07 ^b
FPs-H	3.64 ± 0.22 ^b	0.54 ± 0.05 ^b	0.40 ± 0.01 ^{ab}	1.91 ± 0.06 ^a
FPs-L	3.74 ± 0.14 ^{ab}	0.60 ± 0.01 ^b	0.41 ± 0.01 ^{ab}	1.70 ± 0.04 ^b

由表5可知,与NC组相比,HC组小鼠血清TC、TG、LDL-C水平显著升高,HDL-C水平显著降低($p < 0.05$),表明高胆固醇饮食导致小鼠血脂水平出现异常。与HC组相比,FPs-H组小鼠血清TC和TG水平显著降低,HDL-C水平显著升高($p < 0.05$),LDL-C水平有一定程度的降低,而FPs-L组小鼠血清TG水平显著降低($p < 0.05$),HDL-C水平有一定程度的升高,TC和LDL-C水平也有一定程度的降低。综上,亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D能够降低小鼠血清TC、TG和LDL-C水平,增加HDL-C水平。

2.4.3 对小鼠肝脏的影响

2.4.3.1 病理变化

肝脏是胆固醇合成代谢的主要场所,其代谢紊乱可能导致高胆固醇血症和氧化应激^[22]。不同组别小鼠的肝脏形态及肝脏HE染色切片分别如图2、图3所示。

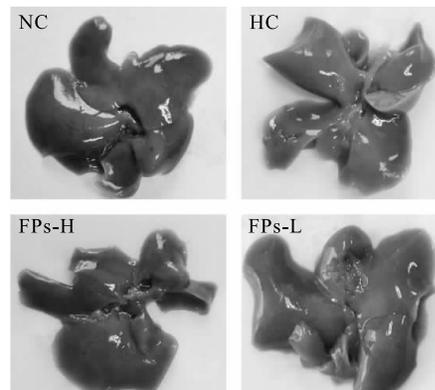
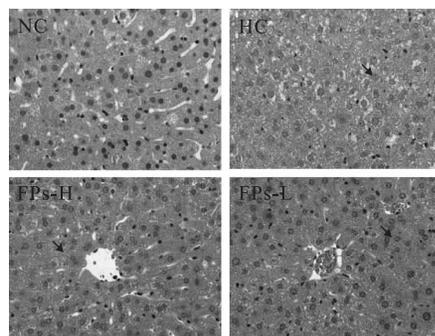


图2 不同组别小鼠肝脏形态



注:黑色箭头表示肝细胞发生脂肪变性,胞质中可见较小的圆形空泡

图3 不同组别小鼠肝脏HE染色切片(400×)

由图2可知:NC组小鼠肝脏表面光滑,形态完整,颜色呈暗红色;HC组小鼠肝脏体积偏大,颜色明显发黄;FPs-H组和FPs-L组小鼠肝脏颜色明显偏暗红色。由图3可知:NC组小鼠肝脏细胞结构清晰,形态完整,且无脂肪变性;HC组小鼠肝脏细胞混乱模糊,结构不清晰,出现了明显的脂肪变性;而FPs-H组和FPs-L组小鼠肝脏细胞变性情况有了不同程度的减轻,细胞结构趋于完整。综上,亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D可以在一定程度上逆转小鼠高胆固醇饮食带来的肝脏病变。

2.4.3.2 肝脏指数变化

正常情况下肝脏指数较为恒定,若肝脏指数显著增加($p < 0.05$),说明肝脏发生了异常生长^[23]。亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠肝脏指数的影响如图4所示。

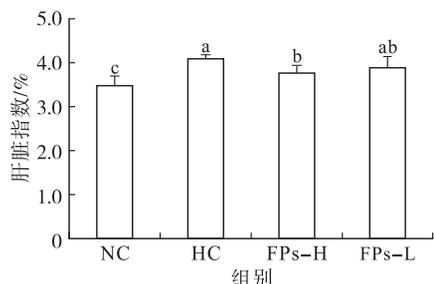


图4 亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠肝脏指数的影响

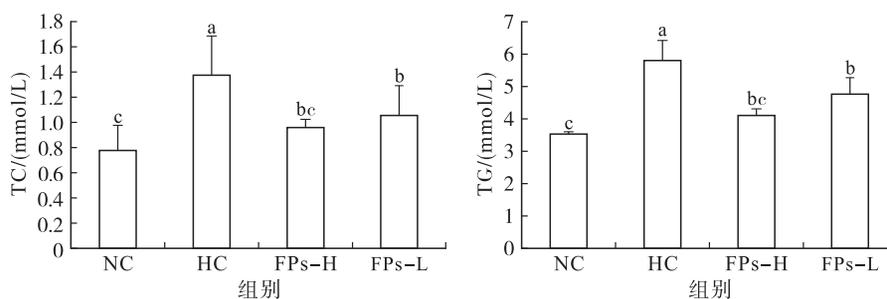


图5 亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠肝脏TC、TG的影响

2.4.3.4 对MDA、SOD的影响

高胆固醇饮食会诱导自由基的生成,导致脂质过氧化和氧化应激^[26]。据报道,抗氧化活性在调节脂质过氧化和机体抗氧化过程中发挥着一定的作用^[27]。MDA是生物体内的自由基发生过氧化时产生的,其含量可以反映机体脂质氧化的程度,间接地反映细胞损伤的严重程度^[28]。SOD是一种重要的抗氧化酶,可以有效地将超氧阴离子自由基转化为 H_2O_2 ,也能够间接反映机体氧化损伤程度^[29]。因此,本文通过测定小鼠肝脏的MDA和SOD水平来评估小鼠体内的抗氧化体系。亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠MDA、SOD的影响如图6所示。

由图4可知:HC组小鼠的肝脏指数显著高于NC组($p < 0.05$),表明高胆固醇饮食造成了脂类物质在小鼠肝脏内的蓄积,导致其肝脏肿大(图2);与HC组相比,FPs-H组小鼠肝脏指数显著降低($p < 0.05$),FPs-L组小鼠肝脏指数有一定程度的降低。徐霞^[24]在研究藜麦蛋白多肽的降血脂作用时发现,与高脂模型组相比,灌胃藜麦蛋白多肽各剂量组小鼠的肝脏指数显著下降,与本研究结果类似。综上,亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D可以减少脂类物质在小鼠肝脏中的积累。

2.4.3.3 TC、TG变化

亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠肝脏TC、TG的影响如图5所示。

由图5可知:与NC组相比,HC组小鼠肝脏TC和TG水平均显著升高($p < 0.05$);与HC组相比,FPs-H组、FPs-L组小鼠肝脏TC、TG水平均显著下降($p < 0.05$)。Feng等^[25]在研究橘皮素的降血脂作用时发现,橘皮素高、中剂量组大鼠的肝脏TC、TG水平显著低于高脂饮食组($p < 0.05$),与本研究结果类似。综上,亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D能够有效抑制小鼠肝脏中胆固醇的蓄积。

由图6可知:HC组小鼠肝脏中MDA水平显著高于NC组($p < 0.05$),表明高胆固醇饮食会造成小鼠肝脏氧化损伤;与HC组相比,FPs-H组和FPs-L组小鼠MDA水平显著降低($p < 0.05$),表明亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D可以缓解小鼠因高胆固醇饮食引起的肝脏氧化损伤。与NC组相比,HC组小鼠肝脏中SOD活力显著降低($p < 0.05$),说明高胆固醇饮食导致机体清除自由基能力减弱;与HC组相比,FPs-H组小鼠肝脏中SOD活力显著提高($p < 0.05$),而FPs-L组小鼠SOD活力有一定程度的提高。综上,亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D可提高小鼠体内SOD活力,进而增强其自由基清除能力和抗氧化能力。

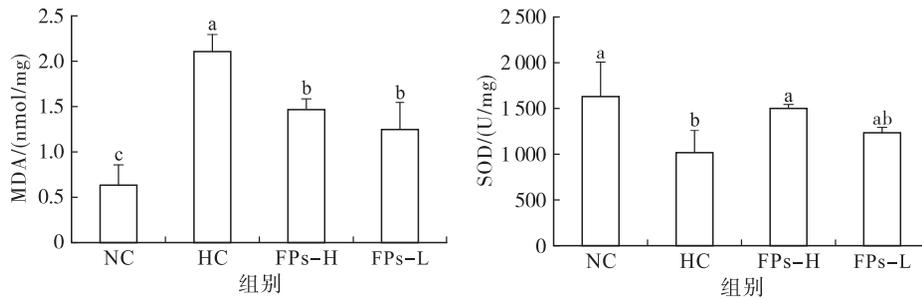


图6 亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠肝脏MDA、SOD的影响

2.4.4 对小鼠粪便TBA的影响

TBA由肝脏中的胆固醇生物合成而来,是胆固醇稳态的重要组成部分,是体内清除胆固醇的重要途径^[30-31]。亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠粪便TBA的影响如图7所示。

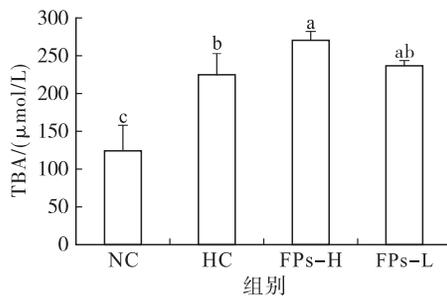


图7 亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D对小鼠粪便TBA的影响

由图7可知,HC组小鼠粪便中TBA含量显著高于NC组($p < 0.05$),而FPs-H组小鼠粪便中TBA含量显著高于HC组($p < 0.05$)。Banno等^[32]在研究新型降胆固醇二肽苯丙氨酸脯氨酸(FP)对高胆固醇血症大鼠粪便胆汁酸的影响时发现,FP能够显著提高高胆固醇血症大鼠粪便中胆汁酸的排出量,这与本研究结果一致。综上,亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分D能够很好地促进胆汁酸的排泄,进而降低小鼠体内的胆固醇水平。

3 结论

本研究以低温压榨亚麻籽饼为原料,制备具有降胆固醇活性的亚麻籽蛋白酶解肽。结果表明,在酶解时间为4h时,亚麻籽蛋白酶解肽的胆固醇胶束溶解度抑制率最高,为47.57%。对酶解时间为4h的亚麻籽蛋白酶解肽进一步超滤分离,发现分子质量不大于3kDa的超滤组分得率最高,为36.28%,并且其胆固醇胶束溶解度抑制率也最高,为70.96%。氨基酸分析表明,亚麻籽蛋白酶解肽分子质量不大于3kDa的超滤组分其疏水性氨基酸含量明显高于其他超滤组分,并且其赖氨酸/精氨酸比值明显低于其他组分。动物实验表明,亚麻籽蛋白酶解肽不大于3kDa的超滤组分可以有效缓解小

鼠因高胆固醇饮食导致的血脂异常,降低肝脏TC、TG水平,改善肝脏脂肪变性,增加粪便中TBA的排泄量,并且能够减轻小鼠因高胆固醇饮食导致的氧化应激反应。综上,亚麻籽蛋白酶解肽不大于3kDa的超滤组分在高胆固醇饮食小鼠体内能够发挥一定的降胆固醇作用,有望成为新型的降胆固醇功能性食品成分。

参考文献:

- [1] JOHNSTON T P, KOROLENKO T A, PIRRO M, et al. Preventing cardiovascular heart disease: Promising nutraceutical and non-nutraceutical treatments for cholesterol management[J]. *Pharmacol Res*, 2017, 120: 219-225.
- [2] ZHOU C, LI G, LI Y, et al. A high-throughput metabolomic approach to explore the regulatory effect of mangiferin on metabolic network disturbances of hyperlipidemia rats[J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(2): 418-433.
- [3] 张慧娟,付冰冰,王静. 基于Caco-2细胞模型的3种大豆肽降胆固醇能力研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(1): 44-50.
- [4] 魏连会,宋淑敏,董艳,等. 亚麻籽多肽对高脂饮食喂养大鼠血脂的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(11): 161-167.
- [5] 侍荣华. 苦荞活性肽对脂代谢的调节作用及机理研究[D]. 上海:上海应用技术大学,2019.
- [6] 周政. 我国亚麻籽油产业发展现状及存在问题[J]. *中国油脂*, 2020, 45(9): 134-136.
- [7] 郭顺堂,徐婧婷,刘欣然,等. 我国植物蛋白资源高效利用途径与技术创新[J]. *食品科学技术学报*, 2019, 37(6): 8-15.
- [8] 唐天悦. 亚麻籽饼肽的制备及其抗氧化活性研究[D]. 上海:上海交通大学,2016.
- [9] DOYEN A, UDENIGWE C C, MITCHELL P L, et al. Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electrodialysis with ultrafiltration membranes[J]. *Food Chem*, 2014, 145: 66-76.

- [10] NWACHUKWU I D, GIRGIH A T, MALOMO S A, et al. Thermoase - derived flaxseed protein hydrolysates and membrane ultrafiltration peptide fractions have systolic blood pressure - lowering effects in spontaneously hypertensive rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(10): 18131 - 18147.
- [11] 郑睿. 降胆固醇亚麻籽蛋白酶解肽的制备及结构表征[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- [12] 刘晓静. 亚麻籽肽降胆固醇作用的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [13] 廖坤梅, 白天禾, 陈楚华, 等. 高良姜粗多糖体外降胆固醇效果研究[J]. *农产品加工*, 2017, 3(5): 4 - 6, 17.
- [14] ZHANG Z C, ZHOU Q, HUANGFU G Y, et al. Anthocyanin extracts of lingonberry (*Vaccinium vitisidaea* L.) attenuate serum lipids and cholesterol metabolism in HCD induced hypercholesterolaemic male mice[J]. *Int J Food Sci Technol*, 2018, 54: 1576 - 1587.
- [15] 赵谋明, 任娇艳. 食源性生物活性肽结构特征与生理活性的研究现状与趋势[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(9): 69 - 81.
- [16] PRADOS I M, ORELLANA J M, MARINA M L, et al. Identification of peptides potentially responsible for *in vivo* hypolipidemic activity of a hydrolysate from olive seeds[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(14): 4237 - 4244.
- [17] 刘恩岐. 黑豆蛋白酶解产物的生物活性研究与结构表征[D]. 陕西 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [18] YANG X Y, ZHONG D Y, WANG G L, et al. Effect of walnut meal peptides on hyperlipidemia and hepatic lipid metabolism in rats fed a high - fat diet [J/OL]. *Nutrients*, 2021, 13(5): 1410 [2023 - 05 - 20]. <https://doi.org/10.3390/nu13051410>.
- [19] 高兴州. 益气化瘀组方对高胆固醇血症大鼠降脂作用及作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [20] LAPPANICHAYAKOOL P, SUTHEERAWATTANANONDA M, LIMPEANCHOB N. Hypocholesterolemic effect of sericin - derived oligopeptides in high - cholesterol fed rats[J]. *J Nat Med*, 2017, 71(1): 208 - 215.
- [21] BUNNOY A, SAENPHET K, LUMYONG S, et al. *Monascus purpureus* - fermented Thai glutinous rice reduces blood and hepatic cholesterol and hepatic steatosis concentrations in diet - induced hypercholesterolemic rats [J/OL]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 88 [2023 - 05 - 20]. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0624-5>.
- [22] ZHANG Q, FAN X, YE R, et al. The effect of simvastatin on gut microbiota and lipid metabolism in hyperlipidemic rats induced by a high - fat diet[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 522 [2023 - 05 - 20]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00522>.
- [23] 邵素娟. 红松松仁降脂肽的分离及其对脂质代谢的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- [24] 徐霞. 藜麦蛋白质及多肽对高脂血症小鼠降脂作用及其降脂产品开发研究[D]. 成都: 成都大学, 2020.
- [25] FENG K, LAN Y, ZHU X, et al. Hepatic lipidomics analysis reveals the antiobesity and cholesterol - lowering effects of tangeretin in high - fat diet - fed rats[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(22): 6142 - 6153.
- [26] PRASAD K, MCNAIR E D, QURESHI A M, et al. Vitamin E slows the progression of hypercholesterolemia - induced oxidative stress in heart, liver and kidney[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 368(1): 181 - 187.
- [27] CHAN P T, MATANJUN P, YASIR S M, et al. Antioxidant and hypolipidaemic properties of red seaweed, *Gracilaria changii*[J]. *J Appl Phycol*, 2014, 26(2): 987 - 997.
- [28] 高天曙, 王宏贤. 山楂叶黄酮类化合物对小鼠血清及肝组织 SOD、MDA 水平的影响[J]. *中医研究*, 2012, 25(4): 67 - 68.
- [29] ASOKAN B R, JAİKUMAR S, SENGOTTUVELU S. Zingiberene protects from isoproterenol - induced cardiotoxicity via attenuation of hyperlipidemia and oxidative stress in rats[J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2022, 32(1): 74 - 80.
- [30] TAN C X, CHONG G H, HAMZAH H, et al. Effect of virgin avocado oil on diet - induced hypercholesterolemia in rats via ¹H NMR - based metabolomics approach[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(11): 2264 - 2274.
- [31] KEVRESAN S, KUHAJDA K, KANDRAC J, et al. Biosynthesis of bile acids in mammalian liver[J]. *Eur J Drug Metab Ph*, 2006, 31(3): 145 - 156.
- [32] BANNO A, WANG J, OKADA K, et al. Identification of a novel cholesterol - lowering dipeptide, phenylalanine - proline (FP), and its down - regulation of intestinal ABCA1 in hypercholesterolemic rats and Caco - 2 cells [J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19416 [2023 - 05 - 20]. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56031-8>.