分　类　号：TS251.93　　单位代码：10190
研究生学号：2202108086　　密　　级：公 开

長春工業大學

硕 士 学 位 论 文

唐丽雯

2024 年 6 月

中国知网　https://Www.cnki.net

鹿血多肽硒螯合物的制备及活性研究

Preparation and activity study on selenium chelate of deer blood polypeptide

硕 士 研 究 生：唐丽雯

导　　师：孙尧讲师

申 请 学 位：理学硕士

学　　科：生物学

所 在 单 位：化学与生命科学学院

答 辩 日 期：2024 年 6 月

授予学位单位：长春工业大学

中国知网 https://Www.cnki.net

摘 要

本研究以双阳梅花鹿（*Cervus nippon*）鹿血为原材料，通过酶解法得到鹿血多肽，再与无机硒化合物螯合制备梅花鹿鹿血多肽硒螯合物（鹿血多肽硒螯合物），一种新型有机硒营养强化剂。对鹿血多肽硒螯合物进行表征实验，探究其稳定性、抗氧化性、细胞吸收特性以及抗炎活性，为补硒剂的开发利用提供重要的参考依据。研究成果如下：

（1）以梅花鹿鹿血为原材料，通过酶解法制备多肽，以水解度为衡量标准，通过单因素和响应面实验来优化酶解条件。结果证明，碱性蛋白酶对梅花鹿鹿血的酶解效果最好，且最佳酶解工艺条件是酶解温度 60 ℃、pH 8.4、酶解时间 5 h，此时水解度为 32.7 ± 0.13%。

（2）以鹿血多肽和亚硒酸钠为原材料，以螯合率为指标，通过单因素和响应面实验来确定鹿血多肽硒螯合物的最优螯合工艺：pH 5.4、时间 39 min、温度 50 ℃、肽硒质量比 4:1，螯合率为 72.9 ± 0.14%。

（3）分子量测定表明鹿血多肽适合用来螯合金属离子。氨基酸成分分析表明，两者的营养价值较高，适合用来制备硒营养强化剂。其中，负电荷氨基酸和疏水氨基酸残基对于螯合反应具有至关重要的意义。紫外光谱和红外光谱证明亚硒酸钠提供的 Se^{4+}主要与鹿血多肽的羧基氧原子和氨基氮原子结合。电镜图里鹿血多肽与鹿血多肽硒螯合物的微观结构不同，证明螯合物的产生。电势的改变证明鹿血多肽硒螯合物结合了负电荷基团。

（4）在pH 2~12、温度40~100 ℃条件下鹿血多肽硒螯合物的硒保留率可达到70%以上，说明其具有稳定性。研究不同浓度的鹿血多肽硒螯合物和鹿血多肽对 DPPH 自由基的清除能力以及羟基自由基清除能力，证明鹿血多肽硒螯合物具有抗氧化能力，且强于鹿血多肽。构建体外细胞吸收模型进行硒转运实验，结果证明鹿血多肽硒螯合物可以促进 Se^{4+}的吸收。

（5）基于网络药理学和分子对接模拟验证鹿血多肽硒螯合物具有较好的抗炎作用。通过数据库分别获取鹿血多肽硒螯合物和抗炎的相关靶点，取交集，使用 STRING 数据库作蛋白相互作用（PPI）网络图，进行 GO 和 KEGG 富集分析。采用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“成分-靶点-疾病-通路”网络模型。筛选相关度高的基因与鹿血多肽硒螯合物的核心靶点，进行分子对接，结果显示 GIn-Asn，Phe-Ile，Phe-Leu 与 1gkc，1086，2h5j 均有较好的对接能力。为验证鹿血多肽硒螯合物具有抗炎作用，构建体外 RAW264.7 炎症模型，研究不同浓度的鹿血多肽硒螯合物对脂多糖（LPS）诱导的

中国知网 https://Www.cnki.net

RAW264.7 细胞的肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-6（IL-6）和白细胞介素-1β（IL-1β）释放量的影响，结果显示均具有抑制效果。

关键词：鹿血多肽　硒离子　螯合　细胞吸收

中国知网　https://Www.cnki.net

Abstract

In this study, deer blood polypeptide was obtained by enzymatic hydrolysis using deer blood from Shuangyang sika deer (*Cervus nipport)* as raw material and then chelated with inorganic selenium compounds to prepare deer blood polypeptide selenium chelate (deer blood polypeptide selenium chelate), a new type of organic selenium nutritional enhancer. The characterization experiments of selenium chelate of deer blood polypeptide were carried out to explore its stability, antioxidant activity, cell absorption characteristics, and anti-inflammatory activity, which provided an important reference for the development and utilization of selenium supplements. The results of the research are as follows:

(1) Using sika deer blood as raw material, peptides were prepared by enzymatic hydrolysis, the degree of hydrolysis was used as the measurement standard, and the enzymatic hydrolysis conditions were optimized by single factor and response surface experiments. The results showed that alkaline protease had the best effect on the enzymatic hydrolysis of sika deer blood. The optimal enzymatic hydrolysis process conditions were 60 °C, pH 8.4, and enzymatic hydrolysis time of 5 h, and the degree of hydrolysis was 32.7 ± 0.13%.

(2) Using deer blood polypeptide and sodium selenite as raw materials and chelation rate as indicators, the optimal chelation process of deer blood polypeptide selenium chelate was determined by single factor and response surface experiments: pH 5.4, time 39 min, temperature 50 °C, peptide-selenium mass ratio 4:1, chelation rate of 72.9 ± 0.14%.

(3) Molecular weight determination showed that deer blood polypeptide was suitable for chelating metal ions. The analysis of amino acid composition showed that the nutritional value of the two was high, and they were suitable for the preparation of selenium nutritional enhancers. Among them, negatively charged amino acids and hydrophobic amino acid residues are crucial for the chelation reaction. Ultraviolet and infrared spectroscopy showed that the Se^{4+} provided by sodium selenite was mainly bound to the carboxyl oxygen atom and the amino nitrogen atom of the deer blood polypeptide. The microstructure of the selenium chelate of the deer blood polypeptide and the deer blood polypeptide in the electron microscope diagram is different, which proves the production of chelate. The change in electric potential proved that the deer blood polypeptide selenium chelate binds negatively charged groups.

中国知网 https://Www.cnki.net

(4) The selenium retention rate of deer blood polypeptide selenium chelate can reach more than 70% under the conditions of pH 2~12 and temperature 40~100 °C, indicating that it is stable. The scavenging ability of deer blood polypeptide selenium chelate and deer blood polypeptide to DPPH free radicals and hydroxyl radical scavenging ability of different concentrations of deer blood polypeptide selenium chelate was studied, and it was proved that deer blood polypeptide selenium chelate had antioxidant capacity and was stronger than deer blood polypeptide. An in vitro cell absorption model was constructed for selenium transport experiments, and the results showed that the selenium chelate of deer blood polypeptide could promote the absorption of Se^{4+}.

(5) Based on network pharmacology and molecular docking simulation, it was verified that deer blood polypeptide selenium chelate had a good anti-inflammatory effect. The related targets of selenium chelate and anti-inflammatory of deer blood polypeptide were obtained from the database, and the STRING database was used as a protein interaction (PPI) network diagram for GO and KEGG enrichment analysis. Cytoscape 3.8.2 software was used to construct the "component-target-disease-pathway" network model. The results showed that GIn-Asn, Phe-Ile, Phe-Leu 1gkc, 1086, and 2h5j all had good docking ability. To verify the anti-inflammatory effect of deer blood polypeptide selenium chelate, an in vitro RAW264.7 inflammatory model was constructed to study the effects of different concentrations of deer blood polypeptide selenium chelate on the release of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1β (IL-1β) induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW264.7 cells, and the results showed that all of them had inhibitory effects.

Key words: Deer blood polypeptide Selenium Chelation Cell absorption

中国知网 https://Www.cnki.net

目 录

第 1 章 绪论 1
1.1 鹿血的研究概述 1
1.1.1 鹿血的营养价值和功效 1
1.1.2 鹿血的成分概述 2
1.1.3 鹿血活性肽的研究 3
1.2 硒的研究概述 3
1.2.1 硒的作用 3
1.2.2 补硒剂的概述 4
1.3 肽金属螯合概述 5
1.3.1 肽金属螯合简述 5
1.3.2 肽金属螯合机制 5
1.3.3 肽螯合硒的研究现状 6
1.4 研究目的和方法 6
1.4.1 研究目的 6
1.4.2 研究方法 7
1.5 技术路线 8
第 2 章 鹿血多肽酶解工艺研究 9
2.1 实验材料与仪器 9
2.1.1 材料与试剂 9
2.1.2 实验仪器设备 9
2.2 方法 9
2.2.1 鹿血多肽制备 9
2.2.2 鹿血蛋白酶解条件的优化 10
2.2.3 数据处理 11
2.3 结果与讨论 11
2.3.1 单因素实验结果 11
2.3.2 响应面实验结果 13
2.3.3 最优工艺条件的确定及验证 16
2.4 本章小结 16
第 3 章 鹿血多肽硒螯合物制备工艺优化 17
3.1 材料与设备 17
3.1.1 材料与试剂 17
3.1.2 实验仪器设备 17
3.2 方法 17

中国知网 https://Www.cnki.net

3.2.1 鹿血多肽硒螯合物制备的单因素实验 17
3.2.2 硒含量及螯合率的测定 18
3.2.3 鹿血多肽硒螯合物制备的响应面实验 18
3.2.4 数据处理 19
3.3 结果与讨论 19
3.3.1 单因素实验结果 19
3.3.2 响应面实验结果 21
3.3.3 最优工艺条件的确定及验证 24
3.4 本章小结 25
第 4 章 鹿血多肽硒螯合物的结构表征及生物活性研究 26
4.1 实验材料与仪器 26
4.1.1 材料与试剂 26
4.1.2 实验仪器设备 26
4.2 方法 27
4.2.1 相对分子质量测定 27
4.2.2 氨基酸分析 27
4.2.3 紫外-可见吸收光谱 27
4.2.4 傅里叶红外光谱 27
4.2.5 扫描电镜 28
4.2.6 电势分析 28
4.2.7 稳定性研究 28
4.2.8 鹿血多肽硒螯合物体外抗氧化活性研究 28
4.2.9 在 Caco-2 细胞单层模型研究硒离子的转运吸收 29
4.2.10 数据处理 31
4.3 结果与讨论 31
4.3.1 分子量测定 31
4.3.2 氨基酸分析 32
4.3.3 可见-紫外光谱分析 33
4.3.4 傅里叶红外光谱分析 34
4.3.5 扫描电镜分析 35
4.3.6 电势分析 35
4.3.7 热稳定性分析 36
4.3.8 酸碱稳定性分析 36
4.3.9 对 DPPH 自由基清除率测定 37
4.3.10 对羟基自由基清除率测定 38
4.3.11 对 Caco-2 细胞的毒性评价 38
4.3.12 Caco-2 细胞单层模型的 TEER 值及 AKP 活性测定 39
4.3.13 Caco-2 细胞转运实验 40

中国知网 https://Www.cnki.net

4.4 本章小结 41
第 5 章 基于网络药理学和分子对接进行抗炎活性研究 42
5.1 实验材料与仪器 42
5.1.1 材料与试剂 42
5.1.2 实验仪器设备 43
5.2 方法 43
5.2.1 潜在作用靶点的获取 43
5.2.2 炎症靶点的筛选及交集基因的获取 43
5.2.3 PPI 网络图的构建 44
5.2.4 核心靶点的筛选 44
5.2.5 GO 富集分析 44
5.2.6 KEGG 富集分析 44
5.2.7 “成分-靶点-疾病-通路”网络图构建 44
5.2.8 分子对接 44
5.2.9 鹿血多肽硒螯合物抗炎活性的验证 45
5.2.10 数据处理 46
5.3 结果与讨论 46
5.3.1 潜在靶点的获得 46
5.3.2 PPI 分析 49
5.3.3 GO 富集分析 50
5.3.4 KEGG 通路富集分析 52
5.3.5 “成分-靶点-疾病-通路”网络图构建 53
5.3.6 分子对接 54
5.3.7 细胞毒性结果 55
5.3.8 炎症细胞模型 NO 分泌量检测 56
5.3.9 炎症细胞模型炎症因子分泌量检测 56
5.4 本章小结 57
第 6 章 结论 59
参考文献 61
附录 70

中国知网 https://Www.cnki.net

第 1 章　绪　论

1.1 鹿血的研究概述

马鹿（*Cervus canadensis*）和梅花鹿（*Cervus nipport*）是亚洲独特的优质资源。目前市场上的鹿类产品包括鹿角、鹿胎盘、鹿血等。其中，鹿血营养丰富，但开发的产品相对较少，仅限于一些附加值低的生产和加工，大多以原血液初加工为主，其中大部分还是以传统鹿血酒、鹿血粉的形式生产。在鹿血产品的开发包括制备鹿血压片糖果，红参鹿血片，鹿血酒等。其中，鹿血压片糖果以鹿血粉为主要原料，结合一些天然原材料经压片技术制备具有增强抗疲劳、提高免疫力、延缓衰老和改善记忆等功效的糖果[1]；红参鹿血片以鹿血和红参为主要原料，以感官评价为考察指标，制备具有补益作用的红参鹿血片[2]；提取鹿血中的多肽制备鹿血酒，提高其溶解性，增加有效成分，最后利用果香、酒香和植物药香的复合作用改善了鹿血的腥味，调整了酒体感官[3]。其实鹿血的开发研究还有很大空间，可以融合酶解、喷雾干燥、冻干等现代技术进行多方面创新，把鹿血的价值尽可能地发挥出来。

1.1.1 鹿血的营养价值和功效

鹿血作为传统名贵中药，被广泛地应用于不同疾病的治疗。《本草纲目》中就有关于鹿血的记载，鹿血能“补虚损，益精血”[4]。鹿血还能治疗心悸失眠、贫血等症状[5]。另外，有研究表明鹿血还具有美容养颜的作用，用鹿血加工成的鹿血粉能使皮肤更加光滑细腻[6]。它还具有抗疲劳、降血压、增强免疫力等多种生理功能[7]。

（1）抗氧化能力

王宁丽在鹿血低聚肽的研究中发现鹿血肽的抗氧化性可能和具有抗氧化活性的氨基酸有关，这类氨基酸约占总氨基酸的三分之一[8]。翟学超等人的研究发现随着肽段分子质量的减小，鹿血抗氧化肽的抗氧化能力增强，其中的原因与氨基酸种类或极性相关，抗氧化活性的氨基酸的占比越大，抗氧化能力越强[9]。

（2）抗肿瘤能力

侯璐在鹿血肽的研究中通过对细胞建立氧化损伤模型，在保护神经细胞的基础上测定胞内ROS 含量来证明鹿血具有抗衰老抗氧化能力，为了进一步验证抗衰老作用，用含有酶解产物的大肠杆菌喂食秀丽线虫，通过检测其寿命来证明鹿血肽具有抗衰老作用，最后考察鹿血肽对乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的增殖情况，验证了其具有抗肿瘤的作用[10]。铁宇娟等人研究了鹿血提取物鹿血晶对卵巢癌小鼠的抑瘤作用，先是

中国知网 https://Www.cnki.net

建立小鼠 ID8 卵巢癌皮下荷瘤模型，再通过测定脾脏、卵巢等组织的肿瘤抑制率和相关激素的表达量，最后证明鹿血提取物鹿血晶对卵巢癌小鼠具有抑瘤作用，这可能与其对荷瘤小鼠的免疫调节、卵巢功能保护有关[11]。

（3）抗疲劳能力

杜小琴在“鹿血的酶解工艺优化及其抗运动疲劳活性评价”一文中通过监测小鼠负重游泳时间、测定小鼠血尿氮含量和肝糖原含量来证明了鹿血酶解液有抗运动疲劳活性[12]。

（4）增强免疫力

李鹰等研究结果表明鹿血能促进肠道菌群的生长，还能帮助肠道菌群恢复正常水平，同时能显著提高小鼠的免疫功能[13]。胡圣爱等人发现鹿血冻干粉能明显促进小鼠腹腔巨噬细胞的免疫功能，提高小鼠的免疫力，还能刺激 T4 的形成和成熟，使 T4/T8 比值增高，说明鹿血粉可以增强小鼠机体免疫功能[14]。任建东在研究中发现降解后的鹿茸血水解肽不仅可以提高机体免疫力， 自身还具备抗氧化能力[15]。

（5）其他作用

王赛雯等人的研究发现鹿血提取物可辅助治疗黑色素瘤小鼠[16]。王春霞等人构建了大鼠贫血模型，以红蛋白含量、红细胞个数和红细胞压积为监测的指标，验证鹿血粉对于缺铁性贫血的改善效果明显[17]。付慧在“鹿血生物活性肽体外抗菌研究”一文中发现鹿血生物活性肽对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌都有抑制效果，且随着肽浓度的增加抑菌效果增强[18]。张怡等人的研究发现鹿血晶对肾脏具有保护作用[19]。李京蔓等人通过研究鹿血晶对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的影响，包括细胞对大肠杆菌的吞噬能力，细胞中炎症因子 iNOS、IL-6、IL-1β的分泌量和炎症因子 iNOS、IL-6、IL-1β的 mRNA 的表达水平，结果表明鹿血晶可以抑制炎症因子的表达和增强巨噬细胞吞噬大肠杆菌的能力[20]。

1.1.2 鹿血的成分概述

新鲜鹿血包含 17 种氨基酸，且必需氨基酸占比相对较大，营养价值高。有研究表明鹿血中含水量高达 80%，蛋白质含量高达 13%，甚至更高，是主要成分，其中有机物的占比也在 16%左右。

鹿血的化学成分复杂。蛋白质是主要成分，包括清蛋白和珠蛋白等，其中白蛋白约占血浆总蛋白的 50%。还含有大量的多肽和氨基酸，含量靠前的包括胱氨酸、赖氨酸、色氨酸及苯丙氨酸[21]。另外还有多种酶类，例如谷胱甘肽氧化酶和脱氢酶。除此之外，还含有固醇类、糖脂类及磷脂类。生理活性物质如雌酮、肾上腺素等，各类嘌

中国知网 https://Www.cnki.net

吟碱、铁卟啉。维生素中维生素 E、维生素 A 和维生素 B_1 含量比较丰富。

1.1.3 鹿血活性肽的研究

随着生物技术的不断发展，多肽作为一类重要的生物活性物质，受到了广泛关注。研究表明肽类物质具有多种功能，提高免疫力、抗炎、抗菌、运输微量元素等[23]。鹿血中含有丰富的蛋白质资源，通过蛋白酶解技术，可以降解为具有生物活性的多肽，即鹿血活性肽。这些活性肽具有的多种生理功能，对改善人体健康具有重要意义。研究表明，蛋白质被降解为多肽后，更有利于吸收和利用，一般认为，分子量为（200~1000 Da）的多肽更容易吸收，还具有不被消化、不消耗人体能量的特点[24]。已有研究表明，鹿血水解物中相对分子质量小于 1000 Da 的小肽居多[25]。

鹿血蛋白提取多肽的方法有酸法和碱法、高温高压提取法、微生物发酵法和酶解法[26]。其中，酸法和碱法由于设备的限制和环境的影响很少应用。高温高压提取法：高温高压的条件下使得鹿血中的活性物质被释放，再经蒸发提取工艺，得到鹿血蛋白活性肽。微生物发酵法：利用酵母菌等微生物在发酵过程中分泌大量蛋白酶，利用蛋白酶来水解鹿血蛋白，从而得到活性肽的方法。酶解法：将鹿血蛋白经蛋白酶水解得到活性肽的过程，通过调解蛋白酶的最适酶解条件来提高鹿血的水解效率，同时还可以水解到不同活性的鹿血活性肽。这种方法具有操作简单和成本低的优点，因此在实际的生产应用中较为普遍。

1.2 硒的研究概述

硒在生物学中扮演着至关重要的角色，它是一种必需的微量元素，对人体健康具有广泛的影响。硒是多种抗氧化酶的重要组成部分，这些酶在保护细胞免受氧化应激损伤方面发挥着关键作用[27]。研究表明，适量的硒摄入能够显著提高人体的抗氧化能力，减少慢性疾病的风险[28]。此外，硒还参与调节人体内的免疫反应。它能够促进免疫细胞的活化和增殖，增强机体的免疫功能。研究表明，硒的缺乏可能引起免疫系统的功能下降，从而导致人类患上诸多疾病，如克山病、大骨节病、白内障等，且癌症和心血管疾病等重大疾病的发病率显著提高，增加感染的风险[29]。因此，适量的硒摄入对于维持免疫系统的正常功能至关重要。

1.2.1 硒的作用

（1）抗氧化功能

硒具有很强的抗氧化性能，它有助于有效清除体内的自由基，减少氧化应激反应

中国知网 https://Www.cnki.net

的发生。这些自由基是高度活跃的分子，它们可以攻击细胞内的蛋白质和 DNA，导致细胞损伤和老化[30]。硒通过参与谷胱甘肽过氧化物酶的合成，有助于清除这些自由基，保护细胞免受氧化损伤[31]。另外，硒还能促进维生素 E 的再生，从而进一步提高抗氧化能力。

（2）增强身体的抵抗力

硒元素对于免疫功能的增强具有至关重要的作用。硒元素是免疫系统中不可或缺的组成部分，有助于提高免疫细胞的活力，强化机体的抵抗力。免疫细胞之间的信号传递是免疫系统发挥功能的关键，硒元素作为其中重要的参与者之一，影响着免疫细胞的反应速度和准确性[32]。这使得机体在应对病原侵袭时，能够更快、更准确地做出应对，有效地抵抗感染。拿心血管疾病为例， 自由基在其中扮演着至关重要的角色，自由基容易损伤血管内皮细胞，促使血管硬化和血栓形成，增加心血管疾病的风险[33]。而适当摄入硒元素能够有效清除自由基，保护血管内皮细胞免受伤害，降低心血管疾病的发病率。

（3）预防癌症

硒元素与预防癌症息息相关。 自由基能损伤 DNA，导致基因发生突变和细胞异常增生，从而增加患癌风险。而摄入适量的硒能够清除自由基，减少 DNA 损伤，降低患癌风险。研究显示，摄入足够的硒与癌症患病风险呈负相关[34]。硒有抑制癌细胞生长和扩散的作用，促进癌细胞凋亡，同时，硒还可增强抗癌药物的疗效，提高癌症患者的生存率。研究人员发现，硒可抑制多种癌细胞生长和增殖，如乳腺癌、前列腺癌、肺癌等。硒通过调节细胞信号传导通路、诱导细胞凋亡等机制发挥抗癌作用[35]。因此，适量补充硒对于预防癌症具有重要意义。

1.2.2 补硒剂的概述

近年来，随着人们对健康的关注日益加深，补硒剂作为一种重要的营养补充剂，受到了广泛的关注和应用。人体必需的微量元素之一就是硒元素，它在维持生物体的生长、发育及其他生理过程中都是必不可少的[36]。据报道，从全世界来看，存在接近 40 个国家和地区缺硒,例如芬兰、英国、希腊、巴西、非洲布隆迪、澳洲和新西兰，由于地质原因，土壤缺乏硒，导致食物链也缺硒。在中国也存在严重的缺硒现象，目前约 2/3 的省份是缺硒地区，其中严重缺硒地区包括黑龙江、吉林、辽宁、河北、河南、山东等，北京、浙江、湖南、江西北部等地区也存在缺硒现象[37]。由于人体不能合成硒，且该元素在人体内的生物半衰期很短，被完全代谢只需要两周左右，所以人体需要从外源物质摄入硒。据中国营养学会报告，成年人每日推荐的摄入值是 50

中国知网 https://Www.cnki.net

μg~250 μg，但是，据目前统计人们通过膳食补充硒的日摄入量大约在 20 μg~30 μg，两者相差甚远，因为缺乏富硒食物的摄入，所以导致人体出现缺硒现象。因此，有效和安全的硒补充是必不可少，而科学补硒也成为了人们的迫切需求[38]。目前，市场上有两种主要类型的硒补充剂，一种是无机硒，如亚硒酸钠和硒酸钠，虽然价格相对较低，但无机硒是以被动扩散的方式吸收，吸收利用率低且稳定性差，生物利用率也低。经人体吸收后无机硒很快被代谢消耗，长期摄入还具有脏器毒性，安全性差。另一种是有机硒，如有机硒制剂和天然产物富硒地区，包括硒代蛋氨酸和富硒大米，有机硒通过肠道壁主动运输吸收，吸收利用率高且无生理毒性。经人体吸收饱和后，富余的有机硒还可存储于脏器组织中待利用[39]。相比之下，有机硒具有更高的生物利用率和安全性而成为市场上更受欢迎的选择。

1.3 肽金属螯合概述

1.3.1 肽金属螯合简述

自 20 世纪 70 年代起，美国Albion 生物实验室首次成功研制出金属螯合物后，不同种类的金属螯合物相继问世，并且在人类营养和动物营养领域得到广泛应用[40]。肽金属螯合大多是指多肽链中的氨基氮原子、羧基氧原子等配位原子与金属离子形成稳定的配位结构，简称螯合过程，形成稳定的金属螯合物。这种螯合作用一定程度上不会改变金属离子本身的化学性质，只会影响肽链的结构和功能。目前，有许多研究都尝试将多肽与金属离子螯合，其中就包括大豆肽、核桃肽、玉米肽、猪血多肽以及雁血多肽等与常见的金属离子钙离子、铁离子、锌离子以及硒离子等螯合[41-44]。在医学领域中，肽金属螯合物作为药物载体被广泛使用，可以实现药物的有针对性输送和缓慢释放，从而提高药效、减轻副作用[45]。例如某些含锌离子的肽金属螯合物被用作抗肿瘤药物，可抑制肿瘤细胞的增殖和扩散[41]。在农业领域，肽金属螯合物作为植物生长调节剂，可促进植物的生长和发育，提高农作物的产量和质量[44]。某些含铜离子的肽金属螯合物作为植物生长促进剂，可以促进植物的光合作用和氮代谢，提高叶绿素含量和光合效率[42]。

1.3.2 肽金属螯合机制

肽金属螯合的机制主要指配位原子与金属离子间的相互作用。在肽链中，氮原子和氧原子是主要的配位原子，可与金属离子形成配位键。当肽链与金属离子接触时，配位原子与金属离子发生配位作用，形成稳定的金属螯合物。配位键的形成涉及共享

中国知网 https://Www.cnki.net

电子对。在螯合肽金属的过程中，肽链内的配位原子提供孤对电子，金属离子提供空轨道，形成配位键[46]。这种结合方式不仅增强了金属离子的稳定性，也改变了肽链的结构和性质。多种因素会影响肽金属螯合物的稳定性，其中包括肽链的结构、金属离子的特性以及配位原子的种类和数量。就肽链而言，其构象和序列与金属离子相互作用产生影响，因此特定序列的肽链可能更容易形成稳定的螯合物[47]。而金属离子的电荷、半径和配位数等性质也会影响其与肽链的相互作用[48, 49]。

1.3.3 肽螯合硒的研究现状

肽螯合硒是一种有机硒形式，通过将硒元素与肽链结合，形成稳定的螯合物，从而提高了硒的生物利用率和安全性。目前，肽螯合硒的制备方法主要有酶解法和微生物发酵法和高温高压提取法等[42]。其中，酶解法因其条件温和、产物纯度高等优点而备受青睐。总之，肽螯合硒作为一种有机硒形式，具有多种生理功能和广泛的应用前景。随着研究的不断深入和技术的不断发展，肽螯合硒在各领域的应用将会更加广泛。

目前有研究表明通过肽螯合硒的方式可以将无机硒转化为有机硒，如大豆肽硒螯合物[43]，该方法不仅可以补硒，同时还更安全。但是以鹿血多肽为原料制备鹿血多肽硒螯合物的报道较少。因此，鹿血多肽作为实现硒高效吸收的潜在来源，引起了我们的兴趣。研究发现，硒补充剂可以通过从大豆、核桃和豌豆中提取多肽并与硒螯合来制备。其中，在最佳制备条件下，大豆多肽的硒螯合率达到 50.79%[44, 45]。因此，我们研究了鹿血多肽与硒的螯合作用，优化了制备条件，分析了鹿血多肽的理化性质，对鹿血多肽硒螯合物进行了表征实验。通过热稳定性研究和酸碱稳定性研究考察螯合物的稳定性。

同时，鹿血多肽硒螯合物还具有多种生物活性，包括抗氧化、抗炎和抗菌等。但是，其药效和作用机制尚未完全解析。所以利用网络药理学线上模拟分析鹿血多肽硒螯合物的抗炎机制以及相关的细胞通路，我们还将使用分子对接模拟方法，研究鹿血多肽硒螯合物与目标蛋白的相互作用。

通过本研究的开展，我们有望深入了解鹿血多肽硒螯合物的开发价值，为其作为一种潜在的生物活性硒补充剂的提供基础理论和实践指导。

1.4 研究目的和方法

1.4.1 研究目的

无论是世界范围内还是中国本土，缺硒现象都很普遍，因此，补硒剂的研发是大

中国知网 https://Www.cnki.net

家关注的方向。从安全性和吸收特性的角度考虑，制备有机硒形式的硒营养强化剂更具有现实意义。因此，我们需要一个多肽来源。

梅花鹿是吉林省的特色天然产物之一，其鹿血营养丰富，是潜在的多肽来源，存在巨大的开发价值。所以本研究以鹿血为原料，螯合硒元素，制备鹿血多肽硒螯合物。通过优化酶解条件和螯合工艺，得到最佳制备条件。对螯合物进行结构表征，分析其稳定性和抗氧化性，构建 Caco-2 细胞单层模型来测定硒的转运量，最后基于网络药理学和分子对接以及构建 RAW246.7 细胞的体外炎症模型来研究其抗炎活性。我们希望鹿血多肽硒螯合物的制备具有现实意义，为进一步研究和开发补硒剂提供理论基础。同时，也希望能促进吉林省梅花鹿产业的发展，提高当地的经济效益。

1.4.2 研究方法

（1）鹿血多肽的酶解工艺优化

以双阳梅花鹿鹿血为原材料，通过酶解法得到鹿血多肽，基于单因素和响应面实验来优化酶解条件，得到最佳工艺条件。

（2）鹿血多肽硒螯合物的制备和表征

在酶解的基础上，将酶解得到的水解度最高的鹿血多肽与亚硒酸钠螯合，得到鹿血多肽硒螯合物，优化工艺条件，确定最佳工艺。进行分子量测定、氨基酸分析、紫外吸收光谱、傅里叶红外色谱、电势测定等表征实验

（3）鹿血多肽硒螯合物的稳定性，抗氧化和细胞转运吸收研究。

通过研究鹿血多肽硒螯合物在不同温度，不同酸碱条件下的硒保留率，分析其稳定性。通过 DPPH 自由基清除率实验和羟基自由基清除率实验来分析其抗氧化性。构建 Caco-2 细胞单层模型研究硒离子的转运吸收，先进行细胞毒性实验，后通过考察电阻值大小和酶比活力来确定模型是否成功构建，最后用于药物转运实验，结果显示鹿血多肽硒螯合物提高了硒的转运量。

（4）基于网络药理学和分子对接分析鹿血多肽硒螯合物具有抗炎作用

运用网络药理学的方法，对鹿血多肽硒螯合物和抗炎的靶点进行筛选，利用微生信平台得到交集基因，对交集基因进行 PPI、KEGG 和GO 分析，通过构建“化合物-靶点-通路-疾病”网络模型。最后，在网络药理学的基础上，筛选出相关度高的大分子蛋白质，与预测的配体通过分子对接结合，经去水，加氢，设置活性口袋等处理，分析其结合能大小，通过 python 的可视化处理，更直观地了解鹿血多肽硒螯合物与靶点之间的相互作用情况，加深我们对鹿血多肽硒螯合物在抗炎机制中作用方式的理解。基于上述结果，通过检测鹿血多肽硒螯合物对常见炎症因子的抑制情况来进行验

中国知网 https://Www.cnki.net

证。首先进行细胞毒性实验，确保鹿血多肽硒螯合物对细胞的安全性，其次分别考察鹿血多肽硒螯合物对 NO 分泌量以及常见炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β分泌量的抑制影响效果。

综上，本文经表征实验证明鹿血多肽硒螯合物对硒的吸收利用具有很好的促进作用，为制备补硒剂提供理论基础，也进一步揭示鹿血多肽硒螯合物还具备多种生物活性，为其进一步的应用和开发提供科学依据。

1.5 技术路线

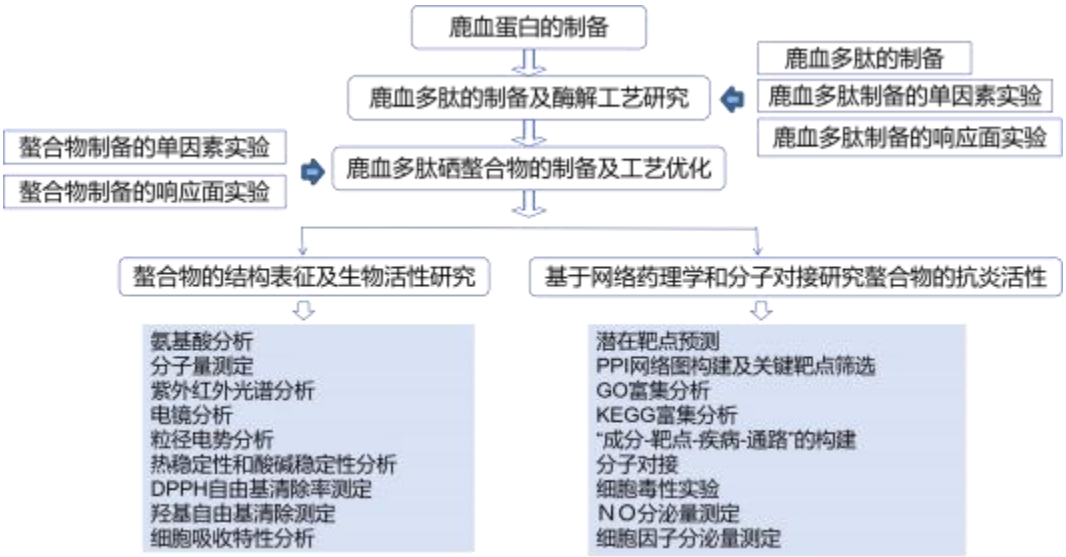


图 1.1 技术路线图

中国知网 https://Www.cnki.net

第 2 章　鹿血多肽酶解工艺研究

2.1 实验材料与仪器

2.1.1 材料与试剂

表 2-1 实验试剂

药品	生产厂家
双阳梅花鹿鹿血	通化承诚药业有限公司
木瓜蛋白酶（100000 U/g）	天津市众联化学试剂有限公司
中性蛋白酶（60000 U/g）	天津市众联化学试剂有限公司
碱性蛋白酶（200000 U/g）	天津市众联化学试剂有限公司
胰蛋白酶（100000 U/g）	天津市众联化学试剂有限公司
氢氧化钠	济南萧试化工有限公司
柠檬酸三钠	国药集团化学试剂有限公司
盐酸	济南萧试化工有限公司

2.1.2 实验仪器设备

表 2-2 主要仪器设备

仪器名称	型号	生产厂家
电子天平	LQ-C20002	上海瑶新电子科技有限公司
落地式全温振荡器	HT-110X30	上海赫田科学仪器有限公司
冷冻干燥机	HD-LG10A	山东霍尔德生物科技有限公司
恒温水浴锅	HH-S6	常州市亿能实验仪器厂
恒温培养箱	HN-25S	青岛聚创环保设备有限公司
高速冷冻离心机	H1850R	湖南湘仪实验仪器开发有限公司
紫外可见分光光度计	UV752	青岛聚创环保设备有限公司
pH 计	FE28-Meter	南京小小生物设备有限公司

2.2 方法

2.2.1 鹿血多肽制备

中国知网 https://Www.cnki.net

1.鹿血蛋白粉的制备

将 5 mL 0.1%的柠檬酸三钠抗凝剂加入新鲜梅花鹿鹿血中，使用高速冷冻离心机（5000 r/min）将混合物离心三次，每次 10 min，取上清液，再经真空冷冻干燥机干燥 1 h，最后经研磨机碾碎，得到鹿血蛋白粉。

2.鹿血多肽粉的制备

在 50 mL 去离子水中加入 5.0 g 经处理得到的鹿血蛋白粉，振荡溶解，加入蛋白酶（加酶量 5000 U/g），使用氢氧化钠（1.0 mol/L）和盐酸（1.0 mol/L）调整 pH，酶解 5 h，结束后升温至 95 ℃灭酶 10 min，完全冷却后，离心（5000 r/min）3 次，每次 10 min，取上清液，经冷冻干燥得到鹿血多肽粉，以备后续实验使用。其中，具体加酶量按公式（1）计算：

$$加酶量（g）=底物量\times加酶量（U/g）/酶活力 \quad (1)$$

2.2.2 鹿血蛋白酶解条件的优化

2.2.2.1 单因素实验

不同蛋白酶、酶解温度、酶解时间和 pH 都会影响鹿血蛋白的水解程度，所以针对这 4 个因素进行了单因素实验，固定操作流程如下：

量取 50 mL 去离子水，加入 5.0 g 鹿血蛋白粉，加入适量蛋白酶，在该蛋白酶最适条件下酶解，（用氢氧化钠和盐酸调节 pH）酶解后，在 95 ℃恒温水浴锅中灭酶 10 min，直至冷却室温，离心（5000 r/min）3 次，每次 10 min，取上清液，以水解度的大小为指标来评定蛋白酶对产物的水解程度，并以此为基准进行后续工艺条件优化。（方法同上述 2.2.1.2 一致）

（1）不同蛋白酶：选取碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶进行实验，调整 pH 为各自的最适 pH，如表 2-3 所示，其余按固定流程进行。

表 2-3 每种蛋白酶的反应条件

蛋白酶	最适 pH	温度（℃）	加酶量（U/g）	水解时间（h）
碱性蛋白酶	8.5	55	5000	5
木瓜蛋白酶	6.0	50	5000	5
胰蛋白酶	8.0	50	5000	5
中性蛋白酶	6.5	50	5000	5

（2）pH：选取碱性蛋白酶酶解，改变 pH 为 7、7.5、8.0、8.5、9.0，其余按固定操作进行。

中国知网 https://Www.cnki.net

（3）酶解温度：选取碱性蛋白酶酶解，改变酶解温度为 30、40、50，60、70 ℃， 其余按固定操作进行。

（4）酶解时间：选取碱性蛋白酶酶解，改变酶解时间为 3、4、5、6、7 h，其余按固定操作进行。

2.2.2.2 水解度测定

水解度用凯氏定氮法和甲醛滴定法测定[1]。凯氏定氮法用于测定样品中的总氮含量，甲醛滴定法用于测定氨基氮含量。按公式（2）计算水解度。

水解度（%）=氨基氮含量/样品中总氮含量×100%　　（2）

2.2.2.3 响应面实验

在单因素的基础上，通过 Design-Expert 8.0.6 软件进行三因素三水平的响应面优化实验，具体设计参数如表 2-4 所示。以鹿血蛋白的水解度为衡量标准。

表 2-4 响应面实验的设计数据

因素	水平		
	-1	0	1
A：酶解温度 （℃）	50	60	70
B：pH	8	8.5	9
C：酶解时间（h）	4	5	6

2.2.3 数据处理

所有测试均重复三次，结果以均数 ± 标准差（ $\bar{x} \pm s.d.$ ）表示。采用 SPSS19.0 统计软件进行数据方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。画图通过 origin 2018 软件完成的。

2.3 结果与讨论

2.3.1 单因素实验结果

（1）不同蛋白酶对鹿血蛋白水解度的影响结果

不同蛋白酶的内肽酶和外肽酶差异会导致蛋白水解程度的不同[26]。为提高鹿血蛋白的水解度，本研究采用四种酶（碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶）水解鹿血蛋白粉。从中图 2.1 可以看出，四种蛋白酶的水解程度存在明显的差异，碱性蛋白酶的水解能力高于另外三种蛋白酶，所以选用碱性蛋白酶酶解鹿血蛋白。这与

中国知网 https://Www.cnki.net

尹馨雪的研究结果一致，在各自最适条件下酶解，碱性蛋白酶水解度相对较高[46]。

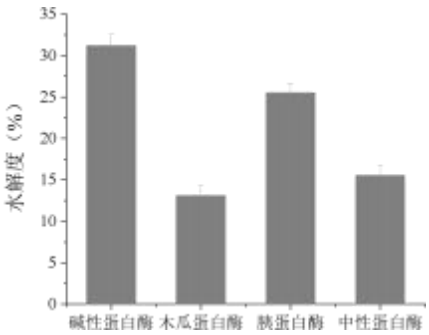


图 2.1 不同蛋白酶对鹿血多肽水解程度的影响

（2）pH 对鹿血蛋白水解度的影响结果

如图 2.2 所示，鹿血蛋白的水解度在 pH 为 8.5 时达到了最高值，为 28.7 ± 0.24%。其整体变化是先升高后下降，变化节点为 8.5。出现该变化趋势是因为酶在最适的 pH 范围内能发挥较好的活性，如果 pH 偏高或偏低都会使酶的稳定性遭到破坏，甚至没有活性，只有在最适 pH 的条件下，解离基团才最利于结合，达到最佳的解离状态[47]。因此，酶解最适 pH 为 8.5。

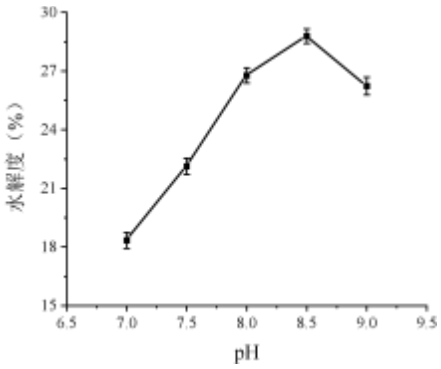


图 2.2 pH 对鹿血蛋白水解度的影响

（3）酶解温度对鹿血蛋白水解度的影响结果

如图 2.3 所示，水解度随着酶解温度的上升而上升，在 60 ℃时达到了最高值 32.2 ± 0. 12%。前期的变化可能是因为温度过低水解不充分，水解度低。后期的变化可能是因为温度过高，导致了空间结构被破坏，影响了水解度。因为蛋白酶本质上是蛋白质，结构的破坏导致了变性，使得蛋白失活，生理功能被破坏，所以酶反应速率下降，水解度下降[48]。因此最佳酶解温度为 60 ℃。

中国知网 https://Www.cnki.net

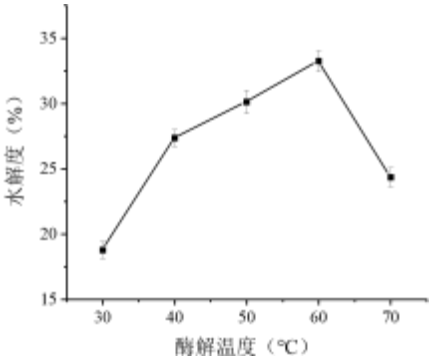


图 2.3 酶解温度对鹿血蛋白水解度的影响

（4）酶解时间对鹿血蛋白水解度的影响结果

由图 2.4 可知，当酶解时间为 5 h 时，水解度达到了最大值，32.5 ± 0.33%，之后随着时间的增加而下降。底物浓度的减少和反应时间过长可能导致酶活力的下降，使得水解度下降。随着酶解产物的增加，新物质的产生也可能会带来一些副反应，最终降低了对鹿血蛋白的水解能力[49]。综合考虑，酶解时间选为 5 h。

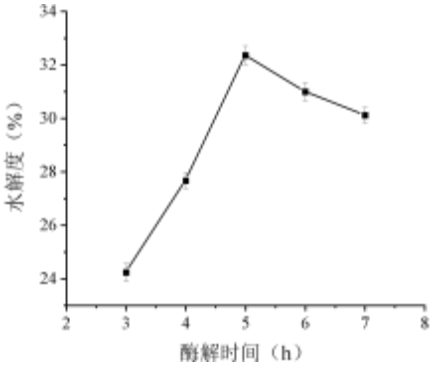


图 2.4 酶解时间对鹿血蛋白水解度的影响

2.3.2 响应面实验结果

在单因素实验的基础上，采用 Design Expert 8.0.6 分析软件分析了pH、酶解温度和酶解时间对水解度的影响，得到了酶解鹿血蛋白的最佳制备条件。结果见表 2-5。

通过对实验数据的多元回归分析，得到了下式鹿血蛋白水解度（Y）与 pH（A）、温度（B）和时间（C）的函数。

$Y=32.862+0.25A-0.42625B+0.02625C-0.6725AB-1.1925AC-0.75BC-2.0535A^2-1.791B^2-1.791C^2$。表 2-6 中 5 个 $P<0.0001$ 和 $F=165.87$ 表明该模型具有高度显著性。R^2 为 0.9953，R^2adj 为 0.9893，说明该模型与实际实验结果一致。由 F 检验可以得出pH、

中国知网 https://Www.cnki.net

温度、时间对水解度的影响由大到小为：pH>温度>时间[50]。AC 的 P<0.0001，这表示温度与时间之间的交互作用对水解度结果的影响显著。

表 2-5 响应面分析的实验设计及结果

实验	A：酶解温度℃	B:pH	C:酶解时间 h	水解度%
1	0	1	-1	29.35
2	1	1	0	28.28
3	-1	0	-1	27.73
4	0	-1	-1	28.86
5	0	0	0	32.82
6	0	0	0	32.71
7	1	0	1	27.92
8	1	-1	0	30.32
9	-1	0	1	29.87
10	0	0	0	32.8
11	-1	-1	0	28.41
12	0	1	1	28.2
13	1	0	-1	30.55
14	0	0	0	32.87
15	-1	1	0	29.06
16	0	0	0	32.88
17	0	-1	1	30.71

表 2.6 响应面回归模型的方差分析

差异来源	平方和	df	均方	F	P	
模型	61.71	9	6.86	165.87	<0.0001	significant
A-酶解温度	0.5	1	0.5	12.1	0.0103	
B-pH	1.45	1	1.45	35.16	0.0006	
C-酶解时间	5.51E-03	1	5.51E-03	0.13	0.7258	
AB	1.81	1	1.81	43.76	0.0003	
AC	5.69	1	5.69	137.61	<0.0001	
BC	2.25	1	2.25	54.43	0.0002	

中国知网 https://Www.cnki.net

续表 2.6 响应面回归模型的方差分析

差异来源	平方和	df	均方	F	P	
A^2	17.76	1	17.76	429.53	<0.0001	
B^2	13.51	1	13.51	326.73	<0.0001	
C^2	13.51	1	13.51	326.73	<0.0001	
残差	0.29	7	0.041			
失拟性	0.24	3	0.078	5.77	0.0617	not significant
净误差	0.054	4	0.014			
总回归	62	16				

图 2.5，图 2.6 和图 2.7 是酶解温度、酶解时间和 pH 三者相互作用的三维响应曲面图，即当三个自变量中任一自变量变为 0 时，剩余自变量对鹿血水解度的交互作用。响应值越显著，响应面越陡；相应参数之间的等高线呈椭圆线，说明两者之间的关系越显著[51]。

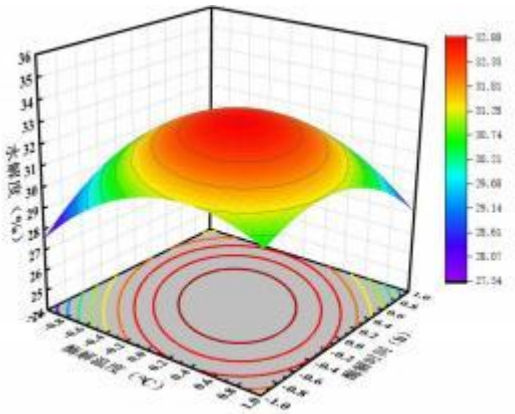


图 2.5 酶解时间与酶解温度对水解度的影响结果

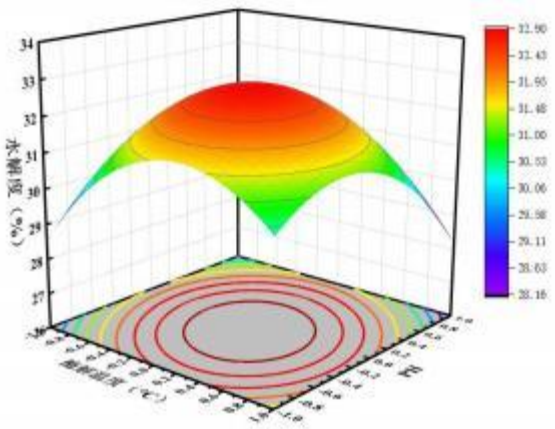


图 2.6 pH 与酶解温度对水解度的影响结果

中国知网 https://Www.cnki.net

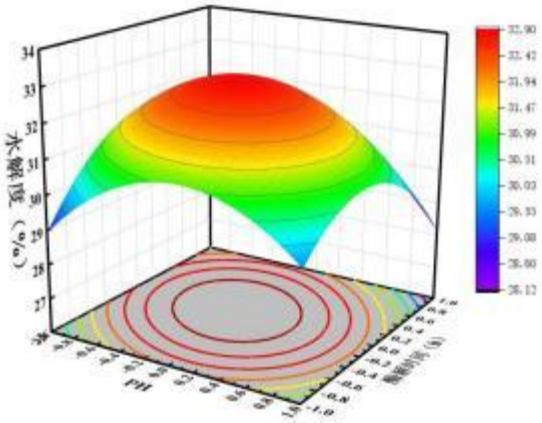


图 2.7 pH 与酶解时间对水解度的影响结果

2.3.3 最优工艺条件的确定及验证

通过响应面优化分析，得到鹿血蛋白酶解的最优预测条件为：酶解温度 60.08 ℃、pH 8.36、酶解时间 5.01 h。为贴合实际操作，将各条件调节为酶解温度 60 ℃、pH 8.4、酶解时间 5 h，进行 3 次平行验证实验，结果显示水解度为 32.7 ± 0.13%，较贴近理论值。所以，最适酶解条件：酶解温度 60 ℃、pH 8.4、酶解时间 5 h。

2.4 本章小结

（1）通过比较碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶对梅花鹿鹿血蛋白水解程度的差异性，筛选出碱性蛋白酶是酶解鹿血蛋白的最适蛋白酶。

（2）通过单因素实验，分别考察了酶解温度、酶解时间和 pH 对梅花鹿鹿血蛋白的酶解效果。在单因素的基础上，利用响应面优化工艺条件，最终得到最佳酶解工艺条件为：酶解温度 60 ℃、pH 8.4、酶解时间 5 h。

中国知网 https://Www.cnki.net

第 3 章　鹿血多肽硒螯合物制备工艺优化

3.1 材料与设备

3.1.1 材料与试剂

表 3-1 实验试剂

药品	生产厂家
鹿血多肽粉	自制
氢氧化钠	济南萧试化工有限公司
盐酸	济南萧试化工有限公司
亚硒酸钠	济南萧试化工有限公司
柠檬酸三钠	济南萧试化工有限公司

3.1.2 实验仪器设备

表 3-2 主要仪器设备

仪器名称	型号	生产厂家
电子天平	JJ124BC	南京昕仪生物科技有限公司
电热鼓风干燥箱	PH-050A	上海一恒科学仪器有限公司
型落地式全温振荡器	LQZ-211	上海精宏实验设备有限公司
冷冻干燥机	HD-LG10A	山东霍尔德生物科技有限公司
恒温水浴锅	HH-S6	常州市亿能实验仪器厂
全自动凯氏定氮仪	KN580	济南阿尔瓦仪器有限公司
高速冷冻离心机	H1850R	湖南湘仪实验仪器开发有限公司

3.2 方法

3.2.1 鹿血多肽硒螯合物制备的单因素实验

螯合反应可能受到许多因素的影响，如肽硒质量比、螯合时间、pH 和螯合温度，所以我们进行了单因素实验来考察各因素的最适条件。操作流程：取 5 mL 的鹿血多肽溶液，加入肽硒质量比为 4:1 的 0.5 mol/L 的亚硒酸钠溶液，搅拌均匀，调整 pH 为

中国知网 https://Www.cnki.net

5.0，在 50 ℃的水浴摇床中反应 40 min。待反应结束后，离心（5000 r/min），取上清液，浓缩至原体积的 1/5，加入 5 倍体积的 95%乙醇，离心（5000 r/min）15 min，除去上清液，用无水乙醇洗涤沉淀 2~3 次，用烘箱低温干燥，得到鹿血多肽硒螯合物粉末。用硒含量作为指标来评估硒的螯合能力。

（1）pH 对螯合率的影响

改变 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0，其余条件按操作流程进行。

（2）螯合温度对螯合率的影响

改变反应温度分别为 30、40、50、60、70 ℃， 其余条件按操作流程进行。

（3）螯合时间对螯合率的影响

改变反应时间为 25、30、35、40、45、50 min，其余条件按操作流程进行。

（4）肽硒质量比对螯合率的影响

改变肽硒质量比为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1，其余条件按操作流程进行。

3.2.2 硒含量及螯合率的测定

采用 3,3′-二氨基联苯胺比色法测定硒含量[45]。根据公式（3）计算硒螯合率：

$$硒螯合率（\%）=（m_1/m_2）\times 100\% \quad （3）$$

其中：m_1 为鹿血多肽硒螯合物中硒的总量g；m_2 为反应体系中硒的总量 g

3.2.3 鹿血多肽硒螯合物制备的响应面实验

不同制备条件会影响鹿血多肽螯合硒元素的能力。以硒螯合率为指标，采用响应面实验考察了温度（℃）、时间（min）、肽硒质量比和 pH 对鹿血多肽螯合能力的影响。除实验变量外，固定条件如下：pH 5.0、温度 50 ℃、时间 40 min、肽硒质量比 4:1。具体水平因素信息如表 3-3 所示。

表 3-3 因素与水平编码表

因素	水平		
	-1	0	1
A：pH	4	5	6
B：时间/min	35	40	45
C：温度/℃	40	50	60
D：肽硒质量比	3:1	4:1	5:1

中国知网 https://Www.cnki.net

3.2.4 数据处理

所有测试均重复三次，结果以均数 ± 标准差（ $\bar{x} \pm$ s.d. ）表示。采用 SPSS19.0 统计软件进行数据方差分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。画图通过 origin 2018 软件完成的。

3.3 结果与讨论

3.3.1 单因素实验结果

（1）pH 对螯合率的影响结果

如图 3.1 所示，硒的螯合率随着pH 的增加而增加，在 5.0 时达到最大值 73 ± 0.25%，随后逐渐降低。这可能是由于 H^+和 Se^{4+}之间对电子供体基团的竞争。pH 超过 5.0 时，螯合率降低，这可能是由于 pH 增大导致硒含量降低，使得螯合率降低。一系列的变化可能是因为 pH 会影响酶和反应底物的某些解离基团的解离状态，从而影响两者的结合或催化，使螯合效果受到影响[52]。综合考虑，最适螯合 pH 为 5.0。

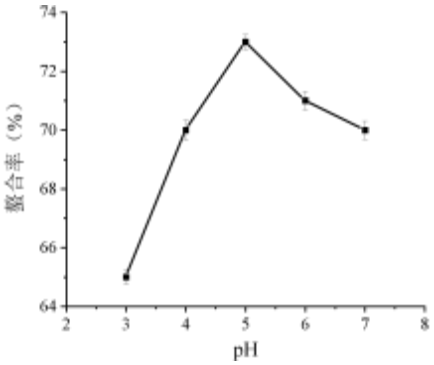


图 3.1 pH 对螯合率的影响

（2）螯合温度对螯合率的影响结果

如图 3.2 所示，随着温度的升高，螯合率先上升，随后降低，该变化趋势和 pH 的变化一致。从图中可以看出，在 50 ℃时螯合率达到最高值为 75 ± 0.15%。高温下螯合率降低，这可能是由于高温下螯合键不容易形成[53]。综合考虑，最适酶解温度为 50 ℃。

中国知网 https://Www.cnki.net

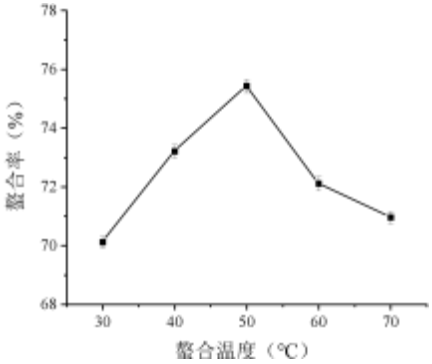


图 3.2　螯合温度对螯合率的影响

（3）螯合时间对螯合率的影响结果

由图 3.3 可看出，随着螯合时间的变长，螯合率逐步增大，在 40 min 时达到最大值（72.08 ± 0.31%），随后降低。随着反应的进行，一方面底物浓度减少，另一方面酶活力受到影响逐渐下降，从而影响了鹿血多肽硒螯合物的稳定性，最终导致其出现该变化趋势。综合考虑，酶解时间选为 40 min。

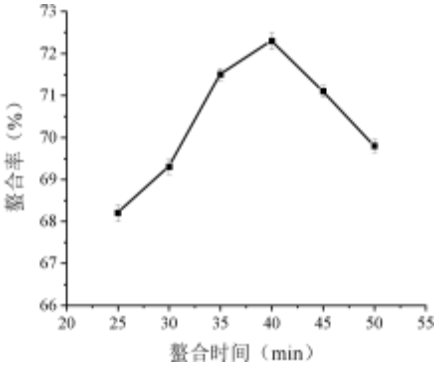


图 3.3　螯合时间对螯合率的影响

（4）肽硒质量比对螯合率的影响结果

如图 3.4 所示，多肽和亚硒酸钠的比例会影响鹿血多肽的螯合速率，无论是配位比太小，还是配位比太大都会导致螯合率的下降，因为配位比太小影响其形成稳定的结构使鹿血多肽硒螯合物不稳定。配位比太大，其利用率会下降，导致肽资源的浪费，所以要考虑成本问题避免浪费[54]。由图 3.4 可以看出，随着肽硒质量比的增加，螯合率逐渐增加，当比例为 4:1 时，螯合率达到了 70.12 ± 0.33%的最大值，随后降低。综合考虑，螯合反应的最佳肽硒质量比为 4:1。

中国知网　https://Www.cnki.net

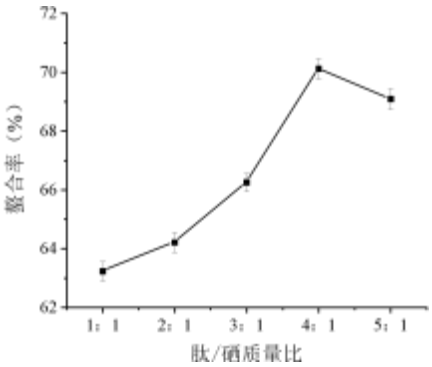


图 3.4 肽硒质量比对螯合率的影响

3.3.2 响应面实验结果

在单因素实验的基础上，采用 Design Expert 8.0.6 软件分析 pH、螯合温度、螯合时间和肽硒质量比对螯合率的影响，得到了鹿血多肽硒螯合物的最佳制备工艺条件。结果见表 3-4 和表 3-5 。通过对实验数据的多元回归分析，如下式说明了肽的硒结合能力（Y）与 pH（A）、螯合温度（B）、螯合时间（C）和肽硒质量比（D）的函数:

$$Y=72.64-0.45A-0.51B-0.027C+0.052D-0.092AB-0.38AC+0.26AD-0.060BC+0.15BD-0.073CD-2.13A^2-1.93B^2-2.88C^2-3.56D^2$$

表 3-5 中 5 个 $P<0.0001$ 和 $F=49.4$ 表明，该模型具有高度显著性。R^2 为 0.9802，R^2adj 为 0.9603，说明该模型与实际实验结果相近。响应值越显著，响应面越陡，相应参数之间的等高线越趋于椭圆线甚至圆线，说明两者之间的关系越显著[55] 。如图 3.5 所示，可以发现各因素之间的相互作用十分紧密，pH 与螯合时间、肽硒质量比与螯合温度、肽硒质量比与 pH、肽硒质量比与螯合时间、pH 和螯合温度、螯合温度与螯合时间的三维响应曲面图都接近圆线。

中国知网 https://Www.cnki.net

表 3-4　响应面分析的结果

实验	A:pH	B：螯合时间	C：螯合温度℃	D：肽硒质量比	螯合率%
1	0	-1	0	-1	67.7
2	0	0	0	0	72.7
3	-1	-1	0	0	69.8
4	0	0	-1	-1	66.22
5	1	0	0	-1	66.51
6	1	1	0	0	67.48
7	0	0	0	0	72.5
8	0	1	0	1	67.1
9	0	0	1	1	66.34
10	-1	0	-1	0	68.12
11	-1	0	0	-1	67
12	1	0	0	1	66.91
13	-1	0	0	1	66.34
14	0	1	0	-1	66.5
15	-1	1	0	0	68.93
16	0	0	0	0	72.6
17	0	-1	1	0	68.15
18	0	1	-1	0	67.1
19	1	0	1	0	66.6
20	0	0	0	0	73.1
21	0	-1	0	1	67.7
22	0	0	0	0	72.2
23	1	-1	0	0	68.72
24	0	1	1	0	66.91
25	1	0	-1	0	67.42
26	0	-1	-1	0	68.1
27	-1	0	1	0	68.8
28	0	0	1	-1	66.34
29	0	0	-1	1	66.51

中国知网　https://Www.cnki.net

表 3-5　回归模型及方差分析

来源	平方和	df	均方	F 值	P 值	显著性
模型	134.07	14	9.58	49.4	<0.0001	significant
A-pH	2.39	1	2.39	12.3	0.0035	
B-螯合时间	3.15	1	3.15	16.26	0.0012	
C-螯合温度	9.08E-03	1	9.08E-03	0.047	0.8318	
D-肽硒质量比	0.033	1	0.033	0.17	0.6858	
AB	0.034	1	0.034	0.18	0.6807	
AC	0.56	1	0.56	2.9	0.1106	
AD	0.28	1	0.28	1.45	0.2487	
BC	0.014	1	0.014	0.074	0.7892	
BD	0.09	1	0.09	0.46	0.5068	
CD	0.021	1	0.021	0.11	0.7468	
A^2	29.39	1	29.39	151.62	<0.0001	
B^2	24.26	1	24.26	125.12	<0.0001	
C^2	53.85	1	53.85	277.77	<0.0001	
D^2	82.26	1	82.26	424.35	<0.0001	
残差	2.71	14	0.19			
失拟性	2.26	10	0.23	2	0.2629	not significant
净误差	0.45	4	0.11			
总回归	136.79	28				

中国知网　https://Www.cnki.net

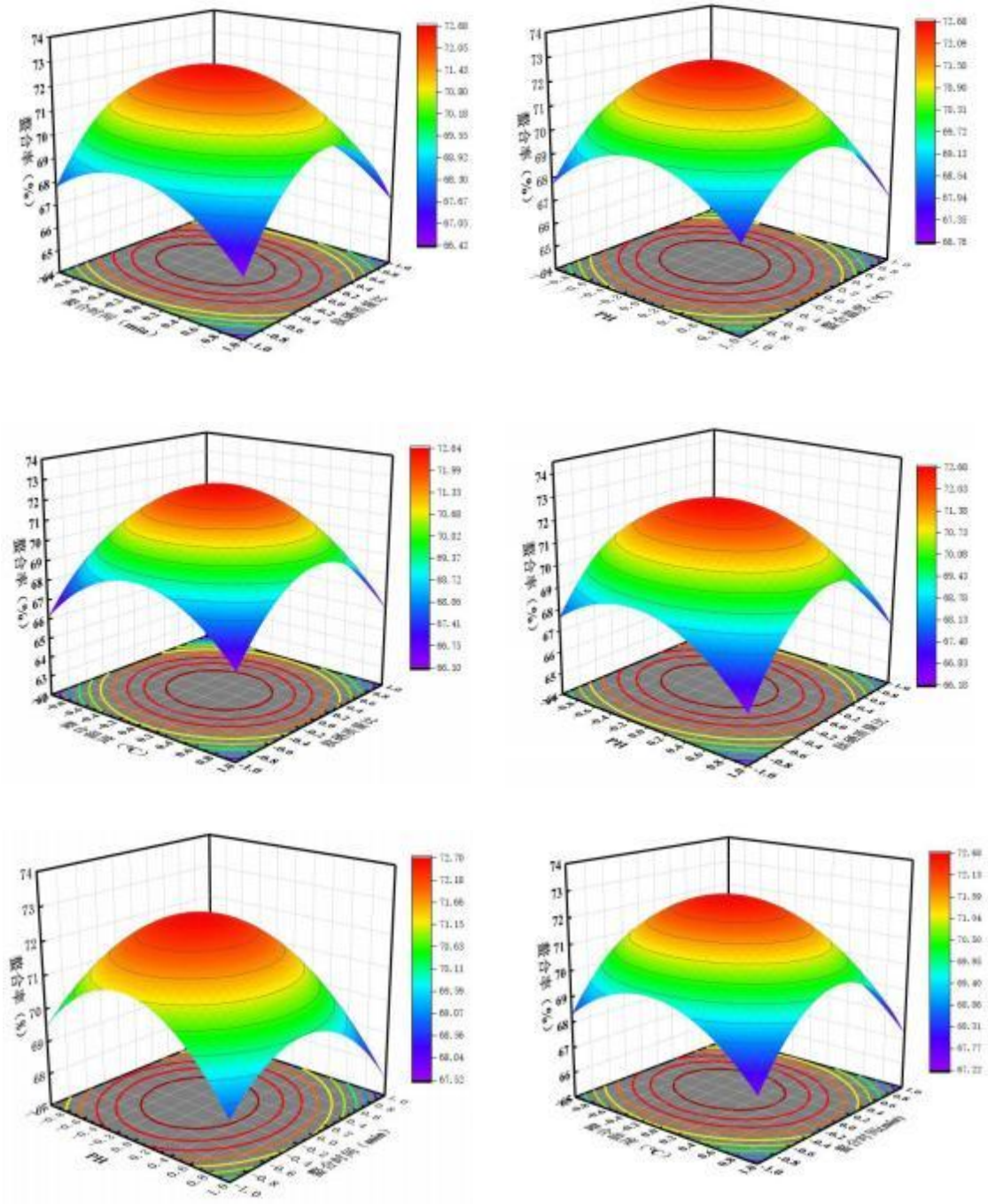


图 3.5 各因素对螯合率的相互作用

3.3.3 最优工艺条件的确定及验证

通过 Design-Expert 8.0.6 软件进行回归分析，得到鹿血多肽硒螯合物的最优预测条件为：肽硒质量比 3.99:1、螯合温度 50.04 ℃、pH 5.35、螯合时间 39.29 min。为了便于实验操作，设置酶解温度 50 ℃、pH 5.4、螯合时间 39 min、肽硒质量比 4:1。在

中国知网 https://Www.cnki.net

这一实验条件下进行了 3 次验证实验，结果显示螯合率的平均值为 72.9 ± 0.14%实际值较为接近理论值，可以推断该模型适用于鹿血多肽硒螯合物的实际生产制备中。鹿血多肽硒螯合物的最佳制备条件：肽硒的质量比 4:1、螯合温度 50 ℃、螯合 pH 5.4、螯合时间 39 min。

3.4 本章小结

（1）以 Se^{4+}螯合率作为指标，对可能产生影响的螯合条件进行了单因素实验，得到对应条件的最优结果：pH 5.0 、螯合温度 50 ℃、螯合时间 40 min、肽硒质量比 4:1。

（2）基于单因素的结果，进行响应面分析，考察了反应温度、反应时间、pH 和肽硒质量比。得到最佳工艺条件：反应时间 39 min、温度 50 ℃、pH 5.4、质量比 4:1。回归方程的验证实验表明该方法具有可行性，为进一步研究鹿血多肽硒螯合物提供了理论基础。

中国知网 https://Www.cnki.net

第 4 章　鹿血多肽硒螯合物的结构表征及生物活性研究

4.1 实验材料与仪器

4.1.1 材料与试剂

表 4-1 主要材料与试剂

药品	生产厂家
鹿血多肽硒螯合物	自制
氢氧化钠	济南萧试化工有限公司
盐酸	济南萧试化工有限公司
Cell Counting Kit-8（CCK-8）细胞增殖毒性检测试剂盒	日本同仁化学研究所

4.1.2 实验仪器设备

表 4-2 主要仪器设备

仪器名称	型号	生产厂家
电子天平	JJ124BC	南京昕仪生物科技有限公司
恒温水浴锅	HT-110X30	上海赫田科学仪器有限公司
高速冷冻离心机	H1850R	湖南湘仪实验仪器开发有限公司
微滤膜	SFP-2860（0.45 μm）	苏州泽莱源环保科技有限公司
紫外可见分光光度计	UV752	青岛聚创环保设备有限公司
氨基酸自动分析仪	Artemis 6000	天美仪拓实验室设备有限公司
傅里叶变换红外光谱仪	MI 10	国仪量子技术（合肥）股份有限公司
扫描电子显微镜	Quanta 200 FEG	荷兰 FEI 公司
梅勒特-托利多 pH 计	FE28-Meter	南京小小生物设备有限公司
超净工作台	SW-CJ-1F	南京小小生物设备有限公司
CO_2 培养箱	HCP-80	海尔生物医疗
酶标分析仪	RT-6100	深圳雷杜生命科学股份有限公司
真空干燥器	400 mm	成都宜邦科析仪器有限公司
倒置显微镜	MI52	广州市明美光电技术有限公司

中国知网 https://Www.cnki.net

4.2 方法

4.2.1 相对分子质量测定

使用高效凝胶过滤色谱法分析[56]。首先将适量的鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物溶解在蒸馏水中，制备质量浓度为 1.0 mg/mL 的样品。将处理过的样品用 5%三氯乙酸处理 2 h，以 5000 r/min 的速度离心 15 min，收集上清液，再用 8000 r/min 离心 10 min。

色谱实验的具体条件如下：使用高效液相色谱仪作为仪器，采用柱型号为 10/300 GL 的柱。流动相组成为磷酸盐缓冲液中含有 0.02 mol/L 的物质，另外加入氯化钠浓度为 0.25 mol/L，使其 pH 维持在 7.2。流速设定为 0.3 mL/min。柱温：35 ℃。相对分子质量校正标准曲线：胰岛（Mr.=6000）；L-氧化型谷胱甘肽（Mr.=612.63）；Gly-Leu（Mr.=206.24）；白藻素（Mr.=457.6）。

相对分子质量与保留时间的回归方程为：Log(Mr.)=5.4418-0.0541t

r=0.9960，P<0.01，其中 Mr.为相对分子质量，t 为保留时间。

4.2.2 氨基酸分析

称取 1.0 g 鹿血多肽和 1.0 g 鹿血多肽硒螯合物放入水解管中，添加 10 mL 浓盐酸（浓度为 6.0 mol/L），确保管口真空密封。在 100 ℃下反应 24 h，冷却至室温后，加入 10.0 mol/L NaOH 溶液中和盐酸，定容至 50 mL。取 2 mL 过滤液放入旋转蒸发瓶中蒸发至恒重，取样品，加入 200.0 μL 超纯水重溶后过膜处理，于 23 ℃下静置 1 h，配制氨基酸测定溶液，用氨基酸分析仪测定。

4.2.3 紫外-可见吸收光谱

分别称取 1.0 g 鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物溶于去离子水（1.0 mg/mL）中，设定波长范围为 200~400 nm，在此范围内进行全波长的紫外扫描。

4.2.4 傅里叶红外光谱

在玛瑙研钵中分别放入 1.0 mg 鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物，再加入 100.0 mg 干燥后的 KBr，研磨均匀，放入压片装置，施加 20 MPa 的压力，待 1 min 后取出压片，压片呈现半透明状态。随后使用傅里叶红外光谱仪对其进行定性分析，获得波长在 500~4000 cm^{-1} 之间的红外光谱图。

中国知网 https://Www.cnki.net

4.2.5 扫描电镜

分别取 2.0 mg 鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物，在样品台上将其平整铺开，用吸耳球吹平。样品进行喷涂和溅射镀金处理，使用扫描电子显微镜进行聚焦，将放大倍数设定为 3000 倍进行观察，并保存图像。

4.2.6 电势分析

将 1.0 mg 鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物分别配制成浓度为 1.0 mg/mL 的溶液，溶于去离子水，37 ℃反应 10 min，用 Nano-2sZEN3600 纳米颗粒尺寸电位仪测定其电位[57]。

4.2.7 稳定性研究

4.2.7.1 鹿血多肽硒螯合物的热稳定性

配制 5.0 mg/mL 的鹿血多肽硒螯合物溶液，分别放置在 23（控制组）、40、60、80、100 ℃的水中浸泡 2 h，冷却至室温，透析 60 h 后测定其硒保留率。以控制组的硒保留率为 100%，通过测量不同温度下样品的硒保留率来评估其稳定性。（硒含量测定同 3.2.2 一致）

4.2.7.2 鹿血多肽硒螯合物的酸碱稳定性

配制 5.0 mg/mL 的鹿血多肽硒螯合物溶液，以原液为控制组，将样品浸泡在不同 pH（2、4、6、8、10 和 12）的恒温水中 2 h，冷却至室温，透析 60 h 后测定其硒保留率。以控制组的硒保留率为 100%，通过测量样品在不同 pH 下的硒保留率来评估其稳定性。（硒含量测定同 3.2.2 一致）

4.2.8 鹿血多肽硒螯合物体外抗氧化活性研究

4.2.8.1 DPPH 自由基清除率实验

配制浓度（0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL）的鹿血多肽硒螯合物、鹿血多肽和 Vc。取适量 DPPH 粉末，无水乙醇溶解配成 100 μM DPPH 工作液。实验组（A_1）的处理方式是将 2 mL 工作液与 2 mL 样品液混合，对照组（C_1）是将 2 mL 工作液和 2 mL 蒸馏水混合，空白组（A_0）是将 2 mL 样品液与 2 mL 无水乙醇混合。在室温条件下，混匀后静置 30 min，用蒸馏水进行零点校准[58]。测定吸光度（517 nm）按公式（4）计算：

$$\text{DPPH 自由基清除能力（\%）}=[1-(A_1-A_0)/C_1]\times 100\% \quad (4)$$

中国知网 https://Www.cnki.net

4.2.8.2 羟基自由基清除率实验

利用 H_2O_2 与 Fe^{2+}混合产生羟基（·OH），在体系中加入水杨酸捕捉·OH 并产生有色物质，该物质在 510 nm 波长处有最大吸收。分别配制不同浓度（0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mg/mL）的鹿血多肽硒螯合物、鹿血多肽和抗坏血酸溶液，首先加入 1 mL 浓度为 6 mM 的硫酸亚铁溶液，随后加入 1 mL 浓度为 6 mM 的水杨酸乙醇溶液，接着加入 1 mL 待测样品液和 1 mL 过氧化氢溶液，蒸馏水定容至 10 mL，在 37 ℃水浴中反应 30 min，测定 510 nm 处的吸光值 A_1[59]。用蒸馏水代替过氧化氢溶液再次测定吸光度值 A_2，随后用双蒸馏水代替样品液测定吸光度值 A_0。以蒸馏水为参比，按公式（5）计算：

$$羟基自由基清除率（\%）=[1-(A_1-A_2)/A_0]\times 100\% \quad (5)$$

4.2.9 在 Caco-2 细胞单层模型研究硒离子的转运吸收

4.2.9.1 Caco-2 细胞培养及单层模型建立

根据相关制备方法[60]，稍作修改。将复苏后的 Caco-2 细胞接种在 25 cm^2 的含有 5 mL 10%胎牛血清的 DMEM 培养基的透明细胞培养瓶中，放置 5% CO_2、37 ℃的细胞培养箱中培养 24 h，待细胞附着在容器壁后进行培养液更换。使用磷酸盐缓冲液（PBS）清洗细胞 2~3 次，并更换新的培养基。细胞生长至 90%~100%融合状态时，加入含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶 1 mL 消化 4 min，当大部分细胞开始脱落时，加入 4 mL 新鲜的培养基来停止消化，使用移液枪反复吸吮和喷射，使细胞呈现单个均匀分散状态后以 1:2 进行传代。

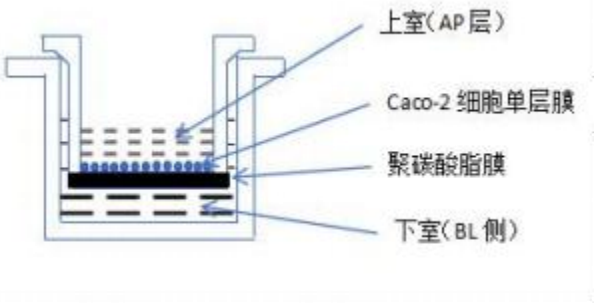


图 4.1 Transwell 板构建 Caco-2 细胞的单层模型

Caco-2 细胞单层模型如图 4.1 所示。根据相关制备方法[61]，稍作修改。当细胞处于 15-20 代，且生长状况良好时，配制成细胞浓度为 1×10^5 的细胞悬液。将 Caco-2 细胞接种到 Transwell 渗透膜上。上室添加 0.5 mL 细胞培养基，下室加入 1.5 mL 培养液。在初始 7 天里，隔天更换培养液，之后改为每天更换，直至 Caco-2 细胞形成

中国知网 https://Www.cnki.net

单层满足验证要求。Caco-2 细胞培养 21 天后再进行转运吸收实验[62]。

4.2.9.2 Caco-2 细胞的存活率测定

参照文献[63]的方法，并稍作修改。对照组：细胞+基础培养液；实验组：细胞+不同浓度（1.25、2.5、5、10、15、20、25、30 g/mL）鹿血多肽硒螯合物溶液。空白组：基础培养液。将 Caco-2 细胞以每孔 1×10^4 细胞的密度接种到 96 孔板中，再分别将 100 mL 的细胞悬液加入对照组和实验组，在 37 ℃、5% CO_2 的条件下培养 24 h。在实验组相应孔中加入 100 μL 预先配好的各浓度的鹿血多肽硒螯合物溶液，去除培养基，PBS 清洗。每个实验孔中加入含有 10% CCK8 的基础培养液各 100 mL，在 37 ℃下孵育 2 h，测量波长为 450 nm 的吸光度。按公式（6）计算细胞存活率，筛选对细胞无毒性的鹿血多肽硒螯合物溶液浓度，每组实验重复三次。

细胞存活率（%）=（实验 OD-空白 OD）/（对照 OD-空白 OD）×100%　　（6）

4.2.9.3 Caco-2 细胞极性验证

在建立 Caco-2 细胞单层模型的过程中，必须监测细胞单层模型的跨膜电阻（TEER）值的变化情况，以便研究药物的渗透性[64]。需要将 MillicellERS-2 型细胞电阻仪的电极分别放置在 TranswellTM 培养板的 AP 侧小室和 BL 侧小室来测量电阻值[65]。按公式（7）计算 TEER 值。

TEER（Ω・cm^2）=[TEER（Ω）-TEER 空白（Ω）]×支持膜面积（cm^2）　　（7）

其中支持膜面积为 1.12 cm^2。

碱性磷酸酶（Alka line phosphatase，AKP）的活力水平可以反映肠上皮细胞的分化程度和功能状态[66]。当细胞的 TEER 值超过 200 cm^2 后，每隔 2 天分别从细胞的 AP 侧和 BL 侧取出培养基，使用碱性磷酸酶试剂盒来测定 AKP 的活性[67]。

4.2.9.4 Caco-2 细胞转运吸收实验

Se^{4+}不同浓度梯度转运实验：在实验中制备不同浓度的亚硒酸钠溶液（0.5、1、2、4.0 mg/mL），将其溶解于 HBSS 缓冲溶液中后，放入 37 ℃的水浴中。在建立了 21 天的 Caco-2 单层模型后，清洗 12 孔 TransWellTM 板的上下室各 3 次，然后向下室中加入 1.5 mL 预热的 HBSS，向上室中注入 0.5 mL 的亚硒酸钠溶液，3 h 后取下室溶液，原子吸收光谱法测定其硒含量[63]。

鹿血多肽硒螯合物的转运实验：操作如 Se^{4+}转运实验，清洗后，下室加入 1.5 mL 预热的 HBSS，上室分别加入统一 Se^{4+}浓度的亚硒酸钠、硒代蛋氨酸、亚硒酸钠+鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物溶液。3 h 后取下室溶液，原子吸收光谱法测定其硒含量。其中，各溶液分别取自经 25 mL 容量瓶定容后的溶液。Se^{4+}浓度的计算方法：亚硒酸钠水溶液的质量浓度；硒代蛋氨酸和鹿血多肽硒螯合物同 3.2.2 一致。鹿血多肽的含量等同于鹿血多肽硒螯合物的含量）按公式（8）计算硒生物利用率。

中国知网 https://Www.cnki.net

$$硒生物利用率（\%）=（A+B）/C\times100\% \quad （8）$$

式中：A 为转运硒含量（μg/孔）；B 为细胞硒含量（μg/孔）；C 为总硒含量（μg/孔）。

4.2.10 数据处理

所有测试均重复三次，结果以均数 ± 标准差（ $\bar{x}$ ± s.d. ）表示。采用 SPSS19.0 统计软件进行数据方差分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。画图通过 origin 2018 软件完成的。

4.3 结果与讨论

4.3.1 分子量测定

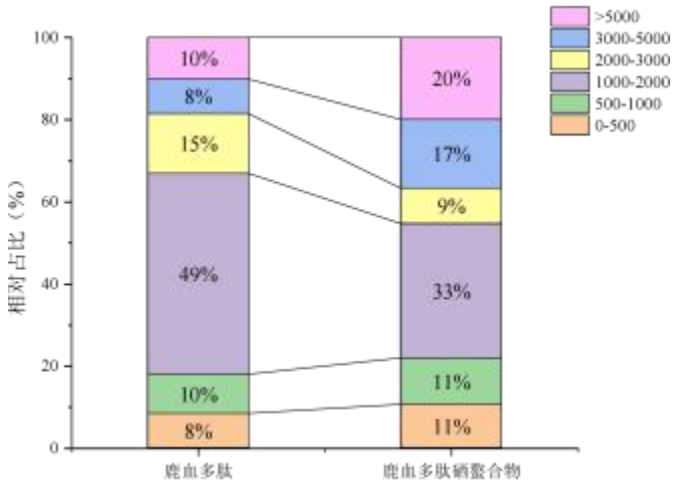


图 4.2 鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物的相对分子质量分布

多肽的分子质量已被证明是影响其金属螯合活性的一个因素[68]。有研究表明低分子量（<500 Da）肽段比高分子量（>500 Da）肽段具有更高的金属螯合活性。例如，鹰嘴豆蛋白的低分子量肽（<500 Da）比高分子量肽具有更高的铁螯合能力[69]，如图 4.2 所示，鹿血多肽中分子量为<2000 Da 的多肽的含量为 67%，这意味着鹿血多肽可能也具有显著的硒螯合能力。鹿血多肽硒螯合物中分子量<2000 Da 的多肽含量显著降低至 55%。别的研究也有类似的结果，螯合后分子量<1000 Da 的肽含量显著降低至 41.95 ± 0.74%[70]。此外，分子量>2000 Da 的显著增加，说明分子量<2000 Da 的多肽可能在螯合反应中发挥了重要作用，这与上述结果一致。根据比例关系，我们可以发现小分子量的多肽占多数，说明鹿血多肽在一定程度上有利于螯合。

中国知网 https://Www.cnki.net

4.3.2 氨基酸分析

表 4-3 氨基酸组成成分

氨基酸	组成部分（mg/100 mg）	
	鹿血多肽	鹿血多肽硒螯合物
Asp	8.32	10.14
Glu	9.1	11.3
Ser	5.84	2.64
His	3.62	3.94
Gly	3.41	1.38
Thr	5.21	2.71
Arg	4.03	5.03
Ala	4.55	5.23
Tyr	1.57	0.13
Cys-s	8.62	2.04
Val	10.21	11.32
Met	1.97	10.87
Phe	4.87	5.30
Ile	4.23	3.54
Leu	11.56	13.49
Lys	6.40	6.62
Pro	6.53	4.32
带负电荷的氨基酸（Glu and Asp）	17.42	21.44
带正电荷的氨基酸（Lys,Arg and His）	16.05	12.59
疏水氨基酸	43.92	44.07
必需氨基酸	41.43	45.30

反应前后氨基酸比例的变化表明氨基酸与 Se^{4+}结合活性的强弱。研究表明，螯合活性较好的多肽通常含有较多量的酸性和碱性氨基酸[71]。如表 4-3 所示，鹿血多肽中谷氨酸（9.1%）、天冬氨酸（8.32%）、组氨酸（3.62%）、精氨酸（4.03%）和赖氨酸（6.4%）均升高，且总量为 31.47 mg/100 mg。其中天冬氨酸和谷氨酸的含量分别增加了 1.82 mg/100 mg 和 2.2 mg/100 mg，说明它们在螯合过程中起着重要作用，进一步推断可能是天冬氨酸和谷氨酸的侧链基团微 Se^{4+}提供结合位点。鹿血多肽和鹿血

中国知网 https://Www.cnki.net

多肽硒螯合物的必需氨基酸含量分别占总氨基酸含量的 41.43%和 45.3%，说明鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物都具有营养价值。此外，鹿血多肽硒螯合物中带负电荷的氨基酸和疏水氨基酸占多数，分别占 12.59%和 44.07%，这可能是因为带负电荷的羧基和疏水氨基酸残基有利于金属键合。

4.3.3 可见-紫外光谱分析

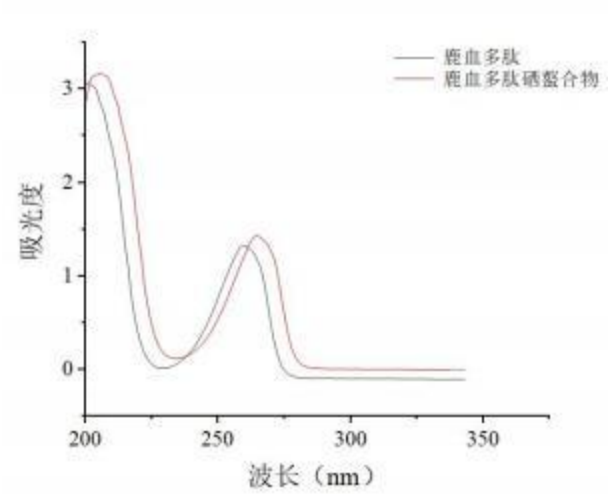


图 4.3 鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物的紫外光谱扫描光谱

螯合物的出现可能会导致新吸收峰的出现或原始吸收峰的位移或消失[72]，因此可以用紫外吸收光谱来分析是否有螯合物的产生。由图 4.3 可知，鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物的紫外光谱有显著差异。鹿血多肽在 259 nm 处有一个吸收峰，说明有羧基的存在，其最大吸收峰在 201 nm 处。鹿血多肽硒螯合物的吸收峰分别移至 264 nm和 205 nm，吸光度也有所增加，说明螯合作用改变了物质结构并产生了新的螯合物，这与 Wu 等人的结果相似[73]。鹿血多肽硒螯合物具有较强的光吸收结构，这可能是鹿血多肽与 Se^{4+}螯合后的价电子跃迁，因为金属离子和螯合物都能吸收某些波长的紫外区域，导致了电子跃迁。同时，配体的成键作用也会导致配体内的电子跃迁，而价电子跃迁的改变会引起紫外吸收的变化。这一结果与罗非鱼皮肤胶原蛋白螯合的结果相似，她们在文中提到的罗非鱼皮肤胶原蛋白螯合后，氧化铁的特征宽吸收带在 220~260 nm 消失，和相应的芳香族氨基酸的特征吸收带移动到 250~280 nm，最大吸收强度增加[74]。

中国知网 https://Www.cnki.net

4.3.4 傅里叶红外光谱分析

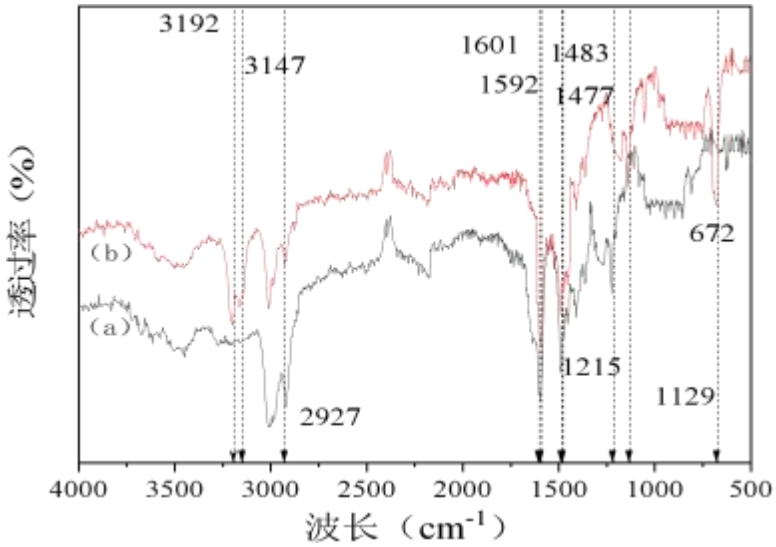


图 4.4 鹿血多肽（a）和鹿血多肽硒螯合物（b）的红外扫描光谱

红外光谱学可以有效地区分两种物质之间的结构差异，因此它被广泛应用于有机基团与金属离子之间的反应[75]。图 4.4 的结果表明两者红外光谱的强度和峰值位置存在差异。与螯合前相比，鹿血多肽硒螯合物在 2927 cm^{-1} 附近的吸收峰变窄，说明不存在游离羧基。吸收峰分别在 3192 cm^{-1} 和 3147 cm^{-1} 附近，表明存在氨基。有研究报道，多肽与 Se^{4+}的螯合机制是 Se^{4+}同氨基和羧基以共价键的形式配合[76]。这和我们的研究结果类似。在 1483 cm^{-1} 处的吸收带对应于多肽中的酰胺 I 带，在螯合后移动到较低的波数 1477 cm^{-1}，证明 C=O 基团参与了与 Se^{4+}的共价键螯合反应[77]。螯合反应后，羧基的特征波数从 1483 cm^{-1} 变化到 1477 cm^{-1}，说明硒的螯合位点与肽链中的羧酸基有关。1215 cm^{-1} 的波长在螯合后移动到 1129 cm^{-1} 处，这与在罗非鱼皮肤胶原肽锌螯合的红外分析结果相类似[74]。此外，鹿血多肽硒螯合物在 672 cm^{-1} 处出现了一个新的吸收峰，这在肽谱中并不存在。样品特征峰的出现程度不同。蓝移或红移证明了样品的分子结构发生了改变，形成了新的物质[78]。这些结果表明，Se^{4+}主要通过肽的羧基氧和氨基氮原子与肽结合。

中国知网 https://Www.cnki.net

4.3.5 扫描电镜分析

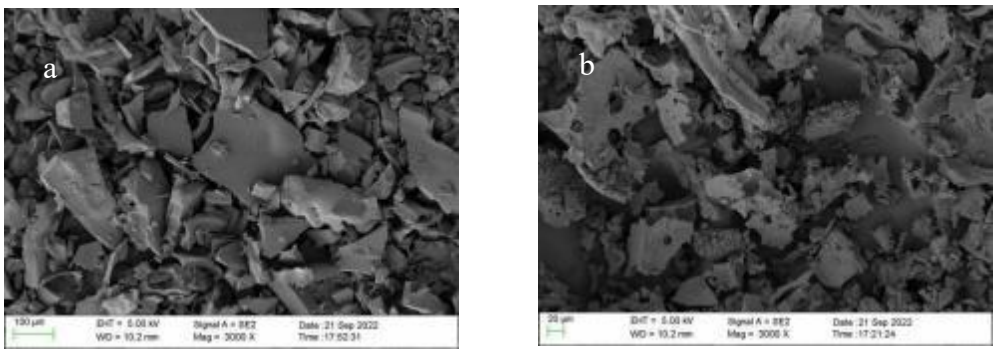


图 4.5 鹿血多肽（a）和鹿血多肽硒螯合物（b）的扫描电镜（扩增 3000 倍）

如图 4.5 所示，在螯合前（a），鹿血多肽表面相对光滑、平坦，结构松散，呈片状。螯合后（b），鹿血多肽硒螯合物结构致密，是一个小颗粒聚集物，这可能是因为金属离子与多肽之间的相互作用促进了多肽的聚集[79]。水分子之间的氢键导致肽链中羧基和氨基的聚集，最终形成颗粒，形态结构的变化说明鹿血多肽的某一个空间为硒提供了一个结合位点，形成了鹿血多肽硒螯合物。两者在电子显微镜上的差异证明了新物质的产生，结果与 Yuan 研究相似[80]。

4.3.6 电势分析

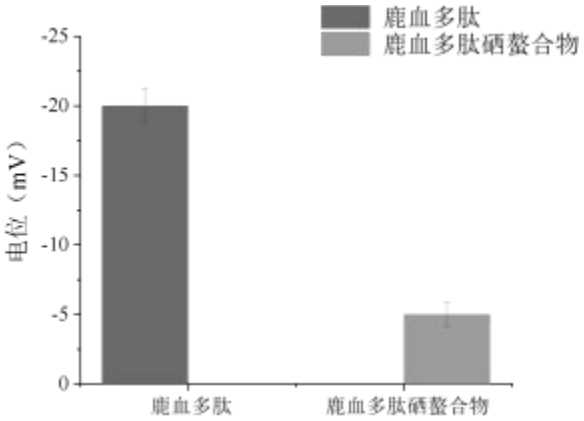


图 4.6 鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物的 zeta 分布

由于各种氨基酸残基的部分电离，产生了蛋白质颗粒的表面电荷[81-84]。经测定鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物的 zeta 电位分别为-20 mV 和-5 mV（图 4.6）。鹿血多肽硒螯合物的 zeta 电位值高于鹿血多肽说明经过螯合后，多肽表面的负电荷明显降低，

中国知网 https://Www.cnki.net

这可能是由于多肽与 Se^{4+}反应过程中的电子迁移所致[85]。zeta 电势作为一种物理化学指标，在一定程度上反映了粒子的表面电荷状态[86]。鹿血多肽硒螯合物的 zeta 电位值高于鹿血多肽，表明金属离子可能螯合到带负电荷的部分，因此 Se^{4+}可能与羧基结合。

4.3.7 热稳定性分析

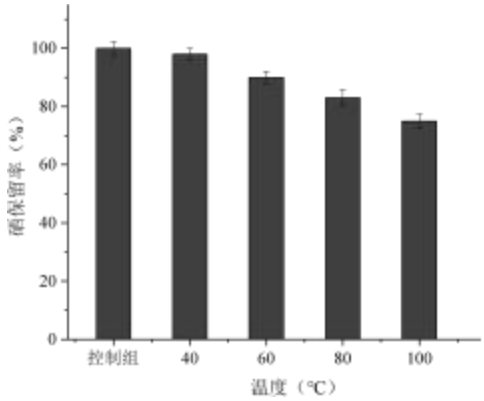


图 4.7 不同温度对硒保留率的影响

图 4.7 是不同温度下鹿血多肽硒螯合物的硒保留率示意图。在 40 ℃时，硒保留率在 98.9%。随着温度的增加，硒含量明显下降。在 100 ℃时，螯合硒含量仍保持在 75%以上，这表明鹿血多肽硒螯合物具有较高的热稳定性。这可能是由于鹿血多肽硒螯合物的结构在高温下被破坏，导致肽与金属的结合位点被破坏，导致稳定性较差[87-88]。

4.3.8 酸碱稳定性分析

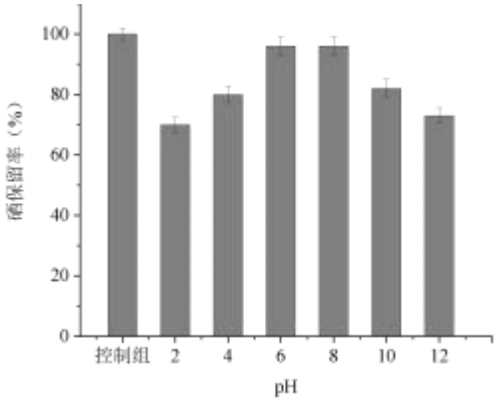


图 4.8 不同 pH 对硒保留率的影响

中国知网 https://Www.cnki.net

在不同的 pH 下，鹿血多肽硒螯合物处理后的硒保留率如图 4.8 所示。可以看出，在中性或弱碱性条件下，硒的保留率较高，达到 95%以上。结果表明，在 pH 2、4 和 12 的酸性和强碱性环境中，硒含量显著降低，但最低的硒含量仍在 70%以上。这可能是因为在不同的 pH 环境下，蛋白质结构会发生变化，肽链被破坏，螯合硒脱落[89]。虽然 pH 会产生影响，但硒的保留率仍然很高，说明鹿血多肽硒螯合物具有酸碱稳定性。

4.3.9 对 DPPH 自由基清除率测定

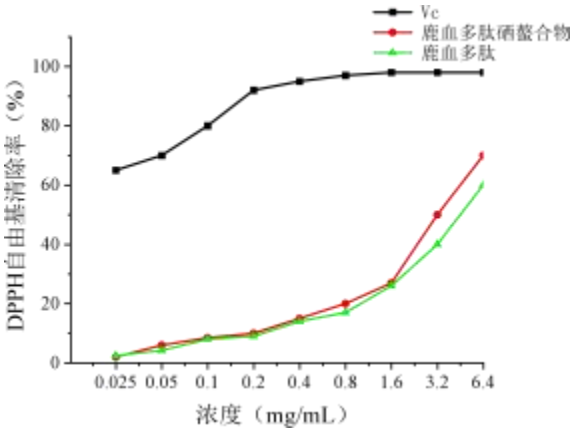


图 4.9 不同浓度的鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物的 DPPH 自由基清除率图

如图 4.9 所示，鹿血多肽硒螯合物和鹿血多肽的 DPPH 自由基清除率随着浓度的增大均逐渐上升，当浓度为 6.4 mg/mL 时，鹿血多肽的清除率为 63.2 ± 0.25%，鹿血多肽硒螯合物的清除率高达 75.56 ± 0.32%，说明鹿血多肽硒螯合物较鹿血多肽有较好的抗氧化性，这可能是因为硒离子本身具有抗氧化性[90]，两者的螯合进一步增强了抗氧化能力。

中国知网 https://Www.cnki.net

4.3.10 对羟基自由基清除率测定

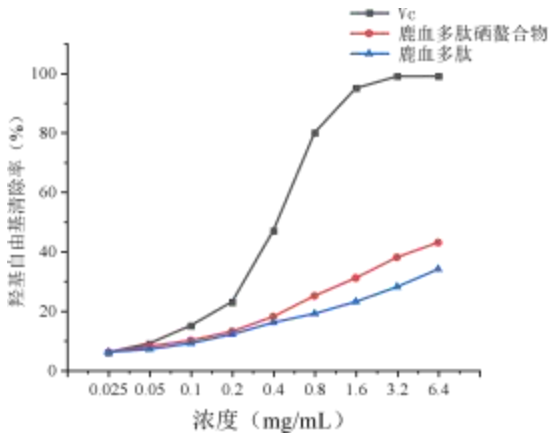


图 4.10 不同浓度的鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物的羟基自由基清除率图

如图 4.10 所示，鹿血多肽硒螯合物和鹿血多肽的羟基自由基清除率随着浓度的增大而逐步上升，当浓度达到 6.4 mg/mL 时，鹿血多肽的清除率为 22.8 ± 0.28%，而鹿血多肽硒螯合物的清除率则高达 31.3 ± 0.36%，说明相较于鹿血多肽，鹿血多肽硒螯合物对羟基自由基具有更好的清除效果。这可能是因为硒离子具有抗氧化性，而多肽结合了硒离子后增强了抗氧化性[91]，使得鹿血多肽硒螯合物在清除羟基自由基方面表现出更高的活性。

4.3.11 对 Caco-2 细胞的毒性评价

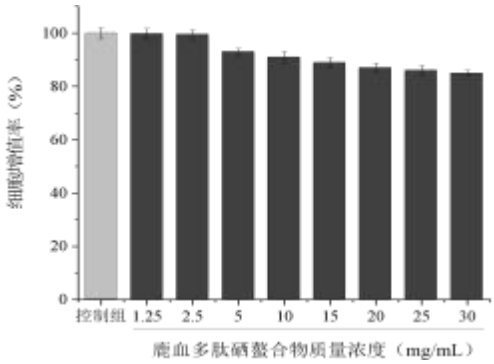


图 4.11 不同浓度的鹿血多肽硒螯合物对细胞增殖的影响

探究不同浓度鹿血多肽硒螯合物溶液是否会对细胞增殖产生影响，以筛选安全药物浓度范围。如图 4.11 所示，随着浓度升高，鹿血多肽硒螯合物作用细胞 24 h 后对细胞增殖会产生抑制作用，但不明显。从图 4.11 可以看出在 2.5 mg/mL 浓度范围以内，鹿血多肽硒螯合物对 Caco-2 细胞不会有损害。

中国知网 https://Www.cnki.net

4.3.12 Caco-2 细胞单层模型的 TEER 值及 AKP 活性测定

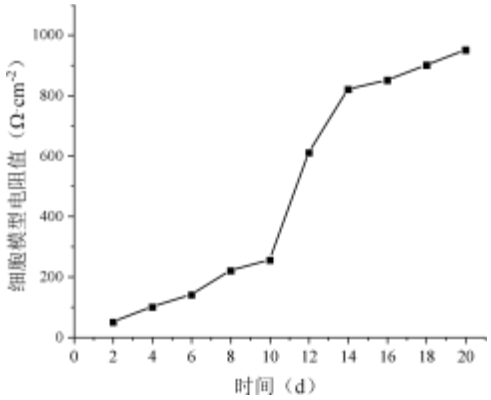


图 4.12 Caco-2 细胞单层模型的跨膜电阻

（1）由图 4.12 可知，由于 Caco-2 细胞黏附在细胞壁上，细胞分裂尚未完成融合，TEER 值在建模后 10 天内几乎没有太大幅度地增加。第 10 天开始 TEER 值迅速升高，第 14 天达到 820 Ω·cm^{-2}，这说明 Caco-2 细胞从第 10 天开始融合，且它保持了相当的一致性[92]。有文献指出，TEER 值大于 250 Ω·cm^{-2} 时 Caco-2 细胞已形成致密的单层膜结构，可以用于药物的转运实验研究[93]。

表 4-4 不同培养时间Caco-2 细胞单层膜两侧 AKP 变化情况

培养天数/d	AP 侧酶活力/金氏单位 ·（100 mL）	BL 侧酶活力/金氏单位 ·（100 mL）	AP 侧酶活力/BL 侧酶活力/
10	1.25 ± 0.03	1.16 ± 0.21	1.07
14	1.89 ± 0.15	1.21 ± 0.12	1.56
18	2.15 ± 0.21	1.24 ± 0.08	1.73
21	4.66 ± 0.31	1.42 ± 0.11	3.28

（2）AKP 是 Caco-2 细胞单层模型建立过程中分泌的标志性酶，若 Caco-2 细胞单层的极化性优越，则 AP 侧的 AKP 活性应远高于 BL 侧的活性[94]。如表 4-4 所示，第 10 天 AP 和 BL 之间的 AKP 活力比为 1.07，表明尚未获得所需的细胞极化水平。第 21 天，AP/BL 酶活性比值达到 3.28。从表中可以发现随着潜伏期延长，AKP 活性呈现上升的趋势。这意味着 Caco-2 细胞单层模型的极化阶段已经基本完成，可以用于药物转运实验[91]。

中国知网 https://Www.cnki.net

4.3.13 Caco-2 细胞转运实验

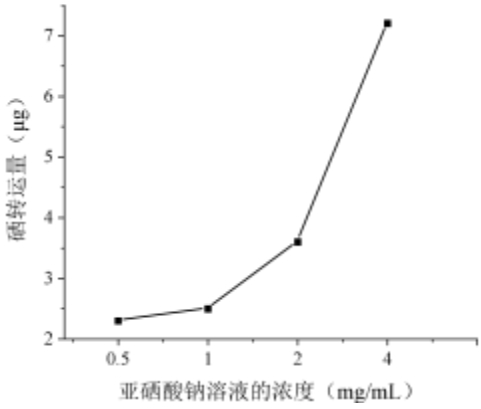


图 4.13　不同浓度亚硒酸钠溶液的硒转运量

由图 4.13 可知，在建模 21 d 后，在上室中加入 0.5 mL 不同浓度的亚硒酸钠溶液，3 h 后测定下室中的 Se^{4+}含量，发现随着 Se^{4+}浓度的增大，下室中硒的转运量增大，并呈现一定的剂量依赖性。说明Caco-2 单层细胞模型建立成功，具有转运药物的能力,可以用于鹿血多肽硒螯合物的 Se^{4+}转运实验。

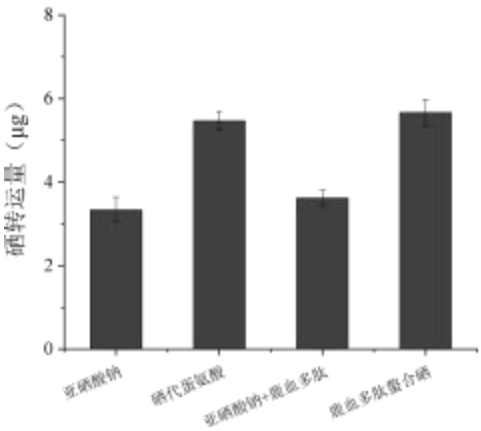


图 4.14　亚硒酸钠、硒代蛋氨酸、亚硒酸钠+鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物对 Caco-2 单层细胞模型硒转运量的影响

图 4.14 发现，在上室加入的亚硒酸钠、硒代蛋氨酸、亚硒酸钠+鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物，3 h 后测定下室硒含量，亚硒酸钠的硒转运量为 3.34 μg，硒代蛋氨酸、亚硒酸钠+鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物的硒转运量分别为5.47 μg、3.62 μg 和5.67 μg。结果表明鹿血多肽硒螯合物的 Se^{4+}转运量高于另外三组。

中国知网　https://Www.cnki.net

4.4 本章小结

（1）通过螯合前后分子量大小对比首先确定了螯合反应的进行，鹿血多肽硒螯合物的产生，其次，两者的分子量分布变化表明分子量小于 2000 Da 的多肽段可能在螯合反应中发挥了重要作用，是主要参与反应的部分。

（2）通过螯合前后氨基酸含量对比分析得出组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸可能参与了螯合反应。相比于带正电荷和亲水性氨基酸残基，带负电荷的羧基和疏水氨基酸残基更有利于螯合。此外，两者的必需氨基酸含量相对较高，富有营养价值。

（3）通过分析螯合前后紫外扫描光谱和红外扫描光谱的差异性，可以推测鹿血多肽在螯合后，其构象发生了变化，多肽与 Se^{4+}配位形成类似-COO-Se^{4+}、N-Se^{4+}的结构。扫描电镜前后的对比图得出鹿血多肽呈不规则长条形块状，螯合后其微观结构呈扁平断裂小块，可分析得出有新物质产生，且该物质的结构较螯合前更加紧密。电势分析得出 Se^{4+}可能螯合到带负电荷的部分，可能与羧基结合。

（4）稳定性分析表明，鹿血多肽硒螯合物在热处理和酸碱处理中是稳定的，即使在高温条件下，硒保留率仍有 75%。在酸性和强碱性环境中，最低的硒保留率仍在 70%以上。在 DPPH 自由基以及羟基自由基清除率研究中，实验证明鹿血多肽和鹿血多肽硒螯合物的浓度与清除率呈正相关，当鹿血多肽硒螯合物的浓度为 6.4 mg/mL 时，鹿血多肽硒螯合物的清除率达 75.56 ± 0.32%，羟基自由基清除率也随着鹿血多肽硒螯合物浓度的增加均逐步上升。

（5）鹿血多肽硒螯合物会对细胞增殖有影响，但在 2 mg/mL 浓度范围以内，鹿血多肽硒螯合物不会对细胞产生明显毒性。利用Caco-2 单层细胞模型，分析鹿血多肽硒螯合物的硒转运能力，结果显示亚硒酸钠、硒代蛋氨酸、亚硒酸钠+鹿血多肽的转运量都低于鹿血多肽硒螯合物，说明四组实验中鹿血多肽硒螯合物的硒转运能力最高。

中国知网 https://Www.cnki.net

第 5 章　基于网络药理学和分子对接进行抗炎活性研究

网络药理学是通过现有数据库进行大数据分析，利用数据库的信息在对应软件上分析药物与靶点、疾病与靶点等的关系，方便研究者进一步了解药物在治疗疾病的过程中的作用机制[95]。近年来，分子对接技术逐步应用于大分子蛋白和受体的相互作用的研究，主要是分析二者的亲和力。借助分子对接技术可以更好地分析药物治疗疾病的机制，使得我们更深入地研究药物对疾病的治疗。本章节利用网络药理学和分子对接模拟分析鹿血多肽硒螯合物的抗炎机制，为了验证其确实具有抗炎作用，分别考察了鹿血多肽硒螯合物对几个常见炎症因子分泌量的抑制作用。

5.1 实验材料与仪器

5.1.1 材料与试剂

表 5-1 主要材料与试剂

药品	生产厂家
RAW264.7 小鼠巨噬细胞	中国科学院细胞库
DMEM 培养基	美国 Gibco 公司自制
胎牛血清	色列 Bioind 公司
无血清细胞冻存液	新赛美生物科技有限公司
脂多糖	北京索莱宝科技有限公司
一氧化氮（NO）检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
Elisa 试剂盒	南京博研生物科技有限公司

表 5-2 数据库

名称	网址
Swiss Target Prediction	http://www.swisstargetprediction.ch
Metascape	http://metascape.org/
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
GeneCards	http://www.genecards,ory/
DAVID	https//David.ncifcrf.gov/
UniProt	http://www.uniprot,org/
Omic-share	http://www.omicshare.com
Cytoscape 3.7.0	https://cytoscape.org/download.html

中国知网 https://Www.cnki.net

5.1.2 实验仪器设备

表 5-3 主要仪器设备

仪器名称	型号	生产厂家
电子天平	HX2002T	慈溪市天东衡器厂
型落地式全温振荡器	LQZ-211	上海精宏实验设备有限公司
高压蒸汽灭菌锅	GI80TW	致微（厦门）仪器有限公司
恒温水浴锅	HH-4	上海力辰邦西有限公司
恒温磁力搅拌器	MS-H280-Pro	北京索莱宝科技有限公司
pH 计	PHSJ-3F	上海仪田精密仪器有限公司
超净工作台	SW-CJ-1F	苏净安泰设备有限公司
CO_2 培养箱	C170	德国BINDER 公司
酶标分析仪	RT-6100	深圳雷杜生命科学股份有限公司
真空干燥器	400 mm	成都宜邦科析仪器有限公司
倒置显微镜	JDS300	北京京昊永成商贸有限公司

5.2 方法

5.2.1 潜在作用靶点的获取

利用 Peptide Cutter 在线工具模拟切割鹿血多肽硒螯合物，经筛选确定了 9 种肽结构进行后续分析，使用 PubChem 数据库下载对应的9 种肽结构，保存为mol 格式，使用Chem3D 软件绘制对应的 3D 结构，保存为 pdb 格式，在 3D 转换格式网页中查找对应的 SMILES 号，最后上传至 Swiss Target Prediction 数据库，种属选择“人源”，其他参数默认，获取鹿血多肽硒螯合物的作用靶点。

5.2.2 炎症靶点的筛选及交集基因的获取

基于 GeneCards 筛选炎症靶点，以“inflammationr”为关键词进行筛选，考虑到靶点数过于庞大，筛选排名靠前的相关靶点进行后续处理。汇总鹿血多肽硒螯合物靶点和疾病靶点，通微生信取两者交集基因，这些交集基因很大程度上可能是鹿血多肽硒螯合物发挥抗炎作用的关键基因。

中国知网 https://Www.cnki.net

5.2.3 PPI 网络图的构建

将鹿血多肽硒螯合物与炎症的交集基因导入 STRING 数据库中的 Proteins with Values/Ranks 处，设置种类为“人源”，经数据分析获得 PPI 网络图。

5.2.4 核心靶点的筛选

将 STRING 导出的数据导入 Cytoscape 3.7.0 处理，利用“Network Analyzer”功能进行相关分析，筛选核心靶点。

5.2.5 GO 富集分析

在 Metascape 中导入核心靶点，并选择“人源”作为物种进行分析，分别选择生物过程（Biological Processes，BP）、分子功能（Molecular Function，MF）、细胞成分（Celluar Components，CC）三个部分进行富集分析，并绘制相关的富集分析图。

5.2.6 KEGG 富集分析

将核心靶点导入 DAVID 数据库，指定物种为“人源”，导出 KEGG 的相关信号通路数据和通路图，将数据导入微生信，绘制排名前十的 KEGG 通路图。

5.2.7 “成分-靶点-疾病-通路”网络图构建

Cytoscape 3.7.0 软件是一款用于分析信息数据的软件，其功能主要是设计、构建和绘制网络结构[95]。为了了解鹿血多肽硒螯合物、靶点、相关通路、疾病之间的相互作用，将相关数据导入 Cytoscape 3.7.0 软件，构建了“成分-靶点-疾病-通路”网络图。

5.2.8 分子对接

使用PDB 数据库和 PubChem 数据库下载肽结构对应靶点的 PDB 格式文件。取排名前 3 的核心靶点作为对接蛋白，同样使用PDB 数据库和 PubChem数据库下载对应的 PDB 格式的文件，经处理后使用 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接，最后使用 Pymol 软件进行可视化结果处理。

中国知网 https://Www.cnki.net

5.2.9 鹿血多肽硒螯合物抗炎活性的验证

5.2.9.1 RAW264.7 体外炎症模型建立

根据相关制备方法[60]，稍加修改。RAW264.7 细胞复苏处理后，接种到含有 10% FBS 和 1%双抗的 DMEM 培养基内，并将其置于 37 ℃、5% CO_2 浓度的细胞培养箱中培养。直至细胞达到对数生长期后传代培养。当细胞覆盖率超过培养瓶底的 80%时，将原培养基吸出，然后用 5 mL 的 PBS 清洗细胞 2 次。使用移液枪吸取 2 mL 的培养液，用于冲洗细胞直到它们完全脱落，然后进行细胞计数，并根据计数结果调整细胞悬浮液的浓度。随后，将其接种到培养皿里，并在恒温培养箱里继续培养。

对细胞设计实验分组：空白组以完全培养基孵育；模型组以 1 μg/mL 的 LPS 孵育；实验组以不同浓度的待测样品加 LPS(1 μg/mL)。每组设置 3 个复孔。

5.2.9.2 RAW264.7 细胞存活率测定

根据相关制备方法[63]，稍作修改。调整细胞浓度为 1×10^4，按每孔 100 μL 将细胞接种于 96 孔板中，培养 24 h 后吸尽原培养液，用 PBS 洗涤细胞两次。实验组分别加入含不同质量浓度的鹿血多肽硒螯合物溶液的完全培养基（0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL）100 μL，将每个空白组分别加入相同体积的完全培养基，每组设 3 个复合孔。继续培养 24 h 后，向每个孔中加入 100 μL MTT 溶液（浓度为 0.5 mg/mL），然后将培养皿放入培养箱中孵育 4 h。废弃 MTT 溶液后，用 PBS 洗涤干净，向每个孔中加入 150 μL DMSO 溶解固体物质，并持续振荡 10 min 以确保结晶物得到充分的溶解，最后用酶标仪测定 490 nm 下每孔的吸光值（A），按公式（9）计算细胞存活率。

$$细胞存活率（\%）=(A_1-A_0)/(A_2-A_0)\times100\% \quad (9)$$

式中：A_0：空白组吸光值；A_1：实验组吸光值；A_2：模型组吸光值

5.2.9.3 诱导后的 RAW264.7 细胞中NO 分泌量的测定

根据相关制备方法[96]，稍作修改。在 24 孔板孔中接种 RAW264.7 细胞，调整每孔的细胞浓度为 1×10^5 个/mL，每孔接种 500 μL，随后置于培养箱中孵育过夜。吸走原有培养基，在空白对照组和模型组中加入 500 μL 完全培养基，实验组加入 500 μL 含不同浓度的鹿血多肽硒螯合物的完全培养基（0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/mL），将细胞置于培养箱继续培养 12 h。吸走原有培养基，并用PBS 洗涤两次。每个模拟组和实验组分别注入 500 μL 浓度为 1 μg/mL 的 LPS 溶液。空白组则注入相同体积的完全培养基。继续培养 24 h，收集上清液，按 50 μL/孔的量在 96 孔板中加入样品上清液，各孔中分别加入 50 μL Griess Reagent I试剂和 Griess Reagent II试剂，振荡混合均匀，于 450 nm测定吸光值。根据浓度和OD 值算出标准曲线的回归方程，计算样

中国知网 https://Www.cnki.net

品中 NO 含量。

5.2.9.4 诱导后的 RAW264.7 细胞中炎症因子分泌量的测定

根据 ELISA 试剂盒的使用方法，分别测定各组的 TNF-α、IL-1β和 IL-6 的含量[97]。酶标板中注入 100 μL 培养上清液，贴上封板膜，在 37 ℃下避光孵育 90 min，弃去液体后加入 350 μL 洗涤液，静置 30 s 后弃去，用吸水纸拍干。注入 100 μL 的生物素抗体工作液到酶标板上，贴上封板膜后在 37 ℃下避光孵育 1 h，此后洗板 5 次。加入 100 μL 的酶结合物工作液，贴上封板膜，将其放置在 37 ℃下避光孵育 30 min，随后洗板 5 次。加入 100 μL 的显色液，在 37 ℃下避光孵育 15 min 后，再加入 100 μL 的反应终止液，于 450 nm波长处测定吸光值。根据浓度和OD 值算出标准曲线的回归方程，计算样品中各细胞因子含量。

5.2.10 数据处理

所有测试均重复三次，结果以均数 ± 标准差（ $\bar{x} \pm$ s.d. ）表示。采用 SPSS19.0 统计软件进行数据方差分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。画图通过 origin 2018 软件完成的。

5.3 结果与讨论

5.3.1 潜在靶点的获得

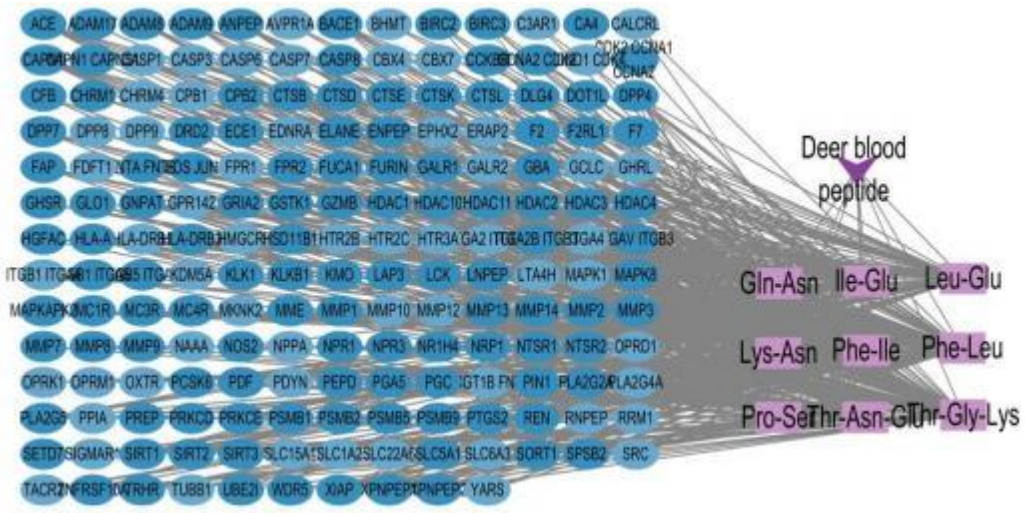


图 5.1 鹿血多肽硒螯合物潜在靶点网络图

利用 Peptide Cutter 在线工具模拟切割得到 9 条肽段，利用肽段查询 PubChem 数据库以获取相应的 SMILES 编码，再将编码号输入 Swiss Target Pblueiction 数据库，

中国知网 https://Www.cnki.net

获取成分的相关靶点信息，随后合并去重可得到 179 个潜在靶点。根据图 5.1 所示，左边 179 个节点呈现矩形排列，代表鹿血多肽硒螯合物潜在活性成分，右边以9 个节点呈矩形排列，表示鹿血多肽硒螯合物可能存在的肽结构潜在靶点，567 条边描述了靶点与化学成分之间的相互作用，充分展现了其多成分、多靶点的特性。通过 GeneCards 和OMIM-GENE-MAP 数据库进行炎症靶点筛选，并在合并后排除重复值，筛选后取前 1568 个。将两者取交集，共得到50 个交集靶点。两者靶点交集的韦恩图如图 5.2。表 5-3 是 50 个潜在靶点的相关信息。

图 5.2 活性成分靶点和炎症靶点 Venn 图

表 5-4 鹿血多肽硒螯合物抗炎的潜在靶点

序号	基因	Uniprot ID	靶点
1	NOS2	P35228	Nitric oxide synthase,
2	HLA-A	P04439	HLA class I histocompatibility antigen A-3
3	TNFRSF10A	O00220	TRAIL receptor-1
4	XIAP	P98170	Inhibitor of apoptosis protein 3
5	SIRT1	Q96EB6	NAD-dependent deacetylase sirtuin 1
6	CTSB	P07858	Cathepsin (B and K)
7	FPR2	P25090	Lipoxin A4 receptor (by homology)
8	CASP8	Q14790	Caspase-8
9	CASP1	P29466	Caspase-1
10	F2	P00734	Thrombin
11	PLA2G2A	P14555	Phospholipase A2 group IIA
12	MMP3	P08254	Matrix metalloproteinase 3
13	MMP1	P03956	Matrix metalloproteinase 1
14	MMP2	P08253	Matrix metalloproteinase 2
15	ELANE	P08246	Leukocyte elastase

中国知网 https://Www.cnki.net

续表 5-4 鹿血多肽硒螯合物抗炎的潜在靶点

序号	基因	Uniprot ID	靶点
16	GZMB	P10144	Granzyme B
17	ACE	P12821	Angiotensin-converting enzyme
18	PTGS2	P35354	Cyclooxygenase-2
19	MME	P08473	Neprilysin
20	DPP4	P27487	Dipeptidyl peptidase IV
21	HSD11B1	P28845	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1
22	CASP3	P42574	Caspase-3
23	CASP6	P55212	Caspase-6
24	PLA2G4A	P47712	Cytosolic phospholipase A2
25	NR1H4	Q96RI1	Bile acid receptor FXR
26	LTA4H	P09960	Leukotriene A4 hydrolase
27	HMGCR	P04035	HMG-CoA reductase
28	FPR1	P21462	Formyl peptide receptor 1
29	MAPK1	P28482	MAP kinase ERK2
30	SRC	P12931	Tyrosine-protein kinase SRC
31	ITGA4	P13612	Integrin alpha-4
32	HLA-DRB1	P04229	HLA class II histocompatibility antigen DRB1-1
33	EDNRA	P25101	Endothelin receptor ET-A
34	GHRL	Q9UBU3	Appetite-regulating hormone
35	MMP12	P39900	Matrix metalloproteinase 12
36	MMP8	P22894	Matrix metalloproteinase 8
37	MMP13	P45452	Matrix metalloproteinase 13
38	MC4R	P32245	Melanocortin receptor 4
39	BIRC3	Q13489	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3
40	BIRC2	Q13490	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2
41	HDAC2	Q92769	Histone deacetylase 2
42	LCK	P06239	Tyrosine-protein kinase LCK
43	PRKCD	Q05655	Protein kinase C delta
44	MAPK8	P45983	c-Jun N-terminal kinase 1
45	MMP9	P14780	Matrix metalloproteinase 9

中国知网 https://Www.cnki.net

续表 5-4 鹿血多肽硒螯合物抗炎的潜在靶点

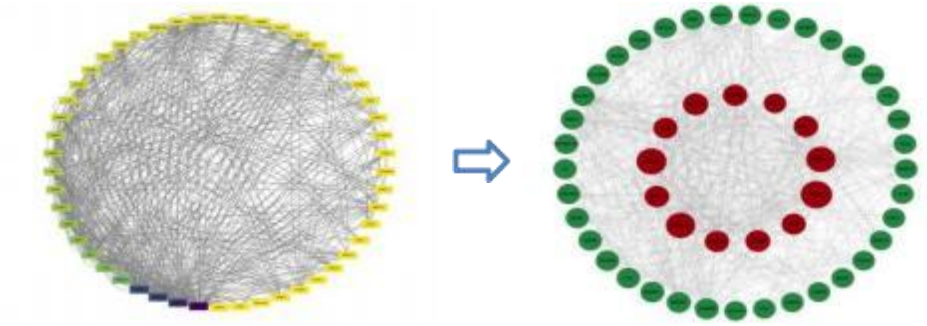
序号	基因	Uniprot ID	靶点
46	PSMB9	P28065	Proteasome subunit beta type-9
47	MMP7	P09237	Matrix metalloproteinase 7
48	F2RL1	P55085	Proteinase-activated receptor 2
49	ADAM17	P78536	ADAM17
50	MMP14	P50281	Matrix metalloproteinase 14

5.3.2 PPI 分析

图 5.3 50 个关键靶点的 PPI 网络图

将上述筛选的 50 个交集靶点使用 STRING 数据库进行 PPI 分析。结果如图 5.3 所示，图中的节点代表不同的蛋白质，而边则展示了蛋白质之间的相互作用关系，深刻展示了鹿血多肽硒螯合物治疗抗炎过程中分子作用机制的复杂性。随后可将上述图谱导入到 Cytoscape 3.7.0 软件中，并运用MCC 方法进行计算。按照分数排名筛选出较核心位置的 13 个靶点（图 5.4），其与其他蛋白的相互作用关系更为密切，可预测这些靶点为鹿血多肽硒螯合物治疗炎症的关键靶点。表 5-4 是核心靶点的相关信息。

中国知网 https://Www.cnki.net



（a）　　（b）

图 5.4 PPI 网络图及核心靶点网络图

a-PPI 网络（50 个）; b-核心网络（13 个）

表 5-5 13 个核心靶点信息

序号	靶点	基因名词	Uniprot ID	Degree
1	Matrix metalloproteinase 99	MMP9	P14780	62
2	Caspase-3	CASP3	P42574	58
3	Tyrosine-protein kinase SRC	SRC	P12931	54
4	Cyclooxygenase-2	PTGS2	P35354	52
5	Matrix metalloproteinase 2	MMP2	P08253	44
6	Cathepsin (B and K)	CTSB	P07858	42
7	Matrix metalloproteinase 3	MMP3	P08254	36
8	Caspase-8	CASP8	Q14790	36
9	Caspase-1	CASP1	P29466	36
10	NAD-dependent deacetylase sirtuin 1	SIRT1	Q96EB6	34
11	Matrix metalloproteinase 1	MMP1	P03956	32
12	ADAM17	ADAM17	P78536	32
13	MAP kinase ERK2	MAPK1	P28482	30

5.3.3 GO 富集分析

通过微生信在线云平台对鹿血多肽硒螯合物治疗炎症的 13 个潜在靶点进行 GO 富集分析，共获得 2819 条生物过程或通路，其中2400 个与 BP 相关，176 个与 CC 相关，243 个与 MF 相关。根据 P 值从小到大排序，选取前 10 条 GO 条目，绘制图 5.5 。BP 主要涉及对炎症反应调节氧水平胶原代谢过程（regulation of inflammatory response）、调节半胱氨酸型内肽酶活性反应（response to oxygen levels）、肿瘤坏死因子反应（collagen metabolic process）、脂多糖反应（regulation of cysteine-type

中国知网 https://Www.cnki.net

endopeptidase activity）、细菌来源的分子反应（response to tumor necrosis factor)、缺氧反应（response to lipopolysaccharide）等生物过程。CC 主要涉及膜筏（membrane raft）、膜微区（membrane microdomain）、膜区（membrane region）、黏着斑（focal adhesion）等细胞组分。MF 主要涉及作用于金属肽酶活性（metallopeptidase activity）、内肽酶活性（endopeptidase activity）、金属内肽酶活性（metalloendopeptidase activity）等功能。选取 BP、CC、MF 分析排名前 10 的靶点，绘制了图 5.5 来展示分析，图中的高度代表了各靶点的相关性高低。表 5-5 是各组分分析中排名前 4 的靶点的相关信息。

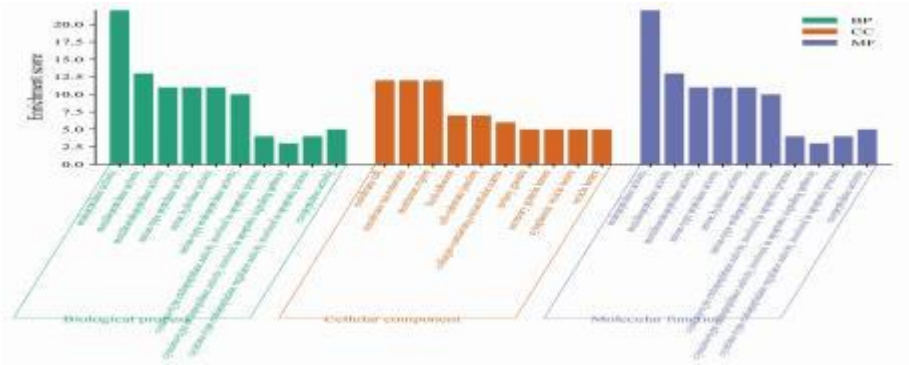


图 5.5 BP、CC、MF 三方面功能富集分析图

表 5-6 GO 富集分析结果

GO	ID	通路	Degree
BP	GO:0050727	regulation of inflammatory response	17
BP	GO:0070482	response to oxygen levels	13
BP	GO:0032963	collagen metabolic process	12
BP	GO:2000116	regulation of cysteine-type endopeptidase activity	12
CC	GO:0045121	membrane raft	12
CC	GO:0098857	membrane microdomain	12
CC	GO:0098589	membrane region	12
CC	GO:0005925	focal adhesion	7
MF	GO:0004175	endopeptidase activity	22
MF	GO:0008237	metallopeptidase activity	13
MF	GO:0004222	metalloendopeptidase activity	11
MF	GO:0008236	serine-type peptidase activity	11

中国知网 https://Www.cnki.net

5.3.4 KEGG 通路富集分析

通过 KEGG 通路富集分析我们可以了解鹿血多肽硒螯合物在抗炎作用中可能参与的通路，于图 5.6 中表示，具体信息见表 5-6，结果表明总共得到了208 条与炎症相关的 KEGG 通路，分别是脂质与动脉粥样硬化（Lipid and atherosclerosis）、细胞凋亡（Apoptosis）、TNF 信号通路（TNF signaling pathway）、NOD 样受体信号通路（NOD-like receptor signaling pathway）、IL-17 信号通路（IL-17 signaling pathway）、阿尔茨海默病（Alzheimer disease）、松弛素信号通路（Relaxin signaling pathway）、神经活性配体-受体相互作用（Neuroactive ligand-receptor interaction）、人 T 细胞白血病病毒 1 型感染（Focal adhesion）等通路。图 5.7 是排名第一的 Lipid and atherosclerosis 的通路图。

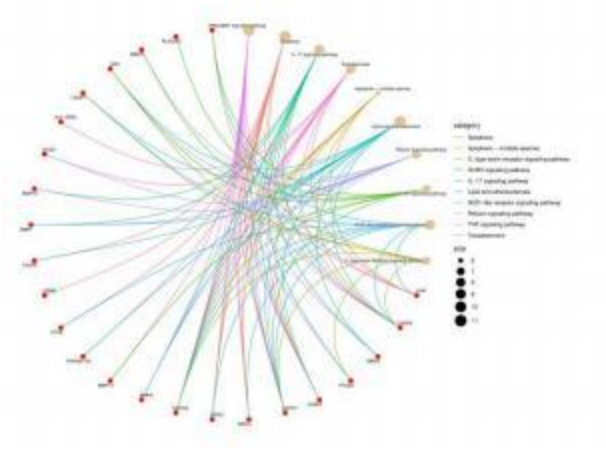


图 5.6 主要 KEGG 信号通路富集图

表 5-7 基因数目前 10 的 KEGG 通路基本信息

Pathways	ID	Gene ID	Pvalue	Degree
Lipid and atherosclerosis	hsa05417	TNFRSF10A/CASP8/CASP1/MMP3/MMP1/CASP3/CASP6/MAPK1/SRC/MAPK8/MMP9	5.43419E-07	11
Apoptosis	hsa04210	TNFRSF10A/XIAP/CTSB/CASP8/GZMB/CASP3/CASP6/MAPK1/BIRC3/BIRC2/MAPK8	1.26153E-08	11
TNF signaling pathway	hsa04668	XIAP/CASP8/MMP3/PTGS2/CASP3/MAPK1/BIRC3/BIRC2/MAPK8/MMP9/MMP14	3.65537E-09	11
NOD-like receptor signaling pathway	hsa04621	XIAP/CTSB/CASP8/CASP1/MAPK1/BIRC3/BIRC2/PRKCD/MAPK8	1.24078E-05	9
Toxoplasmosis	hsa05145	NOS2/XIAP/CASP8/CASP3/MAPK1/HLA-DRB1/BIRC3/BIRC2/MAPK8	3.50107E-07	9

中国知网 https://Www.cnki.net

续表 5-7 基因数目前 10 的 KEGG 通路基本信息

Pathways	ID	Gene ID	Pvalue	Degree
IL-17 signaling pathway	hsa04657	CASP8/MMP3/MMP1/PTGS2/CASP3/MAPK1/MMP13/MAPK8/MMP9	9.7656E-08	9
Alzheimer disease	hsa05010	NOS2/CASP8/PTGS2/MME/CASP3/MAPK1/MAPK8/ADAM17	0.003891777	8
Salmonella infection	hsa05132	TNFRSF10A/CASP8/CASP1/CASP3/MAPK1/BIRC3/BIRC2/MAPK8	0.000465604	8
Coronavirus disease - COVID-19	hsa05171	CASP1/F2/MMP3/MMP1/ACE/MAPK1/MAPK8/ADAM17	0.000353159	8
Pathogenic Escherichia coli infection	hsa05130	TNFRSF10A/CASP8/CASP1/F2/CASP3/MAPK1/SRC/MAPK8	0.000116118	8

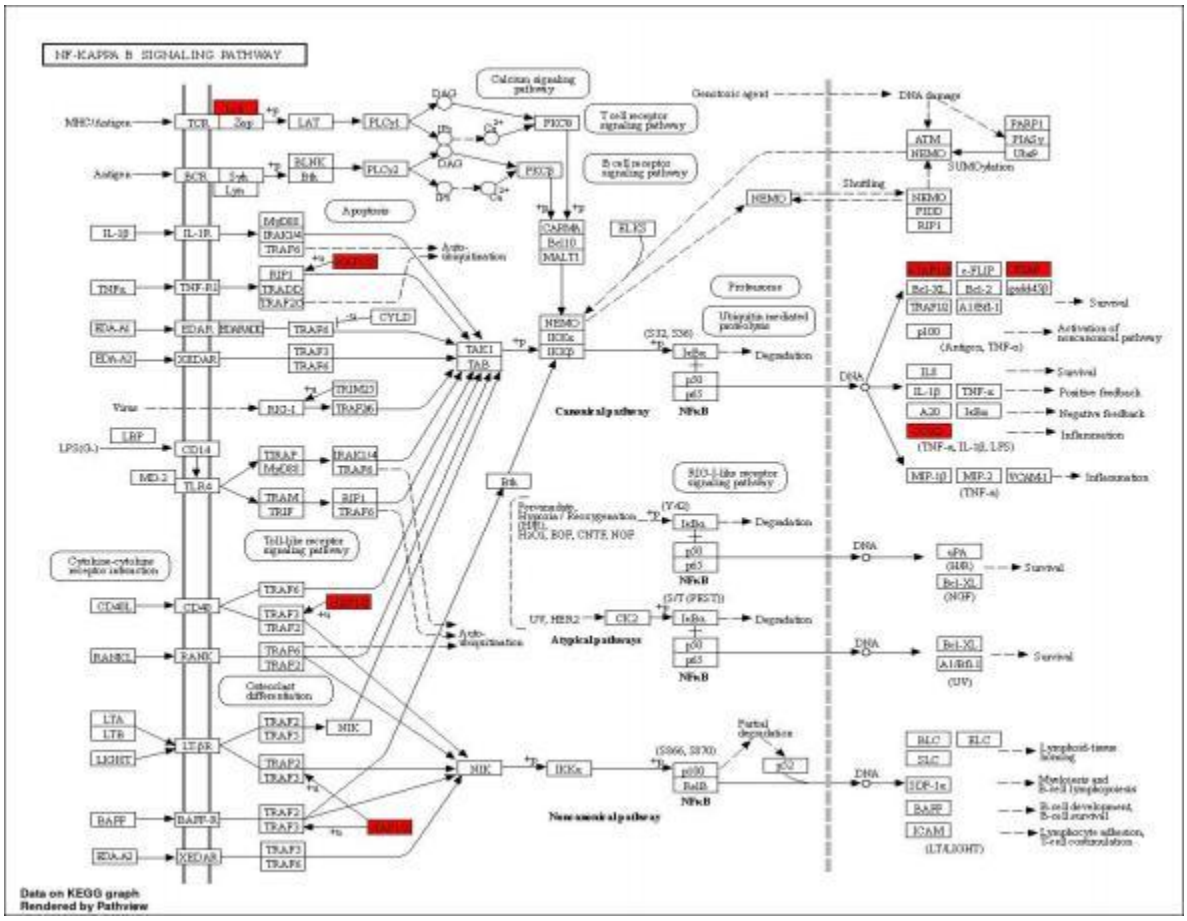


图 5.7 Lipid and atherosclerosis 的通路预测图

5.3.5 “成分-靶点-疾病-通路”网络图构建

采用 Cytoscape 3.7.0 构建鹿血多肽硒螯合物“成分-靶点-疾病-通路”网络模型，结果如图 5.8 所示右侧是炎症筛选出的前 10 个 KEGG 信号通路，左侧是鹿血多肽硒

中国知网 https://Www.cnki.net

螯合物经预测模拟切割后筛选的肽段，各自的包围圈是对应的相关靶点，节点与节点的边表示靶基因和通路之间的关系，显示为中心靶点与成分和通路之间相互作用。

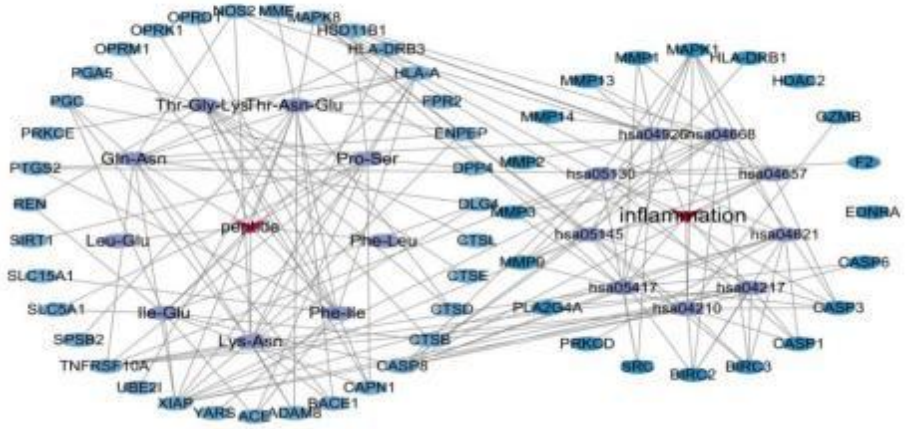


图 5.8 “疾病-化合物-靶点-通路”网络图

5.3.6 分子对接

5.3.6.1 鹿血多肽硒螯合物抗炎靶点的分子对接热图

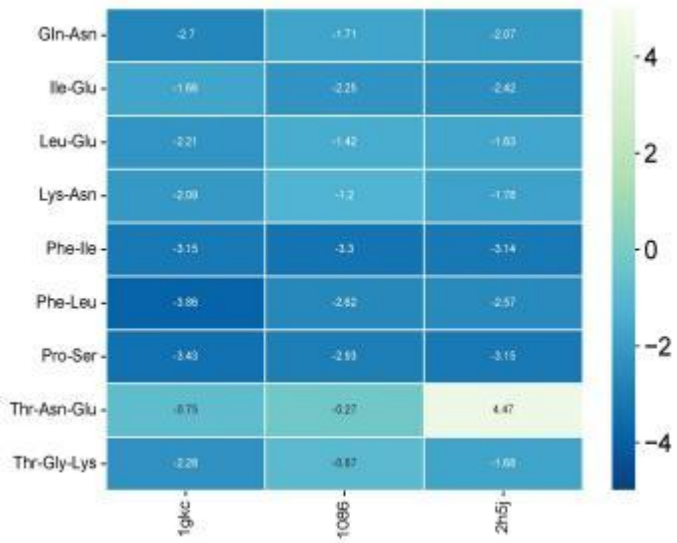


图 5.9 鹿血多肽硒螯合物治疗炎症的核心活性成分与靶蛋白分子结合能热图

从 PPI 核心靶点中筛选出靠前的 3 个基因 MMP9、CASP3 和 SRC，利用 PubChem 数据库筛选出对应的蛋白结构 1gkc、1086 和 2h5j，将筛选的受体与鹿血多肽硒螯合物的配体进行对接，结合能如图 5.9 所示，颜色越深结合能越低，说明结合能绝对值越高，结合能力越好。如图 5.9 所示，肽序列与 3 种靶点蛋白进行分子对接后，结合

中国知网 https://Www.cnki.net

能大部分都小于 0 kcal/mol，说明两者可以结合，其中结合能小于-2.0 kcal/mol 的有 16 个，表明有这 16 种结合方式的结合能力较好，其中 1gkc 与 Phe-Leu 的综合结合能力较强。

5.3.6.2 鹿血多肽硒螯合物与抗炎靶点分子对接结果

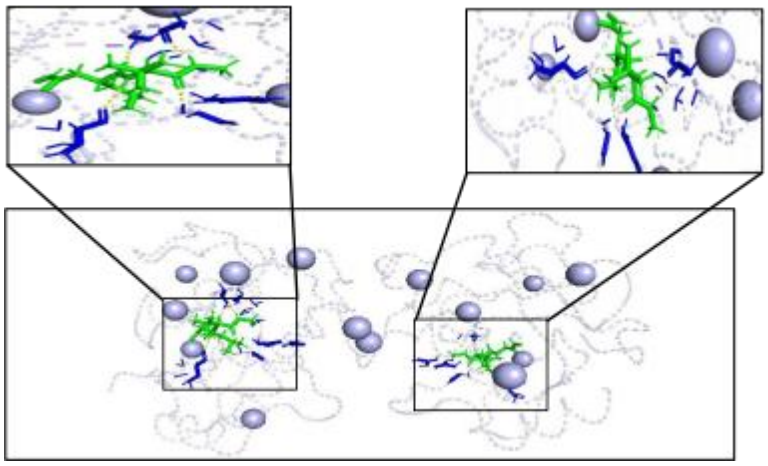


图 5.10 GIn-Asn 与 1gkc 的对接结果

参考图 5.9 的数据，筛选结合能较强的对接模型，后续选取 GIn-Asn 与 1gkc，Phe-Ile 与 1gkc，Phe-Leu 与 1gkc，Pro-Ser 与 1gkc，Phe-Ile 与 1086，Pro-Ser 与 2h5j，Phe-Leu 与 2h5j，最后通过 Pymol 软件构建鹿血多肽硒螯合物与各靶点蛋白的三维结合模型图，如图 5.10~5.16 所示，图中展现了配体与蛋白的具体对接情况。（图 5.11~图 5.16 见附录 P75-77）

5.3.7 细胞毒性结果

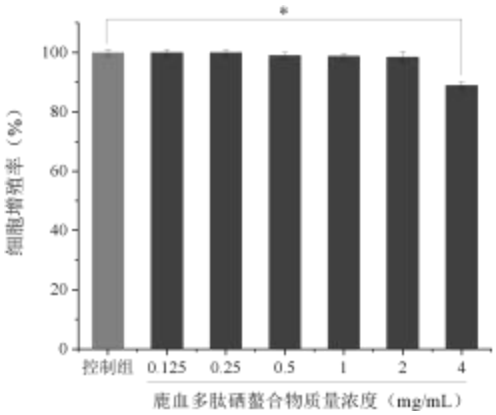


图 5.17 鹿血多肽硒螯合物对 RAW264.7 细胞增殖率的影响
（与控制组比较，* P＜0.05）

中国知网 https://Www.cnki.net

如图 5.17 所示，在 0.125~2.0 mg/mL 的质量浓度范围内各样品对 RAW264.7 细胞几乎无毒性，且对细胞生长有促进作用，当浓度到达 4.0 mg/mL 时，对细胞产生显著抑制作用（P<0.05）,因为硒离子浓度过大对细胞产生了毒性。但 0.125~2.0 mg/mL 范围内是安全的，可以用于后续实验。

5.3.8 炎症细胞模型 NO 分泌量检测

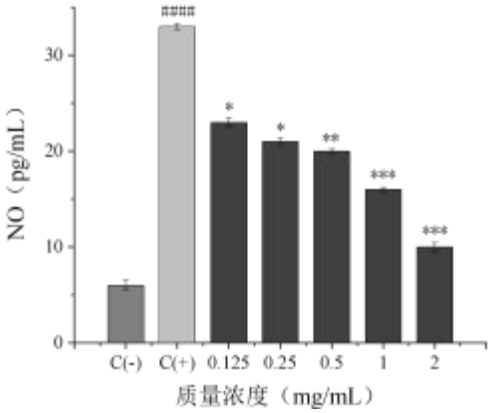


图 5.18 鹿血多肽硒螯合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放的影响
（与空白对照组比较，#### P＜0.0001；与模型组比较，* P＜0.05，** P＜0.01，*** P＜0.001）

如图 5.18 所示，与空白组（C-）比较，LPS 模型组（C+）的 NO 分泌显著升高，表明抗炎细胞模型造模成功。与 LPS 模型组（C+）相比，鹿血多肽硒螯合物处理组显著降低了 NO 的分泌水平，且鹿血多肽硒螯合物的浓度越大，对造模细胞上清液中 NO 含量的抑制作用越强，其中最高质量浓度（2.0 mg/mL）处理组 NO 抑制率达 72%。所以鹿血多肽硒螯合物可以有效降低炎症细胞模型中 NO 的分泌，由此表明鹿血多肽硒螯合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞有显著的抗炎作用。

5.3.9 炎症细胞模型炎症因子分泌量检测

细胞炎症因子是炎症反应的关键因素。在某种程度上，细胞免疫因子的水平可用于评估免疫反应[98]。如图 5.19 所示，与空白组（C-）相比，使用 LPS 诱导后的模型组（C+）的细胞炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β的分泌显著上升，说明抗炎细胞模型造模成功，而使用不同鹿血多肽硒螯合物浓度处理组（0.125~2.0 mg/mL）的细胞炎症因子分泌均被有效抑制，且均呈浓度依赖性，与 NO 释放量的结果趋势一致。其中最高质量浓度（2.0 mg/mL）处理组能够显著抑制 RAW264.7 细胞中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β的释放，抑制率分别为 78.12%、79.54%和 75.47%。这些炎症因子在炎症过程中

中国知网 https://Www.cnki.net

起着关键作用，它们的减少意味着炎症的减轻。由此表明鹿血多肽硒螯合物具有抗炎作用，并且这种作用是通过抑制炎症因子的分泌来实现的。

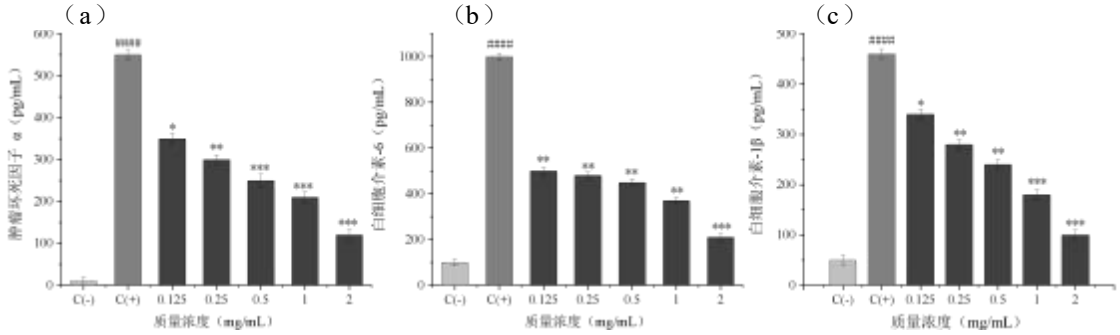


图 5.19 鹿血多肽硒螯合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中炎症因子 TNF-α（a）、IL-6（b）和 IL-1β（c）的分泌的影响

（与空白对照组比较，#### P＜0.0001；与模型组比较，* P＜0.05，** P＜0.01，***P ＜0.001）

5.4 本章小结

本研究通过网络药理学和分子对接来模拟分析鹿血多肽硒螯合物的抗炎作用。为了验证鹿血多肽硒螯合物确实具有抗炎作用，针对常见的炎症因子进行相关分泌量的测定，检测螯合物对它们的抑制情况。

（1）从数据库导出鹿血多肽硒螯合物和炎症的相关基因，取两者交集，共 50 个。在交集基因的基础上进行 PPI 分析，利用 Cytoscape 3.7.0 软件筛选核心靶点。在核心靶点的基础上进行富集分析，GO 分析发现鹿血多肽硒螯合物抗炎的主要作用可能是通过调节氧水平胶原代谢过程、半胱氨酸型内肽酶活性反应、肿瘤坏死因子反应以及脂多糖反应，且主要作用于金属肽酶活性、丝氨酸型肽酶活性、丝氨酸水解酶活性来抑制炎症；KEGG 分析发现鹿血多肽硒螯合物通过在 Lipid and atherosclerosis、TNF signaling pathway、IL-17 signaling pathwayNecroptosis 和 Relaxin signaling pathway 等通路上富集来发挥抗炎作用。

（2）“成分-靶点-疾病-通路 ”网络图的构建可以确定鹿血多肽硒螯合物对抗炎具有潜在作用机制。结果显示，鹿血多肽硒螯合物预测的9 种肽结构与 10 条通路存在密切的互作关系，证明鹿血多肽硒螯合物以多成分、多靶点、多通路的特点进行抗炎。

（3）通过分子对接技术将鹿血多肽硒螯合物与 PPI 筛选出的相关度排名靠前的 3 个核心靶点 MMP9、CASP3 和 SRC 分别进行对接，结果表明鹿血多肽硒螯合物与抗炎核心靶点之间存在稳定的结合，并且形成了多个重要的氢键，这表明鹿血多肽硒螯合物具有良好的结合能力，并且可以通过与受体相互作用来发挥抗炎作用。

中国知网 https://Www.cnki.net

（4）为了验证网络药理学和分子对接的模拟结果，考察了鹿血多肽硒螯合物对几个常见炎症因子分泌量的抑制情况。首先对 RAW264.7 进行细胞毒性实验，结果显示鹿血多肽硒螯合物的浓度在 0~2.0 μg/mL 范围内对细胞无毒性。说明在合理范围内，鹿血多肽硒螯合物对细胞是安全的，可以用于后续的实验验证。对 RAW264.7 细胞构建炎症模型，检测不同质量浓度的鹿血多肽硒螯合物对细胞中 NO、TNF-α、IL-6 和 IL-1β的分泌量影响，结果表明，随着鹿血多肽硒螯合物浓度的增加，对各炎症因子都具有抑制作用，且呈现依赖性。

中国知网 https://Www.cnki.net

第 6 章　结　论

本研究以双阳梅花鹿鹿血为原材料，制备新型有机硒营养强化剂，即鹿血多肽硒螯合物。通过优化酶解条件和螯合工艺来确定鹿血多肽硒螯合物的最佳制备条件，对其进行紫外光谱、氨基酸分析、相对分子质量测定、电势分析等表征实验，一方面确定鹿血多肽硒螯合物的产生，另一方面分析螯合过程中相关基团的结合机理。针对鹿血多肽硒螯合物进行稳定性研究、体外抗氧化活性研究、细胞转运吸收和基于网络药理学和分子对接模拟分析抗炎活性，最后通过测定鹿血多肽硒螯合物对常见炎症因子分泌量的抑制作用来验证。本研究旨在制备新型有机硒营养强化剂，并深入分析鹿血多肽硒螯合物的稳定性，抗氧化活性，细胞吸收特性以及抗炎活性，为其成为新型硒补充剂提供借鉴。主要结果如下：

（1）在梅花鹿鹿血蛋白的酶解研究中，碱性蛋白酶对梅花鹿鹿血的酶解效果最好，且最佳酶解工艺条件是酶解温度 60 ℃、pH 8.4、酶解时间 5 h，此时水解度为 32.7 ± 0.13%。在鹿血多肽硒螯合物的制备研究中，最佳制备条件为 pH 5.4、螯合温度 50 ℃、螯合时间 39 min、肽硒质量为 4:1，硒螯合率为 72.9 ± 0.14%。

（2）相对分子质量的测定结果表明，鹿血多肽本身具有较高的金属螯合活性。氨基酸分析表明，组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸可能参与了螯合反应，且相比于带正电荷和亲水性氨基酸残基，带负电荷的羧基和疏水氨基酸残基更有利于螯合。紫外光谱分析表明，其螯合位点可能与羧基有关。红外光谱分析表明，Se^{4+}主要通过与肽链上的氨基氮原子和羧基氧原子配位形成鹿血多肽硒螯合物。电镜图说明鹿血多肽与 Se^{4+}交联形成结构紧密的鹿血多肽硒螯合物。电势的差异说明鹿血多肽硒螯合物是一种新的物质，且螯合了负电荷基团。

（3）稳定性分析表明，鹿血多肽硒螯合物在热处理和酸碱处理中是稳定的，即使在高温条件下，硒保留率仍在 75%以上。在酸性和强碱性环境中，最低的硒保留率也在 70%以上。体外抗氧化活性实验结果显示，鹿血多肽硒螯合物的浓度和 DPPH 自由基以及羟基自由基清除率都呈正相关，且强于鹿血多肽的抗氧化能力。当鹿血多肽硒螯合物的浓度为 6.4 mg/mL 时，DPPH 自由基清除率达 75.56 ± 0.32%。随着螯合物浓度的增加，羟基自由基清除率呈依赖性，随着螯合物浓度的增加逐步上升。

（4）鹿血多肽硒螯合物会对 Caco-2 细胞的存活产生影响，但在 2.0 mg/mL 浓度范围以内，鹿血多肽硒螯合物不会对细胞产生明显毒性。利用Caco-2 单层细胞模型，分析鹿血多肽硒螯合物的硒转运能力，结果显示亚硒酸钠、硒代蛋氨酸、亚硒酸钠+鹿血多肽的转运量都低于鹿血多肽硒螯合物。

中国知网 https://Www.cnki.net

（5）基于网络药理学分析，鹿血多肽硒螯合物可能通过调节多种靶点和通路发挥抗炎作用。由 PPI 图可以直观看到 MMP9、CASP3、SRC、PTGS2、MMP2、CTSB、MMP3 和 CASP8，这些靶点的度值相对较大，其靶点间的相互作用也较强。GO 分析显示，鹿血多肽硒螯合物参与了氧水平胶原代谢过程、肿瘤坏死因子反应、脂多糖反应、缺氧反应等过程，这些过程在炎症方面具有重要作用。KEGG 分析表明，鹿血多肽硒螯合物可能通过调节细胞凋亡、TNF 信号通路、NOD 样受体信号通路、IL-17 信号通路等发挥其抗炎效果。分子对接结果显示，鹿血多肽硒螯合物与多个潜在靶点，如 MMP9、CASP3 和 SRC 的结合都具有良好的亲和力和稳定性，进一步在理论上验证了其具有抗炎作用。

（6）为了验证鹿血多肽硒螯合物具有抗炎作用，针对常见炎症因子进行了相关实验。首先对 RAW264.7 细胞进行了细胞毒性实验，结果显示鹿血多肽硒螯合物的浓度为 0~2.0 μg/mL 时对细胞无毒性。说明在一定范围内，螯合物对细胞是安全的，可以用于后续的实验验证。其次构建 RAW264.7 细胞炎症模型，然后检测不同质量浓度的鹿血多肽硒螯合物对诱导后的 RAW264.7 细胞中 NO、TNF-α、IL-6 和 IL-1β的分泌量的影响情况，结果表明随着鹿血多肽硒螯合物浓度的增加，RAW264.7 细胞中 NO、TNF-α、IL-6 和 IL-1β的分泌量减少，说明鹿血多肽硒螯合物具有抗炎作用。

综上所述，本研究通过多个实验，揭示了鹿血多肽硒螯合物有望成为新型有机硒营养强化剂，为进一步开发和应用鹿血多肽提供了有利的理论和实验基础，展望其在制备补硒剂的研究领域具有巨大的潜力和价值。

中国知网　https://Www.cnki.net

参考文献

[1] 高倩倩,付慧,李红莹,等. 酶解法制备鹿血生物活性肽的工艺研究 [J]. 粮食与油脂, 2023, 36(11): 95-99.

[2] Graham E A, Rainey R, Kuhlman R E, et al. Biochemical investigations of deer antler growth: part I. alterations of deer blood chemistry resulting from Antlerogenesis [J]. JBJS, 1962, 44(3): 482-488.

[3] Bah C S F, Bekhit A E D A, Carne A, et al. Composition and biological activities of slaughterhouse blood from red deer, sheep, pig and cattle [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(1): 79-89.

[4] 王丹彧,李巍,郭晶,等. 高效液相色谱法测定鹿血与鹿血粉及相关样品中次黄嘌呤的含量 [J]. 中国药物经济学, 2022, 17(12): 121-124.

[5] Wilson P R, Pauli J V. Blood constituents of farmed red deer (Cervus elaphus): I. Haematological values [J]. New Zealand Veterinary Journal, 1982, 30(11): 174-176.

[6] 王春霞,管春姮,高鹏,等. 梅花鹿血粉对大鼠营养性贫血改善作用的研究 [J]. 经济动物学报, 2022, 26(02): 116-120.

[7] 韩欢胜,郭喜明,徐馨,等. 鹿血酒种类、功效及加工工艺研究进展 [J]. 特种经济动植物, 2021, 24(09): 27-29.

[8] 王宁丽,徐月敏,刘毅,等.鹿血低聚肽的氨基酸成分分析 [J]. 食品工业, 2015, 36(10): 22-24.

[9] 翟学超,钟立成.鹿血抗氧化肽不同分子量肽段抗氧化活性的研究 [J]. 经济动物学报, 2015, 19(03): 144-146.

[10] 侯璐,杨丰绮,王艳梅,施维,等. 鲜鹿血与冻鹿血酶解效果的比较 [J]. 农村科学实验, 2017, (11): 116.

[11] 铁宇娟,涂晓娣,王赛雯,等. 鹿血提取物联合顺铂对卵巢癌小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(06): 135-141.

[12] 杜小琴,夏炎,张小琴,等. 鹿血的酶解工艺优化及其抗运动疲劳活性评价 [J]. 安徽农业大学学报, 2021, 48(03): 518-522.

[13] 李鹰,张晓莉,董艳,等. 鹿血对小鼠肠道菌群及免疫功能的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 1997, (06): 10-12.

[14] 胡圣爱,王册,耿志 辉,等. 复方鹿血冻干粉免疫调节作用的研究 [J]. 河北医药, 2003, (10): 732.

中国知网 https://Www.cnki.net

[15] 任建东,施用晖,马立芹,等. 酶解鹿茸血 ACE 抑制活性及其与抗氧化活性关系的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(01): 37-40.

[16] 王赛雯,侯亚义,窦环. 中药鹿血提取物联合顺铂抗小鼠黑色素瘤的作用研究 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(06): 2925-2930.

[17] 王春霞,管春姮,高鹏,等. 梅花鹿血粉对大鼠营养性贫血改善作用的研究 [J]. 经济动物学报, 2022, 26(02): 116-120.

[18] 付慧,李红莹,高倩倩. 鹿血生物活性肽体外抗菌研究 [J]. 现代食品, 2023, 29(10): 204-207.

[19] 张怡,徐凡,金佳琦,等. 鹿血晶对顺铂诱导小鼠急性肾损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2022, 44(02): 403-409.

[20] 李京蔓,潘宇晨,夏晓雨,等. 中药饮片鹿血晶对巨噬细胞的免疫调节作用研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(07): 810-814.

[21] Kim H S, Hong S B, Sung H J, et al. Effect of deer blood on reduction of the side effects of chemotherapeutic drugs [J]. Korean Journal of Pharmacognosy, 2003, 34(2): 145-149.

[22] Grigor P N, Goddard P J, Littlewood C A, et al. Effects of preslaughter handling on the behaviour, blood biochemistry and carcases of farmed red deer [J]. Veterinary record, 1999, 144(9): 223-227.

[23] BarićRafaj R, Tončić J, Vicković I, et al. Haematological and biochemical values of farmed red deer (Cervus elaphus) [J]. Veterinarski arhiv, 2011, 81(4): 513-523.

[24] 张群,张继一,林麒,等. 鹿茸及其主要副产物的生物功效研究进展 [J]. 中兽医学杂志, 2023, (09): 82-84.

[25] Muir P D, Sykes A R, Barrell G K. Changes in blood content and histology during growth of antlers in red deer (Cervus elaphus) and their relationship to plasma testosterone levels [J]. Journal of anatomy, 1988, 158: 31.

[26] 黄开华,高新华,陈伟,等. 鹿血抗氧化活性肽分子量测定及其氨基酸组成分析 [J].应用技术学报, 2017, 17(01): 37-40.

[27] Rayman M P. Selenium and human health [J]. The Lancet, 2012, 379(9822): 1256-1268.

[28] Thomson C D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review [J]. European journal of clinical nutrition, 2004, 58(3): 391-402.

[29] National Research Council, Committee on Animal Nutrition, Subcommittee on

中国知网 https://Www.cnki.net

Selenium. Selenium in nutrition: Revised edition [M]. National Academies Press, 1983.

[30] Rayman M P. The importance of selenium to human health [J]. The lancet, 2000, 356(9225): 233-241.

[31] Shamberger R. Biochemistry of selenium [M]. Springer Science & Business Media, 2012.

[32] Brown K M, Arthur J R. Selenium, selenoproteins and human health: a review [J]. Public health nutrition, 2001, 4(2b): 593-599.

[33] Fairweather-Tait S J, Bao Y, Broadley M R, et al. Selenium in human health and disease [J]. Antioxidants & redox signaling, 2011, 14(7): 1337-1383.

[34] Barchielli G, Capperucci A, Tanini D. The role of selenium in pathologies: An updated review [J]. Antioxidants, 2022, 11(2): 251.

[35] Hariharan S, Dharmaraj S. Selenium and selenoproteins: It's role in regulation of inflammation [J]. Inflammopharmacology, 2020, 28: 667-695.

[36] Kim S J, Choi M C, Park J M, et al. Antitumor effects of selenium [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11844.

[37] Kieliszek M, Bano I. Selenium as an important factor in various disease states-a review [J]. EXCLI journal, 2022, 21: 948.

[38] Razaghi A, Poorebrahim M, Sarhan D, et al. Selenium stimulates the antitumour immunity: Insights to future research [J]. European Journal of Cancer, 2021, 155: 256-267.

[39] Al-Mubarak A A, van der Meer P, Bomer N. Selenium, selenoproteins, and heart failure: current knowledge and future perspective [J]. Current heart failure reports, 2021, 18: 122-131.

[40] Zhang C, Du B, Song Z, et al. Antioxidant activity analysis of collagen peptide-magnesium chelate [J]. Polymer Testing, 2023, 117: 107822.

[41] 郑英敏,袁杨,苏东晓,等. 大豆多肽-锌螯合物的制备工艺优化及其结构表征 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(14): 160-165.

[42] 林栋,孙倩,马立志,等. 核桃多肽-硒螯合物制备工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. 食品科技, 2019, 44(11): 302-307.

[43] 秦修远,刘文颖,陈立城,等. 豌豆低聚肽硒螯合物制备及结构特征研究 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(03): 28-33.

[44] 秦修远,刘文颖,张静波,等. 玉米低聚肽硒螯合物制备及结构特征研究 [J]. 食

中国知网 https://Www.cnki.net

品科技, 2018, 43(12): 293-298.

[45] 秦修远,刘文颖,林单,等. 玉米低聚肽硒螯合物的理化性质及稳定性 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 67-71.

[46] Zheng Y, Guo M, Cheng C, et al. Structural and physicochemical characteristics, stability, toxicity and antioxidant activity of peptide-zinc chelate from coconut cake globulin hydrolysates [J]. LWT, 2023, 173: 114367.

[47] Wang B, **ao S, Zhou G, et al. Novel Casein-Derived Peptide-Zinc Chelate: Zinc Chelation and Transepithelial Transport Characteristics [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2023, 71(18): 6978-6986.

[48] Wu X, Wang F, Cai X, et al. Glycosylated peptide-calcium chelate: Characterization, calcium absorption promotion and prebiotic effect [J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134335.

[49] Zhang H, Qi L, Wang X, et al. Preparation of a cattle bone collagen peptide–calcium chelate by the ultrasound method and its structural characterization, stability analysis, and bioactivity on MC3T3-E1 cells [J]. Food & Function, 2023, 14(2): 978-989.

[50] Ye Q, Wu X, Zhang X, et al. Organic selenium derived from chelation of soybean peptide-selenium and its functional properties in vitro and in vivo [J]. Food & Function, 2019, 10(8): 4761–4770.

[51] 包怡红,王芳,王文琼. 大豆多肽硒螯合物的制备及抗氧化活性分析 [J]. 食品科学, 2013, 34(16): 27-32.

[52] Qi L, Zhang H, Guo Y, et al. A novel calcium-binding peptide from bovine bone collagen hydrolysate and chelation mechanism and calcium absorption activity of peptide-calcium chelate [J]. Food Chemistry, 2023, 410: 135387.

[53] Yang S, Hou Y, Huang J, et al. Preparation, structural characterization and functional properties of a novel selenium chelating peptide derived from the hydrolyzate of wheat protein [J]. International Journal of Food Properties, 2023, 26(2): 3241-3260.

[54] .Jia J, Liu Q, Liu H, et al. Structure characterization and antioxidant activity of abalone visceral peptides-selenium in vitro [J]. Food Chemistry, 2024, 433: 137398.

[55] Qu W, Feng Y. Preparation, structural and functional characterization of corn peptide-chelated calcium microcapsules using synchronous dual frequency

中国知网 https://Www.cnki.net

ultrasound [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2024, 102: 106732.

[56] He H N, Zhao D Q, Lu S Y, et al. Determination of Amino Acids in Sika Deer Antler Velvet and Red Deer Antler Velvet by Pre-column Derivatization HPLC [J]. Herald of Traditional Chinese Medicine, 2018, 24(24): 80-84.

[57] Treffers C, Chen L, A nderson R C, et al. Isolation and characterisation of antim icrobial peptides from deerneutrophils [J]. Int.J.Antim icrob.Agents, 2005, 26(2): 165-169.

[58] Michatowski, Tadeusz. The Titration in the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination:Base or Acid as Titrant? [J]. Journal of Chemical Education, 2013, 90(2): 191-197

[59] Dai H, Cao Y, Fu Y, et al. Sustainable and one-pot fabrication of peptide chelated calcium from fish scale hydrolysates [J]. Collagen and Leather, 2024, 6(7): 2-11.

[60] Rodriguez MD, Monsierra L, Mansilla PS, et al. Phenolic Characterization of a Purple Maize (Zea mays cv. "Moragro") by HPLC-QTOF-MS and Study of Its Bioaccessibility Using a Simulated In Vitro Digestion/Caco-2 Culture Model [J]. Agric Food Chem. 2024, 72(12): 6327-6338.

[61] Wang Z, Li G, Liu X. Identification of Corn Peptides with Alcohol Dehydrogenase Activating Activity Absorbed by Caco-2 Cell Monolayers [J]. Molecules, 2024, 29(7): 1523.

[62] Du C, Wang P, Li Y, et al. Investigation of selenium and selenium species in Cardamine violifolia using in vitro digestion coupled with a Caco-2 cell monolayer model [J]. Food Chemistry, 2024, 444: 138675.

[63] Gu I, Brownmiller C, Howard L, et al. Effects of black raspberry, blueberry, and blackberry volatile extracts on intestinal barrier dysfunction and inflammation in a Caco-2/RAW264.7 cells co-culture model [J]. Journal of Functional Foods, 2024, 114: 106069.

[64] Jacob S ， Pranav S ， Charles K ， et al. Automated Measurement of Transepithelial Electrical Resistance (TEER) in 96-Well Transwells using ECIS TEER96: Single and Multiple Time Point Assessments. [J]. SLAS technology, 2023, 29(1): 100116.

[65] Maqoud F, Orlando A, Tricarico D, et al. Anti-Inflammatory Effects of a Novel Acetonitrile–Water Extract of Lens Culinaris against LPS-Induced Damage in Caco-2 Cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(7): 3802.

中国知网 https://Www.cnki.net

[66] Silva D S A D M, Bridi R, Santé A F M, et al. Soluble and insoluble-bound phenolic bioactive compounds of Tortola bean leaf and their antioxidant properties in chemical-based assays and Caco-2 cells [J]. Food Bioscience, 2024, 57: 103616.

[67] Belaid M, Javorovic J, Pastorin G, et al. Development of an in vitro co-culture model using Caco-2 and J774A. 1 cells to mimic intestinal inflammation [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2024: 114243.

[68] YE Q W, WU X P, ZHANG X Y, et al. Organic selenium derived from chelation of soybean peptide-selenium and its functional properties in vitro and in vivo [J]. Food &Function, 2019, 10(8): 4761-4770.

[69] Cristina T F, Manuel A, Javier V. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates [J].Food Chemistry, 2011, 129, 485–490.

[70] Wu W M, He L C, Liang Y H, et al. Preparation process optimization of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis [J]. Food Chemistry, 2019, 284: 80–89.

[71] Ke H I, Ma1 R J, Liu X Y, et al. Highly effective peptide-calcium chelate prepared from aquatic products processing wastes: Stickwater and oyster shells [J]. LWT - Food Science and Technology, 2022, 168: 113947.

[72] Cui P, Sun N, Jiang P, et al. Optimised condition for preparing sea cucumber ovum hydrolysate-calcium complex and its structural analysis [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2017, 52(8): 1914-1922.

[73] Wu W, He L, Liang Y, et al. Preparation process optimization of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis[J]. Food Chemistry, 2019, 284: 80-89.

[74] Meng K, Chen L. Effects of zinc sulfate and zinc lactate on the properties of tilapia (Oreochromis Niloticus) skin collagen peptide chelate zinc [J]. Food Chemistry, 2021, 347: 129043.

[75] Wang B W, Cheng F S, Gao S, et al. Double enzymatic hydrolysis preparation of heme from goose blood and microencapsulation to promote its stability and absorption [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 699-704.

中国知网 https://Www.cnki.net

[76] Bao X L, Yang B. A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates [J]. Journal of Food Science, 2008, 73(3): 117–121.

[77] Liu F, Wang L, Wang R, et al. Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of peptide-calcium complex [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(31): 7537–7544.

[78] Wang Z Y, Cheng S, Wu D, et al. Hydrophobic peptides from oyster protein hydrolysates show better zinc-chelating ability [J]. Food Bioscience, 2021, 41, 100985.

[79] Qu W J, Feng Y T, Xiong T, et al. Preparation of corn ACE inhibitory peptide-ferrous chelate by dual-frequency ultrasound and its structure and stability analyses [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 83, 105937.

[80] .Yuan F, Fu Y, Ma L, et al. Calcium-chelating peptides from rabbit bone collagen: characterization, identification and mechanism elucidation [J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(3): 1485-1493.

[81] Xiu Y, Jiang T, Guo M, et al. Structure and composition of a potential antioxidant obtained from the chelation of pea oligopeptide and sodium selenite [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64, 103619.

[82] Zhang C, Du B W, Song Z H, et al. Antioxidant activity analysis of collagen peptide-magnesium chelate [J]. Polymer Testing, 2023, 117, 107822.

[83] Meng E K, Chen L, Xia G H, et al. ffects of zinc sulfate and zinc lactate on the properties of tilapia (Oreochromis Niloticus) skin collagen peptide chelate zinc [J]. Food Chemistry, 2021, 347, 129043.

[84] Suna R N, Liub X F, Yub Y, et al. Preparation process optimization, structural characterization, and in vitro digestion stability analysis of Antarctic krill (Euphausia superba) peptides-zinc chelate [J]. Food Chemistry, 2021, 340: 12805.

[85] Zhang Y J, Ding X J, Li M Q. Preparation characterization and in vitro stability of iron-chelating peptides from mung beans [J]. Food Chemistry, 2021, 349, 1291011.

[86] Chen M, Ji H, Zhang Z, et al. A novel calcium-chelating peptide purified from Auxis thazard protien hydrolysate and its binding properties with calcium [J]. Journal of Functional Foods,2019, 60, 103447.

[87] Athira S, Mann B, Sharma R, et al. Preparation and characterization of

中国知网 https://Www.cnki.net

iron-chelating peptides from whey protein: An alternative approach for chemical iron fortification [J]. Food Research International, 2021, 141, 110133.

[88] Wu, J, Cai, X, Tang, M, et al. Novel calcium-chelating peptides from octopus scraps and their corresponding calcium bioavailability [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(2): 536–545.

[89] Qu W, Feng Y, Xiong T, et al. Preparation of corn ACE inhibitory peptide-ferrous chelate by dual-frequency ultrasound and its structure and stability analyses [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 83, 105937.

[90] Garcia V E R B, Makiyama N E, Sampaio R G, et al. Effects of Branched-Chain Amino Acids on the Inflammatory Response Induced by LPS in Caco-2 Cells[J]. Metabolites, 2024, 14(1): 76.

[91] Cai L, Wu S, Jia C, et al. Hydrolysates of hemp (Cannabis sativa L.) seed meal: Characterization and their inhibitory effect on α-glucosidase activity and glucose transport in Caco-2 cells [J]. Industrial Crops & Products, 2023, 205, 117559.

[92] Chen X, Hu H, Lin X, et al. Euphorbia factor L1 inhibited transport channel and energy metabolism in human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 169: 115919.

[93] Ge M X, Chen R P, Zhang L, et al. Novel Ca-Chelating Peptides from Protein Hydrolysate of Antarctic Krill (Euphausia superba): Preparation, Characterization, and Calcium Absorption Efficiency in Caco-2 Cell Monolayer Model [J]. Marine Drugs, 2023, 21(11): 579.

[94] Galkin A, Tammela P. Natural Product–Drug Interactions and Their Evaluation Using a Caco-2 Cell Culture Model [J]. Natural Product Communications, 2023, 18(11): 1934578X231207263.

[95] 曾鹏,朱培亮,黄俊章,等. 基于网络药理学和分子对接的白药子抗口腔鳞癌作用机制研究 [J]. 肇庆学院学报, 2024, 45(02): 1-8.

[96] Zhou N, Zhong Y, Liu H. Characterization and relationship analysis of antioxidant and anti-inflammatory peptides in pomelo fruitlet albumin [J]. Food Chemistry, 2024, 446, 138798.

[97] Saadh J, Jasim A, Ortiz C, et al. Inhibitory effects of menthol, B12N12, B16N16, Al12N12, Al16N16, and their complexes on tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and their potential anti-inflammatory activity: A study using DFT and molecular docking [J]. Inorganic Chemistry Communications, 2024, 162, 112187.

中国知网 https://Www.cnki.net

[98] Zhang X, Jin Q, Zhou X, et al. Chemical constituents of Rubia yunnanensis and their cytotoxicity and anti-inflammatory activities [J]. Phytochemistry Letters, 2024, 60: 199-206.

中国知网 https://Www.cnki.net

附　录

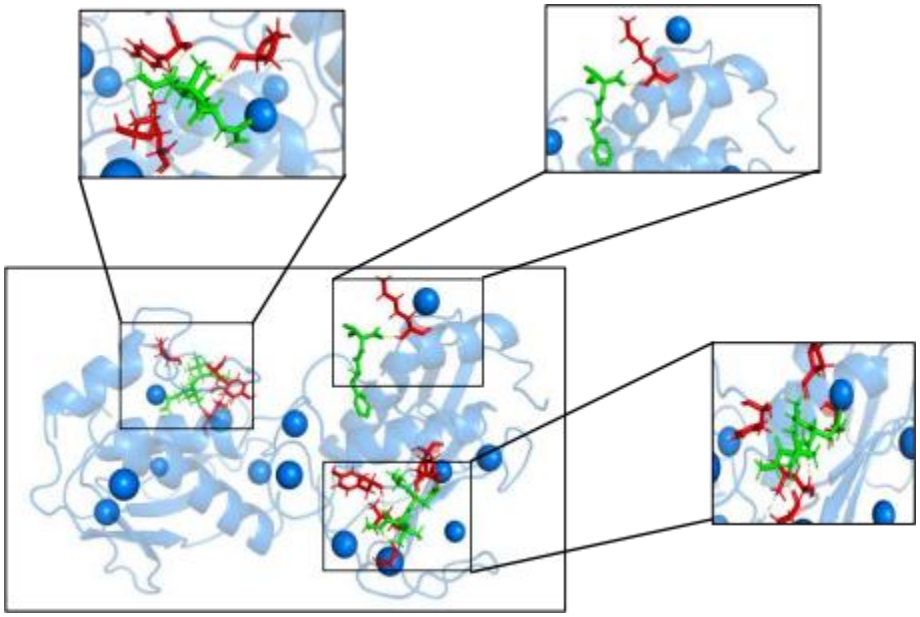


图 5.11 Phe-Ile 与 1gkc 的对接结果

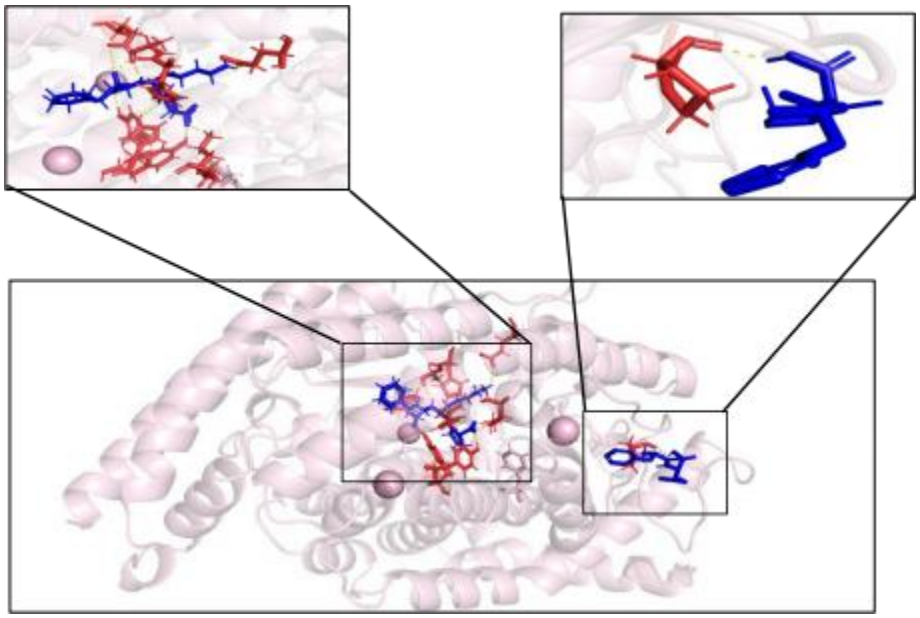


图 5.12 Phe-Ile 与 1086 的对接结果

中国知网　https://Www.cnki.net

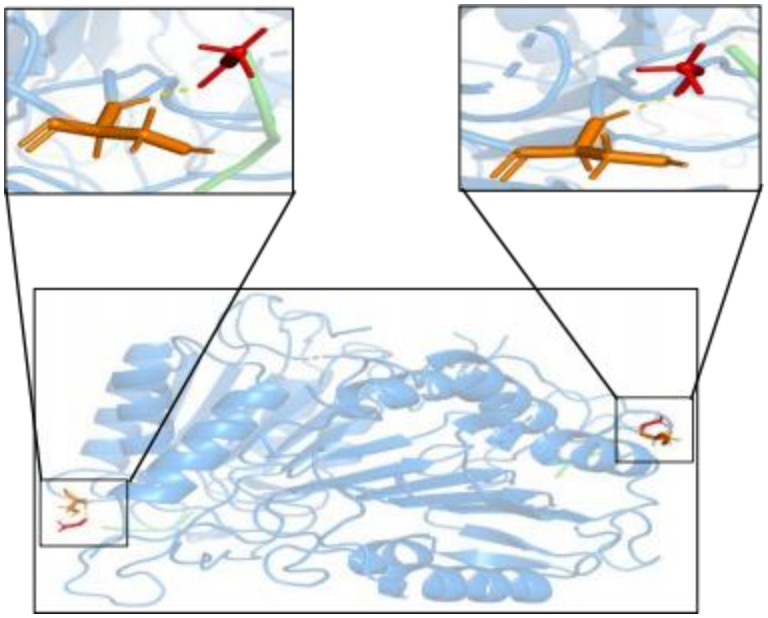


图 5.13 Phe-Ile 与 1086 的对接结果

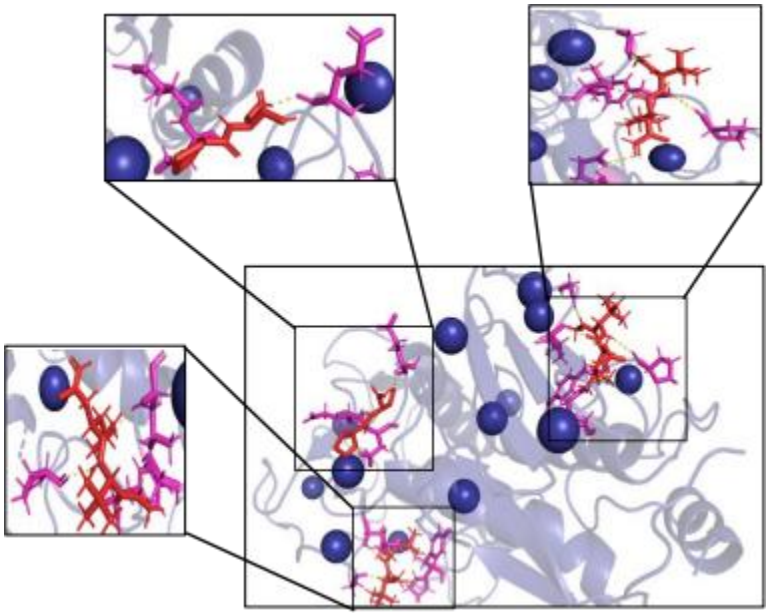


图 5.14 Phe-Ile 与 2h5j 的对接结果

中国知网 https://Www.cnki.net

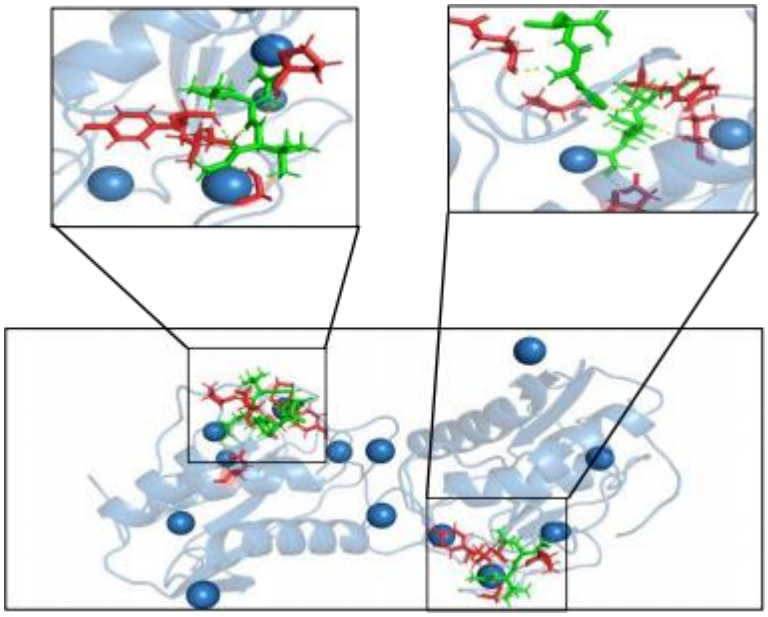


图 5.15 Pro-Ser 与 1gkc 的对接结果

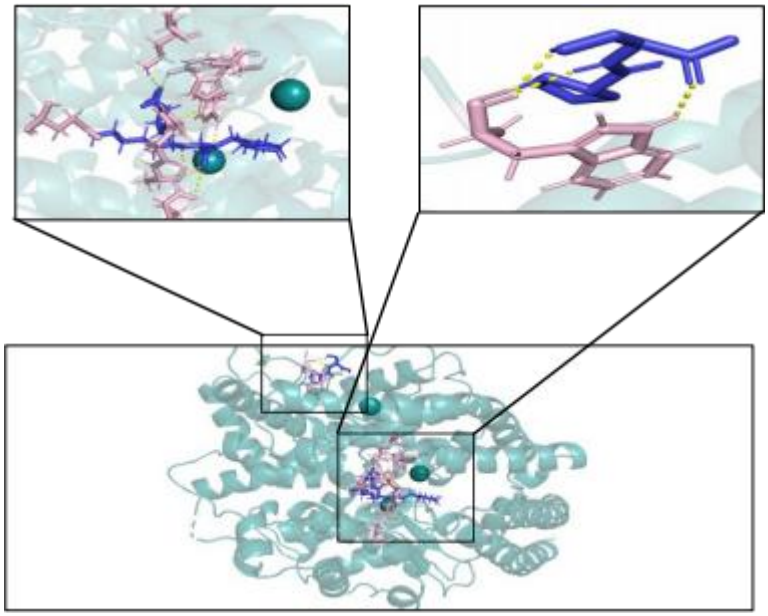


图 5.16 Pro-Ser 与 1086 的对接结果

中国知网 https://Www.cnki.net