

南瓜籽蛋白肽的制备及其延缓肌肉衰减的活性评价

张早伟¹, 喻勤^{2*}, 严建刚², 杜玉兰², 谢岚², 李晓敏², 汪旭霆¹, 肖丹华²

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006) (2. 完美(广东)日用品有限公司, 广东中山 528400)

摘要: 为提升南瓜籽粕的价值, 探究南瓜籽蛋白肽在延缓肌肉衰减的活性及机理, 以南瓜籽粕为原料, 利用酶解技术制备南瓜籽蛋白肽, 对制备工艺进行优化, 并对其延缓肌肉衰减的活性进行评价。采用不同的蛋白酶对南瓜籽粕进行酶解, 进行蛋白酶的筛选以及单因素实验和响应面优化实验, 通过评价最终酶解产物对氧化应激、炎症、线粒体功能的影响, 探究其延缓肌肉衰减的机理。结果显示, 利用碱性蛋白酶和胰酶双酶复合酶解制备的南瓜籽蛋白肽效果最优, 最佳工艺条件为酶解时间 3.50 h、双酶比例 2.97:1、加酶量 0.76%。在此条件下制备的南瓜籽蛋白肽, 可使秀丽隐杆线虫身体摆动次数达 20.63 次/30 s, 相对于未干预组 13.30 次/30 s 有显著提升效果。此外, 最优条件下的南瓜籽蛋白肽显示出优异的抗氧化活性 (CAT 活性提升 2.50 倍、GSH 活性提升 0.49 倍、MDA 水平降低 75.21%)、抗炎活性 (TNF- α 水平降低 41.95%、IL-6 水平降低 69.57%)、线粒体功能 (ATP 水平提升 1.10 倍)。该研究确定了南瓜籽蛋白肽的制备工艺, 同时指出, 其具有提升线虫运动能力以及提升 C2C12 细胞的抗氧化、抗炎、线粒体功能能力, 为南瓜籽蛋白肽延缓肌肉衰减提供理论基础。

关键词: 南瓜籽蛋白肽; 生物活性肽; 肌肉衰减; 秀丽隐杆线虫

文章编号: 1673-9078(2026)03-43-53 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.3.1802

Preparation of Peptides from Pumpkin Seed Proteins and Evaluation of Their Capacity to Delay Muscle Atrophy

ZHANG Zaowei¹, YU Qin^{2*}, YAN Jiangang², DU Yulan², XIE Lan², LI Xiaomin², WANG Xuting¹, XIAO Danhua²

(1.College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

(2.Perfect (Guangdong) Commodity Co. Ltd., Zhongshan 528400, China)

Abstract: To increase the value of pumpkin seed meal and investigate the activity and mechanism of pumpkin seed protein peptides in delaying muscle atrophy, pumpkin seed protein-derived peptides were prepared from pumpkin seed meal using enzymatic hydrolysis. The preparation process was optimized, and the ability of pumpkin seed protein peptides to delay muscle atrophy was evaluated. Different proteases were employed to hydrolyze pumpkin seed meal, and proteinase screening, single-factor experiments, and response surface methodology (RSM) experiments were carried out. By evaluating the effects of the enzymatic hydrolysis products on oxidative stress, inflammation, and mitochondrial function, the mechanism of muscle atrophy retardation was explored. Pumpkin seed protein peptides prepared via dual-enzyme complex hydrolysis using alkaline protease and trypsin displayed the most potent effects. The optimal process conditions included 3.50 hours of hydrolysis, an alkaline protease to trypsin ratio of 2.97:1, and an enzyme dosage of 0.76%. Pumpkin seed protein peptides prepared under these conditions could increase the *Caenorhabditis elegans* body bending frequency to 20.63 times/30 s, significantly greater than that of the non-intervention group (13.30 times/30 s).

引文格式:

张早伟,喻勤,严建刚,等.南瓜籽蛋白肽的制备及其延缓肌肉衰减的活性评价[J].现代食品科技,2026,42(3):43-53.

ZHANG Zaowei, YU Qin, YAN Jiangang, et al. Preparation of peptides from pumpkin seed proteins and evaluation of their capacity to delay muscle atrophy [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(3): 43-53.

收稿日期: 2024-12-03 ; 修回日期: 2025-05-12 ; 接受日期: 2025-05-16
基金项目: 广东省重点领域研发计划重点专项 (2022B0202030001)
作者简介: 张早伟 (2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药学研究, E-mail : 20221120284@stu.gzucm.edu.cn
通讯作者: 喻勤 (1981-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 健康食品研发, E-mail : yuqin8161@perfect99.com

Pumpkin seed protein peptides under optimal conditions also exhibited excellent antioxidant activity (a 2.50-fold increase in CAT activity, a 0.49-fold increase in GSH activity, and a 75.21% reduction in MDA level), anti-inflammatory activity (a 41.95% reduction in $\text{TNF-}\alpha$ and a 69.57% reduction in IL-6), and mitochondrial function (a 1.10-fold increase in ATP). This study identified a satisfactory process to prepare pumpkin seed protein peptides and confirmed the ability of pumpkin seed protein peptides to improve locomotion in nematodes and enhance the antioxidant, anti-inflammatory, and mitochondrial function of C2C12 cells. These findings provide a theoretical basis for the use of pumpkin seed protein peptides to delay muscle atrophy.

Key words: pumpkin seed protein peptide; bioactive peptides; muscle atrophy; *Caenorhabditis elegans*

骨骼肌是人体主要的蛋白质储存库, 约占总体重的 40%, 在运动和能量代谢中发挥重要作用^[1]。肌肉衰减是一种通常发生在老年人中, 与年龄相关的全身性骨骼疾病, 这种疾病会涉及到肌肉质量和力量的加速下降, 与跌倒、死亡率和虚弱等不良后果的增加有关^[2]。肌肉衰减的具体特征为骨骼肌质量数量改变, 如肌肉纤维类型或者肌球蛋白亚型的变化、肌纤维发生萎缩, 以及肌细胞的数量和总蛋白质的损失^[3]。氧化应激、炎症、线粒体功能障碍和自噬往往在这些疾病引起的肌肉衰减中起重要作用^[4-6]。以上的各种因素会造成蛋白质的水解增加以及合成减少, 导致骨骼肌的衰减^[7,8]。与此同时, 蛋白质的衰减与蛋白质合成通路 PI3K-AKT-mTOR 和蛋白质降解通路 PI3K-AKT-FOXO 密切相关^[9,10]。有研究确定了 10 种药物干预措施: 维生素 D、联合雌激素-孕酮、生长激素、生长激素释放激素、联合睾酮-生长激素、胰岛素样生长因子-1 和睾酮等, 但是该研究只能推广到老年人, 不能够普及到肌肉衰减患者^[11]。并且此类药物对人体具有一定的副作用, 高水平的睾酮可能会带来心血管方面的副作用^[12]。到目前为止, 还没有任何专一治疗药物上市, 也没有开发出有效的治疗肌肉衰减的方法。

南瓜籽中蛋白含量丰富, 达到 30%~40%, 南瓜籽粕中蛋白质含量高达 75%, 是一种经济实惠且易于获取的蛋白质资源, 并且支链氨基酸含量丰富, 含有人体所必需的 8 种氨基酸, 也是一种优质的蛋白质食品^[13]。现阶段, 南瓜籽作为南瓜的副产品, 蛋白资源不能得到充分的利用, 无疑是一种巨大的浪费^[14]。近年来, 国内外对南瓜籽成分的活性研究逐渐增加, 在抗氧化^[15]、降血压^[16]、抗糖尿病^[17]等方面都有生理活性。除此之外, 由于南瓜籽具有高蛋白含量的优点, 可以对其采用蛋白酶进行酶解, 转化为利用率更高的生物活性小分子。已有研究证明生物活性肽具有良好的抗氧化性, 并参与调控衰老相关信号通路中重要基因的表达对衰老产生抑制效果^[18]。并且生物活性肽对肌肉功能也会产生一定的影响^[19]。南瓜籽粕作为一种经济实惠且易于获取的蛋白质资源, 为肌肉衰减的预

防和缓解提供了更多的选择性。

本研究通过不同的蛋白酶对南瓜籽粕进行酶解, 并对酶解工艺进行响应曲面的优化, 优化后的组分进行功效评价实验。旨在为南瓜籽蛋白肽在肌肉衰减中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南瓜籽粕, 北京宝得瑞健康产业有限公司; 淀粉酶, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 纤维素酶, 安琪酶制剂(宜昌)有限公司; 碱性蛋白酶、胰酶、风味蛋白酶、植物水解蛋白酶、2SD、AXH、AY50C、NY50C, 南宁东恒华道生物科技有限公司; 盐酸、氢氧化钠, 国药集团化学试剂有限公司; C2C12 细胞, 武汉普诺赛生命科技有限公司; N2 秀丽隐杆线虫, CGC 美国秀丽隐杆线虫中心; MDA 检测试剂盒、 $\text{TNF-}\alpha$ 检测试剂盒、IL-6 检测试剂盒、ATP 检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; CAT 检测试剂盒, 北京盒子生工科技有限公司; GSH 检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器和设备

TW20 恒温水浴锅, 苏州赛恩斯仪器有限公司; 4446025 搅拌器, 艾卡(广州)仪器设备有限公司; TS6006 冷冻干燥机, 上海新诺仪器集团有限公司; WH620R-D 多孔位搅拌器, 维根技术(北京)有限公司; R1010 旋转蒸发仪, 郑州长城科工贸有限公司; Sorvall LYNX400 高速落地离心机, 赛默飞世尔科技公司; K1100 全自动凯氏定氮仪, 济南海能仪器有限公司; SYNERGY H1 多功能酶标仪, 安捷伦科技(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 南瓜籽粕成分分析

总糖、果糖、蔗糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖测定

参考《GB 5009.8-2023 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定》，总膳食纤维测定参考《GB 5009.88-2023 食品安全国家标准 食品中膳食纤维的测定》，脂肪测定参考《GB 5009.6-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》，蛋白质测定参考《GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》，水分测定参考《GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中水分的测定》，灰分测定参考《GB 5009.4-2016 食品安全国家标准 食品中灰分的测定》。

1.3.2 南瓜籽蛋白肽的制备

取一定量南瓜籽粕溶解于水中，在水浴锅中恒温至酶解所需的温度，然后将 pH 值调节至蛋白酶最适宜的 pH 值，加入蛋白酶，利用搅拌设备在 300 r·min⁻¹ 的条件下持续搅拌，达到酶解时间后进行高温灭酶处理，冷却至室温，使用离心机在 10 000 r·min⁻¹ 的条件下离心取上清液，将上清液进行喷雾干燥或冷冻干燥为粉状保存。

1.3.3 酶解工艺的优化

1.3.3.1 蛋白酶的筛选

为了最大程度的利用南瓜籽粕蛋白资源，本研究对比单酶酶解和双酶酶解之后的肽含量，确定最优的酶解方式。

表 1 各种蛋白酶水解条件

Table 1 Various protease hydrolysis conditions			
酶种类	温度/℃	pH 值	酶解时间/h
碱性蛋白酶	50~55	8	5
胰酶	50~55	8	5
风味蛋白酶	50~55	8	5
植物水解蛋白酶	42~52	4	5
2SD	45~50	8	5
AXH	45~50	7	5
AY50C	55~60	10	5
NY50C	50~55	8	5

精准称取 300.00 g 南瓜籽粕，按照 1:9 的料液比溶解于水中，并使用搅拌桨在 300 r·min⁻¹ 的条件下持续搅拌（直至酶解结束），在恒温水浴锅中将样品恒温至各蛋白酶酶解的最佳温度，然后将 pH 值调节至蛋白酶酶解最适宜 pH 值，在蛋白酶酶解之前，先加入淀粉酶和纤维素酶进行酶解，灭酶处理完成后，按称取样品量质量分数 1.00% 的添加量加入各种蛋白酶，按照表 1 所示条件，酶解 5 h 后在 95 ℃ 的条件下进行灭酶处理 10 min，然后冷却至室温，使用离心机在 10 000 r·min⁻¹ 的条件下离心 10 min，取上清液进行冷

冻干燥处理，得到的干燥样品用于后续检测。以酶解样品肽含量以及其对秀丽隐杆线虫运动行为学（身体摆动以及咽泵）的影响为指标，对第一种酶进行筛选。

取第一种蛋白酶酶解液离心后的沉淀，然后分别加入等比例的第二种蛋白酶进行酶解，步骤如上所述，对第二种蛋白酶进行筛选。将筛选得到的两种蛋白酶再同时加入南瓜籽粕溶液中，对比分步酶解和混合酶解的酶解效果，选择最优的酶解方式。

1.3.3.2 单因素实验

选择两个最优的蛋白酶，考察指标为肽含量、对秀丽隐杆线虫身体摆动以及吞咽行为学的影响。优化条件为：酶比例（3:1、2:1、1:1、1:2、1:3）、加酶量（质量分数为 0.20%、0.60%、1.00%、1.40%、1.80%）、酶解时间（1、2、3、4、5 h）、底物质量分数（4.00%、6.00%、8.00%、10.00%、12.00%）。除了以上条件外，其余的条件均控制不变，酶解温度为 52 ℃，酶解 pH 值为 8，酶解时间 5 h，酶比例为 2:1，加酶量 1.00%（质量分数），底物质量分数 10.00%。

1.3.3.3 响应曲面优化实验

通过单因素实验的结果进行分析，以肽含量、对秀丽隐杆线虫身体摆动的影响为考察指标，确定加酶量（A）、酶解时间（B）、酶比例（C）为三个因素，每个因素设置三个水平，进行响应曲面优化实验，以得到南瓜籽蛋白的最佳酶解工艺。各单因素及其水平设计见表 2。

表 2 响应面因素与水平设计

Table 2 Response surface factors and horizontal design			
因素	水平		
	-1	0	1
A 加酶量（% 质量分数）	0.20	0.60	1.00
B 酶解时间（h）	2	4	6
C 酶比例	1:3	1:1	3:1

1.3.4 酸溶蛋白含量以及肽含量的测定

酸溶蛋白含量：精确称取 1.00 g 样品于 50 mL 容量瓶中，用质量分数 15.00% 三氯乙酸定容并摇匀，用滤纸进行过滤，然后取 10 mL 过滤后的样品于消化试管中，分别加入 5 g 硫酸铜催化剂，再分别加入 15 mL 浓硫酸在 420 ℃ 条件下消化 1.5 h。消化完成后进行冷却，然后用凯式定氮仪进行测定。

$$A = \frac{(V - V_0) \times 0.0140 \times 6.25 \times C}{m \times \frac{10}{50}} \times 100\%$$

(1)

式中：
A——酸溶蛋白含量（% 质量分数）；

V —消耗硫酸的体积, mL;
 V_0 —空白组消耗硫酸体积, mL;
 C —硫酸的浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
 m —称取样品的质量, g。
 $B=A-D$ (2)
式中:
 B —肽含量, % (质量分数);
 A —酸溶蛋白含量, % (质量分数);
 D —游离氨基酸含量, % (质量分数)。

1.3.5 线虫延缓肌肉衰减的活性评价研究

1.3.5.1 线虫的同步化

将处于产卵期的 N2 型线虫用 M9 缓冲液清洗至 1.5 mL 离心管中, 离心弃上清, 再用 M9 缓冲液清洗三次, 去掉一半上清液, 加入线虫裂解液, 迅速震荡直至线虫完全裂解, 常温下 $5\,000\,\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 弃去上清, 再用 M9 缓冲液清洗三次, 然后将虫卵放在不含有食物的 NGM 板上 $20\,^{\circ}\text{C}$ 培养, 待其孵化成幼虫备用^[20]。

1.3.5.2 线虫培养

参照 Solis 等^[21]的方法, 将孵化出的幼虫用 S.M 培养基调至适宜的虫密度, 然后用 24 孔板进行培养, 每个孔加入 1 mL 含有幼虫的 S.M 培养基, 然后设置空白组以及 $15\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的南瓜籽蛋白酶解样品的样品组, 处理之后 $20\,^{\circ}\text{C}$ 培养。

1.3.5.3 线虫行为学能力的测定

身体摆动: 取培养 15 d 后的线虫, 将每个孔的线虫混匀, 每个孔取 $100\,\mu\text{L}$ 于载玻片上, 将线虫分散均匀避免有重叠, 然后在光学显微镜下观察线虫, 统计线虫 30 s 的身体摆动情况。

咽泵: 取培养 15 d 后的线虫, 将每个孔的线虫混匀, 每个孔取 $10\,\mu\text{L}$ 于载玻片上, 将线虫分散均匀避免有重叠, 然后在光学显微镜下观察线虫, 统计线虫 30 s 的咽泵情况。

1.3.6 C2C12细胞延缓肌肉衰减活性机理研究

1.3.6.1 C2C12细胞的培养

C2C12 小鼠成肌细胞采用 DMEM 高糖培养基 (含有体积分数 10% 胎牛血清以及体积分数 1% 青霉素链霉素双抗) 进行培养, 放置 $37\,^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中, 待其生长至 80% 左右进行传代和铺板。

1.3.6.2 肌肉衰减模型的建立

参照郎爽等^[22]的方法, 采用 D-半乳糖 (D-gal) 作用于 C2C12 成肌细胞来模拟自然衰老过程中的肌肉衰减。

1.3.7 体外抗氧化活性的测定

实验设计共分为五个组: 空白对照组, D-半乳糖

模型组 (质量浓度为 $20\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 低、中、高南瓜籽酶解液样品组 (PSPP 质量浓度分别为 0.625 、 1.25 、 $2.50\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。将 C2C12 成肌细胞以每孔 3×10^5 的数量接种于六孔板, 培养 24 h 后对细胞进行样品处理, 继续培养 48 h, 按照试剂盒说明书操作, 分别测定 C2C12 细胞中过氧化氢酶 (CAT)、脂质氧化 (MDA)、还原性谷胱甘肽 (GSH) 含量。

1.3.8 炎症反应相关指标的测定

实验设计共分为五个组: 空白对照组, D-半乳糖模型组 (质量浓度为 $20\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 低、中、高南瓜籽酶解液样品组 (PSPP 质量浓度分别为 0.625 、 1.25 、 $2.50\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。细胞操作方法如 1.3.6 所述, 按照检测试剂盒的说明书操作, 分别测定 C2C12 细胞产生的肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 含量。

1.3.9 线粒体功能指标的测定

实验设计共分为五个组: 空白对照组, D-半乳糖模型组 (质量浓度为 $20\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 低、中、高南瓜籽酶解液样品组 (PSPP 质量浓度分别为 0.625 、 1.25 、 $2.50\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。细胞操作方法如 1.3.6 所述, 按照检测试剂盒的说明书操作, 分别测定 C2C12 细胞内 ATP 的含量以及线粒体膜电位。

1.4 数据处理与分析

利用 Design-Expert V 10.0.1 软件对响应曲面实验进行设计与分析; 利用 GraphPad Prism 对实验数据进行单因素方差分析并做图。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 南瓜籽粕成分检测结果

表 3 南瓜籽粕的基本成分
Table 3 Basic components of pumpkin seed meal

序号	检测项目	检测方法	含量/%
1	总糖含量/(g/100g)	GB 5009.8-2023	2.80
2	果糖/(g/100g)		0.39
3	蔗糖/(g/100g)		2.10
4	葡萄糖/(g/100g)		0.34
5	乳糖/(g/100g)		—
6	麦芽糖/(g/100g)		—
7	总膳食纤维/(g/100g)	GB 5009.88-2023	7.37
8	脂肪/(g/100g)	GB 5009.6-2016	7.20
9	蛋白质/(g/100g)	GB 5009.5-2016	66.20
10	水分/%	GB 5009.3-2016	8.11
11	灰分/%	GB 5009.4-2016	7.80

南瓜籽粕的主要成分检测结果见表3,可以发现南瓜籽经过去油之后得到的南瓜籽粕脂肪含量(质量分数7.20%)降低,并且含有丰富的蛋白质(质量分数66.20%),对于后续的酶解工艺研究具有一定的开发价值。

2.2 南瓜籽蛋白肽的制备

2.2.1 蛋白酶的筛选结果

选择碱性蛋白酶、胰酶、植物水解蛋白酶、风味蛋白酶、2SD、AXH、NY50C、AY50C八种蛋白酶,分别在各种酶最佳条件下进行酶解。活性肽的特定生理活性由氨基酸组成和序列决定^[23]。所以可以利用不同蛋白酶的特异性酶解产生不同的活性肽片段去探究其缓解肌肉衰减的活性。如图1所示,碱性蛋白酶、植物水解蛋白酶、AY50C和NY50C四种蛋白酶酶解之后的产物肽含量要高于其他蛋白酶,分别为44.93%、45.69%、44.91%、40.42%(质量分数)。碱性蛋白酶、胰酶、AY50C和NY50C四种蛋白酶酶解物对线虫运动能力影响较大,碱性蛋白酶酶解物对可以使秀丽隐杆线虫的身体摆动次数达到21次/30s,可以使咽泵次数达到35次/30s,然而空白组的秀丽隐杆线虫身体摆动次数仅为13次/30s,咽泵次数为15次/30s。以上三个指标分别占比权重(肽含量质量分数40%、身体摆动次数30%、咽泵次数30%)进行综合考虑,碱性蛋白酶对肽含量以及线虫身体摆动次数影响最大,优先碱性蛋白酶作为第一种蛋白酶。

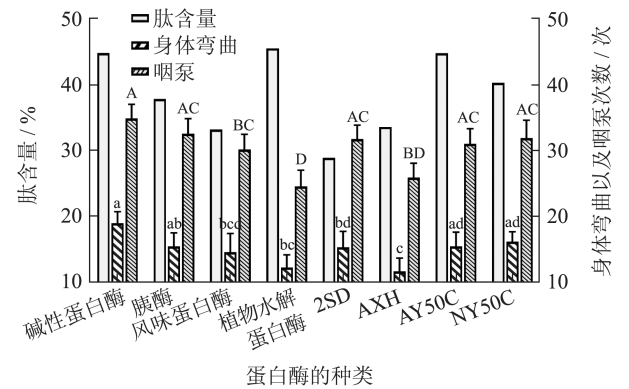


图1 第一种蛋白酶制备南瓜籽蛋白酶解物的肽含量以及对线虫身体摆动以及咽泵频率影响

Fig.1 The initial proteinase was employed to produce a pumpkin seed protein hydrolysate enriched with peptides, and its effects on the body waving and pharyngeal pump frequency of nematodes

注: 不同字母各组之间代表具有统计学差异 ($P<0.05$), 相同字母各组之间无统计学差异 ($P>0.05$)。下图同。

第二次酶解结果见图2, 由图可知, NY50C、胰

酶以及风味蛋白酶三种蛋白酶对滤渣进行酶解后肽含量(质量分数)最高, 分别为65.88%、60.51%和53.28%。胰酶、风味蛋白酶以及NY50C三种蛋白酶对秀丽隐杆线虫的身体摆动以及咽泵次数影响最大。以上三个指标分别占比权重(肽含量40%、身体摆动次数30%、咽泵次数30%)进行综合考虑, 选择胰酶作为第二种蛋白酶。为进一步优化工艺, 节省时间以及能耗, 将上述的分步酶解与双酶混合同步酶解对比, 重复实验结果一致(肽含量为62.00%、身体摆动次数为21.90次/30s、咽泵次数为35.80次/30s), 张慧杰^[24]在研究野菊花内酯过程中统计给药12d秀丽隐杆线虫身体摆动以及咽泵次数分别为25次·min⁻¹、28次·min⁻¹, 由此可以发现南瓜籽蛋白肽具有缓解肌肉衰减的潜力。因此后续采用碱性蛋白酶和胰酶双酶混合同步酶解。

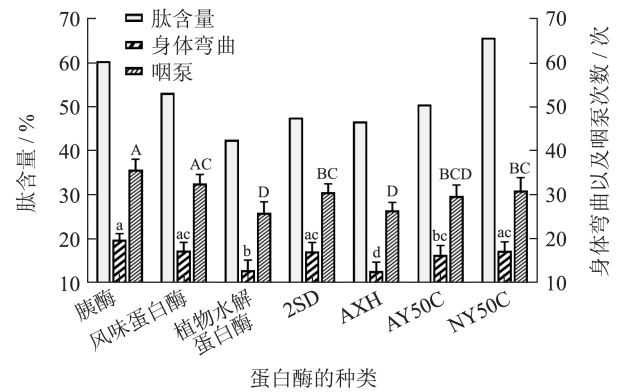


图2 第二种蛋白酶制备南瓜籽蛋白酶解物的肽含量、对线虫身体摆动以及咽泵频率影响

Fig.2 The second protease was employed to prepare a pumpkin seed protein hydrolysate enriched with peptides, and its effects on the body waving of nematodes and the frequency of their pharyngeal pump

2.2.2 单因素优化实验结果

如图3a所示, 刚开始随着蛋白酶浓度的上升, 肽含量也会逐步上升, 说明此时酶量仍处于较低水平, 在加酶量达到0.60%(质量分数)时肽含量达到60.80%(质量分数)。通过增加蛋白酶的用量来增加与蛋白的接触面积进而增加蛋白的酶解效率, 加酶量超过0.60%之后肽含量会呈现下降的趋势, 在蛋白质酶解发生的过程中, 不仅蛋白本身可以作为蛋白酶催化的底物, 所生成的肽分子也可以作为蛋白酶催化的底物, 因此可能会存在肽分子的过度酶解导致肽含量的下降。在酶解反应的最后阶段, 整个反应体系中存在很多小分子肽以及氨基酸, 他们会通过进攻酶-肽片段, 与另一个肽片段的酰胺键结合, 发生蛋白质合成反应, 形成与原来的小分子肽结构显著不同的新小分

子肽^[25]。秀丽隐杆线虫在肌肉衰减等疾病中是一种成熟的模型动物, 衰老后的秀丽隐杆线虫会发生一定程度的肌肉衰减, 并伴随有运动能力的下降^[26]。由单因素实验结果可知, 线虫身体摆动次数与咽泵次数具有一定的关联性, 因此选择以秀丽隐杆线虫的身体摆动为评价指标, 评判样品对肌肉衰减的缓解作用。由实验结果可知, 在加酶量质量分数为 0.60% 时, 酶解物对秀丽隐杆线虫的身体摆动次数影响最大, 为 20.40 次/30 s, 并且随着酶量的继续增加, 对线虫的有利影响逐渐减弱。因此在加酶量质量分数为 0.60% 左右时较为合适。

如图 3b 所示, 在酶解时间为 4 h 时, 肽含量为最大值 62.70% (质量分数), 并随着酶解时间的延长, 肽含量不增反减, 说明此时酶解已达终点。由秀丽隐杆线虫的身体摆动次数可知, 刚开始随着酶解时间的延长, 对线虫的身体摆动的有利影响逐渐增加, 达到 4 h 后继续延长酶解时间可以发现此时样品对线虫有利影响逐渐减弱。因此在酶解时间为 4 h 左右时较为合适。

如图 3c 所示, 可以发现碱性蛋白酶在双酶中所占比例越高时, 对秀丽隐杆线虫运动的有利影响最大, 当双酶比例为 3:1 的时候, 秀丽隐杆线虫身体摆动为 22.60 次/30 s。尽管此时的肽含量为 55.91% (质量分数), 以功能为导向, 因此在酶比例为 3:1 左右时较为合适。

如图 3d 所示, 随着底物质量分数的变化, 肽含量的结果虽有变化, 但对秀丽隐杆线虫运动的影响甚小, 因此后续响应曲面不考虑此因素。

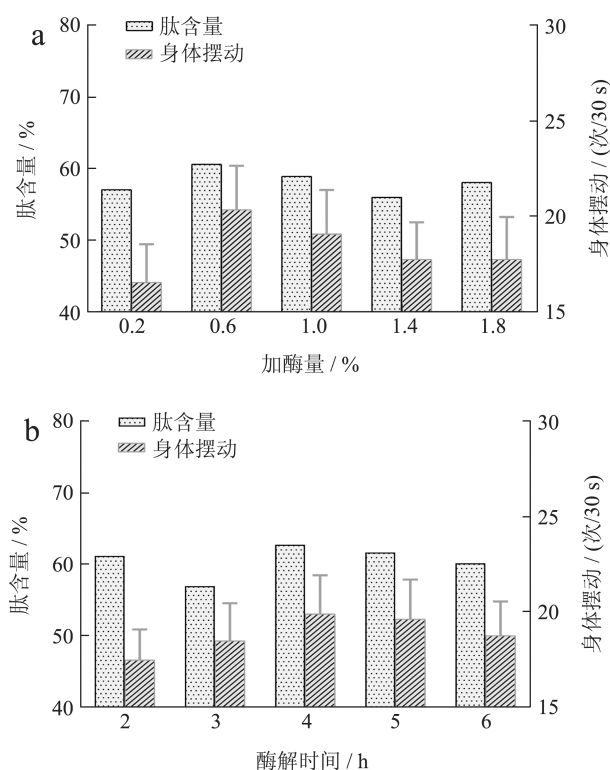


图 3 不同单因素对南瓜籽蛋白酶解物肽含量及其对秀丽隐杆线虫身体摆动的影响

Fig.3 The effects of different single factors on the peptide content of pumpkin seed protease hydrolysate and its impact on the body movement of *Caenorhabditis elegans*

注: a 为加酶量; b 为酶解时间; c 为碱性蛋白酶与胰酶的比例; d 为底物质量分数。

2.2.3 响应曲面优化实验结果

根据单因素实验的结果, 以加酶量 (A)、酶解时间 (B) 和酶比例 (C) 作为三因素, 以酶解液对秀丽隐杆线虫身体摆动次数的影响为响应值, 设计出三因素三水平的响应曲面优化实验, 对酶解工艺进行优化处理, 响应曲面的设计及其结果见表 4。使用 Design-Expert V 10.0.1 对表中的数据进行回归拟合分析, 得到二次回归方程:

$$Y=20.26+0.50A+0.27B+0.83C-0.05AB+0.58AC+0.02BC-0.82A^2-1.22B^2-0.63C^2。$$

由表 5 方差分析可知, 模型的 P 值 <0.0001 , 说明实验设计的模型具有极显著差异, 失拟项的 P 值为 $0.0523 > 0.05$, 说明失拟项差异不显著, 拟合效果较好^[27]。模型的相关系数 $R^2=0.9880 > 0.9$, 说明该模型的实验值与预测值之间相关度好。然后通过分析模型中三个单因素对于线虫身体摆动的影响, 加酶量 (A)、酶解时间 (B) 以及酶比例 (C) P 值均小于 0.05, 对线虫身体摆动次数的影响显著。并且由 F 值可以得出, 对线虫身体摆动的影响由大到小依次为酶比例 $>$ 加酶

量>酶解时间，每两个独立单因素也会对线虫身体摆动次数产生影响。

表 4 响应曲面设计与结果

Table 4 Response surface design and results					
序号	A 加酶量 /%	B 酶解时间/h	C 酶比例	身体摆动 / (次 /30 s)	SD 值
1	0.2	2	50	17.53	2.38
2	1	2	50	18.60	2.36
3	0.2	6	50	17.93	3.26
4	1	6	50	18.80	4.23
5	0.2	4	25	17.93	3.09
6	1	4	25	17.80	2.34
7	0.2	4	75	18.66	3.10
8	1	4	75	20.86	2.52
9	0.6	2	25	17.33	3.52
10	0.6	6	25	18.06	3.24
11	0.6	2	75	18.73	2.19
12	0.6	6	75	19.53	2.65
13	0.6	4	50	20.33	2.21
14	0.6	4	50	20.20	2.35
15	0.6	4	50	20.40	1.83
16	0.6	4	50	20.26	2.18
17	0.6	4	50	20.13	2.57

表 5 方差分析

Table 5 Analysis of variance						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	21.46	9	2.38	63.98	<0.000 1	***
A-加酶量	2.01	1	2.01	53.92	0.000 2	***
B-时间	0.57	1	0.57	15.21	0.005 9	**
C-酶比例	5.54	1	5.54	148.73	<0.000 1	***
AB	0.010	1	0.010	0.27	0.620 5	
AC	1.36	1	1.36	36.41	0.000 5	***
BC	1.225E-3	1	1.225E-3	0.033	0.861 3	
A2	2.86	1	2.86	76.78	<0.000 1	***
B2	6.31	1	6.31	169.36	<0.000 1	***
C2	1.66	1	1.66	44.40	0.000 3	***
残差	0.26	7	0.037			
失拟项	0.22	3	0.072	6.41	0.052 3	不显著
纯误差	0.045	4	0.011			
总和	21.73	16				

注：P<0.01，差异极显著，用 ** 表示；P<0.001，差异极显著，用 *** 表示；P>0.05，差异不显著。

由 Box-Behnken 所做出的两两因素交互图可知，图中的坡度的陡峭程度反映了其对结果的影响度^[28]。

由表 5、图 4 可知两两因素交互作用中加酶量（A）与酶比例（C）的交互项显著，其响应面的坡度较为陡峭。其余两个交互项不显著，其响应面的坡度较为平缓。优化后南瓜籽蛋白制备延缓肌肉衰减肽的最佳工艺为：加酶量为 0.76%（质量分数），酶解时间为 3.50 h，酶比例为 2.97:1，最终得到的线虫身体摆动次数为 20.63 次 /30 s。在最优的条件下进行 3 次重复性实验，所得到的值与最终预测值差别不大，说明该模型优化较为准确。将此得到的酶解液进行后续冷冻干燥之后得到固体粉末，用于后续活性研究。

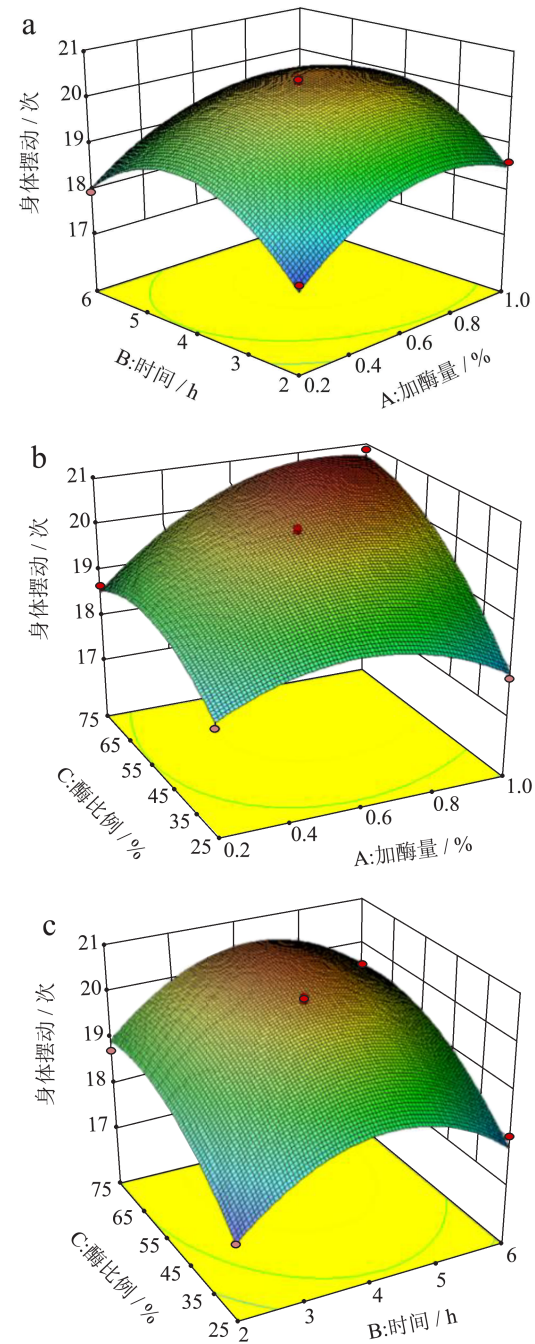


图 4 两因素交互作用响应曲面

Fig.4 Response surface of interaction between two factors

2.2.4 南瓜籽缓解肌肉衰减肽对D-半乳糖诱导的C2C12细胞氧化应激的影响

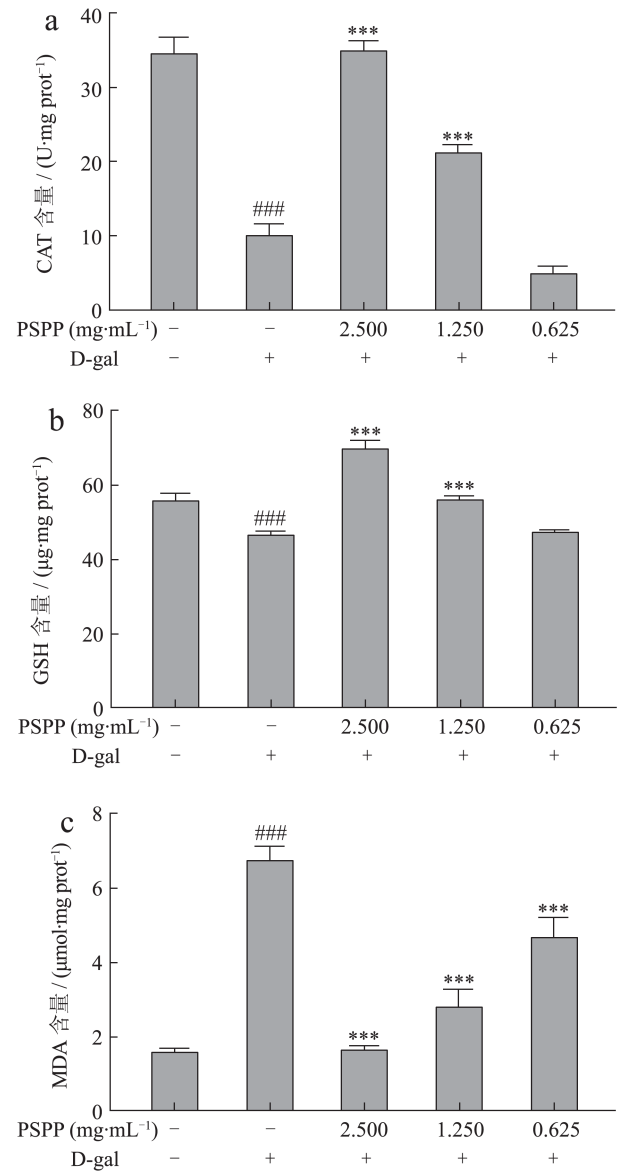


图 5 南瓜籽缓解肌肉衰减肽的抗氧化应激作用

Fig.5 Pumpkin seeds alleviate the antioxidant stress of muscle wasting peptides

注：代表模型组 (D-gal) 与空白组对比有显著性； $P<0.001$ ，差异极显著，用 *** 和 ### 表示。下同。

机体内存在氧化剂与抗氧化剂，当二者之间出现不平衡时更有利于氧化剂，导致机体发生氧化应激导致损伤，抗氧化防御的主要作用是由抗氧化酶实现的，而不是由小分子抗氧化化合物实现的^[29]。近年来 D-半乳糖被广泛的作为一种动物、细胞快速衰老模型诱导剂^[30,31]，大量的 D-半乳糖会导致细胞、动物产生氧化应激以及线粒体功能受损，其对细胞所产生的诱

导作用与细胞正常自然衰老相似^[32]。因此采用 D-半乳糖对 C2C12 细胞进行干预。由图 5 可以发现，模型组 (D-gal 造模) 相比于空白组，C2C12 细胞中抗氧化酶过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽 (GSH) 的活性分别下降 70.86% 和 16.52% ($P<0.001$)，丙二醛 (MDA) 的质量分数上升了 318.38% ($P<0.001$)。高、中剂量样品组 (2.50、1.25 mg·mL⁻¹ PSPP) 的抗氧化酶活性均显著提高 ($P<0.001$ 、 $P<0.001$)，低剂量样品组 (0.625 mg·mL⁻¹ PSPP) 对造模后的细胞内抗氧化酶含量无显著提升效果。高中低剂量样品组分别可以显著降低 MDA 的含量 ($P<0.001$)。王培宇^[33]用 H₂O₂ 处理 HSF 细胞后 GSH 含量由 19.70 μg·mL⁻¹ 降低至 15.20 μg·mL⁻¹，样品干预之后也有不同程度的提升。伍先伟^[34]探究了四种生物活性肽对 H₂O₂ 诱导的 C2C12 细胞氧化应激的影响，经过 H₂O₂ 的造模之后 MDA 质量分数升高了 60%，活性肽处理之后对 MDA 的降低有显著作用。综上所述，南瓜籽缓解肌肉衰减肽可以不同程度提高 C2C12 细胞内抗氧化酶 (CAT 和 GSH) 的活性以及降低脂质过氧化物丙二醛 (MDA) 的含量，提高机体抵御氧化应激的能力，进而缓解 D-半乳糖所引起的细胞内氧化应激，改善肌肉功能。

2.2.5 南瓜籽缓解肌肉衰减肽对D-半乳糖诱导的C2C12细胞炎症反应的影响

D-半乳糖在诱导 C2C12 细胞衰老发生氧化应激的同时，也会产生炎症因子影响肌肉的功能，并发生肌肉的衰减^[35]。炎症因子之间的相互作用会影响细胞的正常代谢，肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 由巨噬细胞分泌，影响免疫以及炎症反应，并可以抑制蛋白质的合成加速蛋白质的降解；白细胞介素-6 (IL-6) 可以通过抑制 PI3K-AKT、JAK-STAT3 信号通路激活 STAT3 蛋白，进而影响骨骼肌蛋白质的降解。由图 6 可得到，与对照组相比，经过 D-gal 的诱导，炎症因子 TNF-α 和 IL-6 水平显著升高，分别升高 0.68、5.41 倍 ($P<0.001$)，而经过样品干预之后，能显著减少由 D-gal 诱导的 C2C12 小鼠成肌细胞所分泌的 TNF-α 以及 IL-6 水平。王惠惠^[36]探究了川陈皮素对 D-gal 诱导的衰老小鼠肌肉衰减的影响，与对照组小鼠相比，D-gal 诱导衰老小鼠血清中 TNF-α、IL-6 质量分数分别升高了 19.81% 和 27.78%，川陈皮素干预后质量分数分别降低了 19.19% 和 11.01%。综上所述，南瓜籽缓解肌肉衰减肽能缓解 D-半乳糖所引起的细胞内炎症，并且对于 IL-6 的干预具有一定的剂量依赖性，通过降低机

体内炎症因子水平,对促进蛋白质合成以及抑制蛋白质的降解发挥重要作用,改善肌肉功能。

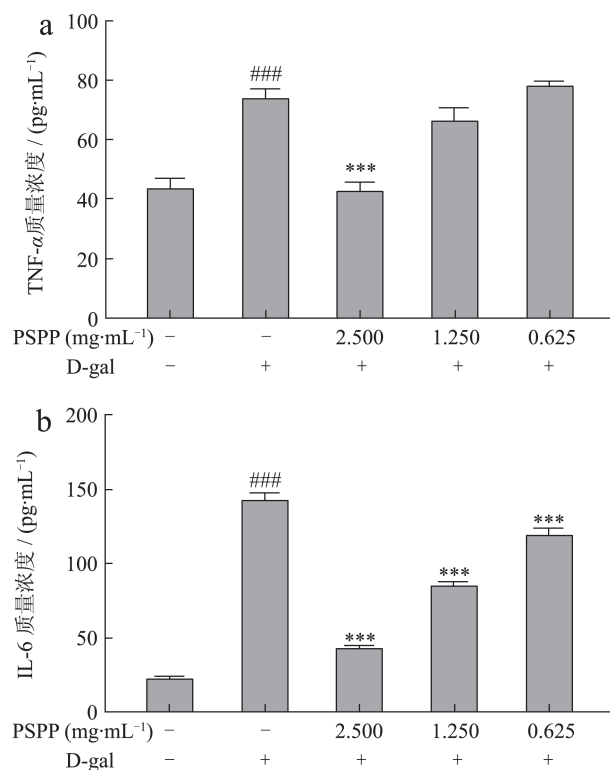


图6 南瓜籽缓解肌肉衰减肽的抗炎作用

Fig.6 The anti-inflammatory effect of pumpkin seeds in relieving muscle wasting peptides

2.2.6 南瓜籽缓解肌肉衰减肽对D-半乳糖诱导的C2C12细胞线粒体功能的影响

线粒体是机体主要的能量生成场所,线粒体功能也是骨骼肌功能的一个重要影响因素^[37]。如图7所展示,与空白组做对比,C2C12细胞经过D-gal的诱导之后ATP的质量分数显著下降约58.59% ($P<0.001$)。经过南瓜籽缓解肌肉衰减肽(PSPP)的干预之后可以恢复部分由D-gal诱导的ATP含量降低 ($P<0.001$)。JC-1荧光探针常被用来检测线粒体膜电位,当线粒体膜电位较高时,可以产生红色荧光,线粒体膜电位较低时,可以产生绿色荧光。如下图所展示,D-gal会导致红色荧光减弱,绿色荧光增强,也就意味着线粒体膜电位的下降。经过样品干预之后红色荧光增强,绿色荧光减弱,此时线粒体膜电位增强。伍先伟^[34]使用JC法以及流式细胞仪分别测定了线粒体膜电位,多肽可以抵抗过氧化氢诱发的C2C12细胞线粒体膜电位降低。综上所述,南瓜籽缓解肌肉衰减肽(PSPP)可以增强ATP的产生以及线粒体膜电位。通过增强线粒体功能维持骨骼肌对于ATP的需求,调节细胞代谢,对于增强骨骼肌的质量发挥重要作用。

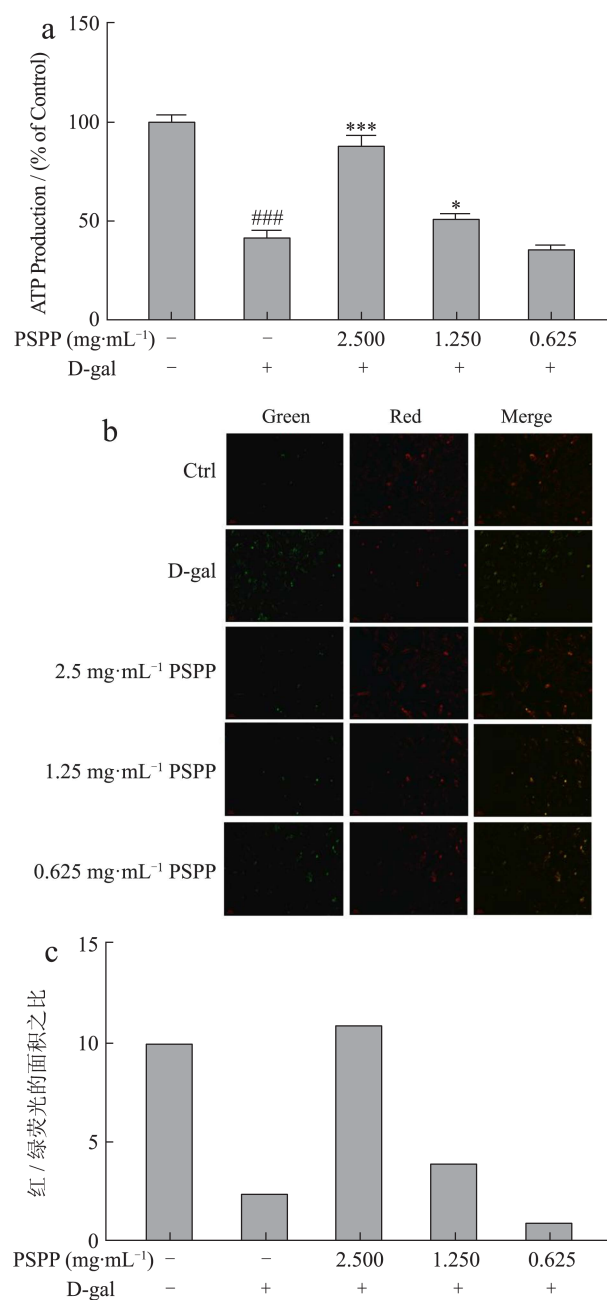


图7 南瓜籽缓解肌肉衰减肽对线粒体功能的影响

Fig.7 Effects of pumpkin seed relieving muscle decay peptide on mitochondrial functions

注: a 为 ATP 含量; b 为线粒体膜电位。* 代表给药组与模型组对比有差异。 $P<0.001$, 差异极显著, 用 *** 和 ### 表示。

3 结论

本研究采用蛋白酶对南瓜籽粕进行酶解,为了提高对南瓜籽粕的利用率,在使用单一蛋白酶对其酶解的基础上考虑使用不同种蛋白酶进行二次酶解,研究结果证明不仅可以提高肽含量,而且对于秀丽隐杆线虫的身体摆动次数以及咽泵频率也略有提升,通过对比两种酶分步酶解和同步酶解对肽含量及功效结果影

响无差异,从产业化的效率上考虑,同步酶解更有利,因此最终确定了碱性蛋白酶和胰酶双酶混合同步酶解的方式。通过单因素和响应面实验对整体制备工艺进行优化,得到的最佳工艺条件为酶解时间 3.50 h、双酶比例 2.97:1、加酶量质量分数 0.76%。

本研究以秀丽隐杆线虫为模型生物模拟正常衰老,根据秀丽隐杆线虫的身体摆动以及咽泵次数两个行为学指标评估南瓜籽蛋白肽延缓肌肉衰减的作用,发现南瓜籽蛋白肽可以增强衰老秀丽隐杆线虫的运动能力,同时发现经过南瓜籽蛋白肽的干预之后,对 D-gal 诱导的 C2C12 细胞氧化应激以及炎症有缓解作用,并且可以增强线粒体功能。由此推断,南瓜籽蛋白肽可能从氧化应激、炎症以及线粒体功能等方面作用,进而影响蛋白质合成通路 PI3K-AKT-mTOR 和蛋白质降解通路 PI3K-AKT-FOXO,通过这两条信号通路增加蛋白质的合成抑制蛋白质的降解,对肌肉衰减产生有利影响。

然而,在骨骼肌功能中,肌纤维萎缩是骨骼肌功能下降的重要病理特征,本研究仅仅从秀丽隐杆线虫以及 C2C12 细胞模型评估了蛋白肽对肌肉功能的影响,对于肌纤维萎缩的探讨存在不足,后续研究中考考虑加入小鼠模型或者更为复杂的体内模型进行更深入的探究,以期提高研究结果的可靠性以及临床研究价值。综上所述,本研究可以为开发肽产品提供一定的理论依据。南瓜籽具有经济实惠且易于获取、安全健康、来源广泛等优点,商业价值巨大,可作为深度开发的对象,本研究对延缓肌肉衰减的探究可以为后续临床研究提供一定的参考。

参考文献

- [1] LIANG J L, XIE J F, WANG C Y, et al. Regulatory roles of microRNAs in sarcopenia and exercise intervention [J]. *Acta physiologica Sinica*, 2020, 72(5): 667-676.
- [2] CRUZ-JENTOFT A J, SAYER A A. Sarcopenia [J]. *Lancet*, 2019, 393(10191): 2636-2646.
- [3] CHEMELLO F, BEAN C, CANCELLARA P, et al. Microgenomic analysis in skeletal muscle: expression signatures of individual fast and slow myofibers [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): 14.
- [4] ZHANG L L, LI M, WANG W, et al. Celecoxib alleviates denervation-induced muscle atrophy by suppressing inflammation and oxidative stress and improving microcirculation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 203: 14.
- [5] WANG K X, LIU Q Y, TANG M Y, et al. Chronic kidney disease-induced muscle atrophy: Molecular mechanisms and promising therapies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 208: 11.
- [6] JI Y A, LI M, CHANG M Y, et al. Inflammation: Roles in skeletal muscle atrophy [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 24.
- [7] SUN H L, GONG Y P, QIU J Y, et al. TRAF6 inhibition rescues dexamethasone-induced muscle atrophy [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(6): 11126-11141.
- [8] MA W J, CAI Y, SHEN Y T, et al. HDAC4 knockdown alleviates denervation-induced muscle atrophy by inhibiting myogenin-dependent atrogenes activation [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2021, 15: 14.
- [9] POHL C, DIKIC I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy [J]. *Science*, 2019, 366(6467): 818-822.
- [10] RIBOT C, SOLER C, CHARTIER A, et al. Activation of the ubiquitin-proteasome system contributes to oculopharyngeal muscular dystrophy through muscle atrophy [J]. *PLoS Genetics*, 2022, 18(1): 1010015.
- [11] DE S A, BECKWEE D, BAUTMANS I, et al. Pharmacological interventions to improve muscle mass, muscle strength and physical performance in older people: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses [J]. *Drugs and Aging*, 2018, 35(8): 719-734.
- [12] SNYDER P J, SHALENDER B, CUNNINGHAM G R, et al. Lessons from the testosterone trials [J]. *Endocrine Reviews*, 2018, 39(3): 369-386.
- [13] 孙益民, 张晓, 陈海娟, 等. 超临界二氧化碳提取南瓜籽油的研究[J]. *应用化工*, 2013, 42(2): 213-217.
- [14] 刘艳荣. 南瓜籽蛋白制备及其活性多肽的研究[D]. 太原: 山西大学, 2011.
- [15] AMIN, TAWHEED, NAIK, et al. *In-vitro* antioxidant and antibacterial activities of pumpkin, quince, muskmelon and bottle gourd seeds [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2018, 12(3): 182-190.
- [16] 周红丽. 南瓜籽蛋白血管紧张素转化酶抑制肽的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [17] BAYAT A, JAMALI Z, HAJIANFAR H, et al. Effects of cucurbita ficifolia intake on type 2 diabetes: Review of current evidences [J]. *Shiraz E Medical Journal*, 2014, 15(2): 1-3.
- [18] XIA E Q, ZHU X, GAO X B, et al. Antiaging potential of peptides from underused marine bioresources [J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(9): 513.
- [19] SHI Y G, ZHANG N, GUO Q Q, et al. Effects of casein non-phosphopeptide on the development of rat muscle analyzed using computed tomography scanning technology [J]. *Food and Function*, 2018, 9(11): 5805-5812.
- [20] LI R, TAO M F, WU T, et al. A promising strategy for investigating the anti-aging effect of natural compounds: a case study of caffeoylquinic acids [J]. *Food and Function*, 2021, 12(18): 8583-8593.
- [21] SOLIS G M, PETRASCHECK M. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2011, 49: 2496.
- [22] 郎爽. 黄芪皂苷对D-半乳糖诱导的原发性骨骼肌减少的作用及其机制研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
- [23] SAIDI S, DERATANI A, BELLEVILLE M P, et al. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein

- by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process [J]. Food Research International, 2014, 65: 329-336.
- [24] 张慧杰.野菊花内酯延缓衰老和治疗肌少症的作用及机制[D].南昌:南昌大学,2022.
- [25] 何林玲,何贝,张霞.蛋白酶在食品加工中的应用进展研究[J].食品工程,2014,1:12-14.
- [26] SHI H, ZHENG Y T, ZHAO J M, et al. Zexie decoction reduce glucose-dependent lipid accumulation and oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* [J]. Phytomedicine, 2023, 120: 9.
- [27] DELSHADIAN Z, MORTAZAVIAN A M, TABARZAD M, et al. Optimisation of experimental conditions for binding of divalent iron to bioactive casein phosphopeptides [J].International Journal of Food Science and Technology, 2018, 53(3): 784-793.
- [28] 胡昂,段蕊,刘志东,等.响应面法优化中性蛋白酶酶解海湾扇贝副产物制备抗氧化酶解物研究[J].海洋渔业,2020,42(1):98-109.
- [29] SIES H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine [J]. Redox Biology, 2015, 4: 180-183.
- [30] SINGH A K, KASHYAP M P, TRIPATHI V K, et al. Neuroprotection through rapamycin-induced activation of autophagy and PI3K/Akt1/mTOR/CREB signaling against amyloid- β -induced oxidative stress, synaptic/neurotransmission dysfunction, and neurodegeneration in adult rats [J]. Molecular Neurobiology, 2017, 54(8): 5815-5828.
- [31] PAROUSIS A, CARTER H N, TRAN C, et al. Contractile activity attenuates autophagy suppression and reverses mitochondrial defects in skeletal muscle cells [J]. Autophagy, 2018, 14(11): 1886-1897.
- [32] TOMONORI S, YOSHIKAKI, TAKASHIN. L-Lysine suppresses myofibrillar protein degradation and autophagy in skeletal muscles of senescence-accelerated mouse prone 8 [J]. Biogerontology, 2017, 18(1): 85-95.
- [33] 王培宇.南瓜籽多肽制备及其抗衰老作用研究[D].无锡:江南大学,2020.
- [34] 伍先伟.多肽减轻由H₂O₂诱导C2C12细胞损伤和延缓衰老动物的肌肉减少的研究[D].广州:广东药科大学,2022.
- [35] WIEDMER P, JUNG T, CASTRO J P, et al. Sarcopenia-molecular mechanisms and open questions [J]. Ageing Research Reviews, 2021, 65: 17.
- [36] 王惠惠.川陈皮素缓解D-半乳糖诱导衰老小鼠肌少症的分子机制[D].兰州:甘肃农业大学,2023.
- [37] XIAO L W, LIU J, SUN Z C, et al. AMPK-dependent and -independent coordination of mitochondrial function and muscle fiber type by FNIP1 [J]. Plos Genetics, 2021, 17(3): 27.