

文章编号:1673-1689(2007)02-0026-04

## 小麦面筋蛋白短肽的镇痛作用研究

孔祥珍<sup>1,2</sup>, 周惠明<sup>1,2</sup>, 钱海峰<sup>1</sup>

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 2. 江南大学食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

**摘要:**采用小鼠热板法和小鼠醋酸扭体法对由不同蛋白酶(碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胃酶、胰酶、中性蛋白酶和复合蛋白酶)水解制备的小麦面筋蛋白短肽的镇痛活性进行了测定。结果表明,由碱性蛋白酶、胃酶、胃酶和胰酶复合水解制备的 3 种面筋蛋白短肽(AWGH、PWGH 和 PPWGH)具有较好的镇痛作用。在小鼠热板法实验中,其痛阈提高百分率分别为(77.78±13.82)%、(81.22±9.69)%和(79.78±22.77)%;在小鼠醋酸扭体实验中,其扭体抑制率分别为(38.25±2.98)%、(57.82±3.04)%和(52.43±3.87)%。

**关键词:**小麦面筋蛋白;肽;镇痛

**中图分类号:**TS 201.2

**文献标识码:**A

### Study on Analgesic Effect of Wheat Gluten Oligopeptides

KONG Xiang-zhen<sup>1,2</sup>, ZHOU Hui-ming<sup>1,2</sup>, QIAN Hai-feng<sup>1</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122; 2. Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:**Wheat gluten oligopeptides were prepared by hydrolyzing wheat gluten with different proteases (Alcalase 2.4 L, Pancreatin Trypsin 6.0S, Pepsin, Pancreatin, Neutrase and Protamex). The analgesic effects of wheat gluten oligopeptides on mice were by acetic acid induced writhing and by hot-plate test. Those results illustrated that wheat gluten peptides obtained with Alcalase 2.4 L, Pepsin, Pepsin and Pancreatin (AWGH, PWGH, PPWGH) had relatively better analgesic effects, with elevation of pain threshold values 77.78±13.82%, 81.22±9.69% and 79.78±22.77% respectively. And inhibition ratios of acetic acid writhing were 38.25±2.98%, 57.82±3.04% and 52.43±3.87% respectively.

**Key words:** wheat gluten; peptides; analgesic effect

我国自古就有“药食同源”的说法,通过改善饮食状况来预防和治疗疾病。近年的研究发现,某些食物蛋白质肽链中蕴藏着生物活性肽(bioactive peptides, BAP),它们在蛋白质降解过程中释放出

来,发挥代谢调节作用。如从乳蛋白、大豆蛋白的蛋白酶水解物中发现了多种具有生物活性的功能肽,它们包括促钙吸收的酪蛋白磷酸肽、阿片样肽、降血压肽、抗血栓肽、免疫促进肽等<sup>[1-3]</sup>。

收稿日期:2006-06-08.

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金项目(2004028500)

作者简介:孔祥珍(1980-),女,山西晋中人,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生,主要从事食品资源利用与开发研究。

通讯作者:周惠明(1957-),男,江苏无锡人,教授,主要从事食品资源利用与开发研究. Email:hmzhou@sytu.edu.cn

阿片肽分为内源性阿片肽和外源性阿片肽两大类。内源性阿片肽是存在于人体脑、神经末梢的吗啡样作用物质,它们能在体内合成,作为激素和神经递质与体内的  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  受体相互作用,其特征是 N 末端具有脑啡肽序列(Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu),具有镇痛、镇静,调节人体情绪、呼吸、脉搏、体温、消化系统及分泌等作用,如脑啡肽(Enkephalin)、内啡肽(Endorphin)和强啡肽(Dynorphin, DYN)等<sup>[4-6]</sup>。外源性阿片肽是存在于外源性食物中,其活性同吗啡一样,能被纳洛酮所逆转的物质。它们可刺激胰岛素和消化道生长抑素的分泌,调节动物行为,促进肠道吸收水分和电解质,调节消化道运动,刺激摄食,抑制呼吸和调整睡眠模式等。

自从 1979 年 Brantl 等证明牛乳蛋白酶解产物具有阿片肽活性以来,人们开展了对牛乳、人乳以及植物蛋白来源如小麦面筋蛋白的生物活性肽的研究,并迅速成为动物营养学和生理学新的研究热点<sup>[7]</sup>。Zioudrou 等也于 1979 年证明食品蛋白质如小麦面筋蛋白和  $\alpha$ -酪蛋白的酶解产物具有阿片肽活性,并对小麦面筋蛋白酶解物中的阿片肽进行了初步分离鉴定<sup>[8]</sup>。近年来,国外对食品蛋白质来源的阿片肽研究较多,且多集中于牛奶蛋白<sup>[9-15]</sup>。国内对小麦面筋蛋白酶解物中的阿片肽活性物质报道较少。

作者采用谷朊粉(小麦面筋蛋白)为原料,通过几种商业化蛋白酶对其进行酶解,制备得到小麦面筋蛋白短肽,对其镇痛作用进行研究。实验采用筛选镇痛药最常用的小鼠热板法和小鼠扭体法,对面筋蛋白短肽的镇痛活性进行了测定,为寻找有效减轻阿片类药物副作用的新物质提供依据。该方法同时又能促进小麦面筋蛋白的深度利用与开发,部分解决谷朊粉的积压问题。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

谷朊粉:蛋白质质量分数为 80.77%,河南省莲花味精有限公司提供;碱性蛋白酶(Alcalase 2.4 L)、中性蛋白酶(Neutrase 0.8 L)、复合蛋白酶(Protamex 1.5 MG),无锡诺维信酶制剂公司提供;胃酶(Pepsin)和胰酶(Pancreatin);四川德阳市生化制品有限公司提供;实验用 ICR 小白鼠:体重 18~22 g,购自江南实验动物中心;盐酸吗啡注射液:沈阳第一制药厂制造;其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 小麦面筋蛋白短肽的制备

分别采用胰蛋

白酶、胃酶、胰酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶和碱性蛋白酶,在其最适条件下对小麦面筋蛋白进行酶解,酶解完毕冷冻离心,收集上清液,冷冻干燥即得不同蛋白酶制备的短肽干粉( $M_w < 10\ 000$ )<sup>[14]</sup>。  
**1.2.2 小鼠热板法** 小鼠体重 18~22 g,雌性。置小鼠于热板上(事先调节热板温度为  $(55 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ),用秒表记录自小白鼠投入热板至出现舔后足的反应时间(潜伏期),作为痛阈值。测定正常痛阈值 2 次,取平均值为正常痛阈值。筛选痛阈值在 5~30 s 内的小鼠供试验用。取预选合格的雌性小鼠 80 只,随机分为 8 组,每组 10 只。编号,再重测痛阈 1 次,将 2 次痛阈的平均值作为该鼠给药前的痛阈值。然后各组小鼠分别腹腔注射不同剂量的小麦面筋蛋白短肽溶液,给药量为 10 mL/kg,另设对照组腹腔注射等体积生理盐水(NS)。各组均于给药后 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h 分别测定各鼠痛阈值,小鼠置热板上 60 s 仍不舔后足,立即取出小鼠,并以 60 s 计。按以下公式计算痛阈提高百分率:

$$\text{提高率} = \frac{(\text{给药后平均痛阈值} - \text{给药前平均痛阈值})}{\text{给药前平均痛阈值}} \times 100\%$$

根据每组不同时间的痛阈提高百分率作图,横坐标代表时间,纵坐标代表痛阈提高百分率。

**1.2.3 小鼠醋酸扭体法** 取筛选合格的小鼠(体重 18~22 g),雌雄各半,随机分成 8 组,每组 10 只,分别为小麦面筋蛋白短肽各组、吗啡对照组和生理盐水对照组。均按每天 0.2 mL(以 10 g 体重计)的体积灌胃给药,连续 3 d。于末次给药前禁食 12 h,给药后 30 min,各鼠腹腔注射质量分数 0.5%冰醋酸 10 mL(以每千克体重计),观察并记录给药后 0~20 min 内小鼠的扭体次数(以腹部内凹、躯体与后肢伸张、臀部高起为扭体反应阳性)。按下列公式计算药物抑制扭体百分率:

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{对照组扭体数} - \text{给药组扭体数})}{\text{对照组扭体数}} \times 100\%$$

### 1.3 统计学处理

实验数据采用均数士标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计方法采用  $t$  检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 小麦面筋蛋白短肽的制备

采用 6 种不同蛋白酶酶解小麦面筋蛋白,分别制备相应的短肽,如表 1 所示。

### 2.2 小麦面筋蛋白短肽对小鼠热板痛阈值的影响

从表 2 中的试验结果看出,小麦面筋蛋白短肽均显示有一定的镇痛作用,其中由胃胰酶、胃酶分

别制备的面筋蛋白短肽 PPWGH 和 PeWGH 具有较强的镇痛作用,其痛阈提高百分率均在 0.5 h 达到最高点,分别为  $(79.78 \pm 22.77)\%$  和  $(81.22 \pm 9.69)\%$ 。0.5 h 时生理盐水对照组和吗啡组的痛阈提高百分率分别为  $(-4.75 \pm 9.44)\%$  和  $(99.75 \pm 31.62)\%$ 。PPWGH 和 PeWGH 两组与对照组相比差异非常显著 ( $P < 0.01$ ),而与吗啡组间无差异 ( $P > 0.05$ )。而由碱性蛋白酶制备的面筋蛋白短肽 AWGH 具有与 PPWGH 和 PeWGH 两种短肽类似的镇痛作用,但作用出现较晚,在 1 h 时达到最高点,其痛阈提高百分率为  $(77.78 \pm 13.82)\%$ 。这些结果表明 PPWGH、PeWGH 和 AWGH 均有较强的镇痛作用。

表2 小麦面筋蛋白短肽对小鼠热板痛反应潜伏期的影响

Tab.2 Analgesic effect of wheat gluten oligopeptides on mice evaluation by hot plate assay

组别	剂量/ (mg/kg)	痛阈提高百分率 ( $x \pm s$ )/%				
		0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h	3.0 h
对照组 control	—	$-4.75 \pm 9.44$	$-23.25 \pm 5.62$	$-15.00 \pm 2.74$	$-11.50 \pm 3.97$	$-11.75 \pm 2.50$
Morphine	10	$99.75 \pm 31.62^{**}$	$37.75 \pm 11.99^*$	$21.00 \pm 3.00$	$5.25 \pm 10.43$	$2.50 \pm 2.50$
AWGH	500	$34.78 \pm 13.04$	$77.78 \pm 13.82^{**}$	$12.11 \pm 10.73$	$15.00 \pm 8.40$	$1.56 \pm 3.56$
PPWGH	500	$79.78 \pm 22.77^{**}$	$63.44 \pm 20.43^{**}$	$33.11 \pm 12.66$	$14.11 \pm 12.61$	$-6.22 \pm 3.80$
PeWGH	500	$81.22 \pm 9.69^{**}$	$56.00 \pm 7.26^{**}$	$30.89 \pm 13.02^*$	$21.33 \pm 12.83$	$15.44 \pm 9.97^*$
PaWGH	500	$59.25 \pm 13.30^*$	$42.88 \pm 11.97^{**}$	$26.88 \pm 9.65^*$	$16.75 \pm 6.63$	$2.75 \pm 1.35$
NWGH	500	$21.56 \pm 13.57$	$33.89 \pm 12.76^*$	$13.11 \pm 9.98$	$1.78 \pm 9.55$	$-12.11 \pm 7.20$
PrWGH	500	$30.40 \pm 9.22$	$31.80 \pm 8.61^*$	$14.40 \pm 12.17$	$12.60 \pm 14.60$	$13.80 \pm 10.20^*$

与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

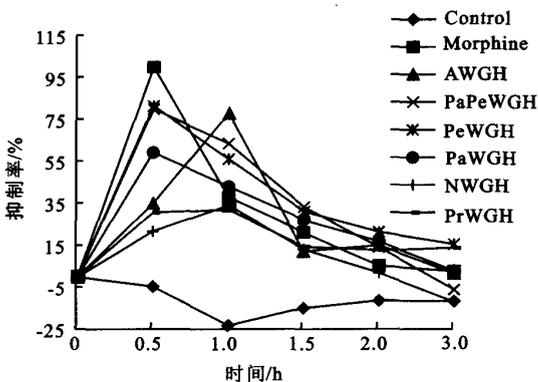


图1 小麦面筋蛋白短肽对小鼠热板法的镇痛抑制率的比较

Fig.1 Analgesic effects of wheat gluten oligopeptides on mice (hot-plate assay)

### 2.3 小麦面筋蛋白短肽对冰醋酸刺激小鼠疼痛扭体次数的影响

表3所示为采用小鼠醋酸扭体法测得的小麦  
万方数据

表1 不同蛋白酶水解小麦面筋蛋白制备的短肽的简写  
Tab.1 The abbreviations of oligopeptides prepared from wheat gluten with different proteases

蛋白酶种类	不同酶制备的小麦面筋蛋白短肽简写
碱性蛋白酶	AWGH
胃酶	PeWGH
胰酶	PaWGH
胃酶+胰酶	PPWGH
中性蛋白酶	NWGH
复合蛋白酶	PrWGH

面筋蛋白短肽的镇痛作用结果。由表中可知, PeWGH 和 PPWGH 能明显减少冰醋酸引起的小鼠扭体反应次数,其扭体次数分别为  $(15.00 \pm 3.88)$  和  $(17.27 \pm 4.21)$ ,与对照组扭体次数  $(35.56 \pm 6.45)$  相比,差异非常显著 ( $P < 0.01$ ),而与吗啡组间无差异 ( $P > 0.05$ )。而由碱性蛋白酶制备的 AWGH 则次之,其扭体次数为  $(22.10 \pm 4.05)$ 。而 PaWGH、NWGH 和 PrWGH 等种短肽组的扭体抑制率与吗啡组  $(71.02 \pm 3.77\%)$  相比有显著差异,分别为  $(19.02 \pm 4.89)\%$ 、 $(13.69 \pm 4.05)\%$  和  $(9.09 \pm 5.81)\%$ ,说明这3种短肽对由冰醋酸刺激小鼠造成的疼痛扭体稍有镇痛效果,但影响不大。

### 3 结论

作者选用筛选镇痛药最常用的小鼠热板法和小鼠醋酸扭体法对小麦面筋蛋白短肽的镇痛作用

进行了研究。小鼠热板法和小鼠醋酸扭体法分别属于热刺激法和化学刺激法。实验结果表明,小麦面筋蛋白短肽对两种疼痛模型均具有一定程度的抑制作用,其中尤以 PeWGH 和 PPWGH 的作用较强,AWGH 的作用则次之。Zioudrou 等研究通过细胞生物学鉴定和离体器官实验,也表明小麦面筋蛋白的酶解物具有一定的阿片镇痛活性<sup>[8]</sup>。对于小麦面筋蛋白的作用部位及其作用机理,还有待于进一步的研究。另外在确定小麦面筋蛋白短肽药理作用的基础上,进行分离提纯,制备镇痛多肽纯品,并测定其氨基酸序列等,从而为探索小麦面筋蛋白短肽的镇痛活性机理,寻找起效更快、镇痛时效更长、副作用更小的新型镇痛药奠定基础。

表3 小麦面筋蛋白短肽对冰醋酸刺激小鼠疼痛的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab. 3 Analgesic effect of wheat gluten oligopeptides on mice evaluation by the acetic acid writhing method

组别	n	剂量/ (mg/kg)	扭体 次数/次	抑制 率/%
对照组	10	-	35.56±6.45	-
对照组	10	-	35.56±6.45	-
Morphine	10	10	10.34±3.81**	71.02±3.77
AWGH	10	1000	22.10±4.05*	38.25±2.98
PPWGH	10	1000	17.27±4.21**	52.43±3.87
PeWGH	10	1000	15.00±3.88**	57.82±3.04
PaWGH	10	1000	28.76±5.55	19.02±4.89 <sup>△△</sup>
NWGH	10	1000	31.12±4.98	13.69±4.05 <sup>△△</sup>
PrWGH	10	1000	32.08±6.05	9.09±5.81 <sup>△△</sup>

与对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与吗啡组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

## 参考文献(References):

- [1] Gill Iqbal, López-Fandiño Rosina, Jorba Xavier. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18: 162-183.
- [2] Korhonen H, Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, (9): 1297-1308.
- [3] 刘政,刘莹,王丽威,等. 生物活性肽的酶法制备[J]. 化学与生物工程, 2005,(3): 7-9.  
LIU Zheng, LIU Ying, WANG Li-wei, et al. Enzymatic preparation of bioactive peptides[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2005, (3): 7-9.
- [4] Hughes J, Coworkers M. Search for the endogenous ligand of the opiate receptor[J]. *Neurose Res Prog Bull*, 1975a, 13: 55-58.
- [5] Hughes J, Coworkers M. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine[J]. *Brain Res*, 1975b, 88: 295-308.
- [6] 滑静,杨佐君,门瑞霄. 内源性阿片肽研究进展[J]. 北京农学院学报,1998, 13(3): 115-121.  
HUA Jing, YANG Zuo-jun, MEN Rui-xiao. Research and development of endogenous opioid peptides[J]. *Journal of Beijing Agricultural College*, 1998, 13(3): 115-121.
- [7] Brantl V, Teschemacher H, Henschen A, et al. Novel opioid peptides derived from casein ( $\beta$ -casomorphin) I. Isolation from bovine casein peptone[J]. *Hoppo-Seyley's Z Physiol Chem*, 1979, 360: 1211-1216.
- [8] Zioudrou C, Streaty R A, Klee W A. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins[J]. *J Biol Chem*, 1979, 254(7): 2446-2449.
- [9] Reid L D, Hubbell C L. An assessment of the addiction potential of the opioid associated with milk[J]. *J Dairy Sci*, 1994, 77(3): 672-675.
- [10] Pihlanto-Leppälä A, Antila P, Mäntsälä P, et al. Opioid peptides produced by in-vitro proteolysis of bovine caseins[J]. *Int Dairy Journal*, 1994, 4:291-301.
- [11] Jarmolowska Beata, Kostyra Elzbieta, Krawczuk Stanislaw, et al.  $\beta$ -casomorphin-7 isolated from brie cheese[J]. *J Sci Food Agric*, 1999, 79: 1788-1792.
- [12] Pihlanto-LeppäläAnne. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins; opioid and ace-inhibitory peptides[J]. *Trends in Food Sci Tech*, 2001, 11:347-356.
- [13] Ijäs Hanna, Collin Marika, Finckenberg Piet, et al. Antihypertensive opioid-like milk peptide  $\alpha$ -lactorphin; lack of effect on behavioural tests in mice[J]. *International Dairy Journal*, 2004, 14:201-205.
- [14] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1982.
- [15] 李仪奎,王钦茂. 中药药理试验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991.

(责任编辑:朱明)