

## 甲鱼水解肽对肠道菌群及免疫功能的影响

苏晓明, 刘小红, 王亚雨, 向沙沙, 石丽华, 朱 炫, 陈 杰

### Effects of *Pelodiscus sinensis* Hydrolyzed Peptides on Gut Microbiota and Immune Function

SU Xiaoming, LIU Xiaohong, WANG Yayu, XIANG Shasha, SHI Lihua, ZHU Xuan, and CHEN Jie

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024110119>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

益生菌与肠道菌群、免疫调节的相互作用与机制研究进展

Interaction and Mechanism of Probiotics with Gut Flora and Immune Regulation: A Review

食品工业科技. 2022, 43(16): 486-493 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030025>

低分子量甘草多糖对健康小鼠免疫功能、肠道菌群和代谢产物的影响

Effects of Low-molecular-weight *Glycyrrhiza* Polysaccharides on Immune Function, Gut Microbiota and Metabolites in Healthy Mice

食品工业科技. 2025, 46(13): 196-206 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024080349>

基于体外消化酵解模型探究芜菁多糖的抗氧化活性及对肠道菌群的影响

Exploring the Antioxidant Activity and Impact on Gut Microbiota of *Brassica rapa* L. Polysaccharides Based on an *in Vitro* Digestion and Fermentation Model

食品工业科技. 2025, 46(13): 106-116 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024070146>

浒苔多糖对肥胖金黄地鼠肠道菌群及粪便短链脂肪酸的影响

Effect of *Enteromorpha* Polysaccharide on Intestinal Bacteria and Short Chain Fatty Acids in Obese Golden Hamsters

食品工业科技. 2023, 44(3): 381-390 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030170>

基于体外消化与发酵模型的多花黄精多糖对肠道菌群的影响

Effects of *Polygonatum cyrtoneura* Hua. Polysaccharide on Intestinal Microorganisms Based on *in Vitro*-Simulated Digestion and Fermentation Model

食品工业科技. 2024, 45(9): 115-123 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050261>

米糠不溶性膳食纤维结合酚结构特性及其对肠道菌群的影响

Structural Characteristics of Rice Bran Insoluble Dietary Fiber Bound Phenolic and Its Effect on Gut Microbiota

食品工业科技. 2023, 44(10): 1-10 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022120059>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

苏晓明, 刘小红, 王亚雨, 等. 甲鱼水解肽对肠道菌群及免疫功能的影响 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(19): 202–213. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110119

SU Xiaoming, LIU Xiaohong, WANG Yayu, et al. Effects of *Pelodiscus sinensis* Hydrolyzed Peptides on Gut Microbiota and Immune Function[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(19): 202–213. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110119

· 生物工程 ·

# 甲鱼水解肽对肠道菌群及免疫功能的影响

苏晓明<sup>1</sup>, 刘小红<sup>2</sup>, 王亚雨<sup>2</sup>, 向沙沙<sup>1,2</sup>, 石丽华<sup>1,2</sup>, 朱 炫<sup>2</sup>, 陈 杰<sup>2,\*</sup>

(1. 潍坊易北特生物科技有限公司, 山东潍坊 261000;

2. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江杭州 310000)

**摘要:** 本试验以甲鱼水解肽为研究对象, 探究其对肠道菌群及免疫功能的影响。通过体外肠道模拟系统、依托 Caco-2 细胞模型, 利用 16S rRNA (V3-V4) 高通量测序技术检测肠道菌群的多样性和组成, HPLC 检测发酵液中短链脂肪酸含量, 以及 qPCR 检测 Caco-2 细胞免疫指标。结果表明, 甲鱼水解肽的干预可显著降低 ( $P<0.05$ ) 肠道中小杆菌属 (*Dialister*)、活泼瘤胃球菌属 (*Ruminococcus gnavus*)、萨特氏菌属 (*Sutterella*) 等促炎菌的相对丰度, 同时提升肠道微生物产各短链脂肪酸尤其是丁酸和异戊酸的含量, 其中低浓度 (5 mg/mL) 甲鱼水解肽促进肠道微生物产短链脂肪酸的效果相较于中 (25 mg/mL)、高浓度 (50 mg/mL) 甲鱼水解肽更加稳定。此外, 短链脂肪酸对调节肠道免疫功能也具有重要作用。Caco-2 细胞模型结果表明: 对于正常的 Caco-2 细胞, 甲鱼水解肽能够调节免疫相关基因 *TLR4*、*NF- $\kappa$ B*、*MD2* 的表达, 促进细胞促炎基因 *IL-6*、*IL-1 $\beta$*  和 *TNF- $\alpha$*  和抑炎基因 *IL-10* 的表达, 进而激活细胞免疫; 对于细胞炎症模型, 甲鱼水解肽下调促炎基因 *IL-1 $\beta$*  的表达, 上调抑炎基因 *IL-10* 的表达, 降低 *iNOS* 的相对表达量, 进而缓解细胞的炎症反应。综上所述, 甲鱼水解肽可通过调节肠道菌群组成维持肠道稳态、提高免疫能力来发挥益生作用, 对探究动物源生物活性肽与肠道微生物的互作关系和营养价值评价体系具有借鉴意义。

**关键词:** 甲鱼水解肽, 肠道菌群, 短链脂肪酸 (SCFAs), 免疫调节, 体外肠道模拟消化模型

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)19-0202-12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110119



本文网刊:

## Effects of *Pelodiscus sinensis* Hydrolyzed Peptides on Gut Microbiota and Immune Function

SU Xiaoming<sup>1</sup>, LIU Xiaohong<sup>2</sup>, WANG Yayu<sup>2</sup>, XIANG Shasha<sup>1,2</sup>, SHI Lihua<sup>1,2</sup>, ZHU Xuan<sup>2</sup>, CHEN Jie<sup>2,\*</sup>

(1. Weifang Yibei Biotechnology Co., Ltd., Weifang 261000, China;

2. School of Food Science and Biological Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310000, China)

**Abstract:** This study took hydrolyzed peptides from *Pelodiscus sinensis* as the research object, aiming to investigate their impact on intestinal flora and immune function. Utilizing an *in vitro* intestinal simulation system and a Caco-2 cell model, 16S rRNA (V3-V4) high-throughput sequencing technology was employed to evaluate the diversity and composition of the intestinal microbiota. Additionally, HPLC was used to quantify the short-chain fatty acid content in the fermentation broth, and qPCR was used to assess the immune factors of Caco-2 cells. The findings revealed that the treatment of *P. sinensis* hydrolyzed peptides could significantly ( $P<0.05$ ) decrease the relative abundance of *Dialister*, *Ruminococcus gnavus*, and *Sutterella* in the gut. Furthermore, these peptides enhanced the production of short-chain fatty acids, particularly butyric acid and isovaleric acid, by intestinal microorganisms. Notably, low concentration (5 mg/mL) of *P. sinensis* hydrolyzed peptides showed a more consistent promotion of short-chain fatty acid production by intestinal microbes compared to the medium (25 mg/mL) and high concentrations (50 mg/mL). Short-chain fatty acids also played a pivotal role in modulating

收稿日期: 2024-11-12

基金项目: 《基于体外模拟系统的食品品质分析与营养评价》(2023330101005339); 国家自然科学基金 (32072230)。

作者简介: 苏晓明 (1982-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物, E-mail: suxiaoming06@163.com。

\* 通信作者: 陈杰 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工, E-mail: chenjie@zjgsu.edu.cn。

intestinal immune function. The Caco-2 cell model demonstrated that *P. sinensis* hydrolyzed peptides could regulate the expression of immune-related genes, including *TLR4*, *NF- $\kappa$ B*, and *MD2*, in normal Caco-2 cells. This led to an increase in the expression of pro-inflammatory cytokines (*IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$* ) and the anti-inflammatory cytokine *IL-10*, thereby activating cellular immunity. In an inflammatory cellular model, *P. sinensis* hydrolysate downregulated the expression of pro-inflammatory cytokines (*IL-1 $\beta$* ) and upregulated anti-inflammatory cytokine *IL-10*, while also reducing *iNOS* relative expression level, thereby alleviating the inflammatory response. In conclusion, *P. sinensis* hydrolyzed peptides can act as prebiotics by modulating the composition to maintain intestinal homeostasis, and enhancing immune function of the intestinal flora, providing valuable insights into the interaction between animal-derived bioactive peptides and intestinal microorganisms, as well as contributing to the nutritional value evaluation system.

**Key words:** *Pelodiscus sinensis* hydrolyzed peptides; gut microbiota; short chain fatty acids (SCFAs); immunomodulation; *in vitro* intestinal simulation digestion model

甲鱼, 俗称鳖、王八、脚鱼, 是水陆两栖爬行动物, 肉质鲜美且富含蛋白质、不饱和脂肪酸、微量元素等多种营养物质, 是我国传统的食疗滋补佳品<sup>[1]</sup>。生物活性肽是特殊的蛋白质片段, 它是一种介于氨基酸和蛋白质之间的分子聚合物。通过生物酶解等方法可以将鳖肉蛋白质制备为成分安全、纯度高且生物活性强的甲鱼水解肽。甲鱼水解肽主要由小分子肽构成<sup>[2]</sup>, 含有比较丰富的脯氨酸、赖氨酸和亮氨酸<sup>[3]</sup>, 且具有抗氧化、增强免疫力、抗癌抗肿瘤、抗炎等功效<sup>[4-7]</sup>, 与甲鱼肉相比, 更容易消化吸收, 能够满足进食受限、消化吸收障碍、代谢紊乱或者特定疾病状态人群对营养素或者膳食的特殊需要<sup>[8]</sup>。因此, 甲鱼水解肽受到广泛关注, 逐渐成为当前研究热点。

人体的肠道微生物主要由厌氧菌构成, 其中厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)占据了很大的比例<sup>[9]</sup>, 在消化过程和维持宿主健康方面起着相当重要的作用。同时, 研究发现肠道微生物能够通过利用糖、氨基酸和蛋白质等外来物质, 合成一系列的代谢产物, 其中短链脂肪酸是主要的代谢物。这些代谢产物会进一步地影响机体健康<sup>[10]</sup>。已有大量研究证明摄入肽能够调节肠道微生物群结构, 影响免疫作用, 改善肠道炎症反应, 促进肠道以及宿主的健康<sup>[11-12]</sup>。李博等<sup>[13]</sup>发现鹿茸多肽能够促进小鼠肠道菌群结构的稳定, 提升小鼠肠道优势菌属(拟杆菌属、梭菌属)以及有益菌属(乳杆菌属)的占比; 陈心媛<sup>[14]</sup>通过给高脂饮食小鼠灌胃大鲈活性肽后, 发现其具有降脂功效, 在一定水平上可调节小鼠的肠道菌群, 改善代谢紊乱。刘臻等<sup>[5]</sup>发现在用甲鱼水解肽喂食小鼠之后, 小鼠的单核细胞、淋巴细胞、自然杀伤细胞的活性显著提升, 能够促进小鼠的细胞免疫, 进而增强小鼠的免疫力。综上所述, 蛋白肽在调节肠道菌群、提高细胞和生物体免疫功能方面具有潜在作用, 其中甲鱼水解肽富含多种活性肽, 但其具体通过何种机制调控肠道菌群及免疫能力尚未可知。

细胞模型系统相较于动物实验和人体实验具有快速、成本低等优点, 能够有效筛选生物活性肽, 并对其生物活性、生物利用度和代谢的分子机制进行研究。Caco-2 细胞能表达一些免疫相关的细胞因子, 如 *TNF- $\alpha$* 、*IL-6*、*IL-10* 等, 因此可以作为研究肠

道免疫及炎症的体外细胞模型<sup>[15]</sup>。为此, 本实验通过体外肠道模拟消化模型来探究甲鱼水解肽对肠道菌群的作用, 通过高效液相色谱测定短链脂肪酸含量变化来探究甲鱼水解肽对肠道微生物及免疫作用的影响, 同时利用 Caco-2 细胞模型研究甲鱼水解肽对正常情况下和氧化损伤情况下对细胞相关免疫基因表达的影响, 揭示甲鱼水解肽的益生作用机制, 进而为甲鱼水解肽相关产品开发提供理论依据, 推动甲鱼深加工产业发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

甲鱼水解肽(肽含量: 76.94%) 浙江清溪健康科技有限公司提供; Caco-2 细胞 上海富衡生物有限公司; 胰蛋白胍 Oxoid; Trizol 美国 Ambion 公司; 酵母提取物、琼脂 杭州微生物试剂有限公司; 二甲基亚砜(DMSO)、3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、PBS 缓冲液 上海麦克林生化科技有限公司; 5-氟尿嘧啶、磷酸(HPLC) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲醇(HPLC)、乙腈(HPLC)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司; 高纯氮气( $\geq 99.999\%$ ) 杭州今工特种气体有限公司; 细胞冻存液(C40050) 苏州新赛美生物科技有限公司; 脂多糖 LPS(L2880) Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 青霉素-链霉素溶液 碧云天生物技术有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清 美国 Gibco 公司; 反转录试剂盒(RR047Q)、qPCR 试剂盒(RR420A) 宝日医生物技术(北京)有限公司; HPLC 所用试剂均为色谱级, 其他试剂均为国产分析纯。

SW-CJ-1FD 超净台 苏州市金净净化设备科技有限公司; ME104E 电子分析天平 瑞士 Mettler Toledo 公司; LC-16 超高效液相 岛津企业管理(中国)有限公司; XMTD-204 恒温水浴锅 上海博迅实业有限公司; CHA-S 恒温振荡器 国华企业; S210 pH 计 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司; BI-150A 恒温培养箱 施都凯仪器设备(上海)有限公司; TGL-16 l mL 离心机、TGL-16M 10 mL 离心机 湖南湘仪实验仪器开发有限公司; Infinite M Nano 酶标



仪 帝肯(上海)贸易有限公司; QuanStudio 3 Flex qPCR 仪、nanodrop 1000 赛默飞世尔科技公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 溶液及培养基配制 模拟胃液(simulated gastric fluid, SGF): KCl 0.514 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.122 g,  $\text{NaHCO}_3$  2.1 g, NaCl 2.761 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.02 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0.048 g, 溶于 1 L 水中。

模拟肠液(simulated intestinal fluid, SIF): KCl 0.507 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.109 g,  $\text{NaHCO}_3$  7.14 g, NaCl 2.246 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.067 g, 溶于 1 L 水中。

维生素 I: 生物素 1.25 mg, 钴胺素 1.25 mg, 对氨基苯甲酸 3.75 mg, 叶酸 6.25 mg, 吡哆胺 18.75 mg, 溶于 25 mL 水中备用。

维生素 II: 硫胺素 25 mg, 核黄素 25 mg, 溶于 5 mL 水中备用。

PBS 缓冲液:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.27 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.42 g, NaCl 8 g, KCl 0.2 g, 溶于 800 mL 水中, 调节 pH 至 6.8 后定容至 1 L 备用。

粪便稀释液: 将 100  $\mu\text{L}$  维生素 II 加入 1 L 灭菌后的 PBS 缓冲液(pH 6.8)中备用。

肠道发酵培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 2.5 g, L-半胱氨酸 1 g, 血红素(5 mg/mL) 2 mL, NaCl 0.9 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.09 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.45 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.45 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.09 g, 溶于 1 L 水中, 灭菌后加入维生素 I 0.2 mL, 树脂天青(1 mg/mL) 1 mL, 胆盐 0.5 g, 葡萄糖 8 g。

细胞培养基: 44.5 mL 的 DMEM 高糖培养基, 0.5 mL 的青霉素-链霉素溶液, 5 mL 的胎牛血清, 过膜除菌后保存于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用, 使用前提前于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中预热。

1.2.2 甲鱼水解肽胃消化体外模拟 根据 Minekus 等<sup>[16]</sup>的方法模拟甲鱼水解肽的胃消化。将肽粉溶于 7.5 mL 的 1.25 倍浓缩 SGF 电解质储备溶液后, 加入 1.6 mL 胃蛋白酶溶液(2000 U/mL)、5  $\mu\text{L}$  的  $\text{CaCl}_2$  溶液(0.3 mol/L), 用 HCl(1 mol/L)调节 pH 至 2.0, 加水定容至 20 mL。设置低、中、高三个浓度, 使最终消化液中的肽含量分别为 5、25、50 mg/mL, 并做三个平行。混匀后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡箱消化 120 min。消化结束后调节 pH 至 7.0 终止消化。

1.2.3 甲鱼水解肽小肠消化体外模拟 根据 Minekus 等<sup>[16]</sup>的方法模拟甲鱼水解肽的小肠消化。模拟胃部消化完成后, 进行甲鱼水解肽的模拟小肠发酵, 在胃消化产物中依次加入 11 mL 1.25 倍浓缩 SIF 电解质储备液溶液、5 mL 胰酶溶液(200 U/mL)、40  $\mu\text{L}$  的  $\text{CaCl}_2$ (0.3 mol/L)溶液, 用 NaOH(1 mol/L)调节 pH 至 7.0, 加水定容至 40 mL, 设置低、中、高三个浓度, 使最终消化液中的肽含量分别为 5、25、50 mg/mL, 并做三个平行。充分混匀后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡箱消化 120 min。样品置于沸水浴中 10 min

终止消化。

1.2.4 粪便的收集及预处理 三名年龄 20~30 岁的志愿者, 要求无传染病、肠道疾病, 近 3 个月内未使用抗菌药物。收集志愿者粪便并转移至无菌操作台中, 称取 10 g 粪便溶解于 80 mL 无菌的磷酸缓冲液, 用无菌玻璃棒搅拌均匀后三层无菌纱布过滤, 过滤完成后迅速将粪便菌液接种至肠道发酵培养基中, 防止粪便中的厌氧细菌失活<sup>[17]</sup>。

1.2.5 接种预还原肠道环境 根据 Yan 等<sup>[18]</sup>的方法接种预还原肠道环境。将支口试管的下端封住, 从上端加入 27 mL 灭菌后的肠道发酵培养液及 3 mL 的粪便提取液, 混匀后封起, 通氮气 5 min 创造厌氧环境。将试管置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡箱中振荡培养 24 h, 使发酵环境中的菌群状态趋于稳定。一切操作在超净台中进行, 防止污染。

1.2.6 模拟肠道发酵 根据 Yan 等<sup>[18]</sup>的方法模拟肠道发酵。24 h 后, 支口试管中的菌群趋于稳定, 此时收集 5 mL 的发酵液于冻存管中, 作为第 0 d 的样品, 并标记为  $D_0$ , 置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。取 1.2.2 和 1.2.3 中经胃、小肠模拟消化后的甲鱼水解肽溶液 5 mL 于支口试管中, 其中包括低、中、高三种浓度甲鱼水解肽各三支, 再取三只支口试管加入 5 mL 无菌超纯水作为空白对照组。加入样品后标上标记, 将支口试管于涡旋仪上充分混匀, 通氮气 5 min 创造厌氧环境, 最后将试管放于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡箱中继续模拟发酵。随后每隔 24 h 取一次发酵液, 取样前充分混匀试管, 从支口试管下端取 3 mL 发酵液于取样管中, 连续取样 3 d, 并将发酵液置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。取样完成后及时通氮气, 保证发酵环境严格厌氧。

1.2.7 肠道菌群 16S rDNA 测序分析 将 1.2.6 中保存在取样管中的发酵液置于常温解冻, 每管取 1.0 mL 至 EP 管中, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒中的说明书提取发酵液中的细菌 DNA, 并将提取出来的 DNA 保存于 EP 管中, 写上标号后于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 等待送样检测。

## 1.2.8 发酵液短链脂肪酸的测定

1.2.8.1 样品短链脂肪酸的提取 1 mL 发酵液至离心管中, 4  $^{\circ}\text{C}$  下 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入 100  $\mu\text{L}$  浓盐酸和 5 mL 乙醚混合均匀, 萃取 20 min 后 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 3500 r/min 离心 10 min, 取上清加入 500  $\mu\text{L}$  的 1 mol/L 氢氧化钠溶液混合均匀, 萃取 20 min 后 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 3500 r/min 离心 10 min, 收集下层水相, 加入 100  $\mu\text{L}$  浓盐酸混合均匀, 后经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤至避光的进样瓶中保存, 标好标号待测<sup>[19]</sup>。

1.2.8.2 短链脂肪酸保留时间及标准曲线的测定 0.025% 磷酸水溶液和乙腈, 经相应滤膜过滤后转移至容器中超声 30 min 待用。检测条件: 色谱柱型号 ZORBAXSB-Aq(4.6 $\times$ 250 mm 5-Micron), 流

动相为 0.025% 磷酸水溶液 (pH2.8):乙腈=95:5, 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 20  $\mu$ L, 检测波长: 210 nm, 柱温: 30  $^{\circ}$ C。洗脱程序: 流动相 A:B=95:5, 流速 1.0 mL/min<sup>[19]</sup>。配制乙酸、丙酸、丁酸、异戊酸、戊酸五种短链脂肪酸的单标, 按照检测条件进行测定, 各短链脂肪酸保留时间分别为乙酸 4.05 min、丙酸 5.83 min、丁酸 10.55 min、异戊酸 21.67 min、戊酸 25.12 min。根据发酵液的短链脂肪酸含量, 将 5 种短链脂肪酸混合配制成适宜浓度梯度的混标, 根据所得峰面积, 确定各个短链脂肪酸的标准曲线, 得到乙酸、丙酸、丁酸、异戊酸和戊酸的标准曲线分别为:  $y=615621x+3058.2$  ( $R^2=0.9999$ ),  $y=567183x+410.1$  ( $R^2=0.9999$ ),  $y=534456x+5129.9$  ( $R^2=0.9999$ ),  $y=593168x-27623$  ( $R^2=0.9999$ ),  $y=377289x+10995$  ( $R^2=0.9996$ )。

1.2.8.3 甲鱼水解肽发酵液短链脂肪酸的检测 将提取物用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后转移至棕色离心管中, 按 1.2.8.2 中方法进行高效液相色谱检测分析。根据所得峰面积代入标准曲线计算短链脂肪酸含量。

1.2.9 细胞的培养

1.2.9.1 细胞复苏 根据许丽惠等<sup>[20]</sup>的方法进行细胞复苏。从液氮罐中取出细胞, 在 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中加热至液体融化, 过程尽量迅速, 减少融化过程中细胞的损伤。将融化后的冻存管转移至超净台中, 吸取冻存液至离心管, 800 r/min 离心 3 min。在超净台中弃上清, 加入 1 mL 生长培养基吹打至均匀后, 转移至细胞培养板。往培养皿中加入 8 mL 新鲜细胞培养基, 摇匀培养液, 使细胞分布均匀。放入 37  $^{\circ}$ C 和 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱, 次日换液。

1.2.9.2 细胞培养和传代 参考 Bao 等<sup>[21]</sup>的方法并稍作修改。Caco-2 细胞培养基使用 89% DMEM 培养基加 10% 胎牛血清及 1% 的青霉素-链霉素溶液, 在 37  $^{\circ}$ C 和 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养并及时传代。半开培养皿, 吸去原细胞培养液后用 2 mL PBS 洗 2~3 遍。弃去 PBS 后加入 1 mL 胰酶于 37  $^{\circ}$ C 孵箱消化 3 min, 在显微镜下观察到 Caco-2 细胞变圆后轻拍培养皿, 加含血清的培养基终止消化, 吹打细胞至细胞成单个, 一分二移入新的细胞培养基中(预先加入 8 mL 预热的细胞培养基), 十字摇匀后放入培养箱。

1.2.10 Caco-2 细胞 RNA 的提取及荧光定量 PCR 在六孔板中铺浓度为  $1\times10^5$  个/mL 的细胞, 培养 24 h 后, 加入浓度为 100、500  $\mu$ g/mL 甲鱼水解肽溶液 24 h 后, 去除上清, 使用 Trizol 法<sup>[22]</sup>提取 Caco-2 细胞的 RNA, 使用 nanodrop 仪器测定提取后的 RNA 浓度, 并按照试剂盒说明书反转录为稳定的 cDNA, 置于冰箱-20  $^{\circ}$ C 保存。利用 NCBI Primer-BLAST 进行目标基因 *IL-6*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*IL-10*、*iNOS*、*TLR-4*、*NF- $\kappa$ B*、*MD2*、*CLDN1* 以及内参基因 *GAPDH* 的对应引物设计及特异性检验。设计的引物如表 1 所

示。使用荧光定量 PCR 仪, 并根据 Takara 的定量 PCR 试剂盒 TB Green® Premix Ex Taq™(RR420A) 说明书, 检测目标基因的转录水平变化。

表 1 细胞引物序列  
Table 1 Sequence of cell primers

引物名称	序列(5'→3')	碱基数
<i>GAPDH</i> F	TGCAACCGGAAGGAAATGA	20
<i>GAPDH</i> R	GCATCACCCGGAGGAGAAAT	20
<i>IL-6</i> F	GCTCGCCAGTGAAATGATGG	20
<i>IL-6</i> R	GGTGGTCGGAGATTCGTAGC	20
<i>IL-1<math>\beta</math></i> F	GCTCGCCAGTGAAATGATGG	20
<i>IL-1<math>\beta</math></i> R	GGTGGTCGGAGATTCGTAGC	20
<i>TNF-<math>\alpha</math></i> F	AGTGAGGATGATGCCAGGATG	21
<i>TNF-<math>\alpha</math></i> R	TCCTTTCCAGGGGAGAGAGG	20
<i>IL-10</i> F	CAAAAGAAGGCATGCACAGCTC	22
<i>IL-10</i> R	GATCTCGAAGCATGTTAGGCAG	22
<i>iNOS</i> F	TCCAAATCTTGCC TG GGGTC	20
<i>iNOS</i> R	AGAAGCTCATCTGGAGGGGT	20
<i>TLR-4</i> F	AGTGAGGATGATGCCAGGATG	21
<i>TLR-4</i> R	TTAGGAACCACTCCACGC	19
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i> F	CCGGCTTCAGAAATGGCAGAA	20
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i> R	TATGGGCCATCTGTTGGCAG	20
<i>MD2</i> F	GCTCTGAAGGGAGAGACTGTG	21
<i>MD2</i> R	TGGGCTCCAGAAATAGCTT	20
<i>CLDN1</i> F	CTGGGAGGTGCCCTACTTTG	20
<i>CLDN1</i> R	GCTGGAAGGTGCAGGTTTGT	20

1.2.11 Caco-2 细胞炎症模型的 RNA 提取及荧光定量 PCR 根据虞青婷<sup>[23]</sup>的方法建立 Caco-2 细胞炎症模型并稍作修改。将 500  $\mu$ g/mL 的甲鱼水解肽溶液溶解于添加了 1  $\mu$ g/mL LPS 的培养液中, 放于 4  $^{\circ}$ C 冰箱备用。在六孔板中铺浓度为  $1\times10^5$  个/mL 的细胞, 培养 24 h 后, 加入上述配制的溶液, 并设置对照组, 继续培养 24 h。按照 1.2.10 的方法提取细胞的 RNA, 并通过 qPCR 测定 Caco-2 细胞炎症模型相关基因的表达。

1.3 数据处理

以上各组实验均进行三组平行测定, 采用 SPSS Statistics 26 软件进行统计学分析, 多组间采用 ANOVA 法进行单因素方差分析, 两个独立样本间采用 *t* 水平检验并设定差异水平判别标准为  $P<0.05$ , 用 Origin 2021、GraphPad Prism 8.0 及联川生物云平台绘制图片, 并用联川生物云平台进行 PCA、RDA 分析及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 甲鱼水解肽对肠道微生物多样性的影响

Alpha 多样性分析能反映物种的丰富度和均匀度, Chao1 指数和 Shannon 指数能够描述物种的 Alpha 丰富度和多样性, Chao1 指数越大代表物种丰富度越高, Shannon 指数越大, 表示不确定性大, 即群落中的未知因素越多, 群落多样性越高。由图 1a 可以看出, 发酵第 1 d、5、50 mg/mL 甲鱼水解肽组的 Chao1 指数与对照组相比有所增大, 25 mg/mL 甲鱼水解肽组 Chao1 指数变化不明显。在第 3 d 时高浓

度甲鱼水解肽组的 Chao1 指数极显著高于对照组 ( $P<0.01$ ), 低浓度和中浓度甲鱼水解肽组 Chao1 指数较对照组无显著变化, 说明高浓度的甲鱼水解肽在经过长时间发酵后会显著增加物种丰富度。和对照组相比, 各浓度的甲鱼水解肽加入后对 Shannon 指数无显著影响。总的来说, 甲鱼水解肽对肠道菌群的 Alpha 多样性影响不大。

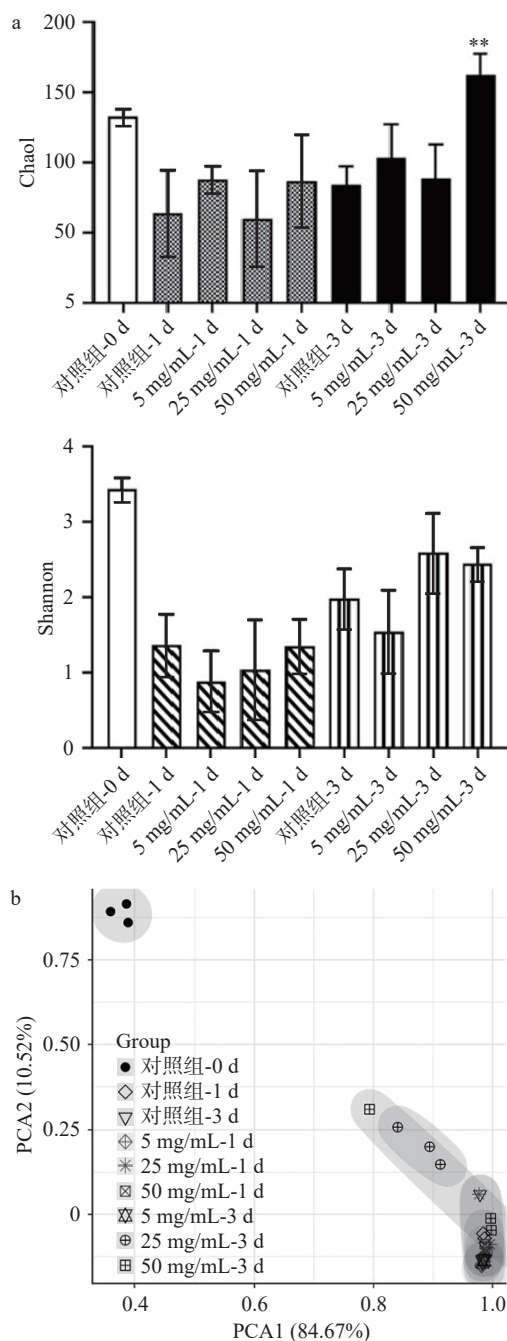


图1 甲鱼水解肽对肠道微生物多样性影响  
Fig.1 Effect of *P. sinensis* hydrolyzed peptides on gut microbiota diversity

注: (a) 甲鱼水解肽发酵液的菌群 Alpha 多样性分析, (b) 甲鱼水解肽发酵液的菌群 Beta 多样性分析; 相同发酵天数下, 甲鱼水解肽组与对照组相比,  $**P<0.01$ 。

Beta 多样性分析量化了微生物组之间的相似性和距离<sup>[24]</sup>。在 PCA 图中, 点与点之间的距离与样品的菌群差异正相关。如图 1b 所示, 第一主成分占

84.67%, 第二主成分占 10.52%, 累计权重为 95.19%。第 0 d 的对照组与其他组别有显著区别, 第 3 d 的中浓度甲鱼水解肽组与其他组别区分较为明显, 剩余组别区分不明显, 各组之间菌群差异不大。这说明加入甲鱼水解肽不会使肠道菌群发生巨大的变化, 有利于维持肠道稳态。

## 2.2 甲鱼水解肽对肠道微生物菌门组成的影响

选取菌门丰度 top10 进行菌门水平物种分析, 并做百分比柱状图。如图 2a 所示, 所有对照组和实验组中, 厚壁菌门 (Firmicutes) 与变形菌门 (Proteobacteria) 为优势菌门, 总占比达到 95% 以上。

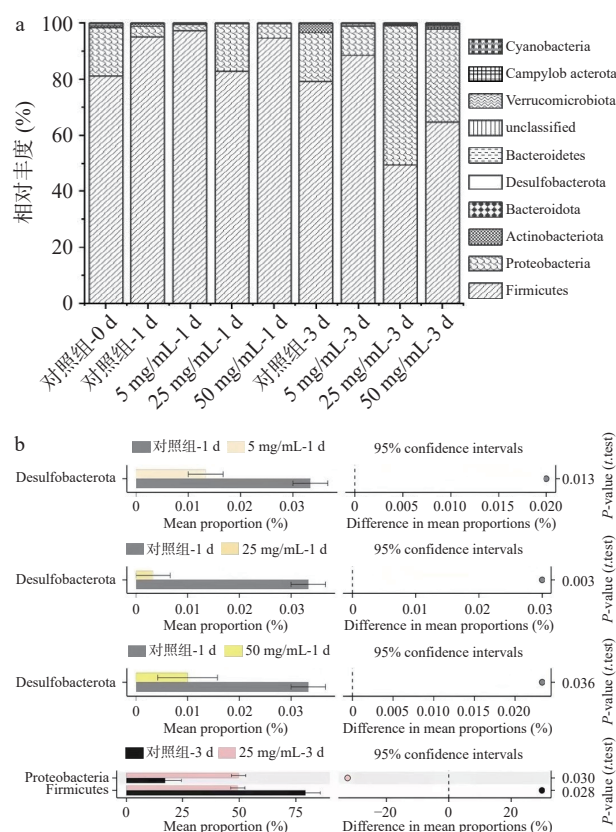


图2 甲鱼水解肽对肠道微生物发酵液菌门分析  
Fig.2 Phylum analysis of intestinal microbial fermentation broth by *P. sinensis* hydrolyzed peptides

注: (a) 甲鱼水解肽发酵液的菌门相对丰度柱状图, (b) 甲鱼水解肽发酵液的菌门显著性比较; 相同发酵天数下, 甲鱼水解肽组与对照组相比,  $P<0.05$ , 显著,  $P<0.01$ , 极显著, 图 3 同。

对比对照组和甲鱼水解肽组的菌门组成, 由图 2b 所示, 在发酵的第 1 d, 对照组的脱硫菌门 (Desulfobacterota) 显著高于低、高浓度的甲鱼水解肽组 ( $P<0.05$ ), 极显著高于中浓度的甲鱼水解肽组 ( $P<0.01$ )。脱硫菌门 (Desulfobacterota) 会将硫酸盐化合物还原为硫化氢 ( $H_2S$ ), 对肠道上皮细胞产生毒性, 继而引发炎症等一系列肠道疾病<sup>[25]</sup>。而甲鱼水解肽具有一定的抗氧化活性, 通过减轻体内的氧化反应, 从而抑制肠道中脱硫菌门微生物的代谢活性, 减少肠道炎症等疾病的发生。在发酵的第 3 d, 发现对照组的厚壁菌门 (Firmicutes) 显著高于 25 mg/mL 的甲鱼水解肽组 ( $P<0.05$ ), 而对照组的变形菌门



(Proteobacteria)显著低于 25 mg/mL 的甲鱼水解肽组( $P<0.05$ ),而其他菌门之间差异不显著( $P>0.05$ )。有研究证实<sup>[26]</sup>,厚壁菌门中多数菌为产丁酸细菌,发酵第 3 d 其含量减少可能与丁酸产量下降有关。适量增加的变形菌门,其代谢物可能具有潜在的健康作用<sup>[27]</sup>。综上所述,甲鱼水解肽在一定水平上能调节肠道菌群中优势菌门的占比。

### 2.3 甲鱼水解肽对肠道微生物菌属组成的影响

选取相对丰度 top30 的菌属做百分比柱状图。如图 3a 所示,发现肠道微生物主要由巨球型菌属(*Megasphaera*)、埃希氏大肠杆菌属(*Escherichia-Shigella*)、巨单胞菌属(*Megamonas*)、萨特氏菌(*Sutterella*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)组成,总占比均大于 90%。其中巨球型菌属(*Megasphaera*)和埃希氏大肠杆菌属(*Escherichia-Shigella*)占比较高。

将发酵第 1 d 和第 3 d 的对照组与甲鱼水解肽组进行显著性比较。如图 3b 所示,在发酵的第 1 d,对照组的活泼瘤胃球菌属(*Ruminococcus gnavus*)、小杆菌属(*Dialister*)均显著高于甲鱼水解肽组( $P<0.05$ ),对照组的嗜胆菌属(*Bilophila*)、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)显著高于低浓度和高浓度甲鱼水解肽组( $P<0.05$ ),极显著高于中浓度甲鱼水解肽组( $P<0.01$ ),对照组的链型杆菌属(*Catenibacterium*)显著高于低浓度和高浓度甲鱼水解肽组( $P<0.05$ ),萨特氏菌属(*Sutterella*)显著高于高浓度甲鱼水解肽组( $P<0.05$ )。而对照组的沙门氏菌属(*Salmonella*)显著低于高浓度的甲鱼水解肽组( $P<0.05$ )。小杆菌属(*Dialister*)是条件致病菌,在机体免疫力下降时,其可能会导致感染<sup>[28]</sup>。活泼瘤胃球菌属(*Ruminococcus gnavus*)是与克罗恩病相关的菌群,它的含量与肠易激综合征呈正相关<sup>[29]</sup>。萨特氏菌属(*Sutterella*)在人类胃肠道中具有轻度促炎能力<sup>[30]</sup>。加入甲鱼水解肽后,上述促炎菌属数量显著下降,说明甲鱼水解肽能抑制促炎菌生长,具有调节肠道免疫作用的能力。

在发酵的第 3 d,对照组的片球菌属(*Pediococcus*)极显著高于低浓度甲鱼水解肽组( $P<0.01$ ),*Erysipelotrichaceae*\_UCG-003 显著高于低浓度甲鱼水解肽组( $P<0.05$ );对照组的片球菌属(*Pediococcus*)、*Erysipelotrichaceae*\_UCG-003、链型杆菌属(*Catenibacterium*)、巨球型菌属(*Megasphaera*)均显著高于中浓度甲鱼水解肽组( $P<0.05$ ),而对照组的埃希氏菌-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)显著低于中浓度甲鱼水解肽组( $P<0.05$ );对照组的链型杆菌属(*Catenibacterium*)显著高于高浓度甲鱼水解肽组( $P<0.05$ ),而对照组的拟杆菌属(*Bacteroides*)、乳酸杆菌属(*Lachnoclostridium*)、*Clostridiaceae*\_unclassified、嗜胆菌属(*Bilophila*)均显著低于高浓度甲鱼水解肽组( $P<0.05$ )。出现这些现象的原因可能是甲鱼水解肽具有一定的抗菌活性,能破坏有害菌体

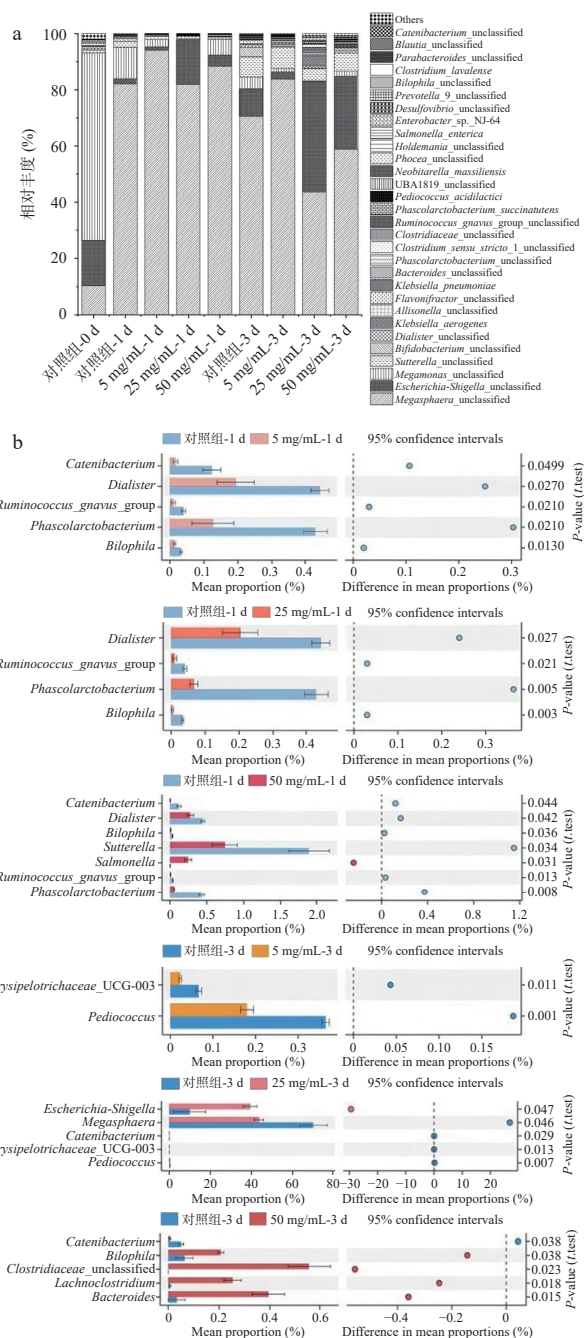


图 3 甲鱼水解肽发酵液的菌属分析

Fig.3 Bacterial genus analysis of *P. sinensis* hydrolyzed peptides fermentation broth

注: (a)甲鱼水解肽发酵液的菌属相对丰度柱状图, (b)甲鱼水解肽发酵液的菌属显著性比较。

的结构<sup>[31]</sup>,减少肠道内的不利菌属,增加乳酸杆菌属等益生菌的数量,从而调节机体免疫功能,促进肠道健康。

有研究发现,高蛋白饮食会影响肠道菌群的组成,增加胆汁耐受微生物的丰度,包括嗜胆菌属(*Bilophila*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)<sup>[32]</sup>,这与本研究的结果一致。拟杆菌属(*Bacteroides*)是肠道菌群的主要成员,能维持肠道的正常生理作用,参与机体的营养吸收,与机体互惠互利<sup>[33]</sup>。总的来说,摄入甲鱼水解肽能够提升肠道微生物中有益菌的数量,降低条件致病菌、促炎菌和有害菌的数量。

## 2.4 肠道微生物相关性分析

选取了甲鱼水解肽发酵液中丰度最高的 30 种肠道微生物进行 Spearman 相关性分析,进一步了解肠道微生物之间的相关性。图中实线表示正相关,虚线表示负相关,线条的粗细代表相关性大小,形状的大小表示菌的相关性权重。

由图 4 可见,大部分菌属呈正相关性。球型菌属(*Megasphaera*)与布劳特氏菌属(*Blautia*)、埃希氏菌-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)呈负相关,克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)与链型杆菌属(*Catenibacterium*)呈负相关。活泼瘤胃球菌属(*Ruminococcus gnavus*)与小杆菌属(*Dialister*)呈正相关,拟杆菌属(*Bacteroides*)与副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、*Flavonifractor* 呈正相关。埃希氏菌-志贺氏菌属、活泼瘤胃球菌属、小杆菌属等是典型的促炎菌,布劳特氏菌、拟杆菌属等都是益生菌,这些菌属间相互影响,共同维持肠道平衡,预防肠道炎症的发生。

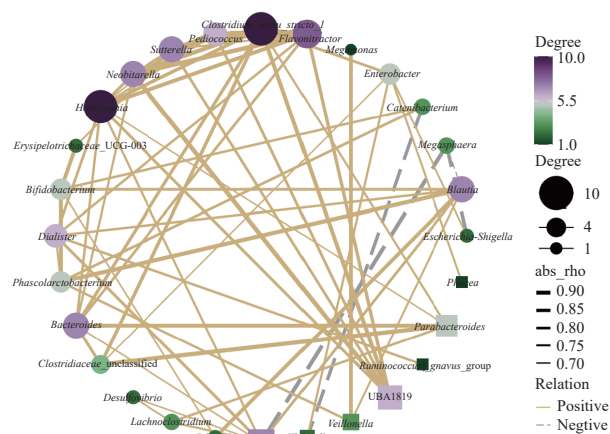


图 4 甲鱼水解肽发酵液的肠道微生物相关性分析  
Fig.4 Gut microbiota correlation analysis of *P. sinensis* hydrolyzed peptides fermentation broth

## 2.5 甲鱼水解肽对短链脂肪酸的影响

### 2.5.1 短链脂肪酸含量变化

微生物通过代谢营养物质能够合成短链脂肪酸,而短链脂肪酸反过来又能调节肠道 pH,改善肠道微生物群结构,在调节免疫功能和炎症反应中起重要作用。研究发现,短链脂肪酸可通过 NO、IL-6、IL-12 等降低吞噬细胞对肠道促炎细菌的反应性,以诱导耐受性,减少炎症反应<sup>[34-35]</sup>。因此,测定发酵液中的短链脂肪酸含量非常重要。

各种短链脂肪酸含量结果如图 5a 所示。在发酵第 1 d,乙酸含量无显著变化。发酵第 2 d, 5、25 mg/mL 甲鱼水解肽组乙酸含量和对照组相比均显著升高( $P<0.05$ ), 50 mg/mL 甲鱼水解肽组乙酸含量和对照组相比有所升高。而在发酵第 3 d, 25、50 mg/mL 甲鱼水解肽组乙酸含量均低于对照组,说明乙酸含量与对照组相比整体上先增加后减少。乙酸作为肠道细胞的能量来源<sup>[33]</sup>和肠道微生物的代谢底物,其水平波动受微生物调控。由 2.3 中分析可

知,在发酵第 3 d,高浓度肽组拟杆菌属含量显著增加,而乙酸含量与拟杆菌属的丰度呈负相关<sup>[36]</sup>,这可能是发酵第 3 d 乙酸含量下降的原因之一。对比丙酸、丁酸、异戊酸、戊酸的含量变化,发酵第 1 d, 5 mg/mL 组的丙酸、丁酸含量和对照组相比显著升高( $P<0.05$ ), 25 mg/mL 组戊酸含量和对照组相比极显著升高( $P<0.01$ ),丁酸、异戊酸含量和对照组相比非常显著升高( $P<0.001$ ), 50 mg/mL 组丙酸、丁酸、异戊酸、戊酸含量和对照组相比非常显著升高( $P<0.001$ )。发酵第 2 d,低浓度组的丙酸含量相比对照组极显著升高( $P<0.01$ ),低浓度组和高浓度组的异戊酸含量和对照组相比非常显著升高( $P<0.001$ ),这说明甲鱼水解肽可提升产各短链脂肪酸的含量。而第 3 d 时, 25 mg/mL 的中浓度甲鱼水解肽组的丙酸含量非常显著降低( $P<0.001$ ), 25、50 mg/mL 甲鱼水解肽组的异戊酸含量低于对照组,且差异非常显著( $P<0.001$ ), 5、25 mg/mL 甲鱼水解肽组的戊酸含量极显著低于对照组( $P<0.01$ ),随着发酵时间的延长,肠道环境中微生物比例的改变可能导致了上述变化。研究发现丙酸具有保护心血管的作用,丁酸和戊酸在缓解机体炎症和调节机体免疫方面发挥着重要作用<sup>[37-38]</sup>,其中丁酸已被证明可通过减少脂多糖(LPS)的移位,抑制巨噬细胞的活化、促炎因子的产生<sup>[39]</sup>,在增强肠道免疫功能中发挥重要作用。

对总短链脂肪酸柱状图分析,见图 5b。在发酵的第 1 d,甲鱼水解肽组提升了肠道菌群产短链脂肪酸的含量,发酵第 2 d, 5 mg/mL 甲鱼水解肽组短链脂肪酸含量和对照组相比非常显著升高( $P<0.001$ ), 25、50 mg/mL 甲鱼水解肽组的总短链脂肪酸较对照显著上升( $P<0.05$ ),而在发酵第 3 d, 25 mg/mL 的甲鱼水解肽组的短链脂肪酸含量和对照组相比非常显著下降( $P<0.001$ ), 5、50 mg/mL 甲鱼水解肽组的总短链脂肪酸含量较对照组显著下降( $P<0.05$ )。在发酵过程中,当碳水化合物被消耗完时,肠道内微生物代谢所需能量就由乙酸、丙酸等提供,因此,在发酵的第 1 d 到第 3 d 时间里,和对照组相比肠道内短链脂肪酸含量先增加后减少<sup>[40]</sup>。在曾全恒等<sup>[27]</sup>的研究中也发现,肠道内短链脂肪酸含量出现先升后降的趋势。总的来说,甲鱼水解肽的加入在一定程度上促进了肠道菌群代谢产短链脂肪酸,降低肠道 pH。在所述甲鱼水解肽对肠道微生物多样性的研究中发现,高浓度的甲鱼水解肽会显著增加物种丰富度,而 5 mg/mL 浓度的甲鱼水解肽对肠道微生物多样性影响较小,因此,5 mg/mL 低浓度甲鱼水解肽下的短链脂肪酸合成受肠道微生物影响不大,促进短链脂肪酸合成的效果稳定性更好,对肠道免疫功能发挥积极作用。

### 2.5.2 短链脂肪酸与肠道微生物相关性分析

为分析肠道环境的变化是否对短链脂肪酸的产生有影响,选取了 top20 的菌属与短链脂肪酸进行 RDA 分析并作图,由不同的样本组向短链脂肪酸做垂线,投影



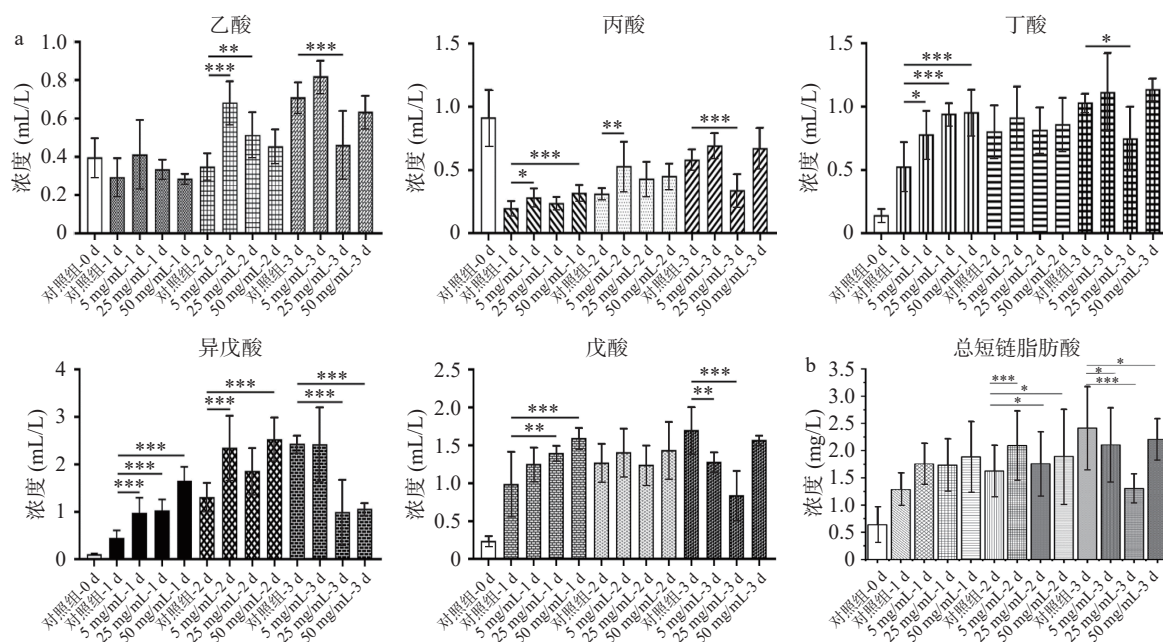


图 5 甲鱼水解肽发酵液中短链脂肪酸含量

Fig.5 Short chain fatty acid content in *P. sinensis* hydrolyzed peptides fermentation broth

注: (a)甲鱼水解肽发酵液中各短链脂肪酸含量, (b)甲鱼水解肽发酵液总短链脂肪酸含量; 相同发酵天数下, 甲鱼水解肽组与对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

点越接近说明实验组样本间的短链脂肪酸属性值越相似。由图 6a 可见, 对照组样品主要分布在第一二象限, 甲鱼水解肽组样品主要分布在二三四象限, 说明加入甲鱼水解肽后对肠道微生物产短链脂肪酸产生了一定的影响。

为进一步探究短链脂肪酸与肠道菌属的相关性程度, 选取了 top30 的菌属与短链脂肪酸做相关性热图, 红色代表正相关, 蓝色代表负相关, 颜色越深说明相关性越高。如图 6b 所示, 发现拟杆菌属 (*Bacteroides*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、*Flavonifractor*、霍尔德曼氏菌 (*Holdemania*) 和 *Neobitarella* 与乙酸的产生呈正相关, 且相关性显著 ( $P<0.05$ ), 萨特氏菌属 (*Sutterella*) 与乙酸的产生极显著正相关 ( $P<0.01$ ); 拟杆菌属 (*Bacteroides*)、狄氏副拟杆菌 (*Parabacteroides*)、小杆菌属 (*Dialister*)、霍尔德曼氏菌 (*Holdemania*) 和 Others 与丙酸的产生呈显著正相关 ( $P<0.05$ ), 布劳特氏菌属 (*Blautia*) 与丙酸的产生呈正相关; 片球菌属 (*Pediococcus*) 与丁酸、异戊酸的产生呈正相关; *Prevotella\_9*、*Lachnoclostridium* 与戊酸的产生呈负相关, 戊酸与肠道内菌属的正相关性并不高。研究发现<sup>[41]</sup>, 拟杆菌属 (*Bacteroides*) 能够产生乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸, 这些短链脂肪酸可参与肠道内免疫作用, 增强肠道屏障, 这与本研究的结果一致。

## 2.6 甲鱼水解肽对 Caco-2 细胞免疫相关基因表达的影响

由图 7a 可知, 浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的甲鱼水解肽水解液使得细胞 *IL-6* 和 *IL-1 $\beta$*  相对表达量非常显著

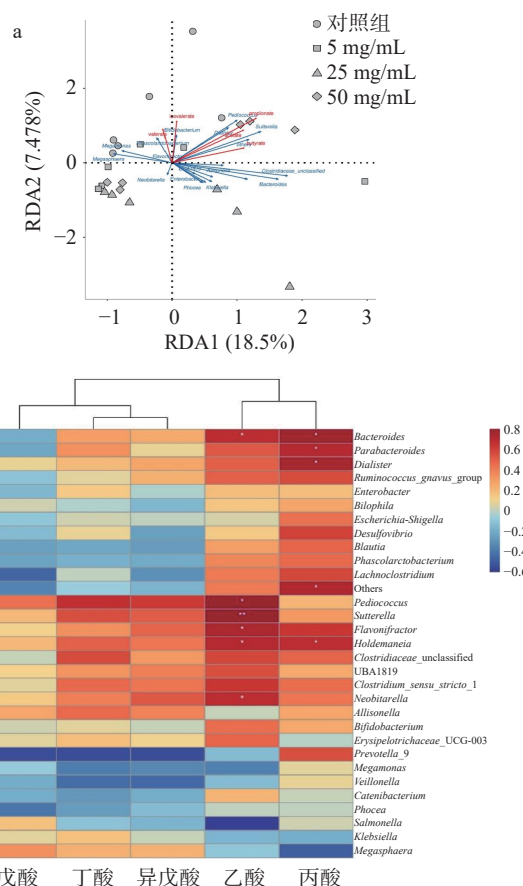


图 6 甲鱼水解肽发酵液的短链脂肪酸与肠道微生物相关性分析

Fig.6 Correlation analysis between short chain fatty acids and gut microbiota in *P. sinensis* hydrolyzed peptides fermentation broth

注: (a)RDA 分析, (b)相关性热图; top30 肠道菌属间相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

上升( $P<0.001$ )、细胞  $TNF-\alpha$  相对表达量极显著上升( $P<0.01$ )、细胞  $IL-10$  和  $CLDN1$  相对表达量较对照组有明显上升;浓度为  $500 \mu\text{g/mL}$  的甲鱼水解肽水解液使得细胞  $TNF-\alpha$  相对表达量极显著上升( $P<0.01$ )、细胞  $IL-10$  相对表达量显著上升( $P<0.05$ )、细胞  $IL-6$ 、 $IL-1\beta$  和  $CLDN1$  相对表达量较对照组有上升趋势,  $iNOS$  相对表达量未发生显著变化。 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、一氧化氮(NO)和  $IL-10$  是细胞培养研究中非常重要的信号分子,其中  $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$  是典型的细胞促炎因子,而  $IL-10$  则是典型的抑炎因子,  $iNOS$  的表达量上升可能会使细胞产生的大量 NO,具有毒性和促炎作用。甲鱼水解肽同时上调了促炎基因和抑炎基因的表达,激活了细胞免疫。 $100 \mu\text{g/mL}$  的甲鱼水解肽水解液使得  $NF-\kappa B$  相对表达量显著降低( $P<0.05$ ),使得  $MD2$ 、 $TLR4$  相对表达量极显著上升( $P<0.01$ ); $500 \mu\text{g/mL}$  的甲鱼水解肽水解液使得  $NF-\kappa B$  相对表达量非常显著降低( $P<0.001$ ),使得  $TLR4$  相对表达量极显著上升( $P<0.01$ )、 $MD2$  相

对表达量较对照组有所上升。 $NF-\kappa B$  作为转录因子,是诱导促炎细胞因子( $IL-1$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ )和趋化因子( $IL-8$ 、 $IL-10$ )所必需的<sup>[42]</sup>,肠屏障中活化的  $NF-\kappa B$  的调节作用通过 TLR2 或 TLR4 的识别来调节<sup>[43-45]</sup>,而 TLR4 可以通过识别活性物质激活细胞后续的信号通路,从而发挥免疫作用。有研究发现猴头菇免疫调节肽能通过 TLR4 介导细胞发挥免疫功能<sup>[46]</sup>。故推测在正常情况下,甲鱼水解肽能够通过调节 Caco-2 细胞相关免疫基因的表达,从而激活细胞免疫,发挥其免疫功能。

## 2.7 甲鱼水解肽对 Caco-2 细胞炎症模型基因表达的影响

在前述实验中发现甲鱼水解肽具有良好的免疫调节能力,而脂多糖(LPS)能通过氧化机制促进肠道屏障功能障碍,进而诱导肠道炎症<sup>[47]</sup>。因此使用 LPS 诱导的 Caco-2 细胞炎症模型来评价甲鱼水解肽的抗氧化和调节免疫的能力。由图 7b 可知,LPS 提升了  $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$  相对表达量,甲鱼水解肽

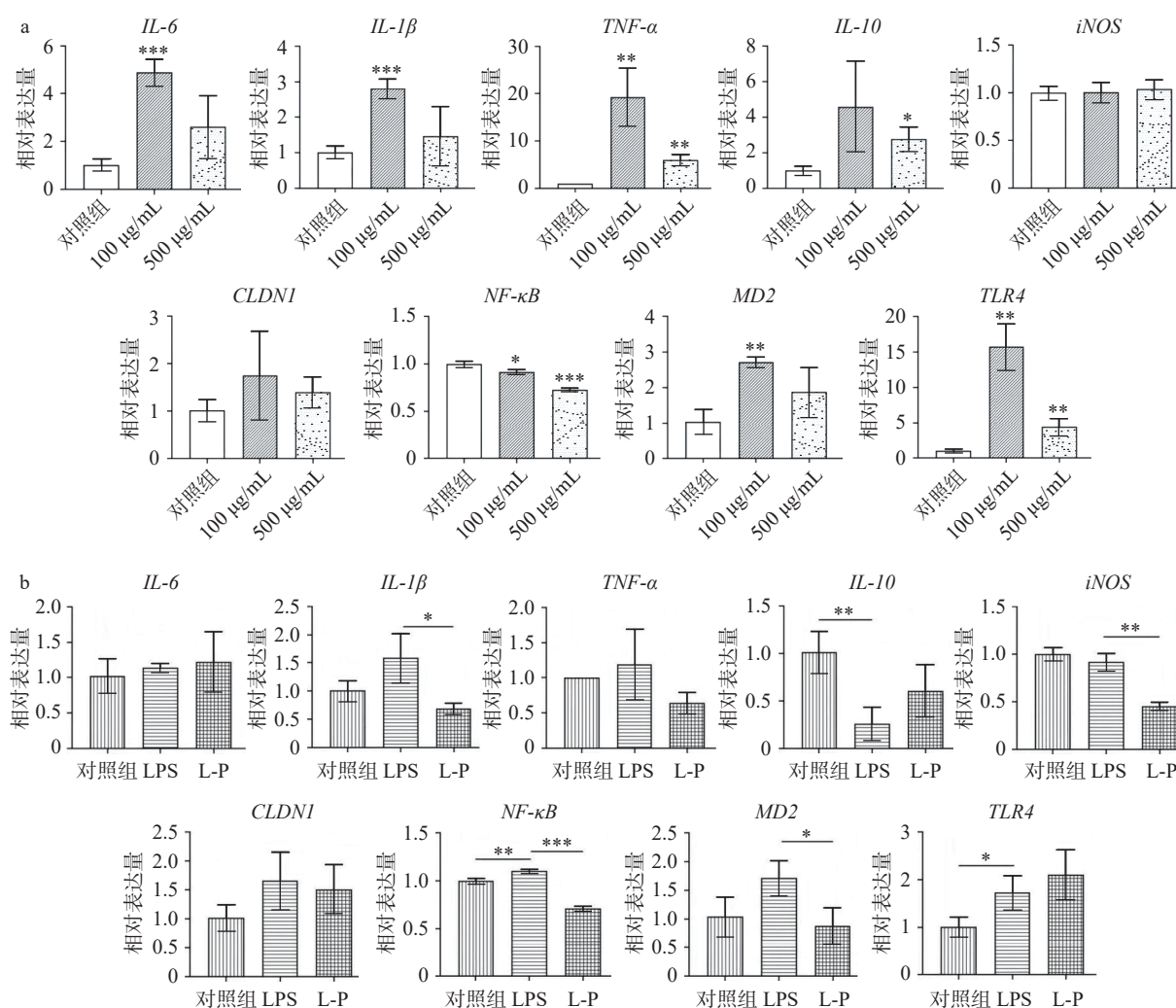


图 7 甲鱼水解肽对 Caco-2 细胞模型及其炎症模型基因表达的影响

Fig. 7 Effects of *P. sinensis* hydrolyzed peptides on gene expression of Caco-2 cell model and inflammatory model

注: (a) Caco-2 细胞免疫相关基因表达, (b) Caco-2 细胞炎症模型基因表达; LPS: LPS 诱导的 Caco-2 细胞炎症模型, L-P: 含有  $500 \mu\text{g/mL}$  的甲鱼水解肽水解液的  $1 \mu\text{g/mL}$  LPS 溶液; 图 7a 中, 甲鱼水解肽组与对照组相比,  $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ ; 图 7b 中, LPS 组与对照组相比、L-P 组与 LPS 组相比,  $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。

下调了 *IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$*  相对表达量, LPS 极显著降低了 *IL-10* 相对表达量( $P<0.01$ ), 未使得 *iNOS* 相对表达量发生显著变化, 而在加入甲鱼水解肽之后, *iNOS* 的相对表达量降低极显著( $P<0.01$ )。研究发现当暴露于 LPS 刺激时, Caco-2 通过产生一系列炎症细胞因子而表现出炎症状态<sup>[43]</sup>。有研究表明, LPS 会刺激细胞分泌 NO, 使细胞 *iNOS* 表达量升高, 但是当 LPS 与猴头菇活性肽共同作用时, NO 分泌量显著降低, 且具有剂量依赖性<sup>[46]</sup>。这些与本文研究结果类似。LPS 使得 Caco-2 细胞促炎基因相对表达量上升, 抑炎基因相对表达量下降, 而甲鱼水解肽缓解了这种负面影响, 这说明甲鱼水解肽能够缓解 Caco-2 细胞炎症反应。虽然甲鱼水解肽炎症模型组(L-P)与 LPS 炎症模型组中的 *IL-10*、*CLDN1*、*TLR4* 相对表达量相比没有统计学意义, 但与 LPS 炎症模型组相比, L-P 组中 *IL-10*、*TLR4* 相对表达量仍呈现上升趋势。此外, L-P 组与对照组中的 *CLDN1*、*TLR4* 相对表达量相比也呈现上升趋势。加入甲鱼水解肽之后, *NF- $\kappa$ B*、*MD2* 相对表达量显著降低( $P<0.05$ )。LPS 是 *TLR4* 识别的典型微生物模式识别分子, LPS 通过进入 MD2 的疏水口袋, 诱导 *TLR4*-MD2 的二聚化, 最终促进 NO 和细胞因子(如 *TNF- $\alpha$* 、*IL-6* 和 *IL-1 $\beta$* )的释放, 引发炎症反应<sup>[48]</sup>, 甲鱼水解肽中存在范德华力和疏水作用, 与 *TLR4*-MD2 具有一定的亲和力, 可减弱 LPS 与细胞膜的结合, 抑制 *TLR4* 与 MD2 的二聚化<sup>[49]</sup>, 从而降低 MD2 的相对表达量。此外, 甲鱼水解肽与 LPS 结合可减轻 LPS 对 *NF- $\kappa$ B* 的刺激, 从而降低 *NF- $\kappa$ B* 转录因子相对表达量的上升, 而 *A.muciniphila* 菌株可以通过抑制 *NF- $\kappa$ B* 来预防 LPS 诱导的 Caco-2 单层上皮屏障功能障碍和炎症反应<sup>[50]</sup>, 这与本文实验研究结果类似。

### 3 结论

本实验通过体外模拟肠道发酵, 揭示甲鱼水解肽对肠道菌群及其免疫功能的不同影响。甲鱼水解肽干预对肠道菌群 Alpha 多样性和 Beta 多样性影响并不显著, 这说明加入甲鱼水解肽有利于维持肠道稳态。通过菌门、菌属水平的分析发现, 甲鱼水解肽的干预能调节优势菌种的占比, 提高有益菌属的数量, 抑制促炎菌的产生, 维护肠道健康。对发酵液中的短链脂肪酸含量及变化进行分析, 发现甲鱼水解肽的加入在一定程度上能够提升乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和异戊酸的含量, 其中 5 mg/mL 的低浓度甲鱼水解肽促进肠道微生物产短链脂肪酸的效果较其他浓度更加稳定, 此外, 短链脂肪酸对肠道免疫功能的调节也具有重要作用。通过测定 Caco-2 细胞模型及其炎症模型发现甲鱼水解肽通过调节免疫相关基因的表达, 激活细胞免疫, 缓解细胞炎症。

综上所述, 甲鱼水解肽能够通过作用于肠道微生态和免疫功能起到益生作用, 对于甲鱼水解肽的益生功能探究和营养价值评价具有借鉴意义, 同时为甲

鱼水解肽相关产品开发提供理论依据, 推动甲鱼深加工产业发展。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 参考文献

- [1] 黄可承, 包建强. 中华鳖营养成分分析与功效研究进展[J]. 上海农业学报, 2023, 39(1): 145–152. [HUANG Kecheng, BAO Jianqiang. Progress on nutritional composition and efficacy of Chinese soft-shelled turtle[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2023, 39(1): 145–152.]
- [2] 史晋源. 甲鱼肽的抗氧化活性与抗疲劳作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021. [SHI Jinyuan. Study on the antioxidant activity and anti-fatigue effect of soft-shelled turtle peptides[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.]
- [3] 孔晓越. 甲鱼源抗氧化肽筛选及构效关系研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2024. [KONG Xiaoyue. Screening and structure-activity relationship study of antioxidant peptides from soft-shelled turtle[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2024.]
- [4] 史晋源, 钟浩, 王倩倩, 等. 甲鱼肽对果蝇寿命及其抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 321–327. [SHI Jinyuan, ZHONG Hao, WANG Qianqian, et al. Effect of soft-shelled turtle peptide on the lifespan and antioxidant activities of *Drosophila melanogaster*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(11): 321–327.]
- [5] 刘臻, 刘冬英, 来伟旗, 等. 甲鱼肽粉对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2013(3): 830–834. [LIU Zhen, LIU Dongying, LAI Weiqi, et al. The effect of turtle peptide powder on immune function in mice[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2013(3): 830–834.]
- [6] WU Y C, LIU X, WANG J L, et al. Soft-shelled turtle peptide modulates microRNA profile in human gastric cancer AGS cells[J]. Oncology Letters, 2017, 15(3): 3109.
- [7] ZHOU J, CHEN M, WU S, et al. A review on mushroom-derived bioactive peptides: Preparation and biological activities[J]. Food Research International, 2020, 134(2): 109230.
- [8] 邹媛婷, 张健, 王共明, 等. 生物活性肽在特殊医学用途配方食品中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(17): 336–344. [ZOU Yuanting, ZHANG Jian, WANG Gongming, et al. Research progress on the application of bioactive peptides in food for special medical purpose[J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(17): 336–344.]
- [9] ECKBURG P B, BIK E M, BERNSTEIN C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. Science, 2005, 308(5728): 1635–1638.
- [10] MA Jiayu, PIAO Xiangshu, SHAD M, et al. The interaction among gut microbes, the intestinal barrier and short chain fatty acids[J]. Animal Nutrition, 2021, 9: 159–174.
- [11] WANG S, HARVEY L, MARTIN R, et al. Targeting the gut microbiota to influence brain development and function in early life[J]. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2018, 95: 191–201.
- [12] NAGPAL R, NETH B J, WANG S, et al. Modified Mediterranean-ketogenic diet modulates gut microbiome and short-chain fatty acids in association with Alzheimer's disease markers in subjects



- with mild cognitive impairment[J]. *EbioMedicine*, 2019, 47(2): 529–542.
- [13] 李博, 秦研, 王鹏, 等. 鹿茸多肽对小鼠肠道菌群的影响[J]. 当代畜牧, 2018(12): 44–47. [LI Bo, QIN Yan, WANG Peng, et al. The effect of deer antler peptides on the gut microbiota of mice[J]. *Contemporary Livestock*, 2018(12): 44–47.]
- [14] 陈心璇. 大鲵活性肽对肠道菌群作用的研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2023. [CHEN Xinai. Effect of bioactive peptides from *Andrias davidianus* on intestinal flora[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2023.]
- [15] SHIMIZU M. Modulation of intestinal functions by food substances[J]. *Nahrung*, 1999, 43(3): 154–158.
- [16] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus[J]. *Food Funct*, 2014, 5: 1113–1124.
- [17] XU Yuanyuan, XIANG Shasha, YE Kun, et al. Cobalamin (Vitamin B12) induced a shift in microbial composition and metabolic activity in an *in vitro* colon simulation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2780.
- [18] YAN Fujie, XIANG Shasha, YING Jian, et al. Healthy food design based on gut microbiota metabolic flux[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2024, 154: 104790.
- [19] 王彩, 高培鑫, 许竞男, 等. 小鼠粪便中短链脂肪酸提取与检测方法的建立及应用[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(6): 1012–1015, 1032. [WANG Cai, GAO Peixin, XU Jingnan, et al. Establishment and application of extraction and determination method for short-chain fatty acids in feces of mice[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2017, 17(6): 1012–1015, 1032.]
- [20] 许丽惠, 严梦涵, 王全溪. 乳酸菌素 PlnJ(G5) 缓解 LPS 诱导肠上皮细胞及小鼠肠道炎症的作用机制[J]. 福建农业科技, 2024, 55(10): 36–42. [XU Lihui, YAN Menghan, WANG Quanxi. Effect of lactobacillin (PlnJ(G5)) on intestinal inflammation induced by LPS[J]. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2024, 55(10): 36–42.]
- [21] BAO X L, YUAN X Y, FENG G X, et al. Structural characterization of calcium-binding sunflower seed and peanut peptides and enhanced calcium transport by calcium complexes in Caco-2 cells[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 101(2): 794–804.
- [22] 陈紫薇, 张吉龙, 庄武超, 等. Trizol 法提取鸡肝组织总 RNA 及 miRNA 的条件优化研究[J]. 中国家禽, 2024, 46(9): 175–181. [CHEN Ziwei, ZHANG Jilong, ZHUANG Wuchao, et al. Optimization of Trizol method for extracting total RNA and miRNA from chicken liver tissue[J]. *China Poultry*, 2024, 46(9): 175–181.]
- [23] 虞青婷. 干制苹果片褐变产物积累机制及其对 Caco-2 细胞氧化应激影响研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2023. [YU Qingting. Mechanism of dried apple slices browning products accumulation and their effects on oxidative stress in Caco-2 cells[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis, 2023.]
- [24] SU X. Elucidating the beta-diversity of the microbiome: From global alignment to local alignment[J]. *mSystems*, 2021, 6(4): e0036321.
- [25] SINGH S B, AMANDA C, LIN H C. *Desulfovibrio* in the gut: The enemy within?[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(7): 1772.
- [26] 赵晓兰, 刘冰, 辛凤姣, 等. 核桃分心木的体外消化特性及其对人体肠道菌群的影响[J]. 核农学报, 2025, 39(2): 317–328. [ZHAO Xiaolan, LIU Bing, XIN Fengjiao, et al. *In vitro* digestive properties and the effect of *Diaphragma juglandis* fructus on human gut microbiota[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2025, 39(2): 317–328.]
- [27] 曾全恒, 王元楷, 周纯洁, 等. 基于体外发酵研究脱镁叶绿素对高脂饮食诱导小鼠肠道菌群的调节作用[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(5): 126–133. [ZENG Quanheng, WANG Yuankai, ZHOU Chunjie, et al. The regulating effect of pheophytins on mice gut microflora induced with high-fat diet based on *in vitro* fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2025, 51(5): 126–133.]
- [28] LI Q, SUN X, YU K, et al. *Enterobacter ludwigii* protects DSS-induced colitis through choline-mediated immune tolerance[J]. *Cell Reports*, 2022, 40(9): 111308.
- [29] HALL A B, YASSOUR M, SAUK J, et al. A novel *Ruminococcus gnavus* clade enriched in inflammatory bowel disease patients[J]. *Genome Medicine*, 2017, 9(1): 1–12.
- [30] KAAKOUSH N O. *Sutterella* species, IgA-degrading bacteria in ulcerative colitis[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(7): 519–522.
- [31] 侯梦凡, 胡晓. 生物活性肽对肠道菌群调节作用研究进展[J]. 中国食品学报, 2022, 22(11): 410–423. [HOU Mengfan, HU Xiao. Research progress on regulating effects of bioactive peptides on gut microbiota[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(11): 410–423.]
- [32] DAVID L A, MAURICE C F, CARMODY R N, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome[J]. *Nature*, 2013, 505(7484): 559–563.
- [33] CHENG Jiaobo, HU Jielun, GENG Fang, et al. Bacteroides utilization for dietary polysaccharides and their beneficial effects on gut health[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(5): 1101–1110.
- [34] MORRISON D J, PRESTON T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism[J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(3): 189–200.
- [35] CHANG PAMELA V, HAO L M, STEFAN O, et al. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(6): 2247–2252.
- [36] 黄廷财, 柴丽娟, 时伟, 等. 酱香型白酒第 2、3 轮次堆积发酵有机酸代谢规律与菌群结构及其相关性解析[J]. 食品科学, 2024, 45(18): 106–115. [HUANG Tingcai, CHAI Lijuan, SHI Wei, et al. Microbial community structure and organic acid metabolism and their correlation in the second and third rounds of stacking fermentation of sauce-flavor Baijiu[J]. *Food Science*, 2024, 45(18): 106–115.]
- [37] KASUBUCHI M, HASEGAWA S, HIRAMATSU T, et al. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation[J]. *Nutrients*, 2015, 7(4): 2839–2849.
- [38] 张小芳, 王欣, 汪惠勤, 等. 人体肠道菌群代谢氨基酸产生短链脂肪酸及对细胞通透性的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 60–67. [ZHANG Xiaofang, WANG Xin, WANG Huiqin, et al. Human intestinal flora metabolite short-chain fatty acids produced from amino acids and effect on cell permeability[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(7): 60–67.]
- [39] WANG Hongbo, WANG Pengyuan, WANG Xin, et al. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2012, 57(12): 3126–3135.

- [40] FU X, CAO C L, REN B B, et al. Structural characterization and *in vitro* fermentation of a novel polysaccharide from *Sargassum thunbergia* and its impact on gut microbiota[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 183: 230–239.
- [41] BURCELIN R. Gut microbiota and immune crosstalk in metabolic disease[J]. *Molecular Metabolism*, 2016, 5(9): 771–781.
- [42] LI X, ZHU B, CHEN N, et al. Molecular characterization and functional analysis of MyD88 in Chinese soft-shelled turtle *Trionyx sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 33–38.
- [43] KANMANI P, KIM H. Functional capabilities of probiotic strains on attenuation of intestinal epithelial cell inflammatory response induced by TLR4 stimuli[J]. *BioFactors*, 2019, 45(2): 223–235.
- [44] SHI M X, YUE Y S, MA C, et al. Pasteurized *Akkermansia muciniphila* ameliorate the LPS-induced intestinal barrier Dysfunction via modulating AMPK and NF- $\kappa$ B through TLR2 in Caco-2 cells[J]. *Nutrients*, 2022, 14: 764.
- [45] 刘春梅. 金黄色葡萄球菌肠毒素 A 诱导肠屏障功能障碍及 EGCG 干预机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023. [LIU Chunmei. Study on the mechanism of intestinal barrier dysfunction induced by *Staphylococcal enterotoxin A* and EGCG intervention[D]. Changchun: Jilin University, 2023. ]
- [46] 于弋涵. 猴头菇活性肽的制备及其免疫调节作用研究[D]. 南京: 南京财经大学, 2021. [YU Yihan. Study on the preparation of *Hericium erinaceus* active peptide and its immunoregulatory effect[D]. Nanjing: Nanjing University of Finance and Economics, 2021. ]
- [47] HIROTANI Y, IKEDA K, KATO R, et al. Protective effects of *Lactoferrin* against intestinal mucosal damage induced by lipopolysaccharide in human intestinal Caco-2 cells[J]. *Yakugaku zasshi Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 2008, 128(9): 1363–1368.
- [48] ANWAR M A, CHOI S. Structure-activity relationship in TLR4 mutations: Atomistic molecular dynamics simulations and residue interaction network analysis[J]. *Rep*, 2017, 7: 43807.
- [49] 左月月, 彭俊超, 易琼, 等. 麦角甾醇过氧化物阻碍 LPS 介导 TLR4/MD-2 二聚化抑制炎症信号传递的研究[J/OL]. 中国免疫学杂志, 1–14[2024-12-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.R.20240914.0902.002.html>. [ZUO Yueyue, PENG Junchao, YI Qiong, et al. Anti-inflammatory effects of ergosterol on LPS-induced lung injury in mice[J/OL]. *Chinese Journal of Immunology*, 1–14[2024-12-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.R.20240914.0902.002.html>. ]
- [50] PATTANAIK K P, GANGULI G, NAIK S K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* EsxL induces TNF-alpha secretion through activation of TLR2 dependent MAPK and NF-kappaB pathways[J]. *Molecular Immunology*, 2021, 130: 133–141.