

食源性免疫活性肽的筛选策略 及作用机制研究进展

Progresses of the screening strategies and the effect mechanism
researches of food-derived immunopeptides

文 李 NIYOKWIZERA Isaac 刘步青 许 宙

WEN Li NIYOKWIZERA Isaac LIU Bu-qing XU Zhou

陈茂龙 程云辉

CHEN Mao-long CHENG Yun-hui

(长沙理工大学化学与食品工程学院, 湖南 长沙 410114)

(College of Chemical and Food Engineering, Changsha University of Science and Technology,
Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:文章综述了目前国内外对食源性免疫活性肽的筛选策略,强调计算科学在筛选中的应用前景。通过探讨食源性免疫活性肽作用的分子机理及其研究现状,提出了未来的研究新思路:结合多组学、生物信息学、细胞试验及动物试验,深入探讨食源性免疫活性肽作用的分子机理。

关键词:食源性;免疫活性肽;计算科学;筛选;免疫调控分子机理

Abstract: The global undergoing strategies of screening the food-derived immunopeptides were summarized in this review, and the prospective using of computational science was emphasized. Moreover, the research background of the molecular mechanism of the food-derive immunopeptides was reviewed, and a new research strategy was also proposed, i. e. combining the multi-omics, bioinformatics, and cellular and animal experiments to investigate their molecular mechanism.

Keywords: food-derived; immunopeptides; computational sciences; screening; molecular mechanism of immuno-regulation

免疫活性肽(Immunopeptides)能增强巨噬细胞吞噬

功能、刺激淋巴细胞增殖并增强机体免疫力,以及提高机体抵御外界病原体感染的能力,部分免疫活性肽甚至参与机体的抗肿瘤作用^[1-2]。

食源性蛋白质来源广泛,食用安全性高。许多免疫活性肽本身以非活性状态存在于食源性蛋白质中,其活性在被消化或水解后才能释放出来。从食源性蛋白质的酶水解产物中所制备的免疫活性肽,能以完整肽的形式被肠道吸收或在肠道与受体结合发挥作用,目前能最有效获得食源性免疫活性肽的水解酶主要有胰酶、碱性蛋白酶和胃蛋白酶等。近 20 年来,对食源性免疫活性肽研究的报道逐年增多,如牛奶、鸡蛋、鱼类、贝类和蛙类等动物来源的免疫活性肽,以及大豆、燕麦、小麦和大麦等植物来源的免疫活性肽等^[3]。

鉴于天然免疫活性肽在生物体内含量较少,且分离提纯成本高,对现有的食品加工副产物中蛋白质进行蛋白酶水解,并分离提纯免疫活性肽不失为一条成本相对较低的途径。试验团队曾对免疫活性肽的分类与常规分离技术^[4],以及活性肽与 MHC 分子结合能力的免疫信息学进行了综述^[5]。文章拟在此基础上,对食源性免疫活性肽的分离策略及作用机制进行综述,旨在为将来的研究提供新思路。

1 免疫与免疫活性肽

免疫系统分为先天免疫(天然免疫)和适应性免疫(获得性免疫)。先天免疫是非特异性的,主要通过机体的天然屏障(如皮肤和黏膜)、生理学防御(低 pH、温度和化学介质)、细胞(如巨噬细胞、多形核白细胞、树突状细

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31972077);湖南省自然科学基金面上项目(编号:2018JJ2423);湖南省协同创新中心项目(编号:15xtcx001);长沙理工大学“双一流”科学研究国际合作拓展项目(编号:2018IC20)

作者简介:文李,女,长沙理工大学副教授,硕士生导师,博士。

通信作者:程云辉(1964—),女,长沙理工大学教授,硕士生导师,博士。E-mail:chengyh6488@sina.com

收稿日期:2019-12-26

胞)和自然杀伤(NK)细胞)或炎症因子(如细胞因子、干扰素、补体、防御素、白三烯、急性期蛋白质和前列腺素)提供第一道防御。适应性免疫对潜在危险的外来抗原具有高度特异性,可分为细胞免疫和抗体介导的体液免疫,而 T 淋巴细胞(T 细胞)和 B 淋巴细胞(B 细胞)是适应性免疫中最重要的细胞。体液免疫中 B 淋巴细胞可在与特异性抗原相互作用时产生抗体,抗体可与入侵的抗原结合并标记以供巨噬细胞破坏。细胞免疫由 T 淋巴细胞组成,T 淋巴细胞可分泌免疫调节因子并介导与抗原呈递细胞(APC)相互作用的细胞免疫应答。T 淋巴细胞分为 3 个亚组,即细胞毒性 T 细胞(Tc 细胞)、辅助 T 细胞(Th 细胞)和调节 T 细胞(Treg 细胞)。Tc 细胞表面受体 CD8⁺可识别内源性抗原与主要组织相容性复合体(MHC I)结合的复合物,并杀死癌症细胞和感染病毒的细胞;而 Th 细胞表面标记物 CD4⁺可识别与 MHC II 结合的外源性抗原复合物,Th 细胞可分泌细胞因子,如干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素(Interleukin, IL)-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 和 IL-25,并帮助激活 B 细胞、T 细胞和其他免疫细胞(如巨噬细胞)参与免疫反应。Treg 细胞负责抑制其他 T 细胞的免疫反应,通过保持自我耐受来预防自身免疫疾病^[6]。

免疫活性肽指能调节免疫活性,参与免疫细胞信号传递物质的短肽。当外源免疫活性肽进入抗原呈递细胞(APC)后,可与 MHC II 结合^[7]。MHC II 可结合由 10~18 个氨基酸组成的短肽,所形成的复合物可被抗原的 T 细胞受体(TCR)识别,并呈递给 CD4⁺ T 细胞,最终促使 CD4⁺ T 细胞参与免疫应答反应,如刺激淋巴细胞增殖、分化、成熟,分泌细胞因子及增强巨噬细胞吞噬功能等^[8]。

2 食源性免疫活性肽及其筛选手段

2.1 常规分离策略

目前,有关食源性活性肽的免疫调控研究大多是利用蛋白质酶的水解产物组分,即肽的混合物,仅少数研究报道了精确的氨基酸序列。传统的分离方法通常是以酶解产物的某种特定活性功能为考察指标(大多为体外),基于蛋白酶解物的疏水性、带电性、分子量等性质的差异^[9-10],结合膜分离、多种常压色谱、高压色谱以及离子交换色谱等分离技术^[11-12],从酶解物中分离肽组分进行体内或体外免疫试验,结合质谱鉴定技术获得食源性免疫活性肽^[13]。Xu 等^[14]从大米加工副产物中提取蛋白质,经胰酶水解、大孔树脂、液相色谱等技术分离出不同的酶解组分,并以小鼠巨噬细胞增殖指数为考察指标,从大米蛋白酶解物中筛选出免疫活性最强的胰酶水解产物,并证明了部分大米蛋白质水解产物具有免疫活性。

2.2 基于计算科学预测的筛选策略

近年来,随着免疫基因组学和生物信息学的不断发

展,免疫信息学也得到了长足发展。质谱鉴定、核磁共振、结构生物学及免疫信息学等研究技术的发展,为免疫活性肽筛选方法的不断更新提供了可能。已知免疫细胞 T 细胞激活及发挥免疫作用的先决条件是 MHC II 和对应抗原肽之间紧密结合而形成的复合物,MHC II 类分子顶部皆存在一个狭长裂缝,可以结合含有特定氨基酸基序组成的短肽;MHC II 分子与外源肽识别的基序专一性决定其可识别一类带有特定共同基序的肽段,使得 MHC II 分子与外源抗原肽的结合具有一定的包容性^[15]。而 MHC II 分子结合肽和 T 细胞表位预测等免疫信息学相关的数据库收集了大量与免疫相关的分子信息,可实现免费在线的数据查询、分析和计算等^[16]。研究者可根据免疫活性肽氨基酸序列信息、MHC II 结构特点和 MHC-多肽复合物三维构象指导免疫活性肽的筛选乃至设计。

目前已有的网上服务器可解决肽段的理化性质、三维结构及与 MHC II 分子结合的可能性,并预测肽段与 MHC II 分子结合后,复合体的三维结构模拟和自由能计算。主要有:

(1) 数据库 SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/0-Home.htm>),装载有 MHC II 分子配体及多肽基序,包含人类和猴、牛、鸡、鼠等动物的 MHC II 类配体和表位,有助于实现针对性地筛选免疫活性肽^[17]。

(2) NetMHCIIpan3.2 服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>),可用来预测人和鼠免疫活性肽与 MHC II 分子结合的可能性和强度^[18]。

(3) Innovagen Pepcalc.com 服务器(<https://pepcalc.com/>),可预测肽段的等电点、净电荷、亲水性分布以及水溶性。

(4) TOXINPRED 服务器(<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>),可用于预测肽的毒性。

(5) 通过 PepFold 3.0 服务器(<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>)可对肽的三维(3D)结构进行预测^[19]。

(6) PepFold 3.0 所获得的数据可继续采用最佳模型 3D Refine 服务器(<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/>)进行氢键结合的优化和原子能量的最小化^[20]。

(7) 通过 RAMPAGE 服务器(<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>)可获得肽段的 Ramachandran 图并评价肽结构的质量。

(8) CLUSPRO 2.0 服务器(<https://cluspro.bu.edu/login.php>)可用于模拟组装肽和 MHC II 之间的复合物,并获得复合体的 3D 模型;然后采用 MMGBSA 法模拟计算复合物的结合自由能 ΔG_{mmgsa} 值^[21]。

多年来,各物种基因组和蛋白质组学研究已积累了大量的蛋白质氨基酸序列数据,而各种质谱技术及生物信息学的发展,为获得食物蛋白酶解产物的氨基酸序列

并进行信息学分析打下了基础。此外,Dhanda 等^[22]开发了一种基于代表性或共识产生表位簇序列的新算法 Cluster2.0(<http://tools.iedb.org/cluster2/>),用来预测免疫活性肽与 MHC II 分子结合的表位,可用来分析所有免疫活性肽的共同基序,寻找免疫活性肽的序列规律,从而指导免疫活性肽的功能验证实验。利用现有的蛋白质序列数据库和免疫信息学数据库,结合细胞免疫功能的试验验证,或许能分析出食源性免疫活性肽的氨基酸组成和序列规律。

3 食源性免疫活性肽的作用机制

3.1 食源性免疫活性肽对先天性免疫的影响

体外和体内试验^[23]发现,食源性免疫活性肽可影响局部肠道免疫效应及系统免疫效应,可通过影响肠道的上皮细胞排列,并由此诱导肠腔上皮细胞和免疫细胞间的交流。肠腔上皮细胞所形成的第一道防御层,可防御有害病原体及分子,且这些细胞被一层黏液覆盖,形成内腔含量与人体之间的物理屏障。研究^[24]发现,肠腔中的免疫活性肽能增强上皮细胞的屏障作用,并增强黏液分泌及清除病原体所需的抗微生物蛋白的产生。如健康小鼠食用蛋黄肽能增加离体上皮细胞中 IL-6 的产生,而 IL-6 在先天性免疫反应和适应性免疫反应中均起作用,说明免疫活性肽可能以此方式通过上皮细胞来影响免疫系统。

另外,淋巴集结(PP)是遍布小肠回肠区域的少量淋巴组织,也被称为聚集的淋巴结节,主要作用为监测肠道细菌种群并防止肠道中的病原细菌的生长,是免疫系统的重要组成部分。Egusa 等^[25]研究了大豆蛋白水解肽在 PP 中的作用,并对喂食富含大豆蛋白水解复合物 5 周后的小鼠,进行 PP 衍生细胞的全基因组表达分析,发现与先天免疫和宿主防御有关的几个基因被上调,其中 *Igh-4* 和 *Aqp8* 的上调会增强吞噬作用,而 *Dmbt1*、*Slpi* 和 *Mx1* 则与抗菌和抗病毒成分相关。

3.2 食源性免疫活性肽对适应性免疫的影响

食源性免疫活性肽并不直接与病原体相互作用,而是通过与提呈细胞内的 MHC II 分子结合后参与免疫调节作用,提高宿主防御病原体的能力^[26]。抗原呈递过程主要发生在肠系膜淋巴结(MLN)中。来自肠道 PP 及固有层的负载抗原的树突状细胞迁移至 MLN 后,激活 T 细胞和 B 细胞,根据不同抗原的性质引起免疫应答或通过 Treg 的形成诱导免疫耐受^[27]。

食源性免疫活性肽不仅会影响局部的肠道免疫组织,也会影响全身其他的免疫组织,如脾脏、腹膜细胞以及血液等。小肽可穿过肠道屏障,进入血液,直接影响全身的免疫细胞。分别用酪蛋白与乳制品、牡蛎、鲑鱼等制成的蛋白质水解物可增加小鼠巨噬细胞的离体吞噬能

力,增强脾脏中 NK 细胞活性及离体脾细胞增殖能力等。研究发现,鲤鱼卵碱性蛋白酶水解肽可增加小鼠脾脏中的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞数量^[28],而鲑鱼卵的水解产物可增加 CD4⁺ 细胞数量^[29]。同时,在血液中都检测到 Th1(含有 IL-2 和 IFN- γ)和 Th2(含有 IL-4 和 -5)细胞因子,说明食源性免疫活性肽参与调控免疫细胞 Th1 和 Th2 的分化^[29]。食源性免疫活性肽可影响 B 细胞反应的另一个重要证据是血液中抗体水平的升高,研究^[28]发现食源性免疫活性肽不仅可能影响 B 细胞分化,还可诱导免疫细胞的类别转换及抗体的产生。

目前,仅有很少的研究调查了食源性蛋白水解肽对人类血液中免疫参数的影响,Yimit 等^[30]发现单剂量大豆水解肽可改变白细胞数量,并导致粒细胞增加及血液中的 CD11b⁺ (巨噬细胞和/或树突状细胞)和 CD56⁺ 细胞数目显著升高(NK 细胞)。在服食小麦麦麸蛋白水解肽 6 d 后,可观察到体内 NK 细胞活性的增加^[31]。这些研究仅检测了少数免疫学参数,且受试样本较少,因此食源性免疫活性肽对人体的作用机理尚需进一步的研究。

3.3 食源性免疫活性肽参与免疫调节作用的分子机制

虽然关于食源性活性肽被免疫细胞摄取并参与免疫调控作用的分子机理方面的研究较少,但现有的研究结果大体可归纳为 3 个方面^[32]:

(1) 食源性免疫活性肽直接激活细胞受体(如 Toll 样受体,Toll-like receptor,TLR2、3、4、5、6、7、8、9,以及阿片肽受体等),并刺激如肿瘤坏死因子 TNF- α 、IL-6、IL-8 和 IL-10 等细胞因子的产生,诱导 T 细胞分化,促进 B 细胞产生免疫球蛋白(Ig),并影响巨噬细胞的吞噬作用。

(2) 大豆和乳清的多种具有生物活性的三肽和四肽在进入细胞后,可通过依赖寡肽转运蛋白(PepT1)行使细胞内抗炎作用。PepT1 是一种 H⁺ 偶联的寡肽转运蛋白,介导肠道上皮细胞吸收多种二肽和三肽,并将肽转运到血液中。如果抑制 PepT1 活性,该作用消失,表明通过 PepT1 转运对于抗炎作用是必需的。细胞摄取外源寡肽后,这些二肽或三肽通过 PepT1 的转运进入胞质溶胶,抑制主要的炎症信号通路,减少促炎细胞因子(如 IL-6、IL-8 和 TNF- α)的分泌,并降低 NF- κ B 诱导的 B 细胞、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等的活化。

(3) 分子量大于三肽的食源性免疫活性肽可通过胞吞作用被细胞吸收。胞吞作用的吸收是通过肽和细胞膜之间的疏水相互作用协助完成的。研究^[33]发现,免疫细胞通过胞吞作用吸收大豆肽 lunasin,并在炎症条件下增加 lunasin 的摄取量,说明该肽参与抗炎反应。Lunasin 是一种 43 个氨基酸的肽,可与 α V β 3 整合蛋白(Integrin)相互作用,从而抑制 α V β 3 整合蛋白介导的炎症标记并下调 NF- κ B 途径。

综上,食源性免疫活性肽被摄取进入上皮细胞或免

疫细胞后,影响免疫信号通路,发挥免疫调控作用,不同的食源性免疫活性肽参与免疫调控的机制不同^[34]。

此外,也有一些食源性免疫活性肽细胞试验相关的研究报道,包括细胞增殖、吞噬能力及细胞因子的分泌等方面的研究内容。如 Li 等^[35]从环纹蛤(*Cyclinasinensis*)蛋白水解产物中筛选出使小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 相对增殖率最高的免疫活性肽 SCSP(RVAPEEHPVEGRYL V),通过细胞试验发现,SCSP 可通过激活 NF- κ B 信号通路来刺激巨噬细胞活性,增强巨噬细胞吞噬作用,并增加 NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的产生,调节 RAW 264.7 细胞中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、核因子 NF- κ B(Nuclear transcription factor- κ B)和 NOD 样受体蛋白 3(NLRP 3)的蛋白质水平;而 NF- κ B 抑制因子- α (I κ B- α)的表达量下调。Wen 等^[36]对从大米蛋白质胰酶水解产物中分离出的组分 RPHs-C-7-3 进行免疫活性分析,发现其可以抑制经 LPS 刺激的 RAW 264.7 巨噬细胞的炎症反应;RPHs-C-7-3 可抑制 NO 和 TNF- α 的释放,降低 TNF- α 、iNOS、IL-6 和 IL-1 的转录水平,减弱 iNOS 和 NF- κ B 的蛋白表达,并阻止 p65 核转位的信号通路,对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 起抗炎作用。树突细胞是重要的提呈细胞之一,其中小鼠树突细胞 DC2.4 是常用的研究抗原分子参与免疫调节作用的细胞系,通过考察 DC2.4 细胞吞噬抗原分子后其标志物 CD86 与 MHC II 分子,及细胞因子 IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF- α 等的变化分析外源分子所参与的免疫调节作用^[37]。

食源性免疫活性肽对先天免疫和适应性免疫均有调节作用,包括诱导或调节细胞因子与免疫球蛋白的产生与分泌,刺激淋巴细胞增殖,增强巨噬细胞的吞噬能力和 NK 细胞活力,从而提高机体的防御能力,达到抑制促炎反应并抵御病原体入侵的目的;食源性免疫活性肽并不直接与病原体相互作用,而是通过一定的方式进入细胞参与免疫调控作用,提高宿主防御病原体的能力^[26]。

4 研究策略及展望

现阶段对食源性免疫活性肽作用机理的研究手段可归纳为体外免疫试验(即细胞模型:如小鼠巨噬细胞 RAW 264.7、树突细胞 DC2.4、人单核细胞 U937 和 THP-1 等)和体内免疫试验(动物模型:如小鼠等)两大类。大多数细胞试验中,主要评估在免疫信号转导中起重要作用的信号分子的变化,如肿瘤坏死因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NF- κ B 及 NO 等^[37]。而动物试验中,主要考察喂食不同浓度的酶解肽一段时间(如 3,7,14,28,45 d)后的动物体重变化,并收集不同组织,如血液、脾脏和胸腺等进行免疫学、血液学和生物化学试验,主要包括考察淋巴细胞的增殖、腹膜巨噬细胞的吞噬作用、NK 细胞的

活性、脾脏 T 淋巴细胞(CD4⁺ 和 CD8⁺ 等)的数量变化,并检测分泌免疫球蛋白-A(S-IgA)(黏膜免疫)、血清免疫球蛋白(IgA、IgM 和 IgG)以及细胞因子(如 IL-2、IFN- γ 、IL-5 和 IL-6 等)的含量等^[28, 37]。

随着各种组学研究的不断发展,蛋白组和转录组技术能快速准确筛选差异表达的相关功能蛋白质和基因,研究^[38]表明组学技术确实为研究外源肽调控细胞机制的有效手段。如 Rojas-Caraballo 等^[39]采用化学合成含有 B-和 T-细胞表位的肽,利用该合成肽对小鼠进行免疫处理,并用转录组技术对比分析免疫肽保护前后被肝吸虫损害的脾脏内 RNA 表达的差异。结果发现,用含有 T 细胞表位的 3 种肽的组合对小鼠有较高的保护作用,生物信息学分析发现与 NO 和活性氧产生相关的途径发生变化,IL-12 和 IL-8 信号传导途径以及巨噬细胞产生均发生变化。

目前,对食源性免疫活性肽的探讨还处于初级阶段,大量存在于食品加工副产物中的蛋白质未被充分利用。以大米为例,中国稻谷每年总产量为 2.1 亿 t 左右,稻米的加工产生大量碎米、米糠、米渣以及淀粉发酵的副产物,富含蛋白质,但并未得到充分的开发利用^[40]。因此,有必要进行更加深入的研究,获得更加有效的分离和筛选策略,并解析食源性免疫活性肽的肽序规律。在肽组学和免疫信息学的研究基础上,探索食源性免疫活性肽高效筛选方法,加速食源性免疫活性肽的研究和应用。结合蛋白组学、转录组学和生物信息学技术,动态分析食源性免疫活性肽参与免疫调控的蛋白质和基因表达量变化,并采用组学工具分析这些关键基因之间的相互关系,绘制细胞内参与食源性免疫活性肽调控作用的动态网络图。结合动物免疫试验,检测相关免疫细胞、细胞因子及免疫球蛋白的变化,最终解析食源性免疫活性肽作用的分子机理。

参考文献

- [1] MAZORRA-MANZANO M A, RAMIREZ-SUAREZ J C, YADA R Y. Plant proteases for bioactive peptides release; A review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(13): 2 147-2 163.
- [2] GIROMINI Carlotta, CHELI Federica, REBUCCI Raffaella, et al. Invited review: Dairy proteins and bioactive peptides: Modeling digestion and the intestinal barrier [J]. J Dairy Sci, 2019, 102(2): 929-942.
- [3] KIEWIET M B G, FAAS M M, DE V P. Immunomodulatory protein hydrolysates and their application [J]. Nutrients, 2018, 10(7): 904-925.
- [4] 陈月华,程云辉,许宙,等.食源性生物活性肽免疫调节功能研究进展 [J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 210-213.
- [5] 黄璐,文李,许宙,等.活性肽与 MHC 结合能力预测的免疫

- 信息学方法研究进展 [J]. 食品与机械, 2018, 34(4): 186-191.
- [6] MENSALI N, GRENOV A, PATI N B, et al. Antigen-delivery through invariant chain (CD74) boosts CD8 and CD4 T cell immunity [J]. Oncoimmunology, 2019, 8(3): 1558663.
- [7] JUREWICZ M M, STERN L J. Class II MHC antigen processing in immune tolerance and inflammation [J]. Immunogenetics, 2019, 71(3): 171-187.
- [8] DOYLE C, STROMINGER J L. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion [J]. Nature, 1987, 330(6145): 256-259.
- [9] KITTS D D, WEILER K. Bioactive proteins and peptides from food sources: Applications of bioprocesses used in isolation and recovery [J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(16): 1309-1323.
- [10] KEHINDE B A, SHARMA P. Recently isolated antidiabetic hydrolysates and peptides from multiple food sources; A review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020, 60(2): 322-340.
- [11] FANG Yong, PAN Xin, ZHAO Er-min, et al. Isolation and identification of immunomodulatory selenium-containing peptides from selenium-enriched rice protein hydrolysates [J]. Food Chem, 2019, 275: 696-702.
- [12] YANG Xiu-rong, QIU Yi-ting, ZHAO Yu-qin, et al. Purification and characterization of antioxidant peptides derived from protein hydrolysate of the marine bivalve mollusk *Tergillarca granosa* [J]. Mar Drugs, 2019, 17(5): 251-266.
- [13] HOU Hu, FAN Yan, LI Ba-fang, et al. Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of Alaska pollock frame [J]. Food Chem, 2012, 134(2): 821-828.
- [14] XU Zhou, MAO Tian-mi., HUANG Lu, et al. Purification and identification immunomodulatory peptide from rice protein hydrolysates food [J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, DOI: 10.1080/09540105.2018.1553938.
- [15] REINHERZ E L, TAN Kemin, TANG Lei, et al. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II [J]. Science, 1999, 286(5446): 1913-1921.
- [16] GALVAO DA SILVA B A V, CHUDZINSKI-TAVASSI A M, PASQUALOTO K F M. A combined computer-aided approach to drive the identification of potential epitopes in protein therapeutics [J]. J Pharm Pharm Sci, 2018, 21(1): 268-285.
- [17] SCHULER Mathias M, NASTKE Maria-dorothea, STEVANOVIC Stafan, SYFPEITHI; Database for searching and T-cell epitope prediction [J]. Methods Mol Biol, 2007, 409: 75-93.
- [18] ANDREATTA M, KAROSIENE E, RASMUSSEN M, et al. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification [J]. Immunogenetics, 2015, 67(11/12): 641-650.
- [19] MAUPETIT J, DERREUMAUX P, TUFFERY P. PEP-FOLD: An online resource for de novo peptide structure prediction [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: W498-W503.
- [20] BHATTACHARYA D, CHENG Jian-lin. 3Drefine: Consistent protein structure refinement by optimizing hydrogen bonding network and atomic-level energy minimization [J]. Proteins, 2013, 81(1): 119-131.
- [21] MILLER BILL R 3RD, MCGEE T DWIGHT J R, SWAILS JASON M, et al. MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations [J]. J Chem Theory Comput, 2012, 8(9): 3314-3321.
- [22] DHANDA S K, VAUGHAN K, SCHULTEN V, et al. Development of a novel clustering tool for linear peptide sequences [J]. Immunology, 2018, 155(3): 331-345.
- [23] FARHADI A, BANAN A L I, FIELDS J, et al. Intestinal barrier: An interface between health and disease [J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2003, 18(5): 479-497.
- [24] NELSON R, KATAYAMA S, MINE Y, et al. Immunomodulating effects of egg yolk low lipid peptic digests in a murine model [J]. Food and Agricultural Immunology, 2007, 18(1): 1-15.
- [25] EGUSA S, OTANI H. Soybean protein fraction digested with neutral protease preparation, "Peptidase R", produced by *Rhizopus oryzae*, stimulates innate cellular immune system in mouse [J]. International Immunopharmacology, 2009, 9(7/8): 931-936.
- [26] CIAN R E, HERNANDEZ-CHIRLAQUE C, GAMEZ-BELMONTE R, et al. Green Alga *Ulva* spp. Hydrolysates and their peptide fractions regulate cytokine production in splenic macrophages and lymphocytes involving the TLR4-NFkappaB/MAPK pathways [J]. Mar Drugs, 2018, 16(7): 10.3390/md16070235.
- [27] MACPHERSON A J, SMITH K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy [J]. The Journal of Experimental Medicine, 2006, 203(3): 497-500.
- [28] CHALAMAIAH M, HEMALATHA R, JYOTHIRMAYI T, et al. Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) egg [J]. Nutrition, 2015, 31(2): 388-398.
- [29] YANG Rui-yue, ZHANG Zhao-feng, PEI Xin-rong, et al. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice [J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 464-470.
- [30] YIMIT D, HOXUR P, AMAT N, et al. Effects of soybean peptide on immune function, brain function, and neurochemistry in healthy volunteers [J]. Nutrition, 2012, 28(2): 154-159.

(下转第 37 页)

- [8] 刘青梅, 巨文华, 杨性民. 蟹糊贮藏过程品质变化的动力学模型研究[J]. 浙江万里学院学报, 2011, 24(2): 68-72.
- [9] 马超. 蟹糊质量和耐贮性的细菌学研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2008: 11.
- [10] 黄键, 陈燕, 全晶晶, 等. 瓶装泥螺和蟹糊可培养细菌的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 217-220.
- [11] 石建喜. 鲢鱼发酵成熟过程中风味形成及品质变化的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [12] 杨婷婷, 刘俊荣, 沈建, 等. 活品底播虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)感官评价描述词的建立[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 16-22.
- [13] 国家技术监督局. 感官分析 通过多元分析方法鉴定和选择用于建立感官剖面的描述词[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 28.
- [14] 张娜. 中华绒螯蟹风味物质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008: 30.
- [15] 蒋根栋. 中华绒螯蟹与锯缘青蟹挥发性风味物质及相关滋味成分的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2008: 25.
- [16] CHUNG H Y, CADWALLADER K R. Aroma extract dilution analysis of blue crab claw meat volatiles[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1994, 42(12): 2 867-2 870.
- [17] 卜俊芝. 三种海蟹营养和风味成分的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012: 7.
- [18] 金燕. 蟹肉风味的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2011: 4-5.
- [19] 黄鹤, 耿丽晶, 陈博, 等. 基于电子鼻对不同发酵阶段蟹酱加热前后特征风味的分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 245-248, 257.
- [20] JIANG S T, BAO S H, TSAO C Y. Protein denaturation and changes in nucleotides of fish muscle during frozen storage[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1987, 35(1): 22-27.
- [21] ANGGO A D, MA'RUF W F, SWASTAWATI F, et al. Changes of amino and fatty acids in anchovy (*Stolephorus Sp*) fermented fish paste with different fermentation periods[J]. Procedia Environmental Sciences, 2015, 23: 58-63.
- [22] PERALTA E M, HATATE H, KAWABE D, et al. Improving antioxidant activity and nutritional components of Philippine salt-fermented shrimp paste through prolonged fermentation[J]. Food Chemistry, 2008, 111(1): 72-77.
- [23] DASHDORJ D, AMNA T, HWANG I. Influence of specific taste-active components on meat flavor as affected by intrinsic and extrinsic factors: An overview [J]. European Food Research & Technology, 2015, 241(2): 157-171.
- [24] CHEN Dai-an, YE Yang-fang, CHEN Juan-juan, et al. Evolution of metabolomics profile of crab paste during fermentation[J]. Food Chemistry, 2016, 192: 886-892.
- [25] GIMENO O, ASTIASARÁN I, BELLO J. Calcium ascorbate as a potential partial substitute for NaCl in dry fermented sausages: Effect on colour, texture and hygienic quality at different concentrations[J]. Meat Science, 2001, 57(1): 23-29.
- (上接第 11 页)
- [31] HORIGUCHI N, HORIGUCHI H, SUZUKI Y. Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 69(12): 2 445-2 449.
- [32] KIEWIET M B G, GROS M, VAN N R J J, et al. Immunomodulating properties of protein hydrolysates for application in cow's milk allergy [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2015, 26(3): 206-217.
- [33] SCHULZ C, CAM A, SIVAGURU M I, et al. Endocytic mechanism of internalization of dietary peptide lunasin into macrophages in inflammatory condition associated with cardiovascular disease [J]. PLoS ONE, 2013, 8(9): e72115.
- [34] TANIGUCHI M, KAWABE J, TOYODA R, et al. Cationic peptides from peptic hydrolysates of rice endosperm protein exhibit antimicrobial, LPS-neutralizing, and angiogenic activities [J]. Peptides, 2017, 97: 70-78.
- [35] LI Wei, YE Sheng-wang, ZHANG Zhuang-wei, et al. Purification and characterization of a novel pentadecapeptide from protein hydrolysates of *Cyclina sinensis* and its immunomodulatory effects on RAW264.7 Cells [J]. Mar Drugs, 2019, 17(1): 10.3390/md17010030.
- [36] WEN Li, CHEN Yue-hua, ZHANG Li, et al. Rice protein hydrolysates (RPHs) inhibit the LPS stimulated inflammatory response and phagocytosis in RAW264.7 macrophages by regulating the NF- κ B signaling pathway [J]. RSC Adv, 2016, 6: 71 295-71 304.
- [37] CHALAMAIAH M, YU Wen-lin, WU Jian-ping. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review [J]. Food Chem, 2018, 245: 205-222.
- [38] MIAO Jian-yin, CHEN Fei-long, DUAN Shan, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the antimicrobial mechanism of peptide F1 against *Escherichia coli* [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(32): 7 190-7 197.
- [39] ROJAS-CARABALLO J, LOPEZ-ABAN J, MORENO-PEREZ D A, et al. Transcriptome profiling of gene expression during immunisation trial against *Fasciola hepatica*: Identification of genes and pathways involved in conferring immunoprotection in a murine model [J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 94.
- [40] LIU Y Q, STRAPPE P, SHANG W T, et al. Functional peptides derived from rice bran proteins [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019, 59(2): 349-356.