

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

Pepsin-大豆蛋白水解物中免疫調節肽之

純化及鑑定

**Purification and identification of immunomodulating peptide from
pepsin-soy protein hydrolysate**

呂明興

Ming-Shing Lu

指導教授：江文德 博士

Advisor: Wen-Dee Chiang, Ph.D.

中華民國一百零四年七月

July, 2015

碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 呂明興 君所提之論文

Pepsin-大豆蛋白水解物中免疫調節肽之
純化及鑑定

Purification and identification of immunomodulating peptide
from pepsin-soy protein hydrolysate

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

蔡正宗

珍果生技股份有限公司研發長

傅偉榮

食品工業發展研究所檢驗技術研發及服務中心

主任

蔣政志

弘光科技大學食品科技學系教授

廖程祺

東海大學食品科學系副教授

指導教授：

呂明興

中華民國一零四年七月十日

碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 呂明興 君所提之論文

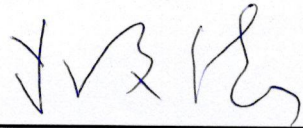
Pepsin-大豆蛋白水解物中免疫調節肽之
純化及鑑定

Purification and identification of immunomodulating
peptide from pepsin-soy protein hydrolysate

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任



指導教授



中華民國一零四年七月十日

目錄

目錄.....	I
圖目錄.....	VII
表目錄.....	XI
中文摘要.....	XII
英文摘要.....	XIII
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	3
一、大豆蛋白.....	3
(一)、大豆蛋白簡介.....	3
1.大豆粉(Soy flour ; SF).....	4
2.濃縮大豆蛋白(Soy protein concentrate ; SPC).....	4
3.分離大豆蛋白(Isolated soy protein ; ISP).....	4
(二)、大豆蛋白組成.....	5
(三)、大豆蛋白機能性.....	6
二、蛋白質水解.....	6
(一)、蛋白質水解方式.....	6

1.酸水解.....	6
2.生物性水解.....	7
3.酵素水解.....	7
(二)、蛋白質水解物之機能性	8
三、膜反應系統	9
(一)、原理	9
(二)、濾膜過濾種類	11
(三)、應用	16
四、免疫調節相關細胞與分子	18
(一)、免疫系統簡介	18
1.先天性免疫.....	18
2.後天性免疫.....	20
(二)、巨噬細胞	20
1.吞嚥作用	21
2.巨噬細胞 M1 及 M2 分型	21
(1).M1.....	23
(2).M2.....	23

(三)、中性顆粒球.....	25
(四)、脂多醣.....	26
(五)、一氧化氮.....	29
(六)、細胞激素.....	34
1.IL-6.....	34
2.IL-10.....	35
參、材料與方法.....	36
一、實驗材料.....	36
(一)、水解物製備.....	36
(二)、濾膜區分物製備.....	36
(三)、純化物製備.....	36
(四)、水解率測定.....	37
(五)、TCA 可溶性氮測定.....	37
(六)、分子量分布測定.....	37
(七)、小鼠巨噬細胞培養.....	37
(八)、細胞存活率測定.....	38
(九)、一氧化氮生成量測定.....	38

(十)、細胞吞噬活性測定	38
(十一)、細胞激素測定	39
(十二)、小鼠脾臟細胞吞噬活性測定	39
(十三)、M1/M2 巨噬細胞分型分析	39
二、實驗方法	39
(一)、實驗流程	39
(二)、水解物製備	41
(三)、水解率測定	44
(四)、TCA 可溶性態氮測定	46
(五)、濾膜區分	47
(六)、分子量分布測定	49
(七)、小鼠巨噬細胞培養	51
1.細胞凍存	51
2.細胞解凍	51
3.細胞繼代	51
(八)、細胞存活率測定	52
(九)、一氧化氮生成量測定	54

(十)、細胞吞噬活性測定	56
1.pEGFP-BL21 基因轉殖螢光大腸桿菌培養	56
2.菌量計數.....	56
3.菌株凍存.....	56
4.吞噬作用測定.....	57
(十一)、細胞激素測定	58
(十二)、小鼠脾臟淋巴細胞吞噬作用測定	59
(十三)、M1/M2 巨噬細胞分型分析.....	61
(十四)、胜肽序列鑑定	62
(十五)、統計分析	63
肆、結果與討論	64
一、酵素水解時間對細胞免疫調節活性之影響	64
(一)、水解率及產量	64
(二)、細胞免疫調節活性	64
二、濾膜區分對細胞免疫調節活性之影響	69
(一)、分子量分布及回收率	69
(二)、細胞免疫調節活性	73

三、逆向管柱層析區分物對小鼠免疫調節活性之影響	84
四、胜肽序列鑑定	98
伍、結論.....	100
陸、參考文獻.....	102



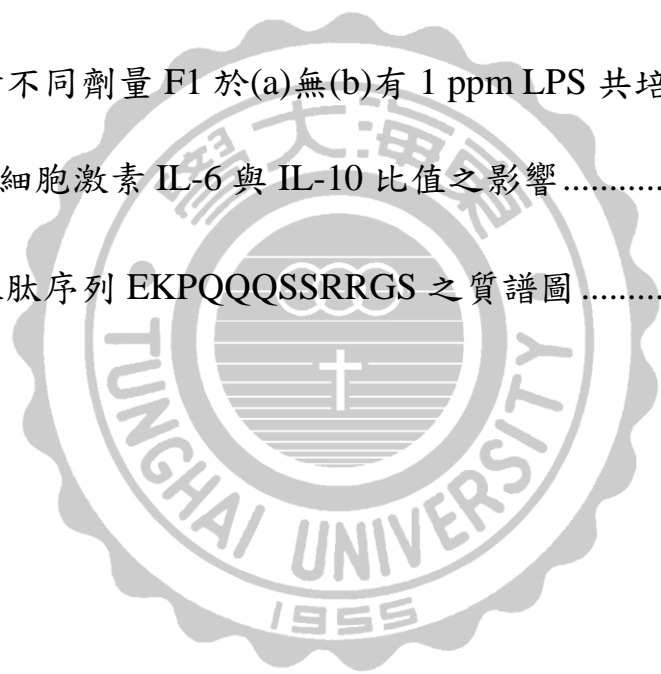
圖目錄

圖一、分離大豆蛋白經不同酵素水解 6 小時所得水解物其添加劑量對 RAW264.7 小鼠巨噬細胞相對吞噬百分率之影響.....	10
圖二、(A)垂直式過濾及(B)掃流式過濾	12
圖三、不同濾膜孔徑大小及其可過濾之化合物範圍	14
圖四、濾膜模組示意圖:(a)板框式(b)管式(c)捲式(d)中空纖維式.....	15
圖五、人體免疫反應概述圖	19
圖六、不同極化巨噬細胞群的誘導劑與選擇性功能特性	24
圖七、在中性顆粒球介導發炎反應中的胞吐作用	27
圖八、脂多醣之結構	28
圖九、巨噬細胞中 LPS 之訊息傳遞路徑	30
圖十、NO 合成酶藉由 L-arginine 合成 NO 之反應.....	32
圖十一、iNOS 基因表現的傳訊路徑	33
圖十二、第一階段實驗流程圖	40
圖十三、第二階段實驗流程圖	42
圖十四、第三階段實驗流程圖	43
圖十五、水解率測定之反應	45

圖十六、膜反應系統	48
圖十七、大豆分離蛋白胃蛋白酶水解物(P-ISPH)之濾膜區分圖	50
圖十八、細胞存活率測定反應	53
圖十九、一氧化氮測定反應	55
圖二十、探討大豆分離蛋白(ISP)經 Pepsin 水解後不同水解時間對水 解率及產率之影響	65
圖二十一、探討 4000 ppm P-ISPH 於不同水解時間對 Raw264.7 細胞 相對吞噬活性之影響	66
圖二十二、探討 4000 ppm P-ISPH 於不同水解時間對 Raw264.7 細胞 NO 生成量之影響	68
圖二十三、探討不同劑量 P-ISPH4h 對 Raw264.7 細胞存活率之影響	70
圖二十四、P-ISPH4h 經不同分子量限值濾膜區分後所得濃縮液及濾 液之分子量分佈圖	71
圖二十五、探討不同劑量 P-ISPH4h 及其濾膜區分物對 Raw 264.7 細 胞相對吞噬活性之影響	74
圖二十六、探討不同劑量 P-ISPH4h 及其濾膜區分物對 Raw 264.7 NO 生成量之影響	75

圖二十七、探討 1P 於不同劑量下對 Raw 264.7 相對吞噬活性之影響	77
圖二十八、探討不同劑量 1P 於(a)無(b)有 1ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 NO 生成量之影響	78
圖二十九、探討不同劑量 1P 對 RAW 264.7 細胞存活率之影響	80
圖三十、探討不同劑量 1P 於(a)無(b)有 1ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-6 生成量之影響	82
圖三十一、探討不同劑量 1P 於(a)無(b)有 1ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-10 產生量之影響	83
圖三十二、探討不同劑量 1P 於(a)無(b)有 1ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 細胞激素 IL-6 與 IL-10 比值之影響	85
圖三十三、1P 之高效能逆相層析圖譜	86
圖三十四、探討 5mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆向層析 區分物對小鼠體內脾臟中巨噬細胞吞噬活性之影響	88
圖三十五、探討 5mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆向層析 區分物對小鼠體內脾臟中中性顆粒球細胞吞噬活性之影響 ..	90
圖三十六、探討 5mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆相層析區 分物對小鼠體內脾臟中巨噬細胞 M1 表型極化之影響	91

圖三十七、探討 5mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆相層析區 分物對小鼠體內脾臟中巨噬細胞 M2 表型極化之影響	92
圖三十八、探討不同劑量 F1 於(a)無(b)有 1ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-6 產生量之影響	94
圖三十九、探討不同劑量 F1 於(a)無(b)有 1ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-10 產生量之影響	95
圖四十、探討不同劑量 F1 於(a)無(b)有 1 ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 細胞激素 IL-6 與 IL-10 比值之影響	97
圖四十一、胜肽序列 EKPQQSSRRGS 之質譜圖	99



表目錄

表一、濾膜技術於食品工業之應用	17
表二、巨噬細胞表面受體及其可識別之病原模式	22
表三、探討 P-ISPH4h 經不同分子量限值濾膜區分後，各區分物(30 kD MWCO Retentate、10 kD MWCO Retentate、1 kD MWCO Retentate、1 kD MWCO Permeate)之產量及回收率	72



摘要

本研究目的為分離、純化 pepsin-大豆分離蛋白水解物(P-ISPH)中免疫調節肽，並鑑定其胜肽序列與探討免疫調節機制。首先探討不同水解時間 P-ISPH 對免疫調節活性的影響，結果顯示 pepsin 水解大豆分離蛋白 4h 所得水解物(P-ISPH4h)能顯著提升細胞吞噬活性且產量最高。其次，探討不同濾膜分子量限值(molecular weight cut-off ; MWCO)區分對 P-ISPH4h 免疫調節活性之影響，將 P-ISPH4h 進行 30 kDa、10 kDa 及 1 kDa MWCO 濾膜序列區分，其中以 1 kDa 濾液(1 kDa MWCO permeate ;1P)最能顯著提升細胞吞噬活性且不引起過度發炎反應。為進一步純化並提升免疫調節活性，將 1P 以逆向高效能液相層析管柱區分，並進行小鼠體內免疫調節活性試驗，結果以管柱區分物 fraction 1(F1)對小鼠脾臟中巨噬細胞及中性顆粒球細胞皆能顯著提升其吞噬活性，但其吞噬活性的增加並非來自誘導巨噬細胞向 M1 或 M2 極化，且對於 LPS 誘導之促發炎細胞激素不具有抑制的效果，表示 F1 不具有抗發炎活性，但能透過提升巨噬細胞及中性顆粒球的吞噬活性達到免疫調節的功能。最後將 F1 以 LC-MS/MS 鑑定其中免疫調節胜肽序列，從可信度最高的五個胜肽片段中挑選一段帶正電荷胺基酸最多之胜肽片段進行合成，後續將以此合成肽進行小鼠體內試驗並比對 F1 之免疫調節活性，以了解免疫調節肽之作用機制。

Abstract

The purpose of this study was to isolate and purify immunomodulating peptides from pepsin-isolated soy protein hydrolysates (P-ISPH) and identified peptide sequence to investigate its mechanisms of immunomodulation. At first, the effect of hydrolysis time on immunomodulating activity of hydrolysate was investigated. The result showed hydrolysis of isolated soy protein with pepsin for 4 h to obtain hydrolysate (P-ISPH4h) which had the highest phagocytosis activity and the highest yield. Furthermore, the effect of fractionation of P-ISPH4h with different molecular weight cut-off (MWCO) membranes on immunomodulating activity was studied. The P-ISPH4h was sequentially fractionated by 30 kDa, 10 kDa and 1 kDa molecular weight cut-off (MWCO) membrane, in which 1 kDa MWCO permeate (1P) showed the most significant increase of phagocytosis activity as compared with P-ISPH4h without causing excessive inflammation. To further purified and enhanced the immunomodulating activity, 1P was distinct by high performance liquid chromatography equipped with reverse-phase column and in vivo immunomodulating activity of column fractions was test in mice. The result showed column fraction 1 (F1) could significantly enhance phagocytosis activity of mice spleen macrophages and neutrophils. But increase of phagocytosis activity did not result from inducing macrophages M1 or M2 polarization, and did not have a suppression effect of pro-inflammatory cytokines induced from LPS. The result indicated that F1 did not have anti-inflammatory activity, but it had immunomodulating function through stimulating phagocytosis activity of macrophages and neutrophils. Finally, the immunomodulating peptide sequence from F1 was identified by LC-MS/MS. Peptide fragment which have most positively charged amino acids was selected and synthesized from five of the most credible peptide fragments. The synthetic peptides will test in vivo immunomodulating activity in mice and compare with F1 to understand the mechanisms of the immunomodulating peptides.

壹、前言

人體的免疫力會受到年齡、飲食、作息、運動、壓力等因素影響 (Hamer *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2015)，現代人生活忙碌、緊張，容易導致體內免疫調節失衡，因此除了維持正常的生活作息以外可藉由補充免疫調節劑來改善免疫失衡的狀態。

近年來許多文獻指出蛋白質水解物中具免疫調節肽能有助於人體健康，如鱈魚骨架蛋白水解物(Hou *et al.*, 2012)、魚卵蛋白水解物(Chalamaiah *et al.*, 2014)、大豆蛋白(歐, 2014)等，其中大豆蛋白具有營養價值高、產量高、價格便宜及應用性廣泛等特性(Rickert *et al.*, 2004)，另外研究也指出大豆蛋白水解物具有抗氧化(Ranamukhaarachchi *et al.*, 2013)、促脂肪分解(Tsou *et al.*, 2012)、抑制血管收縮素轉換酶(Rho *et al.*, 2009)等活性，故以大豆蛋白作為水解物蛋白質來源產生免疫調節肽具有極大的潛力。

巨噬細胞及中性顆粒球為先天性免疫中重要的吞噬性防衛成員，能非特異性的吞噬外來病原並引起發炎反應釋出 NO 與促發炎細胞激素，如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等，適當的發炎反應可以幫助人體抵抗病原的入侵，但過度發炎則會導致組織損傷(Van Ginderachter *et al.*, 2006)。其中巨噬細胞可極化為 M1 及 M2 兩種分型，M1 會產生大量的促發炎細胞激素及活性氧物質具有促發炎的特性，M2 則主要產生

抗發炎細胞激素 IL-10 並幫助組織修復。健康食品免疫調節評估功能性評估方法中提到評估非特異性免疫力主要包括如中性顆粒球及單核球的吞噬能力或是自然殺手細胞的活性。因此本研究將針對小鼠巨噬細胞及中性顆粒球之吞噬活性進行評估以及測定 NO、IL-6 及 IL-10 之生成量，並分析巨噬細胞之 M1、M2 分型以了解樣品之免疫調節機制。

目前評估大豆蛋白酵素水解物免疫調節能力之文獻不多，Kong 等人以 Alcalase 水解大豆蛋白，結果顯示水解物具有促進小鼠巨噬細胞吞噬活性及淋巴細胞增生的活性(Kong *et al.*, 2008)。但該文獻並未將水解物進行超過濾區分也未鑑定機能性肽之序列。另外在本研究室先前的研究中指出 pepsin-大豆蛋白水解物具有刺激小鼠巨噬細胞 RAW264.7 之免疫調節活性(歐，2014)。因此，本研究將利用超濾膜反應系統以及逆相高效能液相層析進一步分離、純化 pepsin-大豆蛋白水解物中免疫調節肽，並分析其免疫調節功效，以評估 pepsin-大豆蛋白水解物是否具有作為免疫調節劑之潛力。

貳、文獻回顧

一、大豆蛋白

(一)、大豆蛋白簡介

大豆(Soy bean)學名為 *Glycine max*，為豆科(Leguminosae)，大豆屬(*Glycine*)，一年生草本植物。大豆為全球重要的經濟作物，目前主要生產國家為美國、阿根廷、巴西、印度及中國。大豆具有營養價值高、產量高、價格便宜及應用性廣泛等特性(Rickert *et al.*, 2004)。大豆的主要有 35-40%蛋白質、35%碳水化合物、20%脂質及 5%灰分，除此之外大豆也含有豐富的卵磷脂(Lecithin)及大豆異黃酮(Isoflavones)，研究顯示富含大豆飲食能有助於改善更年期婦女之不適並預防因骨質流失發生骨折和骨質疏鬆症的機率(蘇，2003；黃，2009)。而大豆成份中以大豆蛋白應用性最廣，具有完整之胺基酸組成且研究指出大豆蛋白之消化利用率可高達 92%以上(Bodwell *et al.*, 1980)。另外，美國食品藥物管理局(Food and Drug Administration；FDA)和世界衛生組織(World Health Organization；WHO)採用 protein digestibility corrected amino acid source (PDCAAS)法，先校正蛋白質消化利用率再評定蛋白質品質，發現大豆蛋白與動物蛋白皆屬於高生物價蛋白質。因此大豆蛋白對於素食者而言是良好的植物性蛋白來源(Sorgentini *et al.*, 1995)。

市上主要的大豆蛋白依其分離的程度不同可分為(Johnson *et al.*, 2008; Lusas & Riaz, 1995; Singh *et al.*, 2008):

1.大豆粉(Soy flour ; SF)

大豆經去殼後整粒粉碎、乾燥而得，由於其中的碳水化合物及脂質皆未被去除，故所含蛋白質之百分比不高，因此應用性較低。而大豆粉若再經過有機溶劑(如正己烷、乙醚等)萃取其中脂質，並乾燥去除有機溶劑後則可得到脫脂大豆粉(Defatted soy flour ; DSF)，此階段的產物中大豆蛋白質含量約為 50% 以上。

2.濃縮大豆蛋白(Soy protein concentrate ; SPC)

大豆濃縮蛋白則是將脫脂大豆粉進一步去除粗纖維、碳水化合物及灰分後，經由乾燥、磨粉而得。因此其中蛋白質含量百分比提高，約為 65% 以上。

3.分離大豆蛋白(Isolated soy protein ; ISP)

將大豆濃縮蛋白進一步以鹼性條件下萃取，去除沉澱物後將上清液以酸性條件(蛋白質等電點)下沉澱，將沉澱物加水混合調整至中性 pH 值，接著離心取出乾燥、磨粉而得，此時大豆蛋白經過精製後蛋白質含量約為 90% 以上。

經過精製後的大豆分離蛋白具有許多優點，如豆臭味低、提高人體消化率、高穩定性及易於儲存等特徵，因此能廣泛做為食品加工時

使用的原料。大豆蛋白能夠提供成膠、保水、起泡、乳化、黏著、增加彈性等功能，可應用於麵包、乾酪、香腸、火腿、奶油、素食肉塊等食品中改善品質(Endres, 2001)，具有很廣泛的加工應用。

(二)、大豆蛋白組成

大豆蛋白溶於水後離心，可以其沉降系數(sedimentation coefficient)分為 2S、7S、11S、15S 蛋白，大豆蛋白中以 Glycinin (11S)及 β -Conglycinin (7S)為最主要蛋白質成分，分別約佔大豆蛋白的 31%和 37%，是最影響大豆蛋白加工功能性的成份(N. Nielsen, 1985)。

Glycinin 分子量約為 300-380 kDa，為六聚體(hexameric)結構，每個次單位由一個酸性多胜肽(acid polypeptide)和一鹼性多胜肽(basic polypeptide)彼此以雙硫鍵組成六角形體(Hou & Chang, 2004; N. C. Nielsen, 1985)，兩個六角體之間則是以靜電吸引力和氫鍵組成立體結構。酸性多胜肽與鹼性多胜肽分子量分別為 38kDa 與 20kDa，其中酸性次單位比鹼性次單位含有較多的麩胺酸(Glutamic acid)、脯胺酸(Proline)及半胱胺酸(Cysteine)，而鹼性次單位則是比酸性次單位含有較多的疏水性胺基酸。

β -conglycinin 分子量約為 150-200kDa，為三具體結構(trimeric)，屬於醣蛋白(glycoprotein)，由 α 、 α' 及 β 這三種次單位彼此以共價鍵

鍵結組成(Maruyama *et al.*, 1999)，其分子量分別為 67 kDa、71 kDa 與 50 kDa (Zheng *et al.*, 2009)，在胺基酸組成方面，含硫胺基酸的含量很低。

(三)、大豆蛋白機能性

大豆蛋白除提供蛋白質營養來源以外，還具有許多特殊的機能性，可降低血液中總膽固醇(關，2009)、改善氧化壓力與肝臟發炎(邱，2008)、調節血壓(Yang *et al.*, 2004)，美國 FDA 也曾發表健康宣稱提出「每日攝取 25 克大豆蛋白，配合低飽和脂肪與低膽固醇飲食，可降低罹患心血管疾病機率」。可見大豆蛋白已被視為對健康有益的食物使用而極具研究價值。

二、蛋白質水解

蛋白質水解是將大分子蛋白質、胜肽中之胜肽鍵結打斷，使其產生較小分子胜肽及胺基酸。

(一)、蛋白質水解方式

依其水解方式的不同主要可分為酸水解、生物性水解及酵素水解。

1.酸水解

酸水解即是利用強酸將蛋白質之胜肽鍵結打斷以達到水解之目的，此發法通常會伴隨加熱以提高水解的反應速率，在水解後再將

pH 值調整至所需條件。酸水解具有高水解效率、低成本的特性，但由於強酸的作用可能會將蛋白質過度水解，而難以控制水解的程度無法生產具特定機能性的胜肽片段，甚至可能會使破壞胺基酸構型產生之 D-amino acid、lysinoalanine 等人體無法吸收之物質(蔡, 1987)。

另外在中和酸鹼的過程中也會使水解物產生大量的鹽類。

2. 生物性水解

原理是利用微生物發酵時產生的酵素將蛋白質水解(Lee *et al.*, 1996; Pihlanto & Korhonen, 2015)，此方法不會造成胺基酸過度水解破壞，但在水解反應過程可能會產生其他非蛋白質水解之產物，如有機酸、醇類、醛類及酯類等，且生物發酵的反應時間通常較長，產率相對於酸水解法低，因此此方法多使用於醬油、豆腐乳、乳酪等的生產製造(Nakahara *et al.*, 2012)。

3. 酵素水解

酵素水解是直接利用已知酵素與蛋白質在控制 pH 值、溫度與反應時間的情況下進行水解，經純化後之酵素與蛋白質的反應速率很快，對蛋白質也具有特定專一性，因此能夠於控制的條件下生產生物活性胜肽(Bioactive peptide)(Hartmann & Meisel, 2007)。缺點是水解過程中可能會使蛋白質中疏水性胺基酸基團暴露出來(Saha & Hayashi, 2001)，而產生苦味胜肽，但可藉由控制水解過程中的條件，如：酵素

種類、pH 值及水解時間等，達到降低苦味的效果(Lee *et al.*, 1996)。

(二)、蛋白質水解物之機能性

蛋白質酵素水解物於早期研究主要針對其膳食營養功能性，研究表示人體腸胃道對蛋白質水解後產生短鏈胜肽(二、三肽)的吸收能力較胺基酸好(Siemensma *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1990)能幫助消化提高蛋白質消化吸收率(Adler-Nissen, 1986)、改善嬰兒蛋白質過敏(Cordle *et al.*, 1991)，但除了膳食營養功能之外近年來愈來愈多研究指出以食物為蛋白質來源之蛋白質經水解後其水解物中具有生物活性肽能提供特定機能性，如抗氧化(Vavrusova *et al.*, 2015)、促進礦物質吸收(Chen *et al.*, 2013)、免疫調節(Hou *et al.*, 2012)、抗高血壓及抑制血管收縮素(Connolly *et al.*, 2015)等功能。其中以大豆蛋白為蛋白質來源之酵素水解物亦有許多生理活性，如抗高血壓(蔡，2004; Rho *et al.*, 2009)、抗氧化(Ranamukhaarachchi *et al.*, 2013)、免疫調節(歐，2014)、促進脂肪分解(Tsou *et al.*, 2012)等，因此可知大豆蛋白水解物中具有多種生物活性肽，極有研究之價值。

本研究將針對水解物中免疫調節活性肽進行探討，免疫調節肽可增強免疫細胞的功能，幫助淋巴細胞增殖、提升自然殺手細胞活性、增加抗體合成與調節細胞激素等(Fitzgerald & Murray, 2006; Horiguchi *et al.*, 2005)。目前已有許多研究指出來自食物中的蛋白質經

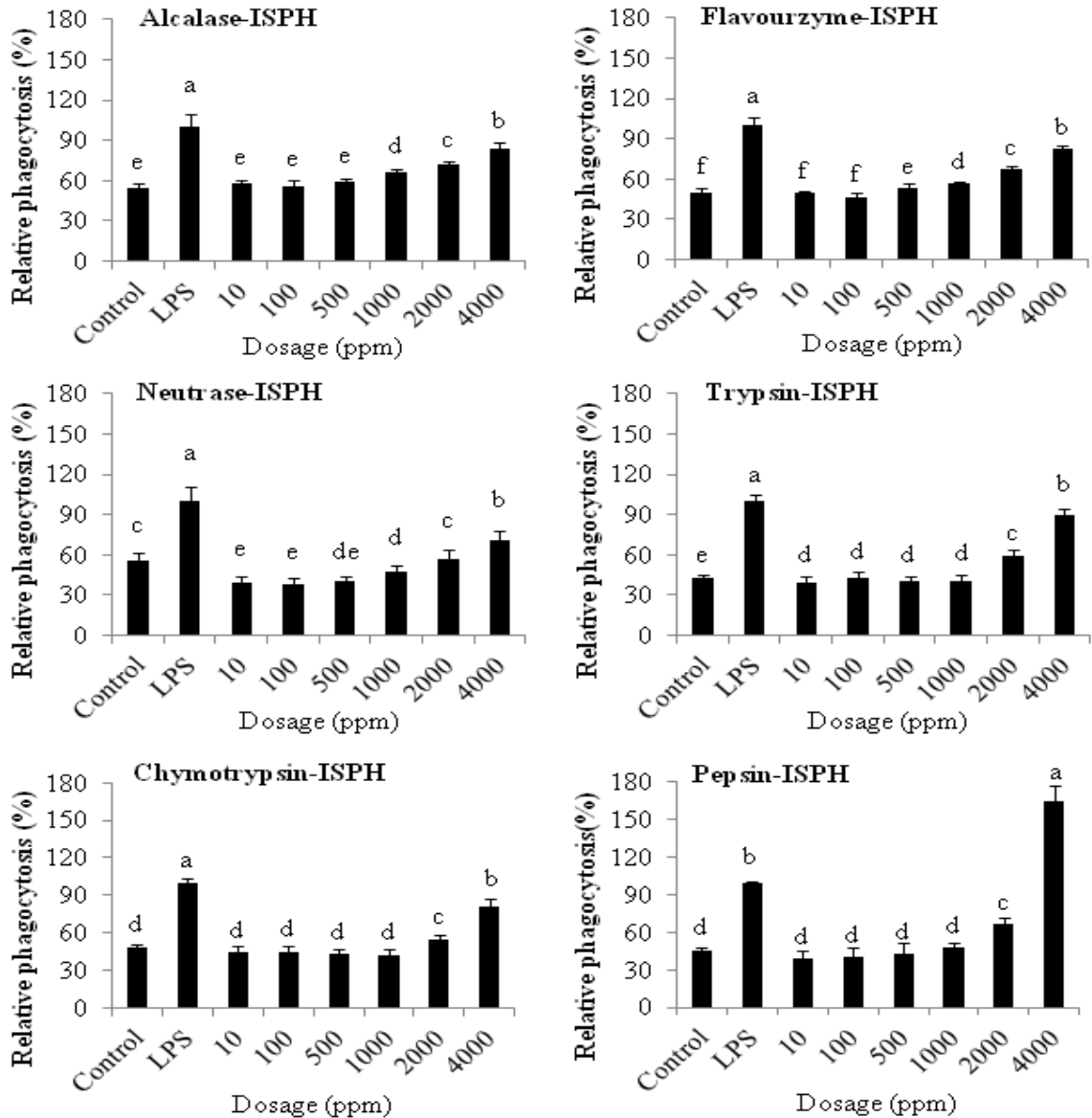
水解後可產生具免疫調節活性肽之水解物，如米白蛋白(rice albumin) (Takahashi *et al.*, 1994)、卵白蛋白(Ovalbumin) (Fitzgerald & Murray, 2006)、牛乳蛋白(Meisel, 2005)、小麥蛋白(Horiguchi *et al.*, 2005)及大豆蛋白(Kong *et al.*, 2008)等。本研究室先前有研究利用多種商業酵素水解大豆分離蛋白(isolated soy protein ; ISP) 篩選具最佳免疫調節能力之酵素水解物，結果指出 ISP 經 pepsin 水解後所得之水解物具有最佳提升小鼠巨噬細胞 RAW264.7 相對吞噬活性(relative phagocytosis) 之免疫調節能力(圖一)(歐，2014)，故本研究將以 pepsin 水解 ISP 並進一步分離、純化，以鑑定調節免疫肽，並探討水解物中胜肽之免疫調節機制。

三、膜反應系統

水解物中因酵素剪切位置及蛋白質胺基酸組成的不同而具有各種不同分子量之長、短鏈胜肽及游離胺基酸，研究指出不同分子量之胜肽片段對生理活性具有不同的影響(Cheryan, 2000b; Siemensma *et al.*, 1993)。為區分水解物中胜肽之分子量，並濃縮、純化其機能性物質以達到提升機能性之功效，可使用膜反應系統(Membrane reactor system)簡單、快速且有效的進行過濾、濃縮及區分。

(一)、原理

膜過濾原理是利用具不同分子量限值(Molecular weight cut-off ;



(歐, 2014)

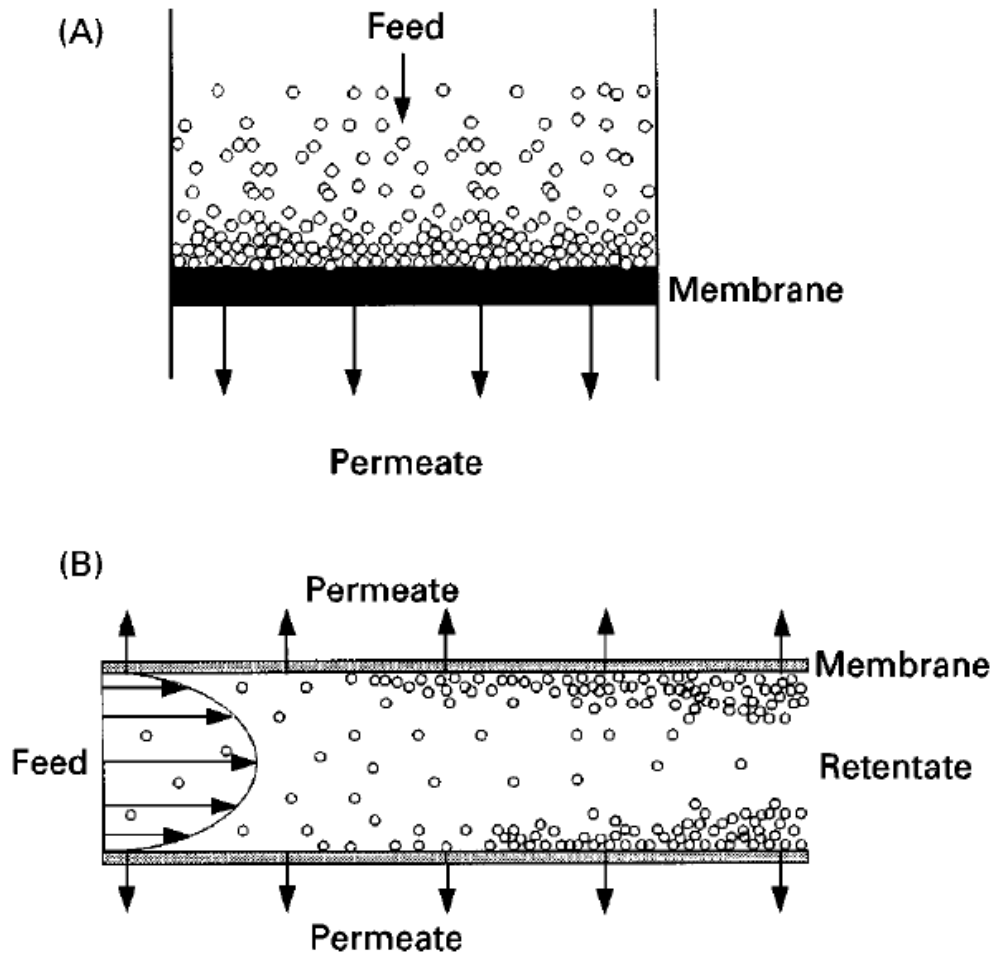
圖一、分離大豆蛋白經不同酵素水解 6 小時所得水解物其添加劑量對 RAW264.7 小鼠巨噬細胞相對吞噬百分率之影響

Fig. 1. Effect of dosage of hydrolysates obtained from hydrolyzing ISP with different enzymes for 6 hours on relative phagocytosis (%) in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean±SD, n=3. Mean with different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test

MWCO)孔徑之過濾膜進行過濾，該濾膜被裝置在一殼管中並與泵連接形成膜反應系統，藉由泵提供動力使流體物質通過濾膜，此時藉由調節系統中之流速、流量可使濾膜系統中產生壓力驅動溶劑帶著小於濾膜 MWCO 的物質通透濾膜形成濾液(Permeate)，而大於濾膜 MWCO 的物質則藉泵的動力繼續在系統中循環通過濾膜以過濾未被完全濾出之小分子，最後無法通過濾膜之物質即為保留液(Retentate)(Cheryan, 2000b)。當循環液濃度增加使過濾效率降低時可於反應槽中加入透析液進行濾析(Diafiltration)，此方式可讓循環液中小分子藉由濾析液的帶動加快通透濾膜的能力，形成邊透析(Dialysis)邊過濾(Filtration)的方式，達到降低小分子殘留在保留液的目的。通常濾析液多為樣液之溶劑(如 RO 水或緩衝液)。

(二)、濾膜過濾種類

濾膜過濾依其流動方式的不同可分為垂直式過濾(Dead-end filtration)及掃流式過濾(Cross-flow filtration)(圖二)(Huisman, 2000)，垂直式過濾意指液體流動方向與濾膜方向垂直，因此大於濾膜 MWCO 之物質容易阻塞在濾膜表面，使濾膜的過濾能力隨過濾時間增加而降低。掃流式濾膜則是液體的流動方向與濾膜平行，小分子物質藉由流體之剪切力進入濾膜孔隙，大分子物質隨流動方相在膜表面平行移動，較不易阻塞在濾膜表面，因此垂直式過濾適用於短時間、低流量之樣



(Huisman, 2000)

圖二、(A)垂直式過濾及(B)掃流式過濾

Fig. 2. (A)Dead-end filtration and (B)Cross-flow filtration

液，掃流式過濾則用於較大量且需長時間維持過濾效率之樣液(Sagle & Freeman, 2004)。

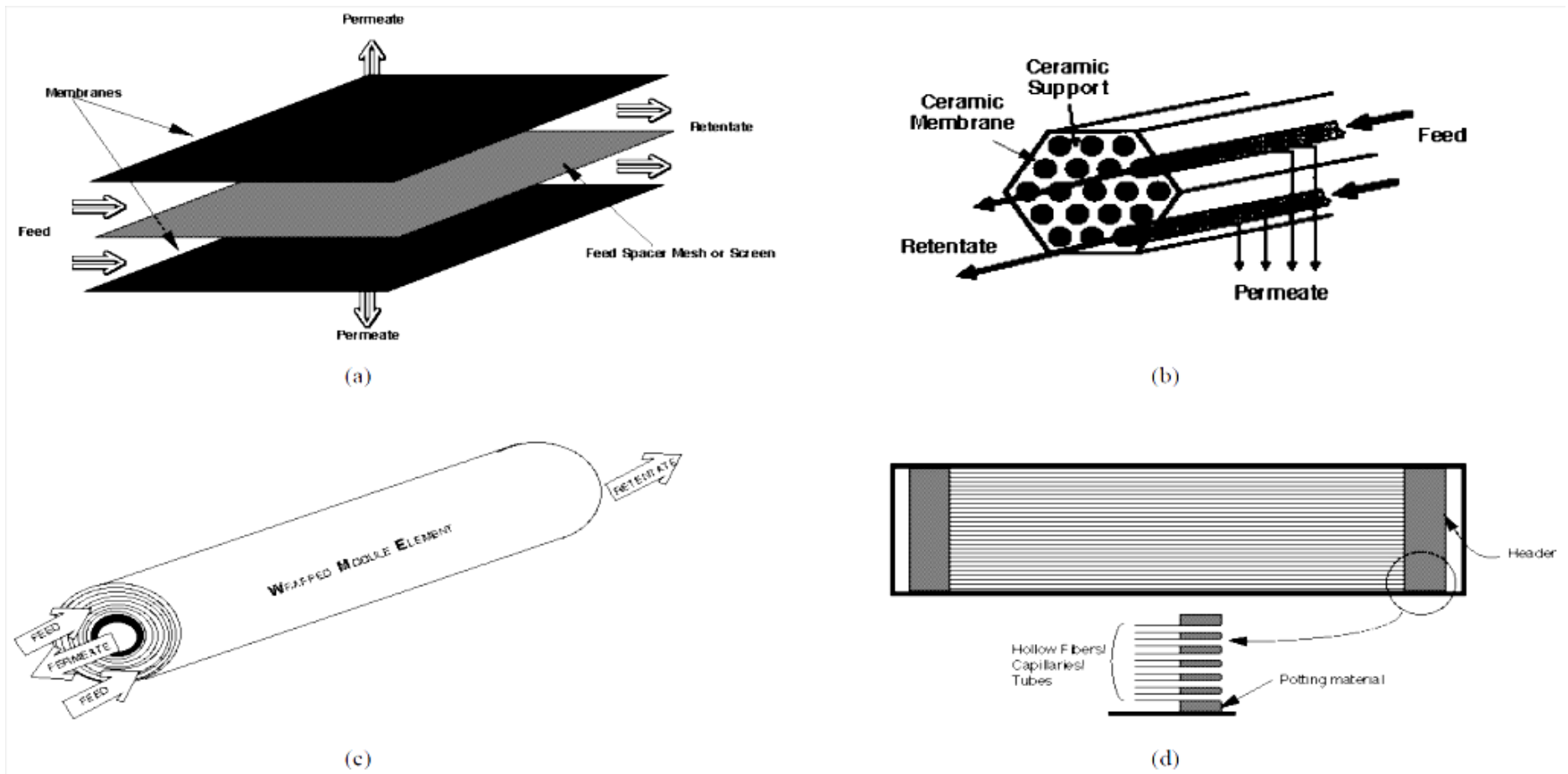
目前使用的濾膜依孔徑大小不同大致可分為微過濾(Microfiltration ; MF)、超過濾(Ultrafiltration ; UF)、奈米過濾(Nanofiltration ; NF)及逆滲透(Reverse osmosis ; RO)，各濾膜孔徑及可過濾之化合物如圖三所示。MF 的濾膜孔徑約為 100-1000 nm，主要可過濾微生物、澱粉及膠體等，操作壓力約為 1-4 bar。UF 濾膜孔徑約為 1-50 nm，可過濾 1,000-500,000 Dalton 的醣類及蛋白質，操作壓力約為 2-6 bar。NF 濾膜孔徑為 1 nm 以下，只有一價鹽類能夠通過濾膜，二價鹽類及雙醣物質皆會被濾膜阻隔，操作壓力約為 15-25 bar。RO 濾膜孔徑小於 0.5 nm，除了溶劑以外幾乎所有溶質皆會被濾膜阻隔，因次過濾效果最佳，但操作所需壓力最高，約為 30-60 bar(Cheryan, 2000b)。濾膜模組主要可分為四種型式包括板框式(Plate-and-frame)、管式(Tubular)、捲式(Spiral Wound)、中空纖維式(Hollow fiber)(圖四)。板框式為其中最簡單的配置型式，包含兩片端板、隔板及濾膜。管式其濾膜則通常在管的內徑，原料液由泵驅動進入管內，濾液則從管膜外側流出。捲式膜為一平面膜層層纏繞捲於濾液收集管外層，原料液通過外層膜過濾後濾液會進入內層膜，而無法通過內層膜的保留液則會留在外層膜，由於操作簡單。中空纖維式為

Size (nm)	Example	Process
0.1	Sodium chloride	Reverse osmosis
	Sucrose	
1	Vitamin B ₁₂	Nanofiltration
10	Pepsin Ovalbumin	Ultrafiltration
100	Immunoglobulin M	
1000	Latex emulsions	Microfiltration
	Bacteria	
	Blood cells	
10000	Starch	

(Cheryan, 2000b)

圖三、不同濾膜孔徑大小及其可過濾之化合物範圍

Fig. 3. Example of compounds of various sizes separated by different membrane



(Sagle & Freeman, 2004)

圖四、濾膜模組示意圖:(a)板框式(b)管式(c)捲式(d)中空纖維式

Fig. 4. Schematic of (a) plate and frame (b) tubular (c) spiral wound and (d) hollow fiber modules

一耐壓力容器內包含數捆的空心纖維濾膜，原料液由空心纖維濾膜外側通過，濾液則由纖維濾膜內側流出，並於纖維膜末端收集(Sagle & Freeman, 2004)。

(三)、應用

濾膜過濾技術除了在廢水處理(Holder *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2007)及海水淡化預處理(Cheng *et al.*, 2013; Tsou *et al.*, 2012)等用途以外在食品加工中的使用相當廣泛(表一)，RO 主要用於液體食品的濃縮，以取代蒸發的熱加工。NF 用於部分脫酸及脫鹽，UF 用於液體食品分餾、濃縮及純化，MF 則用於澄清去除懸浮物以取代離心機(Luo *et al.*, 2013)。其中 UF 於食品加工的使用相當多，可用於果汁澄清(Beutler, 2004)、蔗糖溶液脫色(Peng *et al.*, 2014)、醬油除菌與澄清(Sousa & Määttä, 2015)、牛乳乳蛋白分離(林, 2013) 等。近年來研究指出，蛋白質酵素水解物經超濾膜區分後可提升其機能性，如：菜籽蛋白酵素水解物經濾膜區分後增加抗氧化活性(Luo *et al.*, 2013)、酪蛋白及經濾膜區分後增加血管收縮素轉換酶抑制活性(Holder *et al.*, 2013)、黑豆蛋白水解物經濾膜區分增加抑制脂肪生成活性(Kim *et al.*, 2007)、大豆蛋白水解物經膜區分提升脂解活性(Tsou *et al.*, 2012)、犛牛 κ -酪蛋白水解物經濾膜區分提升抗菌活性(Cheng *et al.*, 2013)等。

因此為更明確得到水解物中具生理活性之胜肽片段，本實驗利用

表一、濾膜技術於食品工業之應用

Table 1. Food industry applications of membrane technology

Dairy

RO: Preconcentration of milk and whey prior to evaporation; bulk transport; specialty fluid milk products

NF: Partial demineralization and concentration of whey

UF: Fractionation of milk for cheese manufacture; fractionation of whey for whey protein concentrates; specialty fluid milk products

MF: Clarification of cheese whey; defatting and reducing microbial load of milk

ED: Demineralization of milk and whey

Fruits and vegetables

Juices: apple (UF,RO), apricot, citrus (MF, UF, RO, ED), cranberry, grape (UF, RO), kiwi, peach (UF, RO), pear, pineapple (MF, UF, RO), tomato (RO)

Pigments: anthocyanins, betanins (UF, RO)

Wastewater: apple, pineapple, potato (UF, RO)

Animal products

Gelatin: concentration and de-ashing (UF)

Eggs: concentration and reduction of glucose (UF, RO)

Animal by-products: blood, wastewater treatment (UF)

Beverages

MF, UF: Wine, beer, vinegar – clarification

RO: Low-alcohol beer

Sugar refining

Beet and cane extracts, maple syrup, candy wastewaters – clarification (MF, UF), desalting (ED), preconcentration (RO)

Oilseeds, cereals, legumes

Soybean processing: Protein concentrates and isolates (UF); protein hydrolysates (CMR); oil degumming and refining (UF, NF); recovery of soy whey proteins (UF, RO); wastewater treatment (MF, UF, NF, RO)

Corn refining: Steepwater clarification and concentration (MF, UF, RO); light-middlings treatment: water recycle (RO); saccharification of liquefied starch (CMR); purification of dextrose streams (MF, UF); fermentation of glucose to ethanol (CMR); downstream processing of fermentation broths (MF, UF, NF, RO, ED, PV); wastewater treatment (MF, UF, NF, RO)

RO, reverse osmosis; NF, nanofiltration; UF, ultrafiltration; MF, microfiltration; ED, electrodialysis; CMR, continuous membrane reactor; PV, pervaporation.

(Cheryan, 2000a)

超濾膜反應系統配合不同 MWCO 之捲式膜及以掃流式過濾法快速區分大豆蛋白水解物中的胜肽片段，期望篩選出能進一步提升免疫調節能力之濾膜區分物以利後續分離、純化及機制探討。

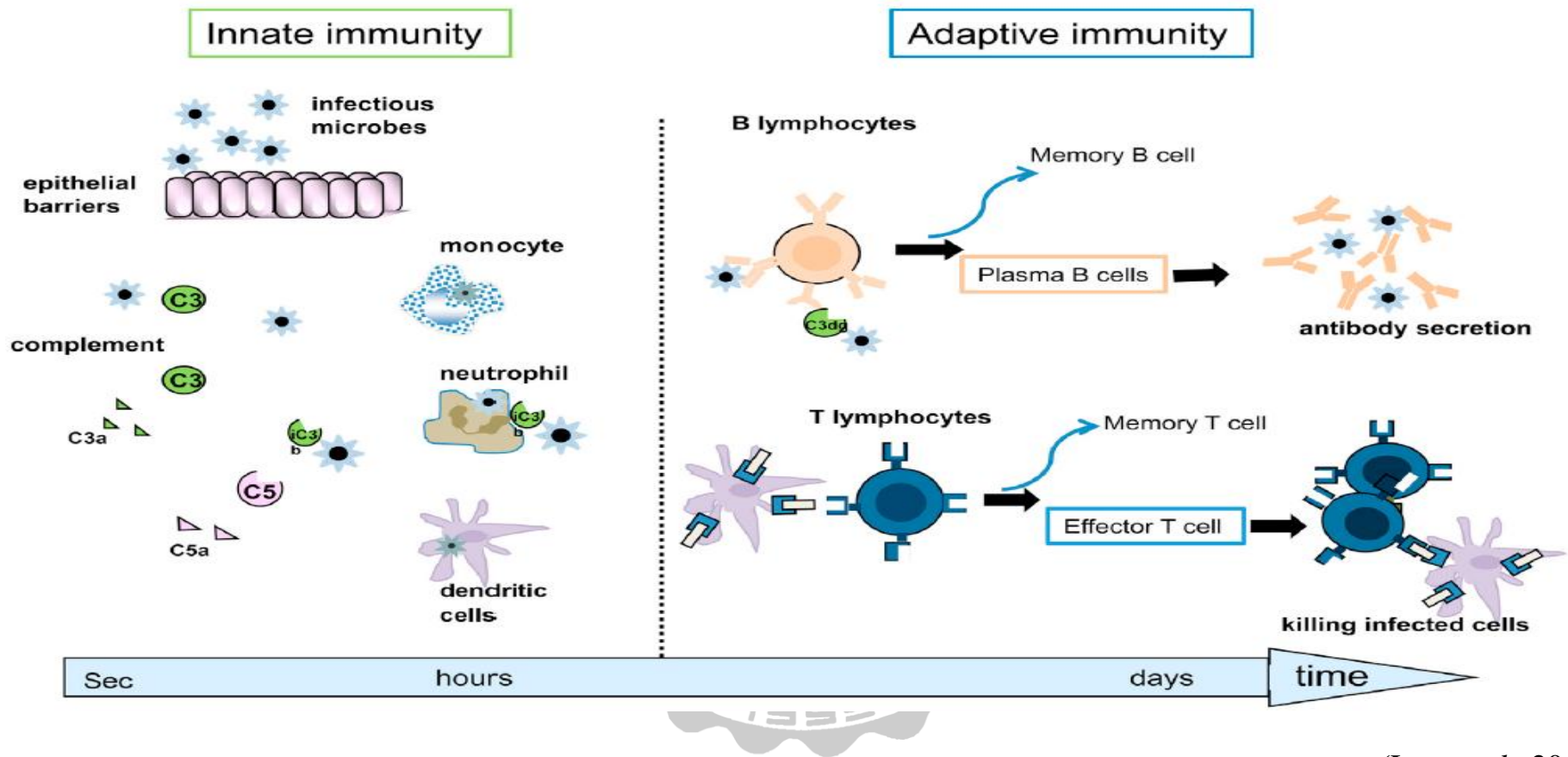
四、免疫調節相關細胞與分子

(一)、免疫系統簡介

免疫的系統的功能主要在於避免感染疾病，人體的免疫系統可分為先天性免疫(Innate immunity)及後天性免疫(Adaptive immunity)(圖五):

1.先天性免疫

先天性免疫又稱非專一性免疫，即對於特定抗原不具有專一性，主要有四種防衛機制:屏障性、生理性、吞噬性及發炎性防衛。屏障性防衛為表皮、真皮及黏膜等組成的物理屏障，具有直接阻隔外來病原的作用。生理性防衛包含體溫、體液酸鹼值、酵素及補體(Complement)，能提供多種生理阻礙防止病原感染。吞噬性防衛由一群特殊的細胞運作，如單核球、噬中性顆粒球及組織巨噬細胞，能將侵入至體內之病原進行非專一性吞噬作用(phagocytosis)以破壞感染病原。發炎性防衛包含一系列反應，由受到感染的組織細胞釋出組織胺、細胞激素等調控因子，促使血管擴張、通透性增加，以利免疫細胞活化、趨向受感染之組織進行防衛。雖然先天性免疫對於病原並不



(Luo *et al.*, 2013)

圖五、人體免疫反應概述圖

Fig. 5. Overview of human immune responses

具有專一性的抵抗能力，但作用迅速通常在感染數小時內就會發生免疫反應，並連結後天性免疫共同防禦入侵病原(Beutler, 2004; Luo *et al.*, 2013)。

2.後天性免疫

後天性免疫又稱專一性免疫，其能夠辨識並且選擇性地消滅外來病原，一旦分辨抗原並且對其產生反應後，後天性免疫能夠展現免疫記憶能力，當再度遇到同樣的抗原時能夠快速且引發更強的免疫反應。免疫反應主要由 T 細胞及 B 細胞這兩群淋巴細胞進行，T 細胞由骨髓產生後遷移至胸腺成熟，並表現出 T 細胞接受器(T-cell receptor; TCR)，當 TCR 接觸與主要組織相容性複合體(Major histocompatibility complex; MHC)結合之抗原便會產生細胞型免疫(Cell-mediated immune)作用，T 細胞依功能可分為 T 輔助細胞(T helper cell)及 T 毒殺細胞(T cytotoxic cell)。B 細胞在骨髓中成熟，其細胞膜上具有結合之抗體分子，當與抗原結合時 B 細胞能分化為記憶 B 細胞(Memory B cell)和漿細胞(Plasma cell)，漿細胞能分泌大量抗體形成體液免疫(Humoral immune)(Peng *et al.*, 2014)。

(二)、巨噬細胞

巨噬細胞(Macrophage)由來自骨髓的單核球(Monocyte)分化而來，在不同的組織中巨噬細胞會具有不同的功能與名稱，如肝臟中的 Kupfer

cells、肺中的 alveolar macrophages、腦及膽中的 microglia 及骨頭中的 osteoclast 等都是巨噬細胞的一種(Sousa & Määttä, 2015)。

1. 吞噬作用

巨噬細胞在先天性免疫中扮演著重要的角色，能夠藉由吞噬作用 (phagocytosis) 攝入外來抗原如整個微生物和不溶性顆粒及受損或死亡的宿主細胞碎片並且形成吞噬小體 (phagosome)，接著吞噬小體與胞內溶酶體 (lysosome) 結合藉由溶酶體中的溶解酶分解吞噬物質。巨噬細胞能夠進一步將吞入之抗原與 MHC 分子結合並於膜上表現而成為抗原呈現細胞 (Antigen-presenting cell; APC)，APC 能夠將抗原呈現給 T 細胞及 B 細胞以啟動後天性免疫反應 (Peng *et al.*, 2014)。

巨噬細胞為辨識外來抗原，其細胞膜上具有多種表面受體，如甘露糖受體 (mannose receptor)、葡聚糖受體 (glucan receptor)、清道夫受體 (scaveager receptor) 及 Toll-like 受體 (Toll-like receptor; TLR) 等 (表二)，當外來抗原結合巨噬細胞表面受體而活化吞噬作用時，巨噬細胞之胞內肌動蛋白 (actin) 與細胞骨架將會重塑 (remodeling) 導致膜偽足的延伸並環繞抗原進行吞噬作用 (Schumann, 2015)。

2. 巨噬細胞 M1 及 M2 分型

巨噬細胞是高度異質性的細胞，這種可變性有助於細胞適應環境

表二、巨噬細胞表面受體及其可識別之病原模式

Table 2. Macrophage surface receptors and recognized pathogen-associated patterns

Receptor type	Recognized pathogen-associated patterns
<i>C-type lectin receptors (CLR)</i>	<i>Cell wall carbohydrates of bacteria, yeast, fungi</i>
Mannose receptor	Mannose, N-acetylglucosamine, fucose
Glucan receptor	β -glucans
<i>Scavenger receptors (SR)</i>	<i>Modified lipoproteins, negatively charged molecules</i>
SR-A I	Lipopolysaccharide (LPS) lipoteichoic acid (LTA)
SR-A II	Lipopolysaccharide (LPS) lipoteichoic acid (LTA)
<i>Toll-like receptors (TLR)</i>	<i>Characteristic components of microorganisms</i>
TLR-2	Lipopeptides/lipoproteins, glycolipids, zymosan
<i>(heterodimer with either TLR-1 or TLR-6)</i>	Lipoteichoic acid (LTA)
TLR-4	Lipopolysaccharide (LPS)
<i>(homodimer in association with MD-2 and CD14)</i>	
TLR-5	Flagellin
<i>(monomer)</i>	



(Schumann, 2015)

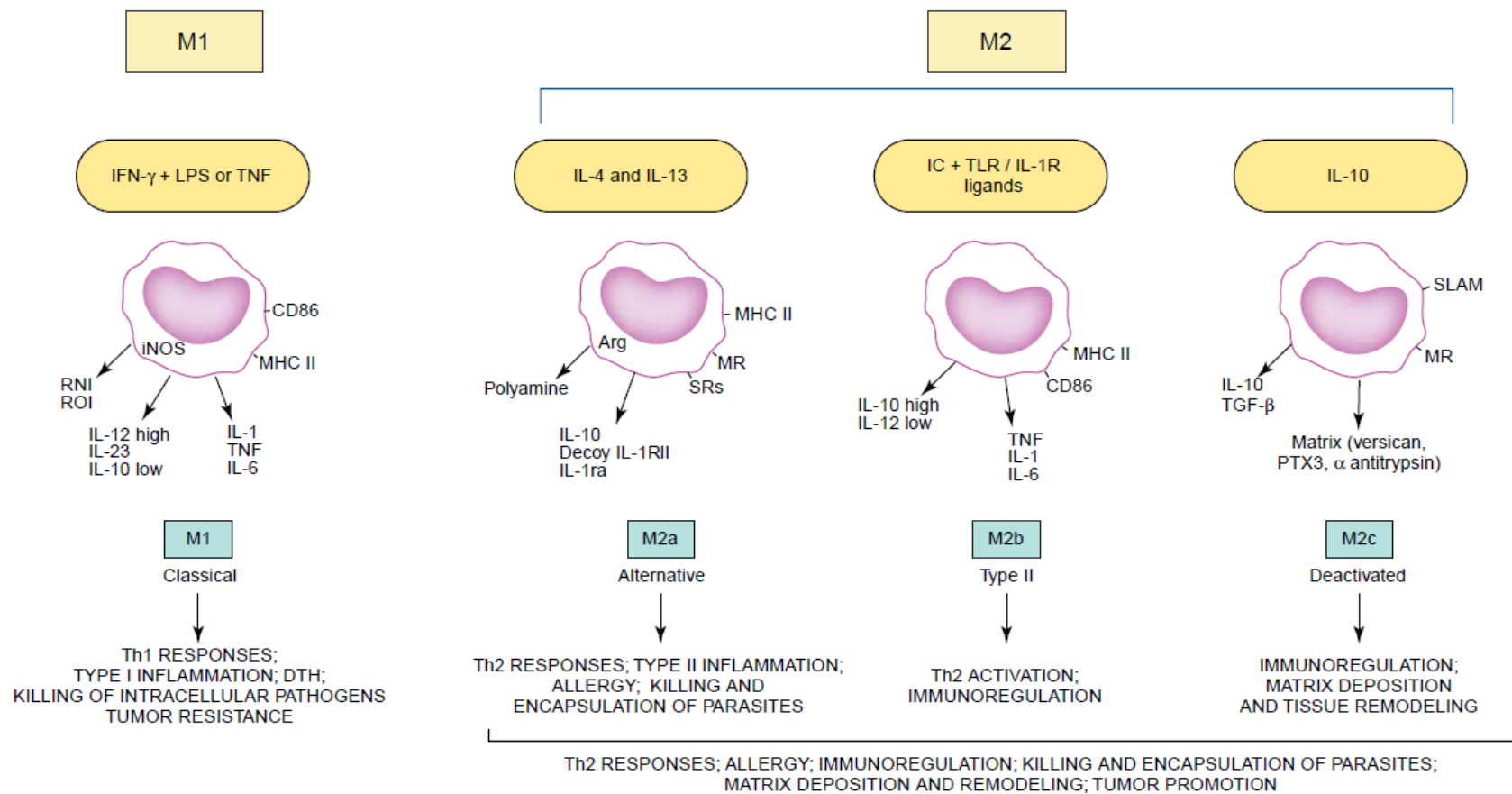
及訊號的改變，目前已知巨噬細胞可極化為 M1 及 M2 兩種分型(圖六):

(1).M1

M1 巨噬細胞為經典活化型態(Classical activated state)，細胞表面分化群(Cluster of differentiation ; CD)受體呈現 CD68⁺/CD206⁺的型態(Shono *et al.*, 2013)，其是由細菌脂多醣(Lipopolysaccharide ; LPS)、干擾素 γ (Interferon γ ; IFN- γ)、顆粒單核球集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony stimulating factor ; GM-CSF)及腫瘤壞死因子 α (tumor necrosis factor α ; TNF- α)等刺激誘導而分化，M1 巨噬細胞會合成並釋放促發炎(Pro-inflammatory) 細胞激素，如 TNF- α 、interleulin -1 β (IL-1 β)、interleulin-6 (IL-6)、interleulin-12 (IL-12)等，並產生大量活性氧物質(Reactive oxygen spices ; ROS)及活性氮物質(Reactive nitrogen spices ; RNS)以介導宿主發炎反應防禦微生物和抗腫瘤的能力，但 M1 細胞過度的反應會導致慢性炎症而損傷組織(Van Ginderachter *et al.*, 2006)。

(2).M2

M2 巨噬細胞又稱替代活化型(Alternatively activated state)巨噬細胞，細胞表面呈現 CD68⁺/CD206⁺的型態(Shono *et al.*, 2013)，相反於 M1 細胞的促發炎特性，M2 細胞主要與組織的癒合相關，細胞狀態



(Mantovani *et al.*, 2004)

圖六、不同極化巨噬細胞群的誘導劑與選擇性功能特性

Fig. 6. Inducers and selected functional properties of different polarized macrophage populations

可進一步被分為 M2a、M2b 及 M2c，這三種狀態有一些重疊的生化反應，但具有不同的活化機制及功能。M2a 藉由 interleukin-4 (IL-4) 的刺激會使 M2a 細胞分泌多胺(Polyamines)及 interleukin-10 (IL-10)，這將會阻止促發炎細胞激素 IFN- γ 、IL-6 及 TNF- α 的產生而具有抗發炎的能力。M2b 需要活化 TLR 及 Fragment of constant region γ receptor II (FcRII)，然後與 IgG 結合後 M2b 細胞會釋出大量的 IL-10 及促發炎因子:IL-6、TNF- α 、IL-1 β ，並表現出 CD86 細胞表型，M2b 能促進血管生成並活化第二型輔助 T 細胞(Th2)與 M2c。M2c 接收到 IL-10 的刺激後會釋出胞外基質、轉化生長因子(Transforming growth factor β ；TGF- β)與 IL-10 幫助減少 M1 細胞的活化並且增進組織修復 (Mantovani *et al.*, 2004)。

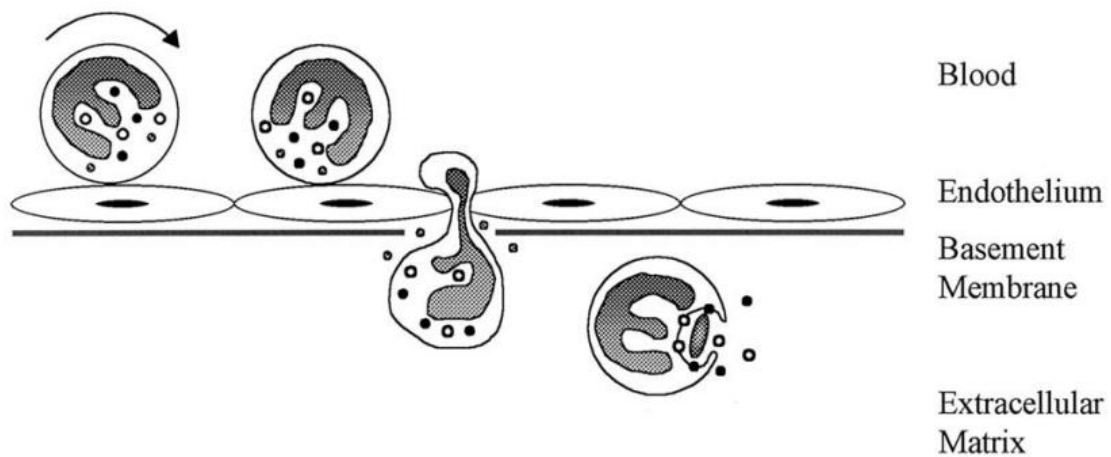
(三)、中性顆粒球

在血液中循環的白血球當中，以中性顆粒球(Neutrophils)數量最多，雖然它們的生命期短約 6-8 h，但當宿主遭受感染時中性顆粒球能夠大量且最快速抵達發炎組織，是先天性免疫的細胞之一(Borregaard, 2010)。為調節產生大量中性顆粒球，顆粒細胞集落因子(Granulocyte colony stimulating factor；G-CSF)是必須的，而發炎組織也會產生趨化因子(Chemotactic factor)促使中性顆粒球聚集(Summers *et al.*, 2010)。如同巨噬細胞一樣中性顆粒球也會進行吞噬作用藉由胞內顆粒中的

過氧化酶、溶解酶等消化噬入的病原物質，並且產生比巨噬胞更大量的 ROS 與 RNS 以促進發炎反應毒殺病原或受感染的細胞。但中性顆粒球對 LPS 的反應不如巨噬細胞敏感，主要是藉由趨化因子、腫瘤促進劑(Tumor promoting agents)及凝集素(Lectins)等刺激產生發炎反應(Sredni-Kenigsbuch *et al.*, 2000)。另外中性顆粒球可遷移至發炎部位藉由胞吐作用(Exocytic events)釋出胞內顆粒成份(圖七)，如防禦素(Defensins)、溶菌酶(Lysozyme)、乳鐵蛋白(Lactoferrin)等抗菌物質破壞細菌細胞膜(Faurschou & Borregaard, 2003)。

(四)、脂多醣

脊椎動物的先天性免疫系統透過種系編碼的模式識別受體(Pattern recognition receptors ; PRRs)識別外來病原之病原體相關分子模式(Pathogen-associated molecular patterns ; PAMPs)，而脂多醣(Lipopolysaccharide ; LPS)即為 PAMPs 的一種(Postel & Kemmerling, 2009; Takeuchi & Akira, 2010)。LPS 為格蘭氏陰性細菌外膜的組成分，結構主要由三個部分組成，包括:lipid A、core 以及 O-specific chain(圖八)，其中 lipid A 被認為是內毒素的組成份，core 是由大約 10 個單糖所組成的糖苷部分(Glycosidic part)，而 O-specific chain 則是由一至八個單糖的重複亞基組成，具有細菌之免疫特異性(Caroff & Karibian, 2003)。

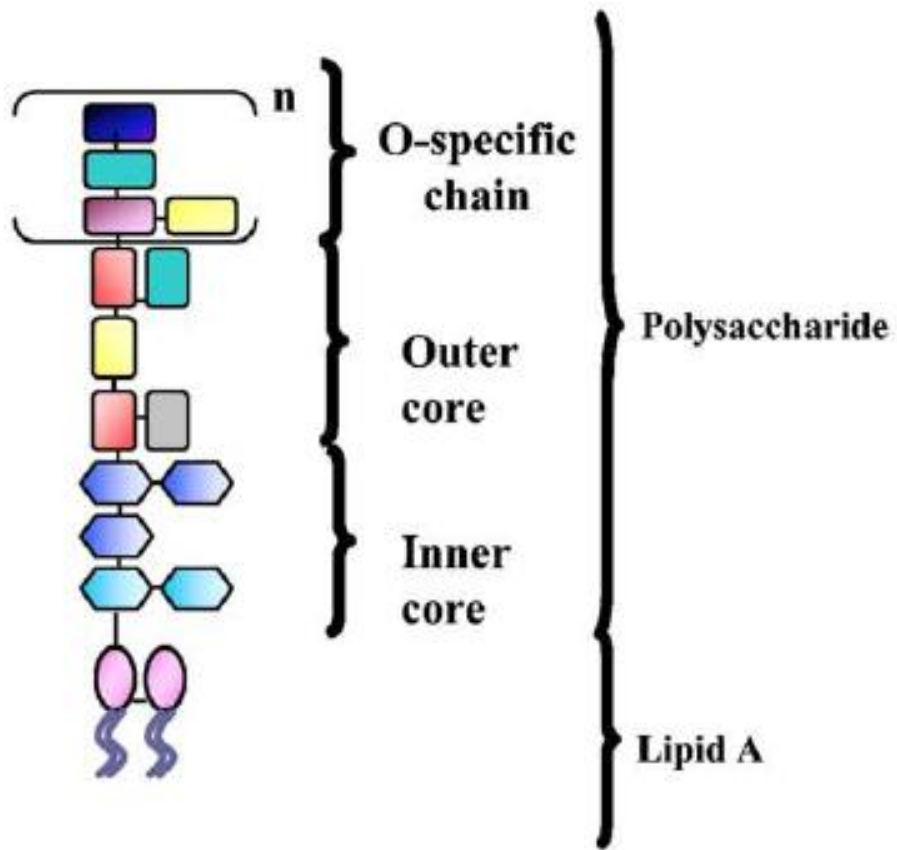


(Fauschou & Borregaard, 2003)

圖七、在中性顆粒球介導發炎反應中的胞吐作用

Fig. 7. Exocytic events in the neutrophil-mediated inflammatory response





(Caroff & Karibian, 2003)

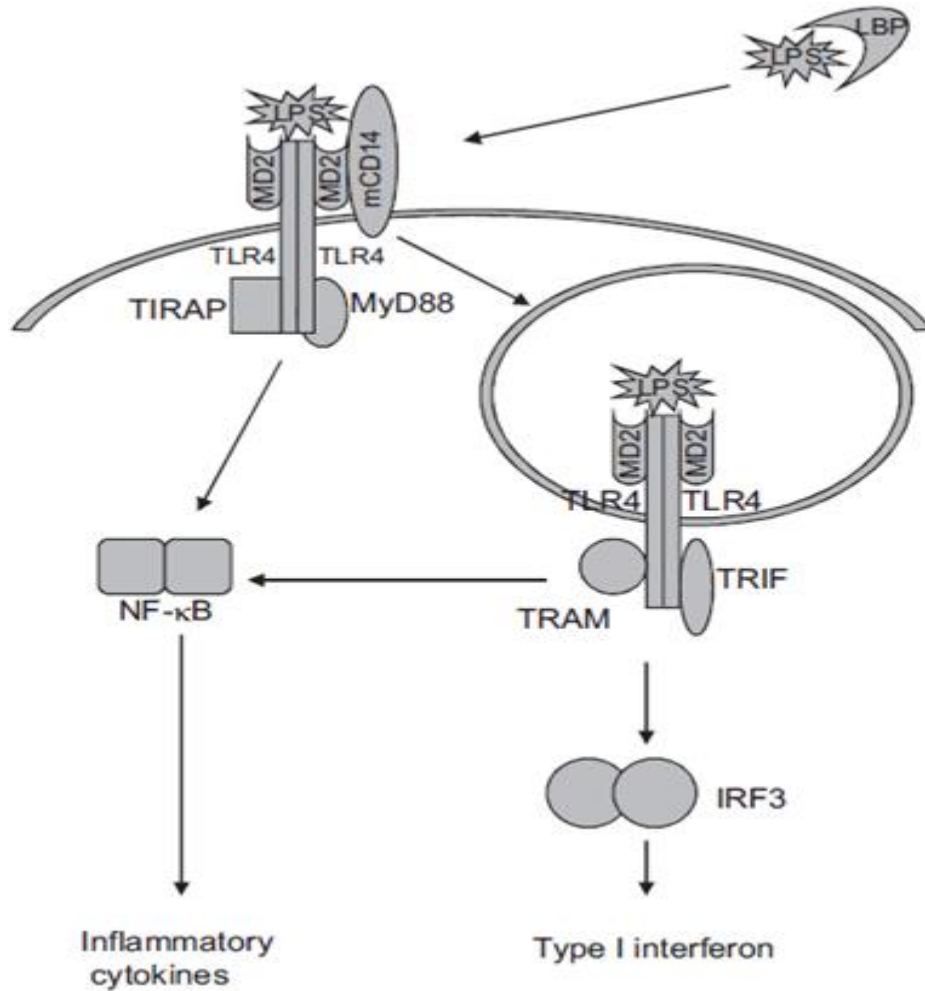
圖八、脂多醣之結構

Fig. 8. Structure of lipopolysaccharide

LPS 是巨噬細胞發炎反應有效的誘導劑之一，LPS 會與血液中的 LPS 結合蛋白(LPS binding protein；LPS)形成複合體，接著連接至巨噬細胞 CD14 表面受體並轉移至 myeloid differentiation protein-2(MD-2)/TLR4 複合物，並啟動 myeloid differentiation factor 88(MyD88) dependent 及 MyD88 - independent pathways 通過活化 I κ B kinase (IKK) pathway 導致核轉錄因子 NF- κ B 活化，促進促發炎細胞激素 IL-6、IL-8，IL-12、IL-23 等基因表現而釋出細胞激素(Gyorffy *et al.*, 2013)，並且誘導 induced NOS(iNOS)的基因表達產生一氧化氮(NO)(圖九)。少量的 LPS 可刺激免疫系統啟動防衛作用，但大量的 LPS 存在下則會誘發全身性炎症反應產生高熱(High fever)、心跳速率增加、血管內凝血(Intravascular coagulation)、膿毒性休克(Septic shock)而導致肺、腎功能衰竭(Caroff & Karibian, 2003)。

(五)、一氧化氮

一氧化氮(Nitric oxide；NO)是重要的細胞內及細胞間傳訊分子，參與心血管、神經、免疫系統當中多種調節機制。在免疫系統中它是一種游離氧自由基(NO \bullet)可作為病理過程中的細胞毒殺劑，尤其是在發炎反應中會大量產生(Bogdan, 2001; Moncada & Higgs, 1991)。NO 是很小的分子可自由地擴散通過細胞膜到達作用位置進行反應，其在生物體內的合成是藉由 L-精胺酸(L-arginine)與氧分子利用 NADPH 作

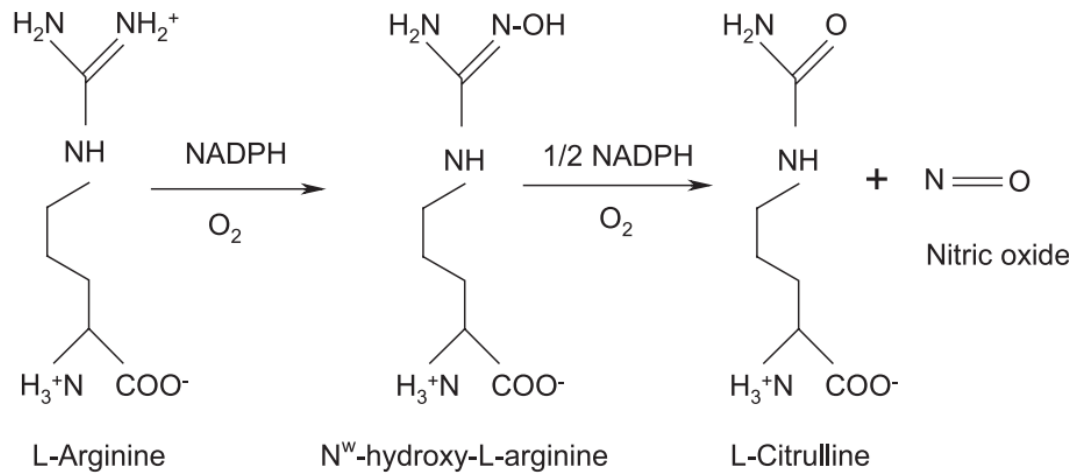


(Gyorfy *et al.*, 2013)

圖九、巨噬細胞中 LPS 之訊息傳遞路徑

Fig. 9. Lipopolysaccharide induced signaling pathway in macrophage

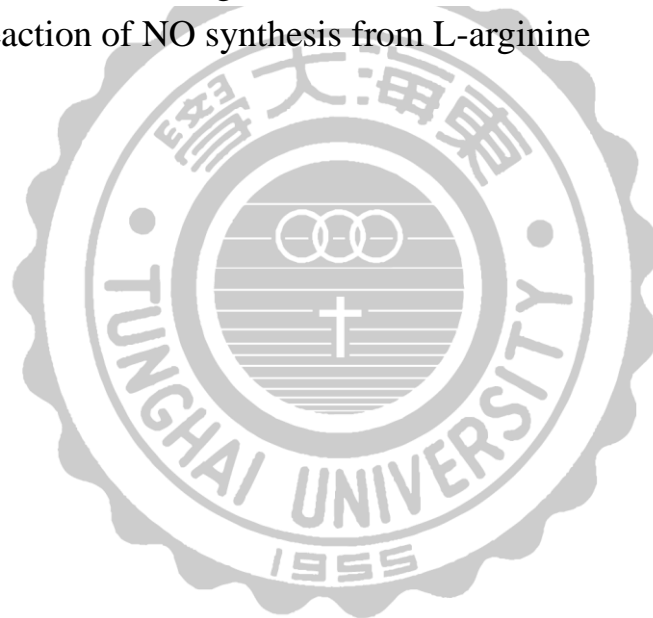
為電子供應者，經由兩次氧化轉化出 L-瓜胺酸(L-citrulline)與 NO(Mayer & Hemmens, 1997)(圖十)，而 NO 在體內的合成需要透過 NO 合成酶(Nitric oxide synthases ; NOS)的催化，目前已知 NOS 有三種類型，包括內皮型 NOS(Endothelial NOS ; eNOS)、誘導型 NOS(Induced NOS ; iNOS)及神經型 NOS(Neuronal NOS ; nNOS)(Alderton *et al.*, 2001)，其中 eNOS 和 nNOS 屬於組成型 NOS(Constitutive NOS)是不斷表現於靜息細胞(Resting cell)，受鈣離子與鈣調素(Calmodulin)活化產生低濃度 NO 以調節正常生理功能。iNOS 則不存在靜息細胞中而是通過免疫刺激的巨噬細胞、單核球、肥大細胞(Mast cells)、內皮細胞(Endothelium)、平滑肌細胞(Smooth muscle cells)等，當這些細胞受到促發炎細胞激素如 IL-1 β 、TNF- α 、干擾素 γ (Interferon- γ ; IFN- γ)及細菌產物如 LPS 刺激時便會產生大量的 NO(圖十一)引起發炎反應抵抗病原(Aktan, 2004)。除了發炎反應外 NO 也參與動脈粥樣硬化(Atherosclerosis)、類風濕關節炎(Rheumatoid arthritis)、糖尿病(Diabetes)、膿毒性休克(Septic shock)等病理反應(Buttery *et al.*, 1994; Hubbard & Giardina, 2000; Luoma *et al.*, 1998)，因此適量 NO 能幫助細胞調節生理功能及抵抗病原但過量則對細胞具有傷害性。

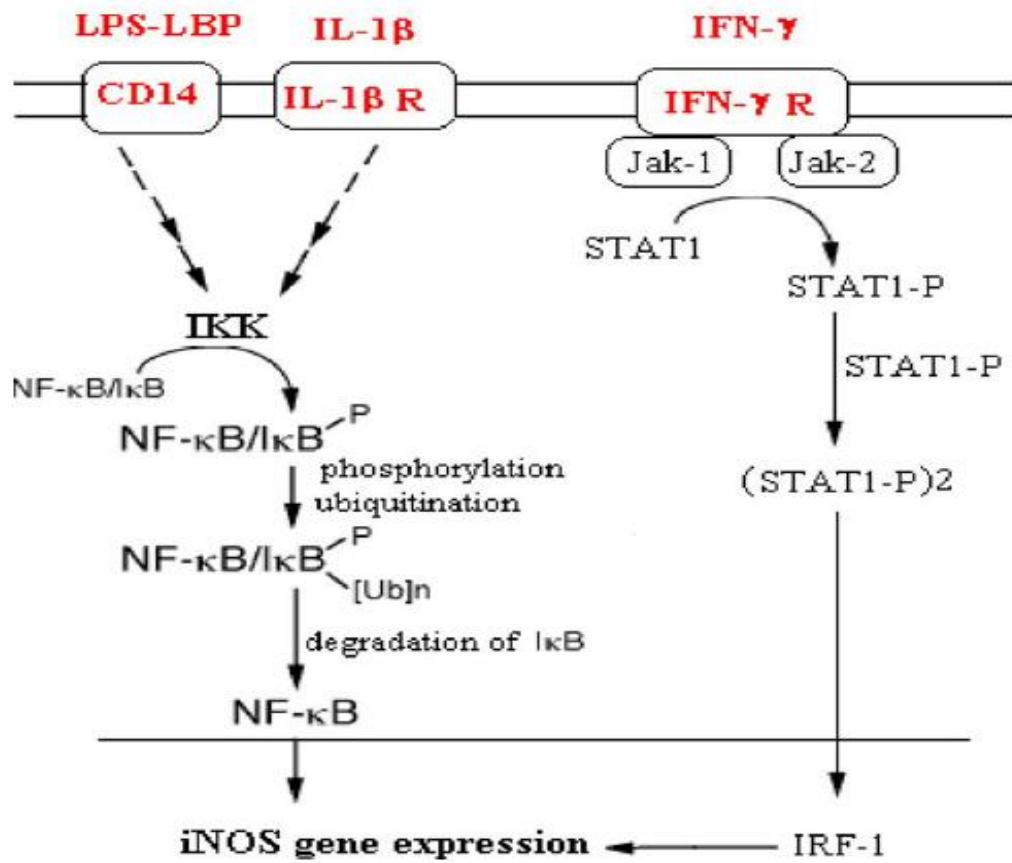


(Aktan, 2004)

圖十、NO 合成酶藉由 L-arginine 合成 NO 之反應

Fig. 10. The reaction of NO synthesis from L-arginine





(Aktan, 2004)

圖十一、iNOS 基因表現的傳訊路徑

Fig. 11. Signaling pathway of iNOS gene expression

(六)、細胞激素

有效的免疫反應牽涉到淋巴細胞、發炎細胞及造血細胞，在這些細胞的交互作用中，是由一群統稱為細胞激素(cytokines)的蛋白質作為媒介，細胞激素彼此以複雜的方式交互作用，可為添加、協同(synergistic)、拮抗(antagonistic)或涉及其他細胞激素的誘導作用。細胞激素具有多效性能調節多種生理作用，但其產生通常是短暫且受到嚴密的監控(Stenken & Poschenrieder, 2015)。

本研究將針對與巨噬細胞發炎反應相關之細胞激素 IL-6、IL-10 進行測定與探討:

1.IL-6

IL-6 為 28 kDa 的醣蛋白，可由 T 細胞、B 細胞、單核球、巨噬細胞、中性顆粒球、上皮細胞、成骨細胞等多種細胞產生(Yuzhalin & Kutikhin, 2015)，IL-6 的基因表現是由干擾素(IFN)、腫瘤壞死因子(TNF)、IL-1 及細菌 LPS 等所誘導的發炎反應驅使。IL-6 具有多效性，能夠促進輔助型 T 細胞 Th2、Th17 的分化，參與慢性炎症與抗原特異性免疫反應並參與急性期蛋白(Acute phase proteins)於肝組織的釋放，活化內皮細胞的黏附因子，而 IL-6 作為成熟劑(Maturing agent)能刺激許多淋巴細胞與肝細胞，另外 B 細胞分化為漿細胞也受到 IL-6 的影響(Neurath & Finotto, 2011)。

2.IL-10

在 1990 年,IL-10 被 Tim R. Mossman 所領導的研究團隊所分離與鑑定,它可以顯著抑制多種細胞激素如 IL-2 及 IFN- γ 的產生,因為這種效果 IL-10 最初被稱為細胞激素合成抑制因子(Cytokine synthesis inhibitory factor)(Fiorentino *et al.*, 1989)。IL-10 的主要來源是單核球及巨噬細胞,但它也被發現表達在調節型 T 細胞(T regulatory cells ; T reg)(Vieira *et al.*, 2004)、Th1 細胞(O'Garra & Vieira, 2007)、B 細胞(Pistoia, 1997)及樹突細胞 (Dendritic cells ; DCs) (Corinti *et al.*, 2001)等。IL-10 的影響,主要集中在 DCs、T reg 細胞和巨噬細胞。IL-10 是多效性細胞因子,能夠下調促發炎細胞激素 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IFN- γ 及 TNF- γ (Asadullah *et al.*, 2003),抑制 DCs、巨噬細胞及單核球抗原呈現的功能(Romagnani, 1995),抑制 T 細胞增殖(Tang *et al.*, 2012)以及刺激自然殺手細胞(NK cell ; NK)的增殖與增加細胞毒性(Mocellin *et al.*, 2004),由此可知 IL-10 具有免疫調節及抗發炎的活性,能夠在過敏及自體免疫疾病中保護人體,IL-10 的免疫抑制能力可能是阻斷 NF- κ B 結合到 DNA 鏈而導致(Clarke *et al.*, 1998)。

參、材料與方法

一、實驗材料

(一)、水解物製備

分離大豆蛋白(Isolated soy protein; ISP)NEW Soy 88，購自台灣振芳股份有限公司(Taipei,Taiwan)。Pepsin from porcine gastric mucosa 購自 Sigma (St.Louis, MO, USA)。Sodium phosphate monobasic monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)購自 J.T.Baker (USA)。Hydrochloric acid (HCl)購自聯工化學廠股份有限公司(Hsinchu,Taiwan)。

(二)、濾膜區分物製備

超濾膜反應系統(Ultrafiltration membrane reactor system)購自邁先生物技術股份有限公司(Taipei,Taiwan)。捲式膜(Spiral-wound membrane)分子量限值(molecular weight cut-off；MWCO)分別為30、10及1 kDa (kilo dalton)購自 Osmonics Inc. (MN,USA)。

(三)、純化物製備

逆相層析管柱 InertSustain® C18 10 x 250 mm 購自 GL Sciences Inc. (Japan)。HP 1100 series quaternary pump、variable wavelength detector 購自 Waldbromm (Germany)。

(四)、水解率測定

Sodium tetraborate ($\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、Sodium dodecyl sulphate (SDS)、o-phthaldehyde (OPA)、 β -Mercaptoethanol、Leu-Gly 皆購自 Sigma (St.Louis, MO, USA)。

(五)、TCA 可溶性氮測定

Trichloroacetic acid ($\text{TCA}, \text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$)、Methyl red、Brogresol green、Sodium hydroxide (NaOH)購自 Sigma。Boric acid (H_3BO_3)購自 SHOWA (Japan)。消化錠(含 Potassium sulfate (K_2SO_4)及 Cooper sulfate (CuSO_4))購自台灣今日儀器股份有限公司 (Taipei, Taiwan)。Hydrochloric acid (HCl)及 Sulfuric acid (H_2SO_4)購自聯工化學廠股份有限公司 (Hsinchu, Taiwan)。

(六)、分子量分布測定

膠體層析管柱 SuperdexTM Peptide 10/300 GL、購自 GE Healthcare (Sweden)。Acetonitrile、Sodium phosphate monobasic monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)購自 J.T Baker (USA)。Sodium chloride (NaCl)、標準品 Cytochrome C、Aprotinin、Vitamin B12、Glycine-Glycine-Glycine 購自 Sigma (St.Louis, MO, USA)。

(七)、小鼠巨噬細胞培養

小鼠巨噬細胞 RAW264.7 (BCRC 60001)購自食品工業發展研

究所(Hsinchu,Taiwan) 。 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)購自 Gibco (USA) 。 L-glutamine 、 Charcoal/dextran treated fetal bovin serum (FBS)購自 Biological Industries (Kibbutz,Israele) 。 Sodium carbonate (NaHCO_3)購自 Sigma (St.Louis, MO, USA) 。

(八)細胞存活率測定

Potassium chloride (KCl) 、 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 、 Sodium carbonate (NaHCO_3) 、 Sodium chloride (NaCl) 、 Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) 、 (3-,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 、 Dimethyl sulfoxide (DMSO)購自 Sigma (St.Louis,USA) 。

(九) 、一氧化氮生成量測定

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)購自 Gibco (USA) 。

Sodium nitrite (NaNO_2) 、 Griess reagent 、 Lipopolysaccharide (LPS) 購自 Sigma (St.Louis,USA) 。

(十) 、細胞吞噬活性測定

DMEM、LB broth 購自 Becton, Dickinson and Company (USA) 、 Agar 購自 HiMedia Lab (India) 。 Glycerol 、 pEGFP BL 21 *E.coli* 購自 USB Corporation (USA) 。 Lipopolysaccharide (LPS) 、 Trypanblue solution (0.4 %) 、 Citric acid monohydrate 、 Sodium citrate

tribasic dihydrate、Sodium chloride (NaCl)購自 Sigma (St.Louis, MO, USA)。

(十一)、細胞激素測定

mouse interleukin-6 (IL-6)、mouse interleukin-10 (IL-10) ELISA kit 購自 R&D System (Minneapolis, USA)。Tween-20、Sulfuric acid 購自聯工化學廠股份有限公司(Hsinchu,Taiwan)。

(十二)、小鼠脾臟細胞吞噬活性測定

B6 小鼠購自國家動物實驗中心(Taipei,Taiwan)。RPMI 1640 medium 購自 HyClone (USA)。Trypanblue solution (0.4 %)、Citric acid monohydrate、Sodium citrate tribasic dihydrate、Sodium chloride (NaCl)購自 Sigma (St.Louis,USA)。

(十三)、M1/M2 巨噬細胞分型分析

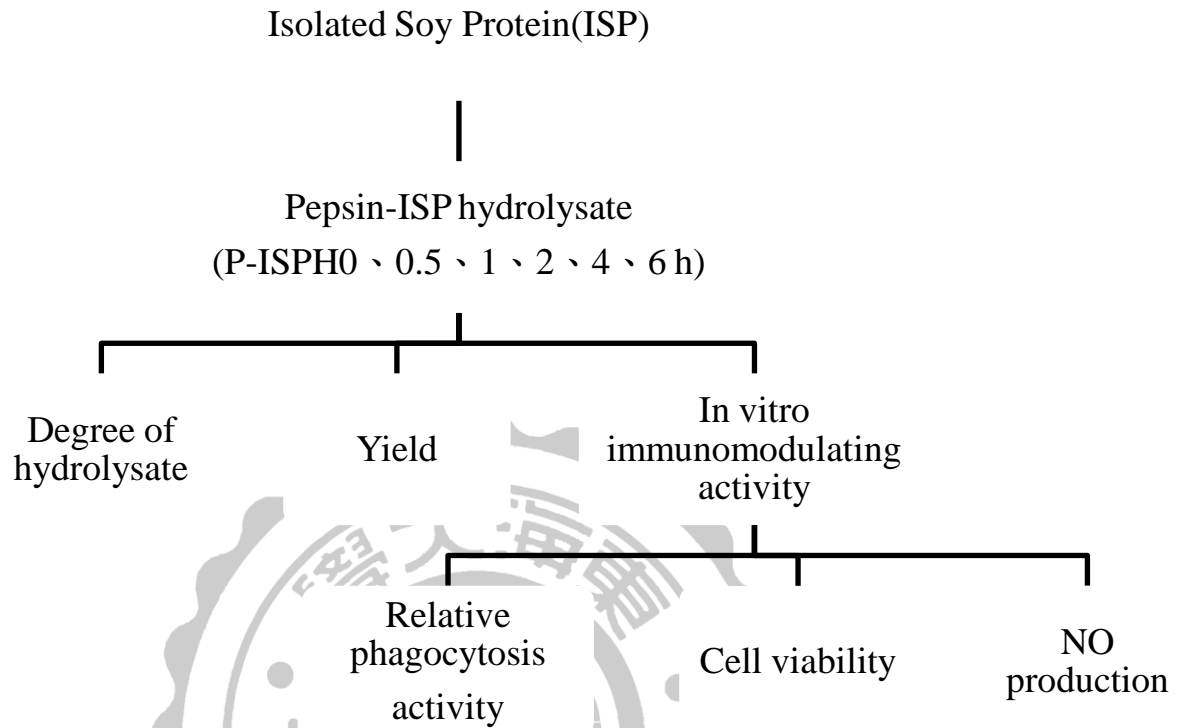
PE-anti-mouse CD68、PE/Cy5-anti-mouse CD197、FITC anti-mouse CD206 購自 Biolegend (San Diego,USA)。Sodium azide (NaN₃)購自 USB Corporation (OH,USA)。

二、實驗方法

(一)、實驗流程

本實驗主要分為三階段進行。第一階段首先進行 ISP 的酵素水解如圖十二，所得水解物分別於水解時間 0、0.5、1、2、4、6 h 取樣，

分析水解物之水解率、產率，並以體外細胞實驗確認水解物對吞噬活



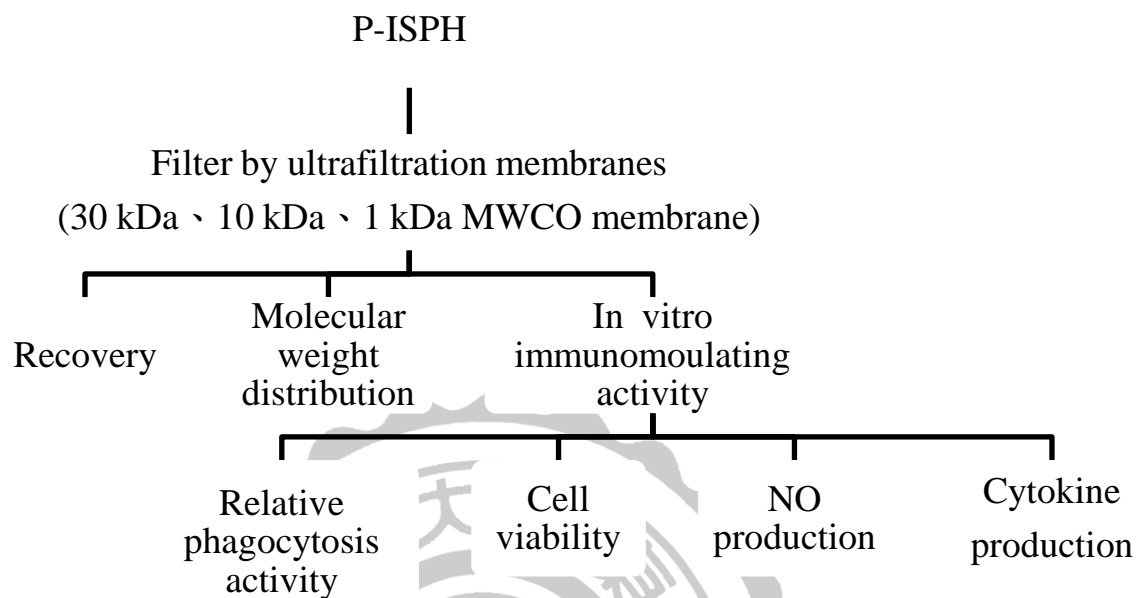
圖十二、第一階段實驗流程圖

Fig. 12. Experimental flow chart for the first stage

性、NO 生成量及細胞存活率等免疫調節機能之影響，目的希望能篩選出具免疫調節機能且胜肽產率高之酵素-蛋白質水解物。第二階段則以具免疫調節機能且胜肽產率高的酵素-蛋白質水解物進行不同分子量 MWCO 濾膜區分如圖十三，希望水解物經過濾膜區分後能進一步提升其免疫調節機能性，實驗將分析各濾膜區分物之回收率及分子量分布，以了解各濾膜區分物中胜肽片段分子量分布範圍及其在水解物中的百分比。並同樣進行體外細胞實驗分析濾膜區分物對吞噬活性、NO 生成量、細胞存活率、細胞激素產生量等免疫調節機能之影響，此階段欲篩選出最具有免疫調節活性之濾膜區分物以利進行後續分離及純化。第三階段將最具免疫調節活性之濾膜區分物進行逆向高效液相層析如圖十四，收集管柱區分物進行小鼠體內實驗，分析脾臟巨噬細胞、中性粒細胞及淋巴細胞之吞噬活性、脾臟淋巴細胞增生活性及細胞激素產生量等免疫調節功能，並將具免疫調節功能之管柱區分物進行胜肽序列鑑定以探討免疫調節肽之可能調節機制。

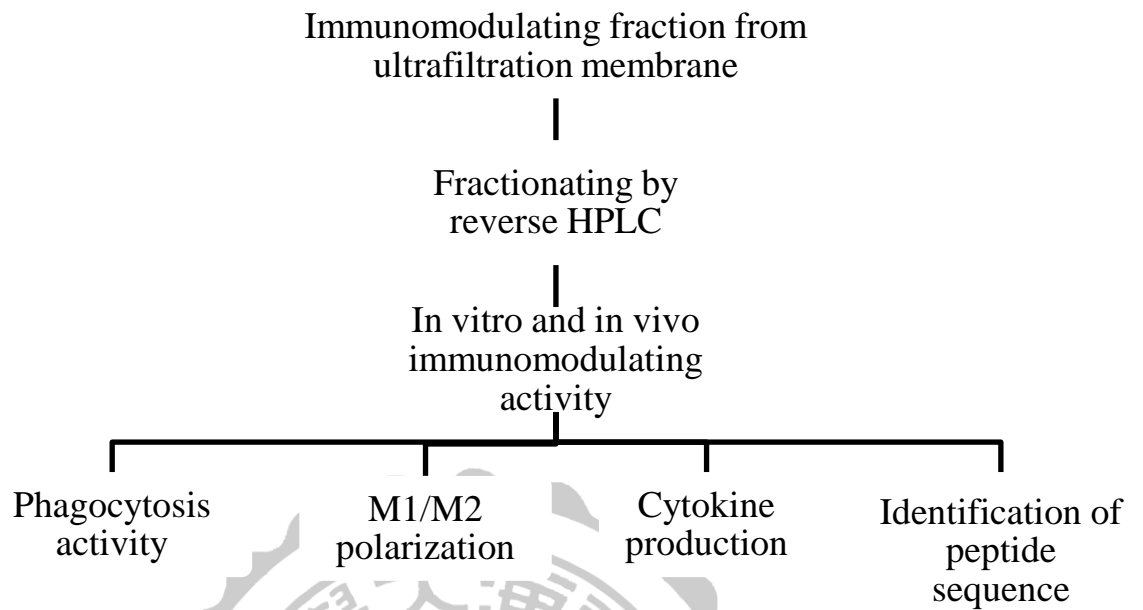
(二)、水解物製備

配製 0.2 M 磷酸緩衝液，調整 pH 值至 Pepsin 最適 pH 值:2.0，加入 2.5 % (w/v)ISP 利用攪拌器充分混合。以恆溫水浴槽調整溫度至 37 °C 後加入 Pepsin (E:S = 1:100)，並分別於水解時間 0、0.5、1、2、4、6 h 取樣至離心管，樣品以沸水浴 15 min 將酵素失活後



圖十三、第二階段實驗流程圖

Fig. 13. Experimental flow chart for the second stage



圖十四、第三階段實驗流程圖

Fig. 14. Experymental flow chart for the third stage

取部分凍乾保存於-20 °C，部份則冷凍保存於-20 °C供後續實驗使用。

(三)、水解率測定

實驗參考 Nielsen 等人(2001)，在鹼性(pH9.0)及還原劑 β -mercaptoethanol (含硫醇基；HS-R₁)存在下，*o*-phthaldehyde (OPA) 會與蛋白質、胜肽及游離胺基酸中 α -胺基(H₂N-R₂)反應，形成於 340 nm 具有最大吸光值之衍生物質(圖十五)。藉由測定 α -胺基的濃度，可得知蛋白質胜肽鍵的斷鍵數量，斷鍵數量越高表示水解程度越高。

試劑配製：

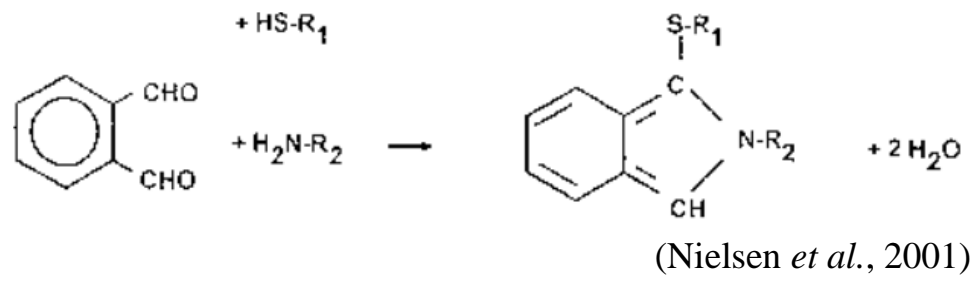
Solution A : 3.814 g sodium tetraborate (NaB₄O₇·H₂O)以二次去離子水定量至 100 mL。

Solution B : 20 g sodium dodecyl sulfate (SDS)以二次去離子水定量至 100 mL。

Solution C : 20 mg OPA 以甲醇定量至 0.5 mL。

Solution D : 50 μ l β -mercaptoethanol。

反應試劑 : 12.5 mL Solution A+1.25 mL Solution B+0.5 mL Solution C+50 μ l Solution D，以二次去離子水定量至 25 mL 後均勻混合置於褐色瓶中。



圖十五、水解率測定之反應

Fig. 15. Reaction of degree of hydrolysis determination



測定方式：

取適當稀釋後之水解液 50 μl 加入 1 mL 反應試劑中均勻混合，於室溫反應 2 min 後以分光光度計測其 340 nm 下之吸光值，以藉由雙胜肽(Leu-Gly)為標準品製作標準檢量曲線，計算水解物中 α -胺基的含量並帶入水解率(degree of hydrolysis ; DH)計算公式。

DH 計算公式：

$$\text{DH}(\%) = \frac{H_{\text{sample}}}{H_{\text{total}}} \times 100\% \quad (1)$$

H_{sample} 為樣品胜肽鍵斷鍵數即為 α -胺基濃度(mmol/mL)。

H_{total} 為樣品蛋白總胜肽鍵數(ISP 之 α -胺基當量 7.8 meq α -胺基/g 乘以 ISP 克數)。

(四)、TCA 可溶性態氮測定

三氯乙酸(Trichloroacetic acid; TCA)可使大分子蛋白質變性沉澱，而小分子之胜肽及胺基酸則不會被沉澱。因此利用 TCA 沉澱去除水解物中大分子蛋白質後可利用凱式定氮法測定水解物中小分子胜肽及胺基酸以 TCA 可溶性態氮之含量表示，並以此計算水解物胜肽之產率。取 2 至 5 mL 樣品加入等量的 20 % (w/v) TCA 溶液均勻混合，靜置 15 min 後以濾紙去除沉澱物，上清液置於消化管內加入消化錠及 10 mL Sulfuric acid (H_2SO_4)，以加熱槽加熱至 400 $^{\circ}\text{C}$ 反應 2 h。待冷卻後加入 75 mL 二次去離子水及 40 mL Sodium hydroxide (NaOH)，

將消化管置於蒸餾接收器進行蒸餾反應 5 min，並以含有 Bromocresol green、Methyl red 指示劑(MR-BG)之 4 % (w/v) Boric acid(H_3BO_3) 65 mL 作為接收液。反應結束後以 0.1 N Hydrochloric acid (HCl) 滴定接收液至其變色終點，並記錄滴定量。將滴定量帶入計算公式並扣除樣品水解前之 TCA 可溶性態氮含量即可得水解物中胜肽之產量。

計算公式:

$$\text{Yield (N mg/mL)} = \frac{(V1-V2) \times C \times 14}{\text{Sample volume(mL)}} \quad (2)$$

V1: 樣品滴定量(mL)。

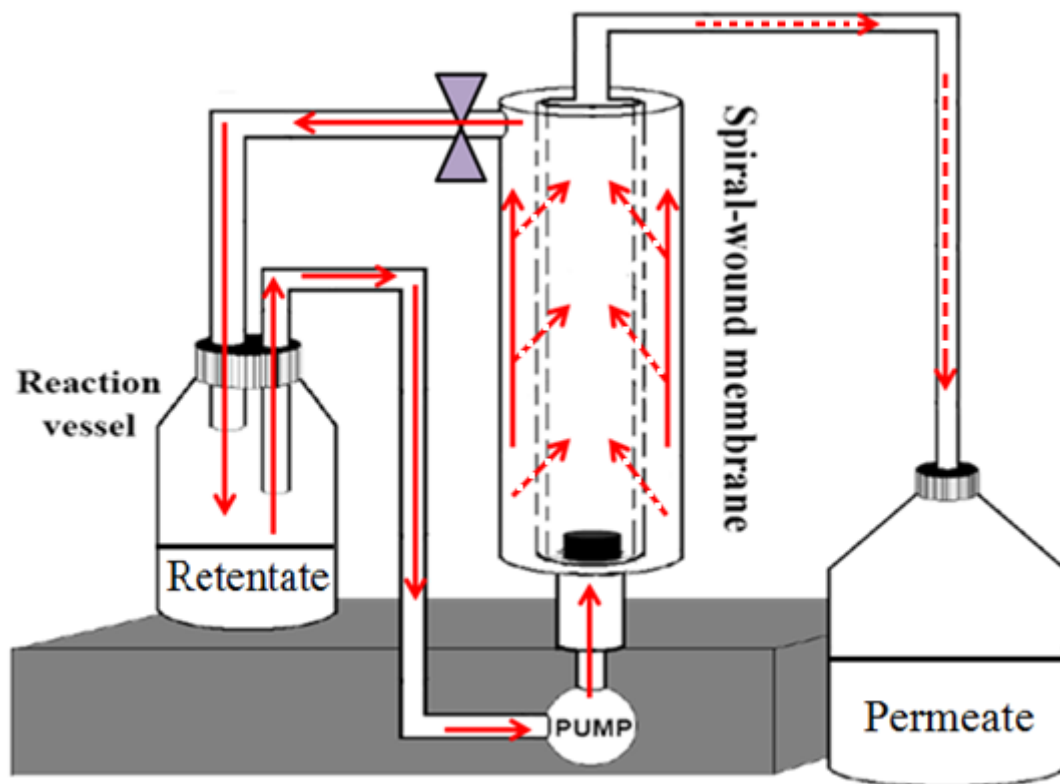
V2: 空白組滴定量(mL)。

C: HCl 的濃度(0.1 N x 力價)。

14: 氮原子的原子量

(五)、濾膜區分

區分水解物所使用之膜反應系統如圖十六所示。其區分原理為使用不同分子量限值(Molecular weight cut-off; MWCO)之濾膜將水解物依序區分。將水解物置於反應槽中，藉由幫浦的帶動可將水解物送入捲式膜，在未限制管內液體流速的情況下，水解物會迴流至反應槽中循環。當調整外膜調節閥使流速變小，會使系統產生回壓驅使水解物中分子量小於濾膜 MWCO 之物質通過濾膜而形成濾液(permeate)，大於濾膜 MWCO 之物質則無法通過濾膜而回到反應槽成為保留液



圖十六、膜反應系統

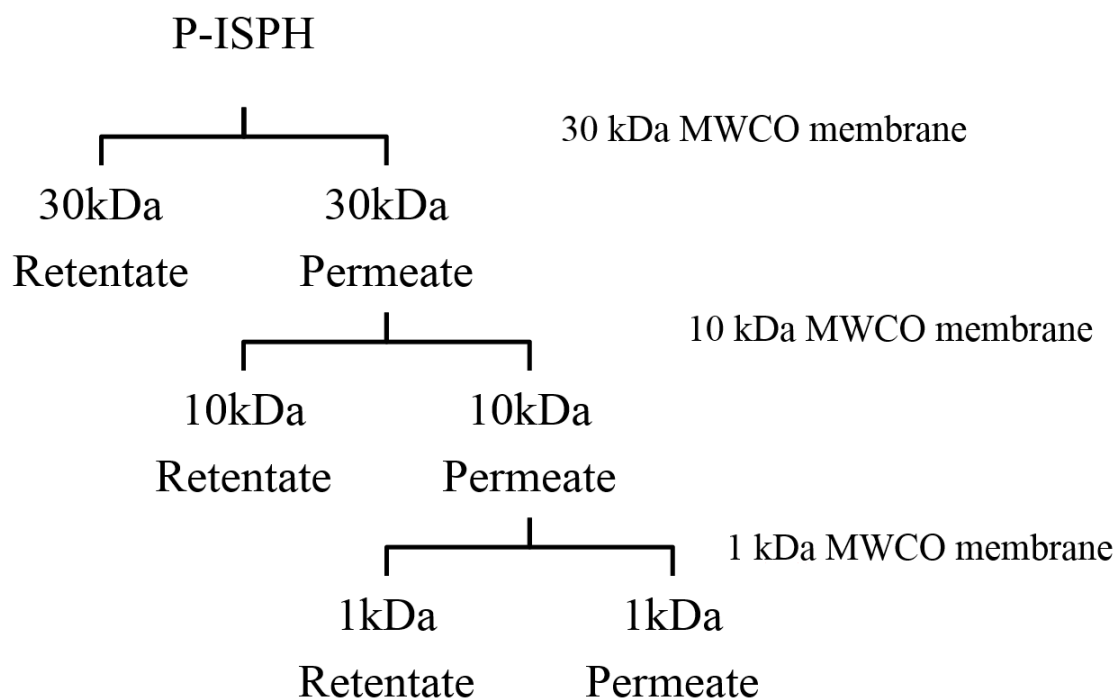
Fig. 16. Membrane reactor system



(retentate)。本次實驗使用之濾膜孔徑分別為 30 kDa、10 kDa 及 1 kDa MWCO。首先將水解物以 30 kDa MWCO 濾膜區分可得 30 kDa retentate 及 30 kDa permeate；接著將 30 kDa permeate 以 10 kDa MWCO 濾膜區分可得 10 kDa retentate 及 10 kDa permeate；再將 10 kDa permeate 以 1 kDa MWCO 濾膜區分可得 1 kDa retentate 及 1 kDa permeate(圖十七)。

(六)、分子量分布測定

水解物與濾膜區分物的分子量分布使用膠體過濾層析(size exclusion chromatography;SEC)管柱配合高效能液相層析儀(high performance liquid chromatography ; HPLC)進行分析。其原理為管柱中填充具有微小孔隙之膠體，當樣品流經管柱時，大分子物質無法進入膠體孔隙故較快地被沖提出來，小分子物質則會進入膠體空隙故較慢地被沖提出來。因此可利用不同分子量標準品之滯留時間判斷樣品之分子量分布範圍。實驗參考 Chiang 等人(1999)之方法，固定相為 Superdex™ Peptide 10/300 GL，移動相為含 0.25 M NaCl 與 0.02 M Na₂HPO₄ 之 phosphate buffer (pH7.2)。樣品經 0.2 μm filter 過濾後，注射 20 μl 至 HPLC 系統進行分析，流速為 0.5 mL/min，吸收波長設定為 214 nm，並以 Cytochrome C (12,327 Da)、Aprotinin (6,512 Da)、Vitamin B12 (1,855 Da)、Gly-Gly-Gly (189 Da)、Glycine (75 Da)作為



圖十七、大豆分離蛋白胃蛋白酶水解物(P-ISPH)之濾膜區分圖

Fig. 17. Fraction chart of Pepsin-isolated soy protein hydrolysate (P-ISPH)

標準品進行分子量分布測定。

(七)、小鼠巨噬細胞培養

本實驗使用之小鼠巨噬細胞株為 RAW264.7。細胞培養於 DMEM 培養基(含 10 % 胎牛血清(FBS)、1.6 g/L NaHCO₃ 及 2 mM L-Glutamine)，於 5% CO₂、37 °C 條件下培養，48 至 72 h 後更換新培養基或進行繼代培養，當細胞代數超過 50 後則捨棄並重新解凍。

1.細胞凍存

當細胞達到培養皿底面積之八成量時，將培養基移除，加入新培養基將細胞沖洗懸浮，細胞懸浮液收集至 50 mL 離心管後以 200 x g、4 °C 條件下離心 5 min，去除培養基並將離心管底部細胞拍散，接著加入 1 mL 含 10 % DMSO 之培養基作為細胞凍存液，混合均勻後置於抗凍管。以 4°C 冷藏 5 min，接著移至 -20 °C 冷凍 20 min，再移至 -80 °C 冷凍 12 h 後移至液態氮桶內保存。

2.細胞解凍

將含有細胞之抗凍管移出液態氮桶，以 37 °C 水浴 1 min 解凍，接著將細胞液加入含培養基之 10 cm 培養皿中均勻混合，培養於 5 % CO₂、37 °C 恆溫培養箱中，培養 24 h 後更換新培養基。

3.細胞繼代

當細胞達到培養皿底面積之八成量時，將培養基移除，加入新培

養基將細胞沖洗懸浮，將細胞懸浮液以 1:3 至 1:9 的比例加入含有新培養基之培養皿中繼代培養。

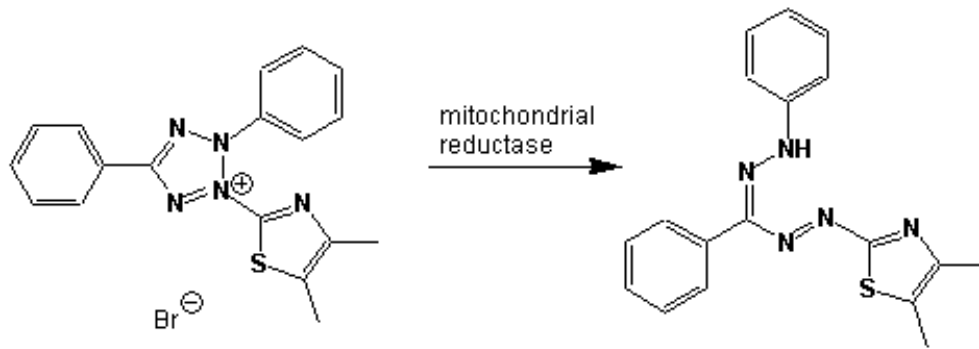
(八)、細胞存活率測定

參考 Mosmann (1983) 之測定方法，原理為活細胞中粒線體具有琥珀酸去氫酶(Succinate dehydrogenase)，可將 MTT 試劑還原產生在 595 nm 下有最大吸光值之紫色結晶(圖十八)，因此可加入 Dimethyl sulfoxide (DMSO)將結晶溶解後利用分光光度儀偵測 595 nm 吸光值，並帶入公式計算細胞存活率(Cell viability %)，吸光值越高代表具有活性琥珀酸去氫酶之活細胞越多。

培養 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞於 96 孔培養盤(1×10^5 cells/well)，在 37 °C、5 % CO₂ 條件下培養 24 h 後，移除培養基，分別加入不同濃度樣品在 37 °C、5 % CO₂ 條件下培養 24 h。移除培養基，加入 PBS 清洗細胞，並於甲醇組加入甲醇處理 2 至 3 min 作為陰性對照組，接著移除 PBS 及甲醇，加入 MTT 試劑(0.5 mg/mL MTT)培養 4 h。反應時間結束後，移除 MTT 試劑並加入 DMSO 培養 20 min，最後以光光度儀偵測 595 nm 吸光值，並帶入公式計算細胞存活率(Cell viability %)。

計算公式:

$$\text{Cell viability}(\%): \frac{\text{O.D}_{\text{sample}} - \text{O.D}_{\text{methanol}}}{\text{O.D}_{\text{control}} - \text{O.D}_{\text{methanol}}} \times 100 \% \quad (3)$$



圖十八、細胞存活率測定反應

Fig. 18. Reaction of cell viability determination



O.D_{sample}: 樣品處理組之吸光值

O.D_{control}: 未經樣品處理的控制組吸光值

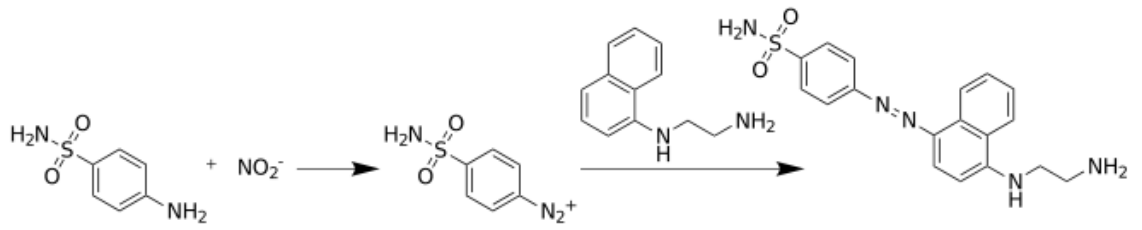
O.D_{methanol}: 經甲醇處理之陰性對照組

(九)、一氧化氮生成量測定

當發炎反應發生時，巨噬細胞會產生大量一氧化氮(NO)，NO 經氧化後產生 NO₃ 再藉由 nitrate reductase 分解成穩定的 nitrite (NO₂⁻)；測定方法採用 Griess method，由於 Griess reagent 中含對氨基苯磺酸 (Sulfanilamide)、N-1-萘基乙烯二胺二鹽酸鹽 (naphthylethylenediamine dihydrochloride) 及磷酸，其中氨基苯磺酸會與 NO₂⁻ 結合產生重氮化合物，再經由 N-1-萘基乙烯二胺二鹽酸鹽作用而產生在 550 nm 具最大吸光值之物質(圖十九)，可用分光光度儀測定並以不同濃度 NO₂⁻ 作為標準品繪製標準檢量線後計算 NO 生成量。

培養 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞於 96 孔培養盤(1 x 10⁵ cells/well)，在 37 °C、5% CO₂ 條件下培養 24 h，移除培養基，分別加入不同濃度樣品並以 1 ppm LPS 作為陽性對照組在 37 °C、5% CO₂ 條件下培養 24 h。配製不同濃度 NO₂⁻ 作為標準品，取 50 μl 細胞液或標準品加入 50 μl Griess reagent，避光反應 10 min 後，以分光光度儀測定 550 nm 之吸光值後帶入標準檢量線計算 NO 生成量。

(十)、細胞吞噬活性測定



圖十九、一氧化氮測定反應

Fig. 19. Reaction of NO determination



原理為 trypan blue 存在之下，未被吞噬之基因轉殖螢光大腸桿菌 (pEGFP-BL21) 所產生的螢光會被消光(quench)，被巨噬細胞吞噬之螢光大腸桿菌則因 trypan blue 不會進入胞內消光，而可以偵測到其螢光訊號，故可以偵測吸光值分析細胞之吞噬活性，吸光值愈高代表細胞之吞噬活性愈強。

1.pEGFP-BL21 基因轉殖螢光大腸桿菌培養

於無菌操作台內取 50 μ l 至 50 mL LB 培養基(25 g LB broth/1 L RO 水)中，以 37 $^{\circ}$ C、200 rpm 搖瓶培養 18 至 20 h。

2.菌量計數

將菌液連續進行 10 倍序列稀釋後，將稀釋菌液以分光光度儀偵測並記錄 600 nm 下之吸光值。接著取 100 μ l 稀釋菌液以 L 型玻棒塗抹於 LB agar 培養基(含 1.5 % agar 之 LB 培養基)，培養於 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱 18 至 20 h 後計數菌落數。將菌落數及吸光值繪製標準曲線，即可作為後續實驗之菌數計算依據。

3.菌株凍存

將菌數定量至 1×10^9 之菌液以 4 $^{\circ}$ C、3500 x g 離心 10 min，去除上清液後加入含 20 % glycerol 之 LB 培養基混合均勻，冷凍保存於 -20 $^{\circ}$ C。

4.吞噬作用測定

培養 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞於 96 孔培養盤(1×10^5 cells/well)，在 37°C 、 5% CO_2 條件下培養 24 h，移除培養基，分別加入不同濃度樣品並以 1 ppm LPS 作為陽性對照組，在 37°C 、 5% CO_2 條件下培養 24 h。接著將 pEGFP-BL21 基因轉殖螢光大腸桿菌(5×10^6 cells/well)加入 96 孔培養盤，以 4°C 、 $120 \times \text{g}$ 離心 5 min 使螢光大腸桿菌沉降至培養盤底部讓巨噬細胞進行吞噬作用，並在 37°C 條件下作用 2 h。接著將 96 孔培養盤以 4°C 、 $120 \times \text{g}$ 離心 5 min，再加入 2x trypan blue 試劑反應 2 min，去除 2x trypan blue 試劑後以螢冷光儀 (Ex:485, Em:538) 測定吸光值。將數值帶入公式計算相對吞噬作用百分比(Relative phagocytosis (%))。

計算公式:

$$\text{Relative phagocytosis (\%)} = \frac{\text{O.D}_{\text{sample}}}{\text{O.D}_{\text{LPS}}} \times 100\% \quad (4)$$

試劑配製:

Citrate buffer: 取 0.2 M citrate acid 28 mL 與 0.2 M sodium citrate 22 mL 均勻混合。

2 x trypan blue 試劑: 取 trypan blue 5 mL、5 M NaCl 3 mL、0.1 M citrate buffer 20 mL 以滅菌水定量至 50 mL 後均勻混合。

(十一)、細胞激素測定

本實驗利用酵素連結免疫吸附分析法(enzyme-linked

immunosorbent assay ; ELISA) 以商業套組分析細胞激素 interleukin-6 (IL-6)及 interleukin-10 (IL-10)，藉此分析樣品對細胞免疫調節功能之調控。將 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞培養於 24 孔培養盤(5×10^5 cells/well)，於 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 5% CO_2 培養 24 h，收集細胞培養液冷凍保存於 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 待分析使用。取 96 孔 ELISA 分析盤，加入 $100\text{ }\mu\text{l/well}$ capture antibody 附著(coating)12 至 14 h，接著移除 capture antibody，以 wash buffer $300\text{ }\mu\text{l/well}$ 清洗孔槽 3 次，加入 $100\text{ }\mu\text{l/well}$ reagent diluent 進行 blocking 1 h，移除 reagent diluent，以 wash buffer $300\text{ }\mu\text{l/well}$ 清洗孔槽 3 次，加入 $100\text{ }\mu\text{l/well}$ 標準品或細胞培養液(與 LPS 共培養之細胞其細胞培養液中具有大量細胞激素故應稀釋 30 倍)反應 2 h，移除標準品及細胞培養液，以 wash buffer $300\text{ }\mu\text{l/well}$ 清洗孔槽 3 次，加入 $100\text{ }\mu\text{l/well}$ detection antibody 反應 2 h，移除 detection antibody，以 wash buffer $300\text{ }\mu\text{l/well}$ 清洗孔槽 3 次，避光並加入 Streptavidin-HRP $100\text{ }\mu\text{l/well}$ 反應 20 min，以 wash buffer $300\text{ }\mu\text{l/well}$ 清洗孔槽 3 次，避光並加入 substrate solution $100\text{ }\mu\text{l/well}$ 反應 20 min，加入 $50\text{ }\mu\text{l/well}$ stop solution，最後以分光光度儀偵測 450 nm 吸光值並將數值帶入標準曲線計算細胞激素濃度。

試劑配製：

PBS: 含 5.36 mM KCl 、 $0.44\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ 、 4.17 mM NaHCO_3 、

0.14 mM NaCl 及 0.35 mM Na₂HPO₄ 溶解於二次去離子水中並調整為 pH 7.2。

Reagent dilute: 0.1 % (w/v) Bovine serum albumin (BSA) 溶解於 PBS 中。

Wash buffer: 0.05 % (w/v) Tween 20 溶解於 PBS 中。

Substrate solution: Tetramethylbenzidine: H₂O₂ = 1:1。

Stop solution: 2N H₂SO₄。

(十二)、小鼠脾臟細胞吞噬作用測定

流式細胞儀可依細胞大小及顆粒性的不同，區分脾臟細胞中之巨噬細胞(Macrophages)及中性顆粒球(Neutrophils)，並藉由分析細胞吞噬基因轉殖螢光大腸桿菌而得之胞內螢光訊號得知樣品對不同細胞群吞噬作用之影響，並將螢光訊號帶入公式計算陽性螢光級數(positive fluorescent level)，陽性螢光級數越高表示細胞吞噬能力越佳。

實驗動物為 B6 小鼠，19 周齡，性別皆為公鼠。以腹腔注射 5 mg/kg 樣品，注射後三天犧牲，將小鼠以 isoflurane 迷昏後腋下採血並脫頸犧牲，取脾臟秤重後置於 5 mL YAC medium 以 200 mesh 篩網磨碎，收集磨碎後之細胞懸浮液，以 300 x g、4 °C 條件下離心 10 min，去除上清液，輕拍離心管底部將沉澱細胞拍散，加入 0.1 x Hank's

balanced salt solution (HBSS) 5 mL 將紅血球破碎，再加入 HBSS 10 mL 靜置 5 min。接著以 300 x g、4 °C 條件下離心 10 min，去除上清液，輕拍離心管底部將沉澱細胞拍散，加入 YAC medium 以流式細胞儀分析細胞數目後將細胞懸浮液濃度調整為 2×10^7 cells/mL。將脾臟淋巴細胞培養於含 YAC medium 之 96 孔細胞培養盤(1×10^5 cells/well)，接著加入 BioParticles® FITC-E.coil (2.5×10^6 cells/well)，以 4 °C、120 x g 離心 5 min 使螢光大腸桿菌沉降至底部與細胞進行吞噬作用，將 96 孔盤置於 37 °C 培養 2 h，待培養時間結束以 4 °C、120 x g 離心 5 min，移除上清液，加入 50 μ l 2x trypan blue 及 50 μ l analysis buffer 與細胞混和均勻，最後以流式細胞儀吸取細胞懸浮液，圈選細胞群並分析其螢光訊號帶入公式計算陽性螢光級數。

計算公式:

$$\text{positive fluorescent level} = M1 + M2 \times 10 + M3 \times 100 + M4 \times 1000 \quad (6)$$

M1: 螢光訊號為 10^1 以內之細胞百分比

M2: 螢光訊號為 10^2 以內之細胞百分比

M3: 螢光訊號為 10^3 以內之細胞百分比

M4: 螢光訊號為 10^4 以內之細胞百分比

試劑配製:

YAC medium: 含 RPMI 1640 medium 400 mL、10% FBS、200

mM L-glutamine 4.5 mL、2-ME 450 μ l、sodium pyruvate 4.5 mL 及 gentamycin 450 μ l。

10 x HBSS: sodium chloride 80 g、potassium chloride 4 g、potassium phosphate monobasic 0.6 g、glucose 10 g、sodium bicarbonate 3.5 g 定量至 1L。

Analysis buffer:取 organ cell suspension medium (含 RPMI 1640 medium 200 mL、5 % FBS、200mM L-glutamine 4.5 mL、2-ME 450 μ l、sodium pyruvate 4.5 mL、gentamycin 450 μ l、gentamycin 450 μ l) 200 mL、10 x Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)(96 g DPBS powder 以二次去離子水定量至 1L)80 mL 定量至 1L。

(十三)、M1/M2 巨噬細胞分型分析

巨噬細胞具有 M1 及 M2 兩種不同分化型態，因此兩者細胞膜具有不同的分化群(cluster of differentiation；CD)抗原，M1 細胞具有 CD68⁺/CD197⁺，M2 細胞則具有 CD68⁺/CD206⁺之型態。因此可利用商業 Fluorescein isothocyanate (FITC)、Phycoerythrin (PE)、PE-Cy5 結合單株抗體與細胞 CD 抗原結合，以流式細胞儀偵測螢光訊號分析細胞分型百分比。

實驗動物為 B6 小鼠，19 周齡，性別皆為公鼠。以腹腔注射 5 mg/kg 樣品，注射後三天犧牲，將小鼠以 isoflurane 迷昏後腋下採血並脫頸

犧牲，取脾臟秤重後置於 5 mL YAC medium 以 200 mesh 篩網磨碎，收集磨碎後之細胞懸浮液，以 300 x g、4°C 條件下離心 10 min，去除上清液，輕拍離心管底部將沉澱細胞拍散，加入 0.1 x Hank's balanced salt solution (HBSS) 5 mL 將紅血球破碎，再加入 HBSS 10 mL 靜置 5 min。接著以 300 x g、4°C 條件下離心 10 min，去除上清液，輕拍離心管底部將沉澱細胞拍散，加入 YAC medium 以流式細胞儀分析細胞數目後將細胞懸浮液濃度調整為 2×10^7 cells/mL。取 50 μ l 細胞懸浮液加入 9 μ l 螢光結合抗體(含 CD68、CD197、CD206 抗體)，充分混合後於 4 °C 避光反應 30 min，加入 wash buffer 2 mL 終止反應並洗去未鍵結抗體，以 4 °C、300 x g 條件離心 10 min，去除上清液，加入 200 μ l analysis buffer 均勻混合，以流式細胞儀分析細胞分型百分比。

(十四)、胜肽序列鑑定

以逆相管柱層析區分之最具吞噬活性區分物，委託東海大學化學系生物化學研究室，以高效液相層析串聯質譜儀(HPLC tandem mass spectrometry；LC-MASS/MASS)鑑定。使用電噴灑離子化法(Electrospray ionization；ESI)將樣品離子化，接著以四極柱串聯離子阱(Quadrupole tandem ion trap)質量分析器依不同質荷比(mass per charge；m/z)將離子分離並以偵測器接收訊號，將樣品訊號帶入資料庫進行比對鑑定其中可能含有的胜肽片段。定序後的胜肽片段依其序

列委託曜鴻公司進行人工合成，人工合成肽將與管柱區分物進行小鼠動物試驗比對免疫調節功能。

(十五)、統計分析

所有實驗數據結果皆以平均值加、減標準差(mean \pm SD)表示，並利用 Statistical analysis system (SAS)統計分析軟體以 Duncan's multiple range test 分析樣品數據之間是否有差異，顯著差異水準為 $p < 0.05$ 。



肆、結果與討論

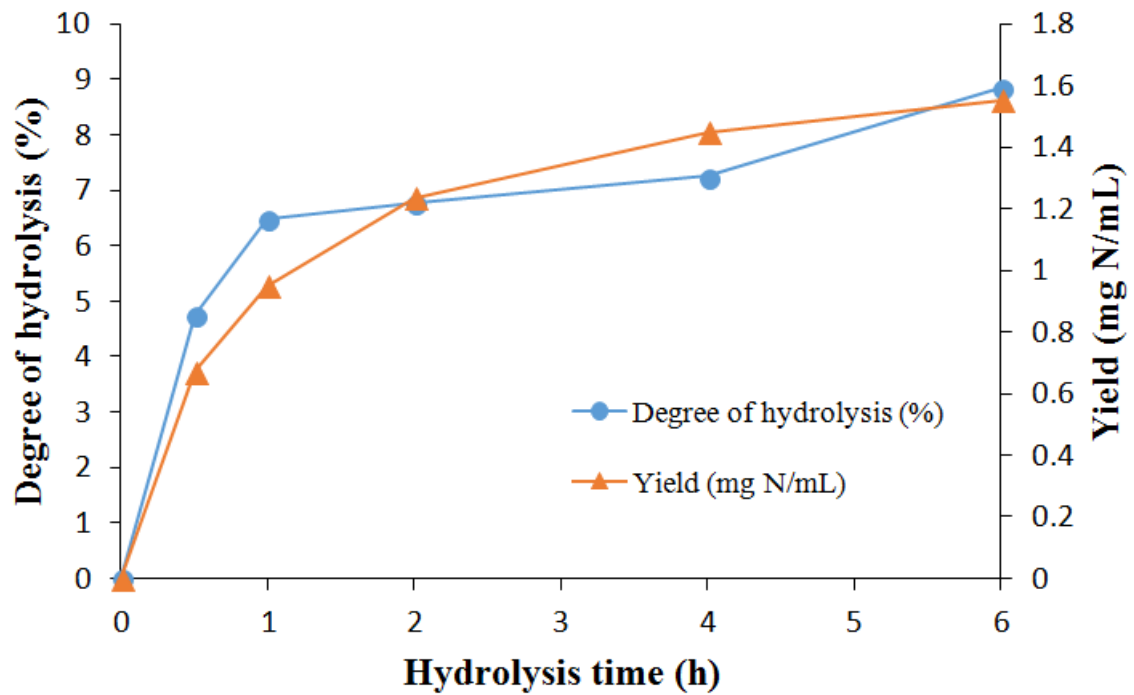
一、酵素水解時間對細胞免疫調節活性之影響

(一)、水解率及產量

研究指出蛋白質水解物水解程度的不同會影響其機能性(Jamdar *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010)，故本研究首先探討水解時間對 pepsin-分離大豆蛋白水解物(pepsin-isolated soy protein hydrolysate；P-ISP_H)水解率及產率之影響，分別於水解時間 0、0.5、1、2、4、6 h 取樣，各時間點所產生之水解物分別為 P-ISP_H0h、P-ISP_H0.5h、P-ISP_H1h、P-ISP_H2h、P-ISP_H4h 及 P-ISP_H6h。圖二十為 ISP 經 pepsin 水解後不同水解時間對水解率及產量之影響。結果顯示水解率及產量皆隨水解時間增加而上升，水解率於 6 h 達到 8.9%，產量於 6 h 達到 1.55 mg N/mL，但是水解率的高低並不一定與水解物的機能性有正相關，有時過度的水解可能會使機能性肽被破壞(Klompong *et al.*, 2007)，因此水解物的免疫調節能力仍需經後續細胞實驗確定。

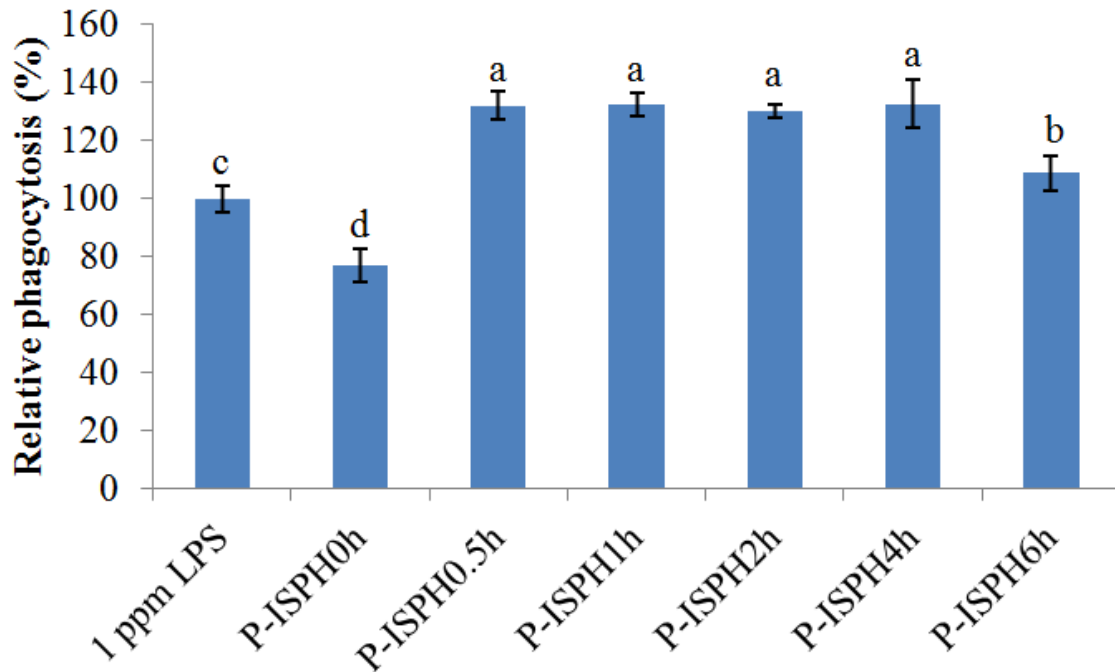
(二)、細胞免疫調節活性

實驗使用小鼠巨噬細胞 RAW264.7 作為體外免疫調節檢驗平台，測定其相對吞噬活性及 NO 生成量，圖二十一為 4000 ppm P-ISP_H 於不同水解時間對 Raw264.7 細胞相對吞噬活性之影響，結果顯示 P-ISP_H0.5h、P-ISP_H1h、P-ISP_H2h、P-ISP_H4h、P-ISP_H6h 與 P-ISP_H0h



圖二十、探討大豆分離蛋白(ISP)經 Pepsin 水解後不同水解時間對水解率及產率之影響

Fig. 20. Effect of different hydrolysis time of isolated soy protein (ISP) hydrolysate by pepsin on degree of hydrolysis and yield in terms of TCA soluble nitrogen.



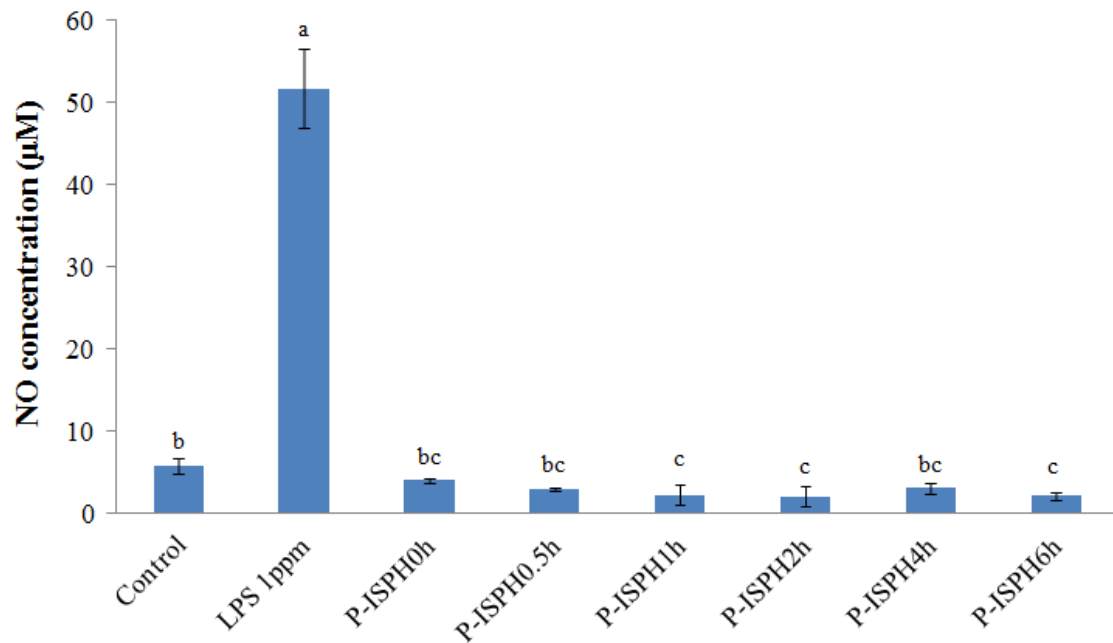
圖二十一、探討 4000 ppm P-ISP 於不同水解時間對 RAW264.7 細胞相對吞噬活性之影響

Fig. 21. Effect of 4000 ppm Pepsin-ISP (P-ISP) with different hydrolysis time on relative phagocytosis (%) in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

相比，能夠顯著($p < 0.05$)提升巨噬細胞之相對吞噬百分比，其中 P-ISP0.5h、P-ISP1h、P-ISP2h、P-ISP4h 對巨噬細胞之吞噬活性具有最高的提升能力，且彼此之間沒有顯著差異。但 P-ISP6h 刺激巨噬細胞之吞噬活性能力卻顯著低於 P-ISP0.5h、P-ISP1h、P-ISP2h 及 P-ISP4h，推測當水解時間超過 6 h 水解物中具刺激吞噬活性之免疫調節肽片段被過度水解而降低其免疫調節的能力。

圖二十二為 4000 ppm P-ISP 於不同水解時間對 Raw264.7 細胞 NO 生成量之影響。結果顯示 P-ISP0.5h、P-ISP1h、P-ISP2h、P-ISP4h 及 P-ISP6h 刺激巨噬細胞之 NO 生成量皆顯著低於 1 ppm LPS 陽性控制組，且除了 P-ISP1h、P-ISP2h、P-ISP6h 對於巨噬細胞之 NO 生成量顯著低於未加樣刺激之控制組以外，其餘水解物組別對巨噬細胞之 NO 生成量與控制組相比皆無顯著差異。此結果表示水解時間 0~6 h 之 P-ISP 於 4000 ppm 劑量下皆不具有刺激巨噬細胞產生發炎反應釋出 NO 的效果。

由圖二十至圖二十二的結果可得知 P-ISP0.5h、P-ISP1h、P-ISP2h、P-ISP4h 最具有刺激吞噬作用之活性，且其皆不會導致巨噬細胞產生發炎反應釋出大量 NO，其中又以 P-ISP4h 之產量為最高，具有作為免疫調節劑的潛力，故後續將以 P-ISP4h 進行濾膜區分探討 P-ISP4h 及其濾膜區分物對細胞免疫調節能力之影響。



圖二十二、探討 4000 ppm P-ISP 於不同水解時間對 RAW264.7 細胞 NO 生成量之影響

Fig. 22. Effect of 4000 ppm P-ISP with different hydrolysis time on NO concentration in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

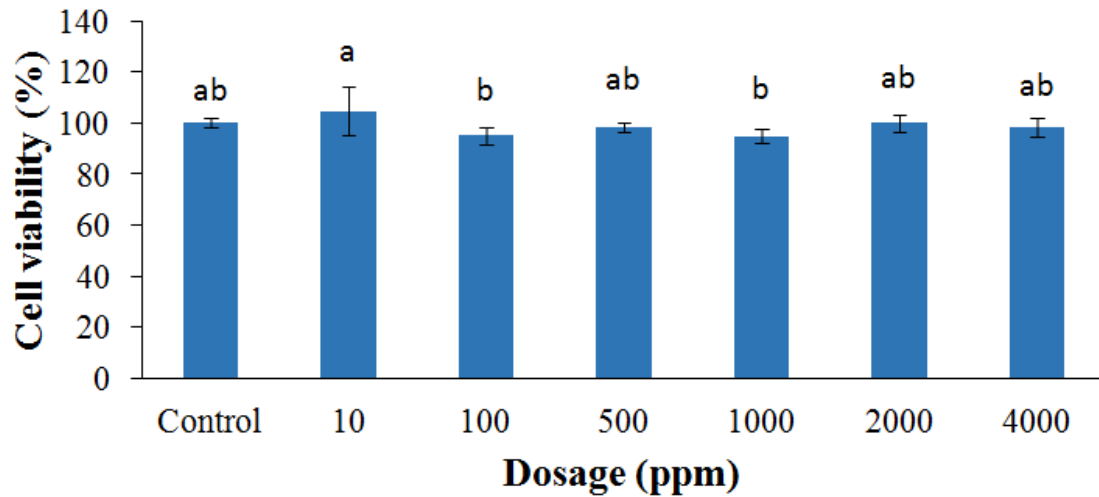
圖二十三為探討不同劑量 P-ISP4h 對 RAW264.7 細胞存活率之影響。結果顯示 P-ISP4h 除了在 10 ppm 劑量下與控制組相比對於細胞存活率有顯著提升，在 100~4000 ppm 劑量下與控制組相比對於細胞存活率之影響皆無顯著差異，表示 P-ISP4h 於 10~4000 ppm 劑量對於巨噬細胞不具有細胞毒性。

一、濾膜區分對細胞免疫調節活性之影響

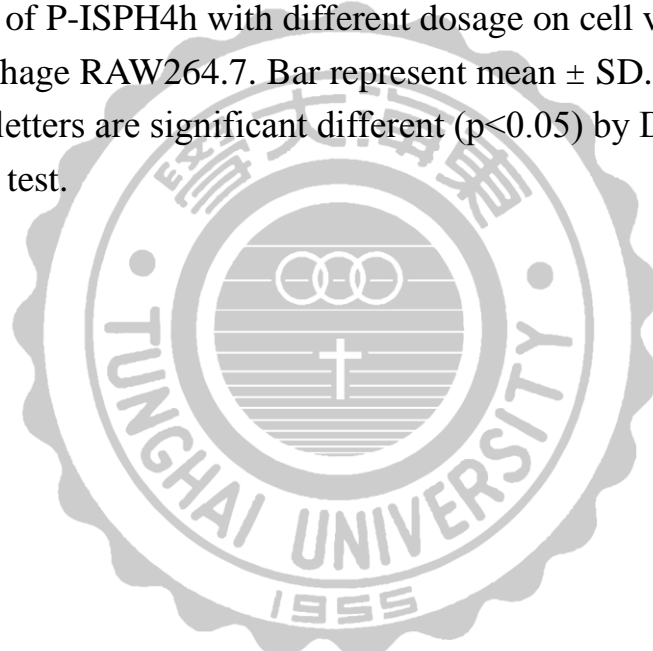
已有許多研究指出蛋白質酵素水解物經濾膜區分後可提升其機能性(Cheng *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2013; Tsou *et al.*, 2012)，為了進一步提升 P-ISP4h 之免疫調節機能性，本研究將 P-ISP4h 進行濾膜區分，分別以 30 kDa、10 kDa、1 kDa MWCO 捲式膜進行區分後，所得區分物分別為 30 kDa MWCO retentate (30R)、10 kDa MWCO retentate (10R)、1 kDa MWCO retentate (1R) 及 1 kDa MWCO permeate (1P)。實驗將分析區分物之分子量分布及回收率並進行體外細胞試驗探討區分物之免疫調節能力。

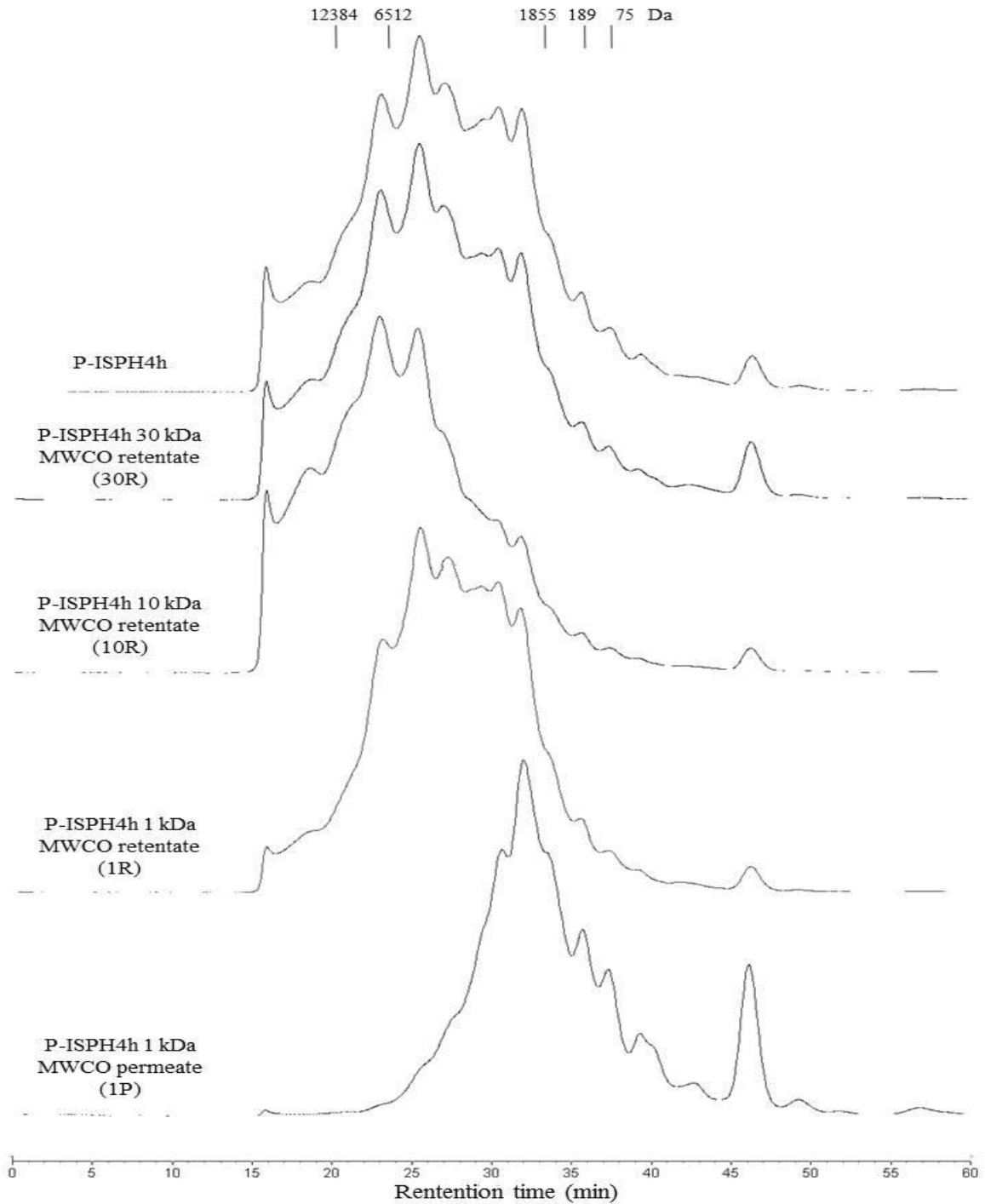
(一)、分子量分布及回收率

圖二十四為 P-ISP4h 經不同分子量限值濾膜區分後所得濃縮液及濾液之分子量分佈圖。標準品之分子量分別為 12,327 Da、6,512 Da、1,855 Da、189 Da 及 75 Da。由結果可得知不同 MWCO 之濾膜可將 P-ISP4h 依分子量有效區分。各區分物之回收率結果顯示於表三，



圖二十三、探討不同劑量 P-ISP4h 對 RAW264.7 細胞存活率之影響
 Fig. 23. Effect of P-ISP4h with different dosage on cell viability (%) in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.





圖二十四、P-ISP4h 經不同分子量限值濾膜區分後所得濃縮液及濾液之分子量分佈圖

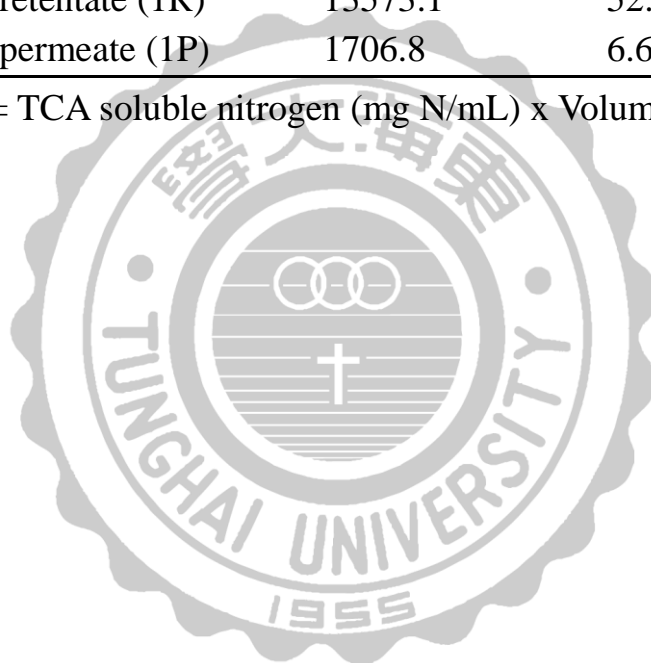
Fig. 24. The molecular weight distribution for retentates and permeate obtained from the fractionating P-ISP4h with different molecular weight cut-off (MWCO) membranes, P-ISP4h was sequentially filtered by a membrane module with 30 kDa, 10 kDa and 1 kDa retentate or permeate, respectively.

表三、探討 P-ISPH4h 經不同分子量限值濾膜區分後，各區分物(30 kD MWCO retentate、10 kD MWCO retentate、1 kD MWCO retentate、1 kD MWCO permeate)之產量及回收率

Table 3. The yield and recovery of P-ISPH4h and its retentates or permeates obtained from fractionation with different molecular weight cut-off membrane in membrane reactor system.

Sample	Yield (mg N)	Recovery (%)
P-ISPH4h	25936.6	100
30kDa MWCO retentate (30R)	795.0	3.1
10kDa MWCO retentate (10R)	9862.8	38.0
1kDa MWCO retentate (1R)	13573.1	52.3
1kDa MWCO permeate (1P)	1706.8	6.6

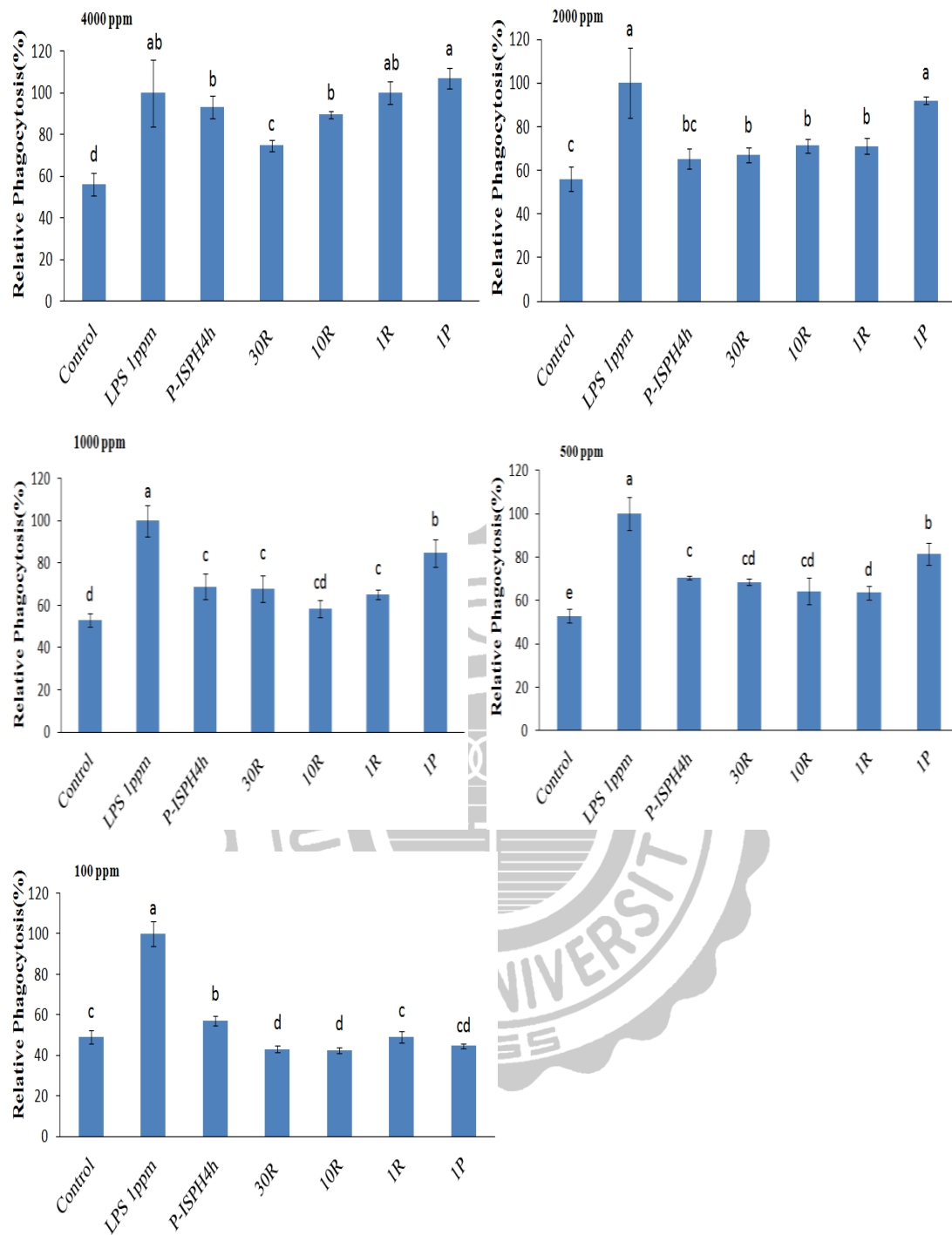
Yield (mg N) = TCA soluble nitrogen (mg N/mL) x Volumn (mL)



其中以 10R 及 1R 之回收率最高，分別為 38% 及 52%。先前有研究指出 pepsin-大豆蛋白水解物經濾膜區分後其胜肽片段主要集中於 1 kDa 以下，回收率約為 49.4% (歐，2014)，結果與本實驗不同之原因應為使用之膜過濾條件不同使殘留在濾膜中之濾液與保留液所導致。

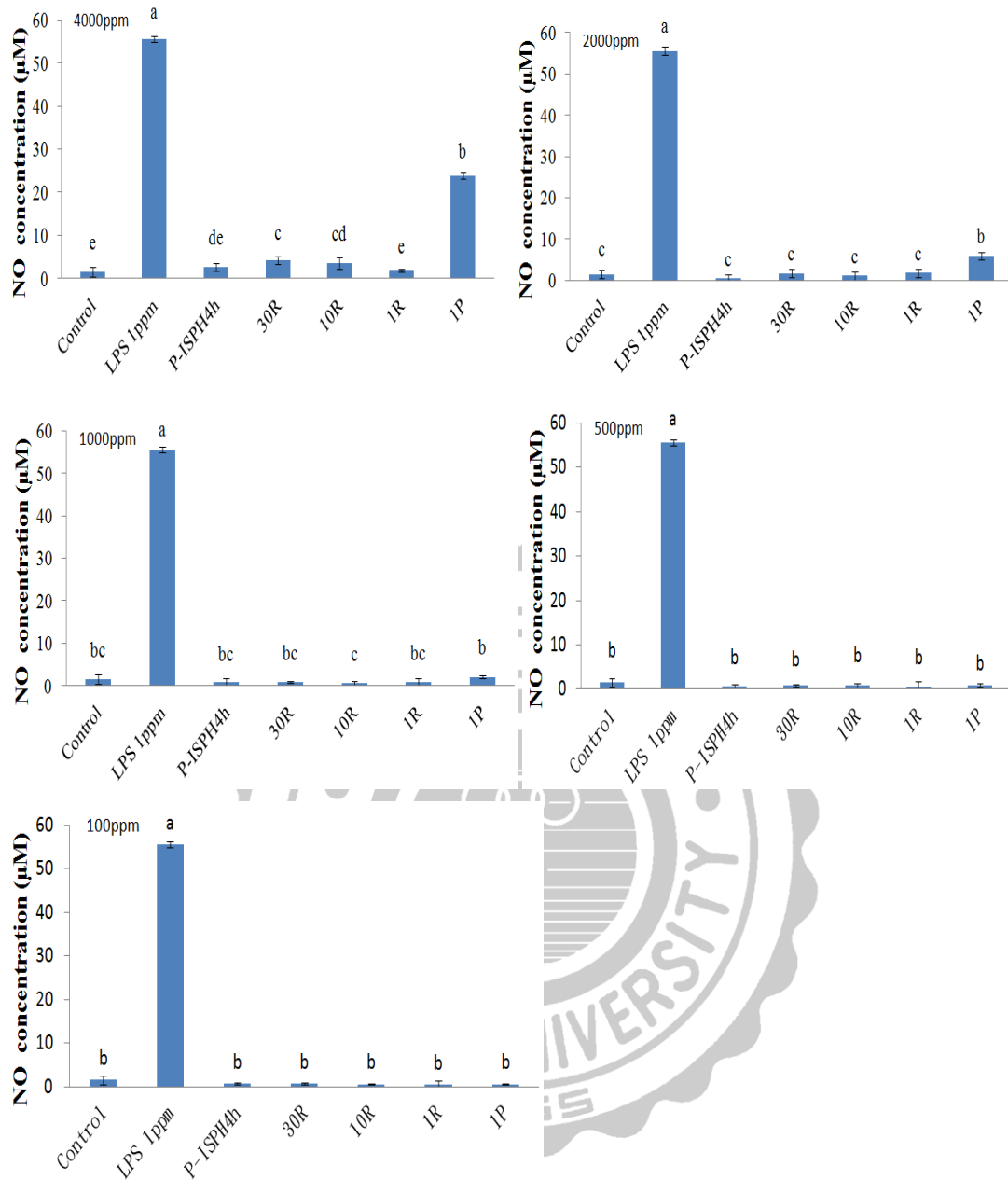
(二)、細胞免疫調節活性

為篩選出最具免疫調節活性之區分物，將 P-ISPH4h 及其區分物 30R、10R、1R 與 1P 進行巨噬細胞相對吞噬活性分析及 NO 生成量分析，劑量範圍為 100~4000 ppm。圖二十五為不同劑量 P-ISPH4h 及其濾膜區分物對 RAW264.7 細胞相對吞噬活性之影響。結果顯示劑量為 4000 ppm 時 P-ISPH4h、10R、1R、1P 與 1 ppm LPS 陽性對照組相比沒有顯著差異皆能提升細胞吞噬活性，而 500 ~2000 ppm 劑量所有組別與控制組相比皆能顯著提升細胞之吞噬活性，其中又以 1P 刺激之吞噬活性為最高。而當劑量為 100 ppm 以下時除了 P-ISPH4h 以外其餘濾膜區分物皆無法顯著提升吞噬活性。圖二十六為不同劑量 P-ISPH4h 及其濾膜區分物對 RAW264.7 NO 產生量之影響。結果顯示當劑量為 100~1000 ppm 時，所有組別之 NO 生成量與控制組相比皆無顯著差異，且顯著低於 1 ppm LPS 陽性對照組，表示此劑量範圍之樣品不會誘導細胞產生發炎反應。而當劑量為 2000~4000 ppm 時 1P 之 NO 生



圖二十五、探討不同劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物對 RAW 264.7 細胞相對吞噬活性之影響

Fig. 25. Effect of P-ISP4h and its retentates and permeate with different dosage on relative phagocytosis (%) in mouse macrophage RAW264.7. 30R: 30 kDa MWCO retentate; 10R: 10 kDa MWCO retentate; 1R: 1 kDa MWCO retentate; 1P: 1 kDa MWCO permeate. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖二十六、探討不同劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物對 RAW 264.7 NO 生成量之影響

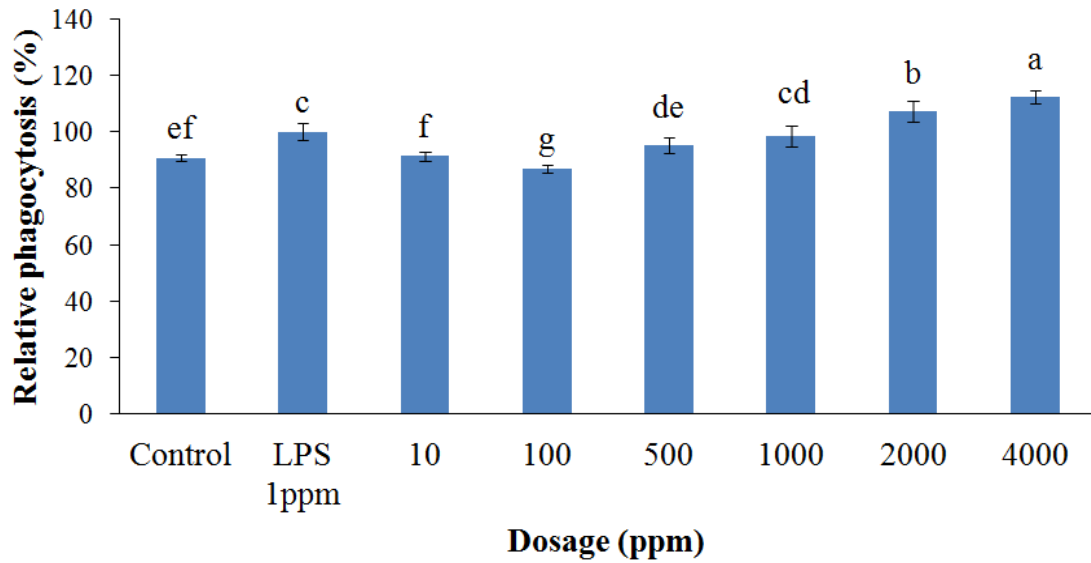
Fig. 26. Effect of P-ISP4h and its retentates and permeate with different dosage on NO concentration in mouse macrophage RAW264.7. 30R: 30 kDa MWCO retentate;10R: 10 kDa MWCO retentate;1R: 1 kDa MWCO retentate;1P: 1 kDa MWCO permeate.Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

成量顯著高於控制組，但仍顯著低於 1 ppm LPS 誘導之 NO 生成量。有研究指出適量之 NO 生成有助於免疫系統破壞腫瘤細胞及入侵病原(Zheng *et al.*, 2014)，因此 1P 於 2000 ppm 劑量以上之 NO 生成量增加並不完全會造成負面的發炎反應，適當的 NO 增加或許會提高先天性免疫對抗原的抵抗能力。

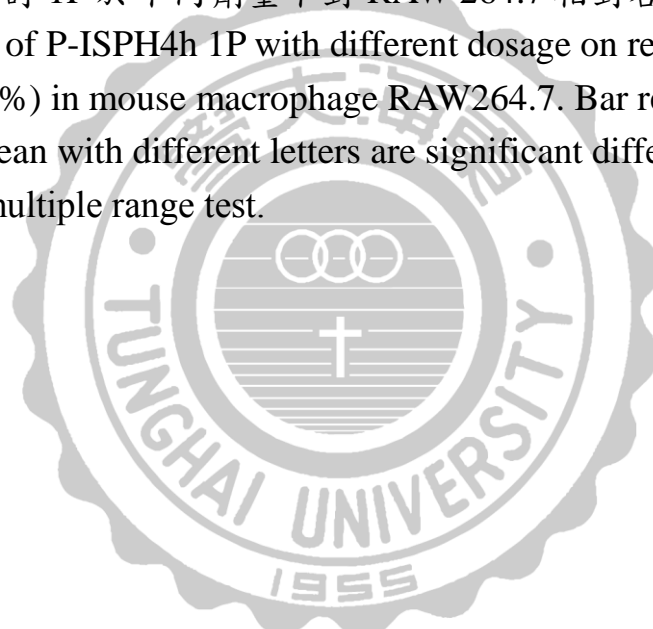
由圖二十五及圖二十六的結果可知濾膜區分物 1P 於 500~4000 ppm 劑量下最能顯著提升吞噬作用的活性，且其 NO 生成量顯著低於 1 ppm LPS 組別，表示促進吞噬的能力並非如 LPS 一樣刺激產生發炎反應，後續將針對不同劑量 1P 進行細胞實驗探討劑量對免疫調節活性之影響。

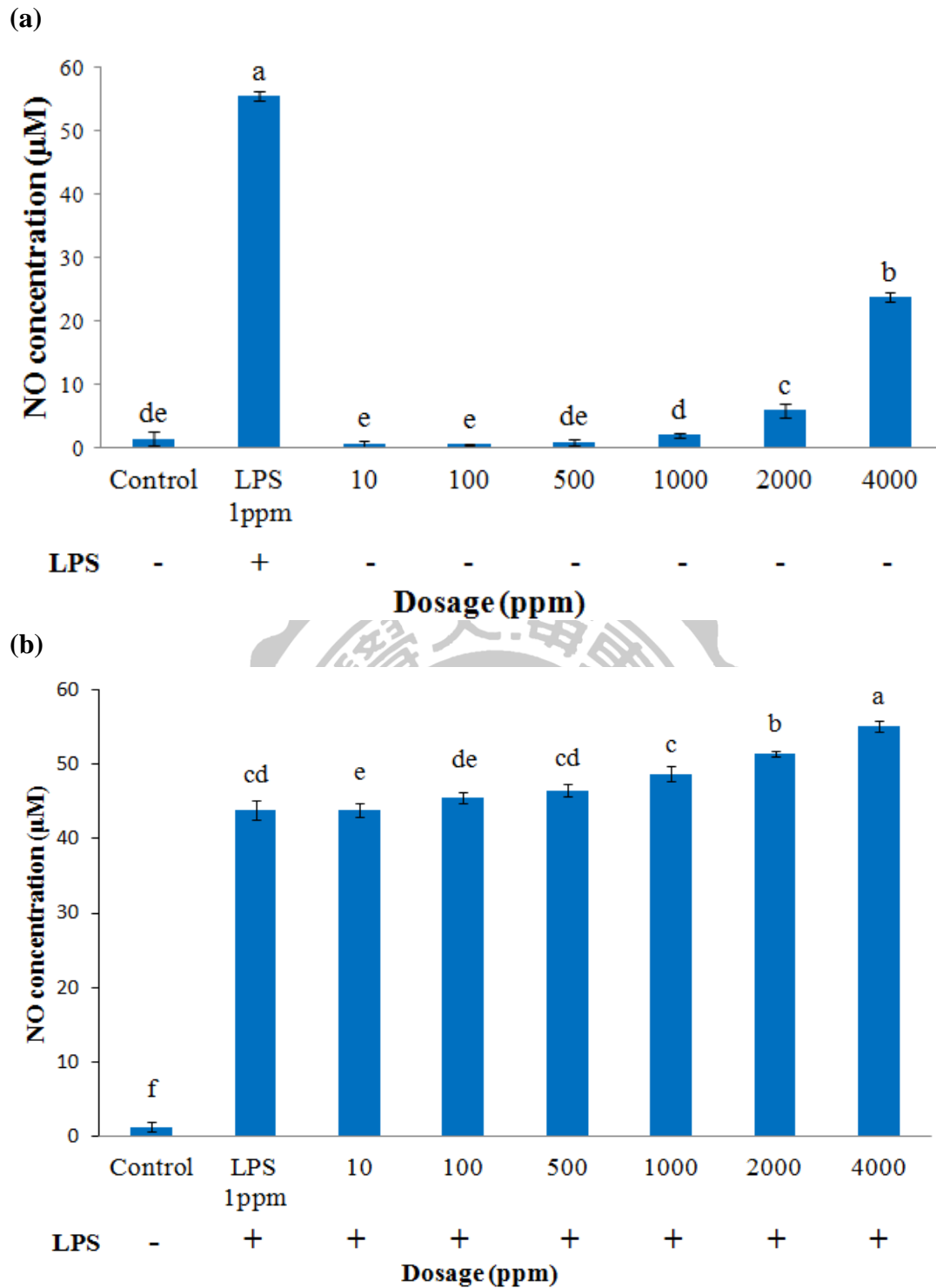
許多研究亦指出分子量低之短鏈胜肽較具有機能性，如菜籽蛋白水解物 1 kDa 濾液相較水解物能顯著增加抗氧化活性(He *et al.*, 2013)、大豆蛋白 1 kDa 保留液能顯著增加 3T3-L1 細胞促脂解活性(Tsou *et al.*, 2012)等。

圖二十七為 1P 於不同劑量下對 RAW 264.7 相對吞噬活性之影響。結果顯示 1P 劑量於 1000 ppm 以上與控制組相比能夠顯著提升細胞之吞噬活性，且隨著劑量增加其促進細胞吞噬的能力也越高。為進一步確認 1P 是否具有抑制發炎反應的效果，將探討 1P 與 LPS 共培養對細胞 NO 生成量之影響。圖二十八為不同劑量 1P 於(a)無(b) 有 1 ppm



圖二十七、探討 1P 於不同劑量下對 RAW 264.7 相對吞噬活性之影響
 Fig. 27. Effect of P-ISP4h 1P with different dosage on relative phagocytosis (%) in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



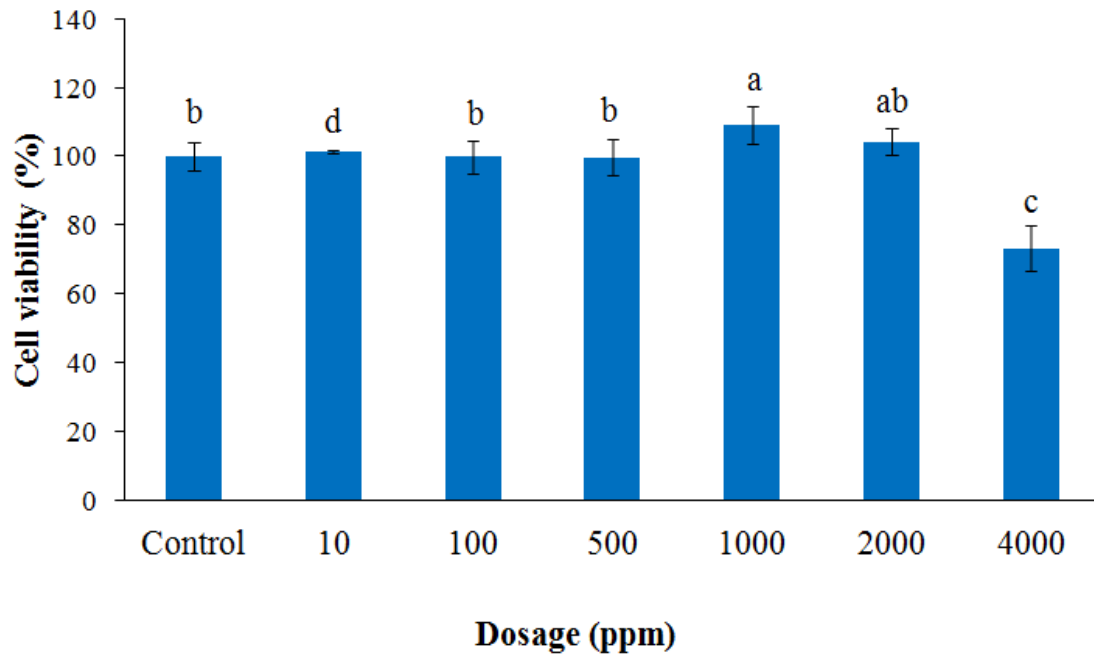


圖二十八、探討不同劑量 1P 於(a)無(b)有 1 ppm LPS 共培養時對 RAW264.7 NO 生成量之影響

Fig. 28. Effect of P-ISP4h 1P (a) without or (b) with 1 ppm LPS induced and with different dosage on NO concentration in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

LPS 共培養時對 RAW264.7 NO 產生量之影響，結果顯示 1P 與 1 ppm LPS 共培養時，當劑量高於 2000 ppm 以上，NO 生成量與未加入樣品之 LPS 組相比會顯著增加，且 NO 生成量也隨著 1P 劑量增加而提升，表示 10~4000 ppm 劑量下 1P 雖然不會引起嚴重的發炎反應但對於 LPS 誘導的發炎反應不具有抑制的效果。而為確認 1P 在刺激吞噬活性的同時是否具有細胞毒性，將針對 1P 進行細胞存活率進行分析。圖二十九為不同劑量 1P 對 RAW 264.7 細胞存活率之影響。結果顯示 1P 於 2000 ppm 劑量以下時之細胞存活率與控制組相比皆無顯著降低，表示 1P 於 2000 ppm 劑量以下不具有細胞毒性。但當劑量達到 4000 ppm 時細胞存活率與控制組相比即有顯著降低，推測應該是 4000 ppm 劑量之濃度過高使細胞培養環境之滲透壓提升而導致。綜合圖二十七至二十九的結果，可知 1P 於 2000 ppm 時能顯著增加細胞吞噬活性，且不會產生大量 NO 引起發炎反應也不會具有細胞毒性。

由於發炎反應時細胞會釋出大量 IL-6，促使細胞分泌大量 NO 並活化巨噬細胞進行吞噬作用(Minato & Abe, 2013)，而 IL-10 則具有抑制發炎的效果，能降低細胞產生 NO 及促發炎細胞激素(Asadullah *et al.*, 2003)，因此為了解 1P 對免疫調節的機制，實驗將對 IL-6 及 IL-10 生成量進行分析。

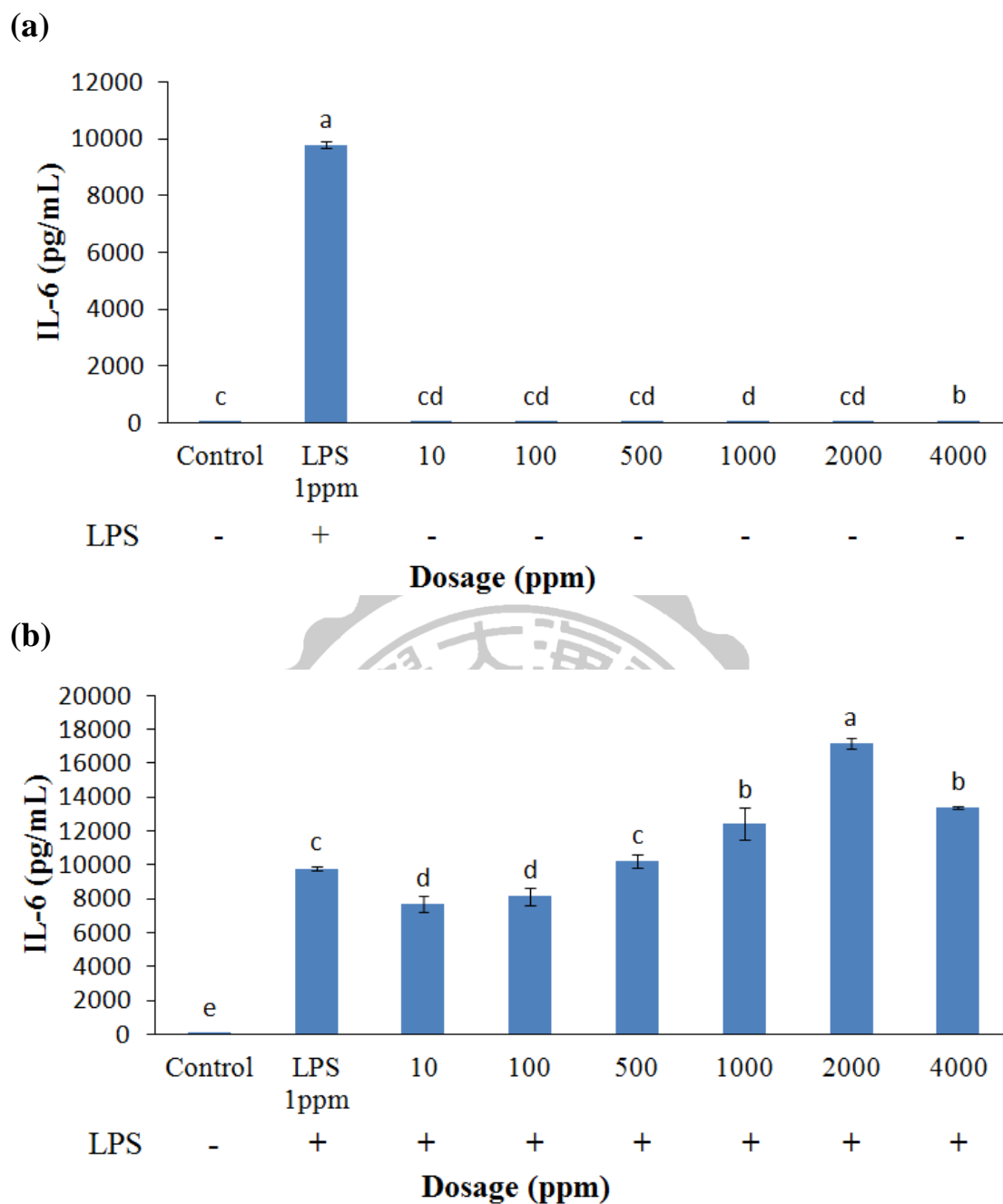


圖二十九、探討不同劑量 1P 對 RAW 264.7 細胞存活率之影響

Fig. 29. Effect of P-ISPH4h 1P (a) without or (b) with 1ppm LPS induced and with different dosage on cell viability (%) in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

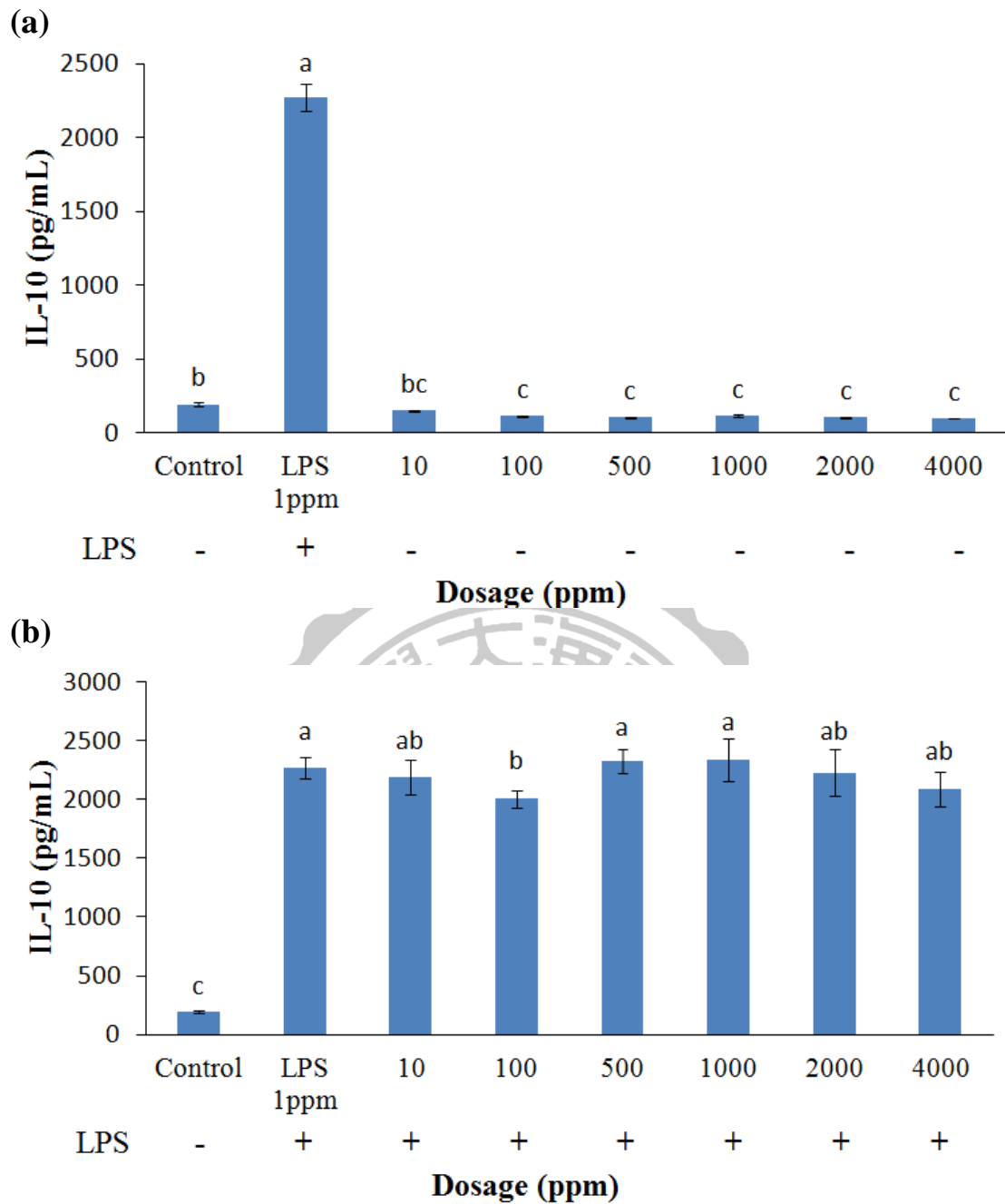
圖三十為不同劑量 1P 於(a)無(b)有 1 ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-6 產生量之影響。結果顯示 1P 在沒有與 LPS 共培養時，於 10~4000 ppm 劑量對細胞 IL-6 生成量皆顯著低於 1 ppm 陽性對照組，僅於 4000 ppm 劑量下對 IL-6 生成量顯著高於控制組，此結果與圖二十八(a)相似，表示 1P 於 2000~4000 ppm 不會大量產生促發炎細胞激素 IL-6 以及具有細胞毒性的 NO。而在 1P 與 LPS 共培養的情況下，1P 於 1000 ppm 以上對 IL-6 生成量皆顯著高於 1 ppm LPS 陽性對照組，表示 1P 對於 LPS 誘導之發炎反應不具有抑制作用，其中在 4000 ppm 時 IL-6 生成量出現降低的結果，此現象應來自 4000 ppm 之高濃度使細胞存活率下降所導致(圖二十九)。有研究顯示鯊魚衍生蛋白水解物具有增強腸上皮細胞之免疫功能，但同時也會造成 IL-6 的生成量顯著增加，但 IL-6 之生成量同樣也低於 LPS 陽性對照組，表示水解物不造成嚴重發炎反應(Mallet *et al.*, 2014)。

圖三十一為不同劑量 P-ISPH4h 1P 於(a)無(b)有 1 ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-10 產生量之影響。結果顯示 1P 在沒有與 LPS 共培養時，於 10~4000 ppm 劑量下對於 IL-10 生成量皆顯著低於 1 ppm LPS 陽性對照組，且僅在 1P 於 10 ppm 劑量下與控制組相比 IL-10 生成量無顯著差異，其餘劑量組別之 IL-10 生成量皆顯著低於控制組。當細胞過度產生發炎反應時，為了調節適當的發炎反應巨



圖三十、探討不同劑量 1P 於(a)無(b)有 1 ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-6 生成量之影響

Fig. 30. Effect of P-ISP4h 1P (a)without or (b)with 1 ppm LPS induced and with different dosages on IL-6 production in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖三十一、探討不同劑量 1P 於(a)無(b)有 1ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-10 產生量之影響

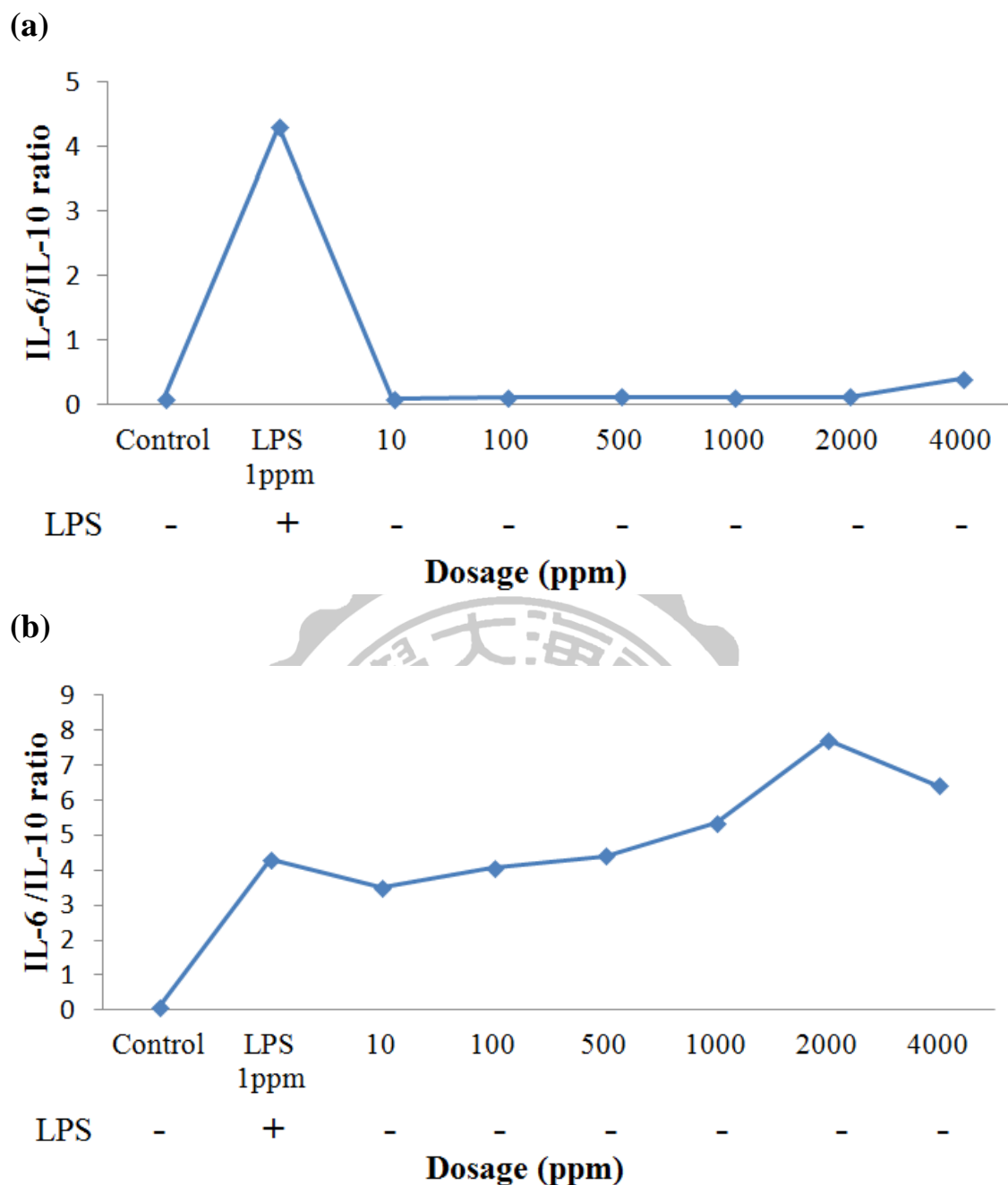
Fig. 31. Effect of P-ISP4h 1P (a)without or (b)with 1ppm LPS induced and with different dosages on IL-10 production in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

噬細胞會產生 IL-10 以抑制其他細胞促發炎細胞激素的產生，故 1P 於 10~4000 ppm 劑量皆不會造成 IL-10 顯著增加表示細胞並沒有產生嚴重的發炎反應。而 1P 在與 LPS 共培養的情況下，除了 1P 於 100 ppm 劑量之 IL-10 生成量顯著低於 1 ppm LPS 陽性對照組，其餘劑量組別與 LPS 組相比 IL-10 生成量皆無顯著差異，表示 1P 對 LPS 所誘導之發炎反應不具有抑制效果。

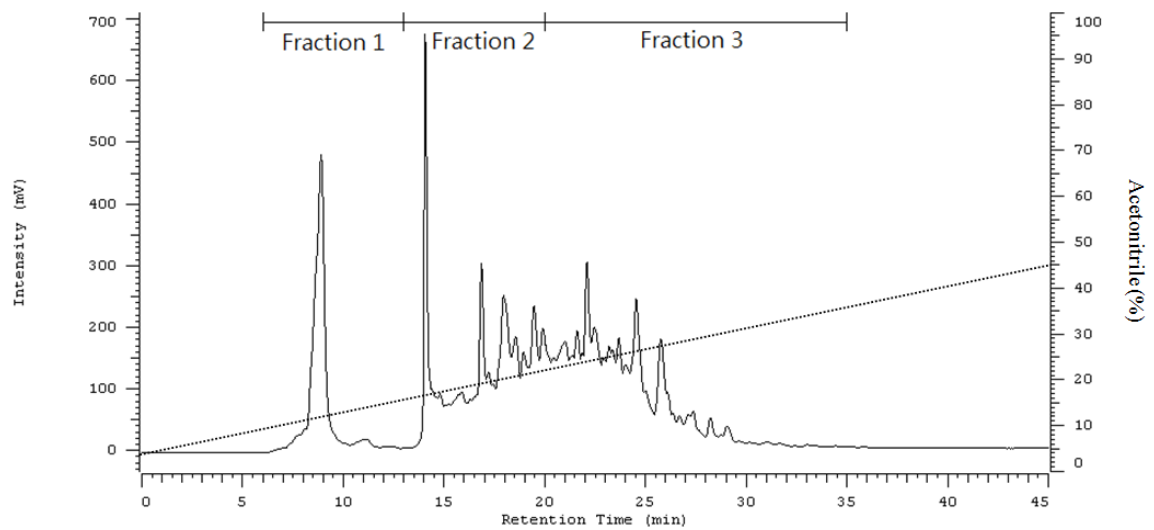
圖三十二為不同劑量 1P 於(a)無(b)有 1ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 細胞激素 IL-6 與 IL-10 比值之影響，比值愈高表示細胞愈趨向發炎反應，此結果更進一步證明 1P 對於 LPS 誘導之發炎反應不具有抑制的效果(圖 b)，但也不會直接引起巨噬細胞產生嚴重發炎反應(圖 a)。後續實驗將以 1P 進行逆相層析區分，收集區分物進行小鼠體內試驗分析區分物之免疫調節能力，並鑑定區分物中免疫調節肽之序列以了解其免疫調節機制。

三、逆向管柱層析區分物對小鼠免疫調節活性之影響

經過濾膜區分後，以 1P 最具有促進細胞吞噬作用之免疫調節能力，故以 1P 進行逆相管柱層析，利用 1P 中胜肽片段極性之不同進行區分，並將管柱區分物進行小鼠體內試驗，以篩選最具免疫調節活性之區分物進行 LC-MS/MS 鑑定其中免疫調節肽序列。圖三十三為 1P 之高效能逆相層析圖譜，依圖譜訊號區分為三個部份，分別於滯留時



圖三十二、探討不同劑量 1P 於(a)無(b)有 1ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 細胞激素 IL-6 與 IL-10 比值之影響
 Fig. 32. Effect of P-ISP4h 1P (a)without or (b)with 1ppm LPS induced and with different dosages on IL-6 /IL-10 ratio in mouse macrophage RAW264.7.



圖三十三、1P 之高效能逆相層析圖譜

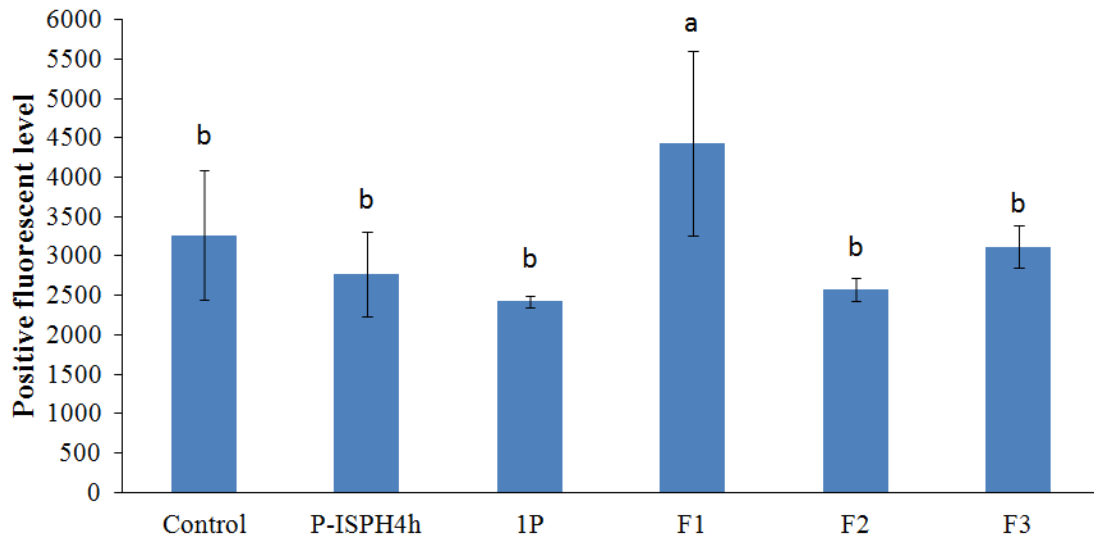
Fig. 33. Reverse phase high-performance liquid chromatography of P-ISPH4h 1P.



間 6~14 min 收集為 Fraction 1 (F1)、滯留時間 14~21 min 收集為 Fraction 2 (F2)及滯留時間 21~35 min 收集為 Fraction 3 (F3)。

研究指出中性顆粒球通常是最快速抵達感染區域的免疫細胞，且其夠產生之抗微生物分子亦比巨噬細胞更為豐富，但其細胞壽命短往往限制了中性顆粒球的免疫能力，因此其需要與細胞壽命較長之巨噬細胞互相協助，中性顆粒球可釋出一些巨噬細胞無法合成之抗菌物質如乳鐵蛋白，巨噬細胞也可藉由攝入凋亡之中性顆粒球而增強其吞噬活性，因此對急性感染的抵抗力強弱便取決於中性顆粒球及巨噬細胞之免疫活性(Appelberg, 2007)，而保健食品之免疫調節功能評估中，對非特異性免疫力之調節評估就包括中性顆粒球及巨噬細胞的吞噬能力，因此本研究之小鼠體內免疫調節試驗將會測定中性顆粒球及巨噬細胞的吞噬能力。

圖三十四為探討 5 mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆向層析區分物對小鼠體內脾臟中巨噬細胞吞噬活性之影響，若陽性螢光級數愈高代表細胞之吞噬活性越高，結果顯示 F1 與所有組別相比能夠顯著提升脾臟巨噬細胞之，而 F2 及 F3 與控制組相比陽性螢光級數則無顯著差異，表示 F1 於 5 mg/kg 劑量下能顯著增加脾臟巨噬細胞之吞噬活性。



圖三十四、探討 5 mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆向層析區分物對小鼠體內脾臟中巨噬細胞吞噬活性之影響

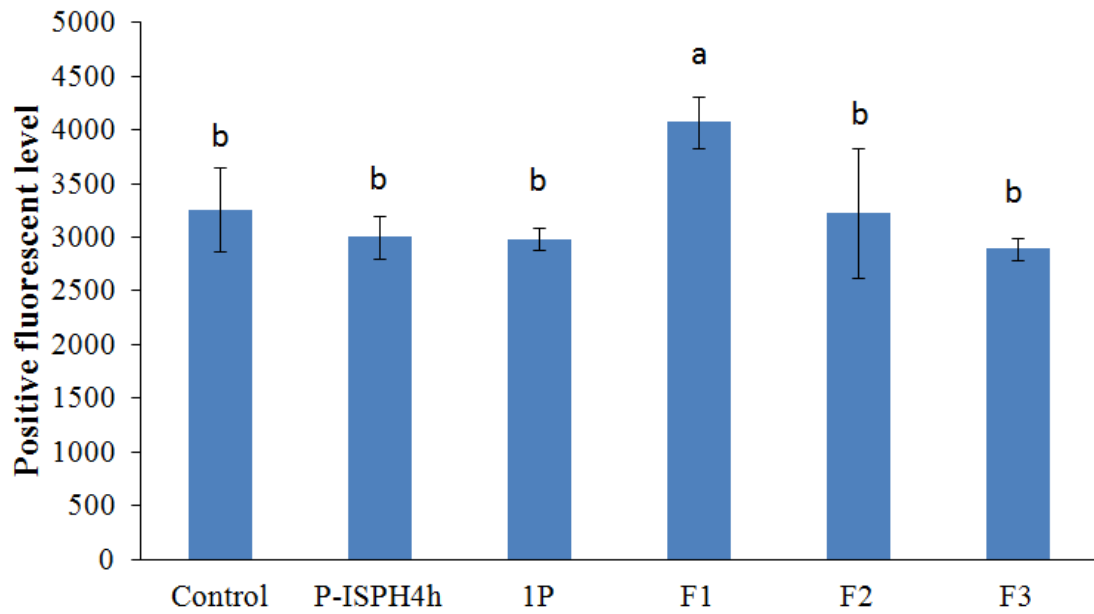
Fig. 34. Effect of P-ISP4h, 1P and its reverse phase chromatography fractions on positive fluorescent level in mouse macrophage from spleen in vivo. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

圖三十五為探討 5 mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆向層析區分物對小鼠體內脾臟中中性顆粒球細胞吞噬活性之影響，結果同樣顯示 F1 與所有組別相比能夠顯著提升脾臟中性顆粒球之陽性螢光級數，且 F2 及 F3 與控制組相比陽性螢光級數也無顯著差異，綜合圖三十四至圖三十五結果可知在 5 mg/kg 劑量下之管柱區分物中僅有 F1 於能夠提升巨噬細胞及中性顆粒球之吞噬活性。

因 M1 巨噬細胞之表面帶有 CD68 及 CD197 表面抗原，而 M2 巨噬細胞之表面帶有 CD68 及 CD206 表面抗原(Shono *et al.*, 2013)，因此可利用螢光物質連結抗體與細胞表面抗原結合後分析其螢光訊號，若呈現 CD68⁺/CD197⁺則為 M1 形態，呈現 CD68⁺/CD206⁺則為 M2 型態，其中陽性細胞百分比越高表示樣品越能刺激細胞向特定型態極化。

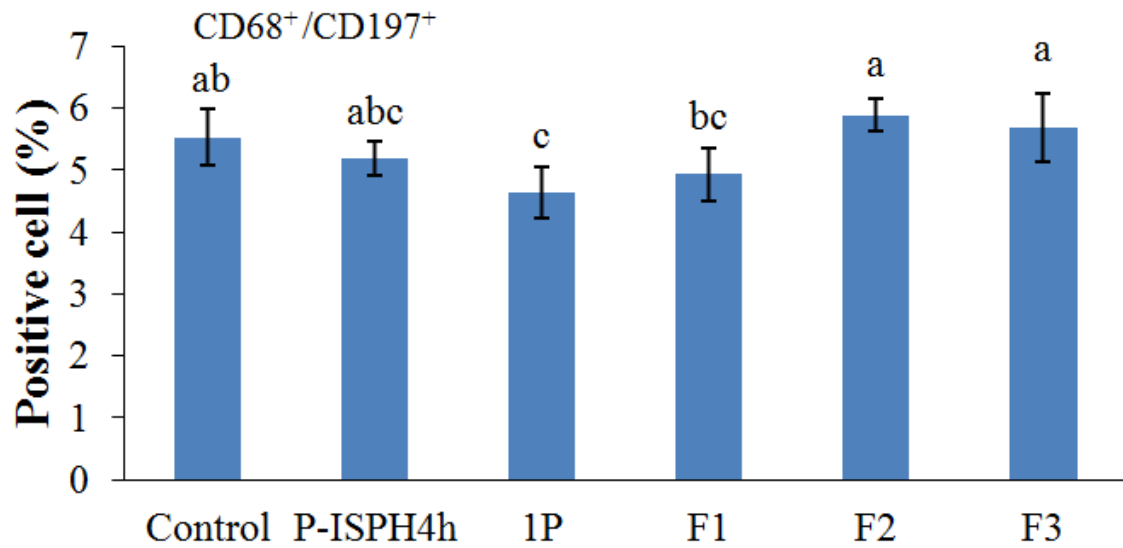
圖三十六為探討 5 mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆相層析區分物對小鼠體內脾臟中巨噬細胞 M1 表型極化之影響，結果顯示除了 1P 之陽性細胞百分比與控制組相比具有顯著降低的結果外，其餘組別之陽性細胞百分比與控制組相比並無顯著差異，表示 P-ISP4h、1P 及 F1 雖然能提升細胞吞噬活性，但其免疫調節效果並非來自刺激細胞向 M1 極化。

圖三十七為探討 5 mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆相層



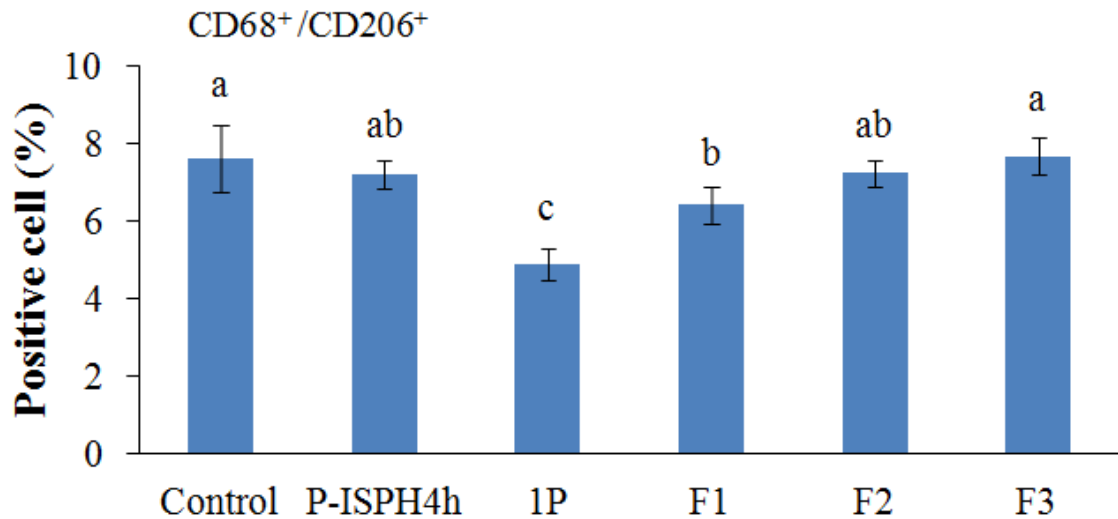
圖三十五、探討 5 mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆向層析區分物對小鼠體內脾臟中中性顆粒球細胞吞噬活性之影響

Fig. 35. Effect of P-ISP4h, 1P and its reverse phase chromatography fractions on positive fluorescent level in mouse neutrophil from spleen in vivo. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖三十六、探討 5 mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆相層析區分物對小鼠體內脾臟中巨噬細胞 M1 表型極化之影響

Fig. 36. Effect of 5 mg/kg P-ISP4h, 1P and its reverse phase chromatography fractions on M1 phenotype polarization in mouse macrophage from spleen in vivo. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



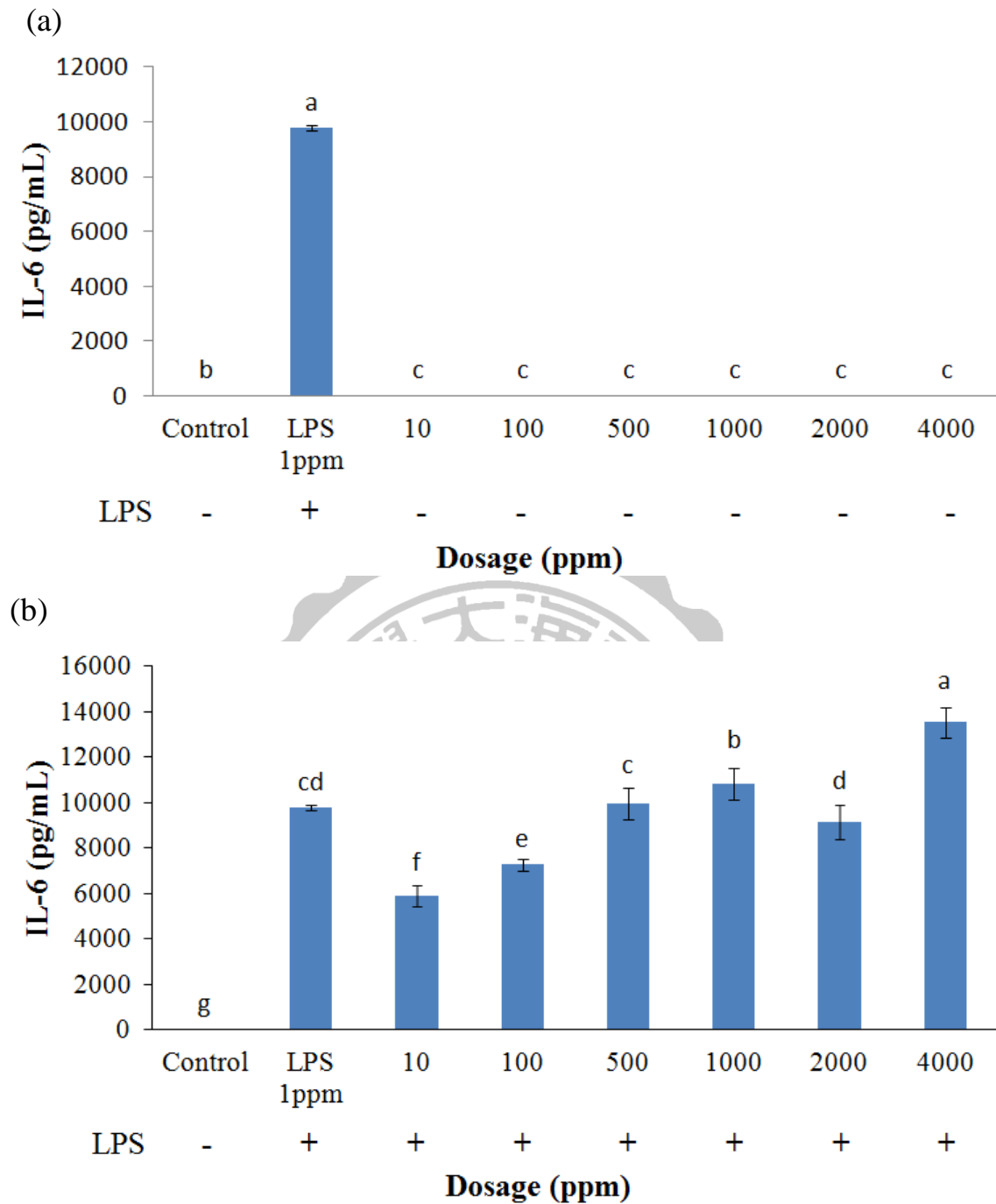
圖三十七、探討 5 mg/kg 劑量 P-ISP4h 及其濾膜區分物及逆相層析區分物對小鼠體內脾臟中巨噬細胞 M2 表型極化之影響

Fig. 37. Effect of 5 mg/kg P-ISP4h, 1P and its reverse phase chromatography fractions on M2 phenotype polarization in mouse macrophage from spleen in vivo. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

析區分物對小鼠體內脾臟中巨噬細胞 M2 表型極化之影響，結果顯示 1P 及 F1 之陽性細胞百分比與控制組相比皆顯著降低，而 P-ISPH4h、F2 及 F3 之陽性細胞百分比與控制組相比皆無顯著差異，表示 5 mg/kg 劑量下 P-ISPH4h、1P 及管柱區分物同樣不會刺激巨噬細胞向 M2 表型極化，而不具有抗發炎之活性。為了解 F1 之免疫調節機制，實驗將以 RAW264.7 進行體外細胞實驗對 F1 刺激促發炎細胞激素 IL-6 及抗發炎細胞激素 IL-10 生成量進行分析。

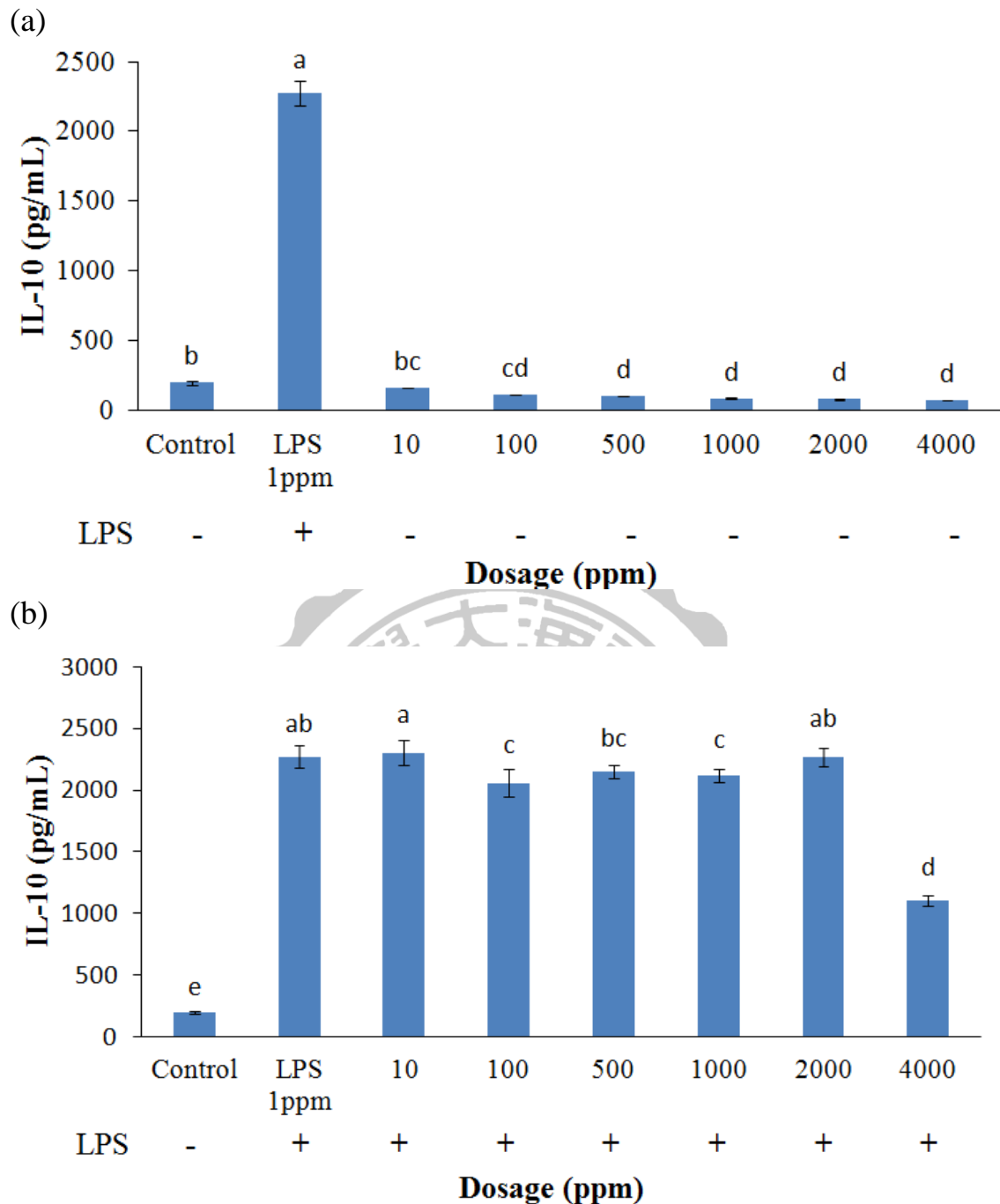
圖三十八為探討不同劑量 F1 於(a)無(b)有 1 ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-6 產生量之影響。結果顯示 F1 在沒有 LPS 共培養時，F1 於 10~4000 ppm 劑量之 IL-6 生成量皆顯著低於 1 ppm LPS 陽性對照組及控制組，這表示 F1 於此劑量範圍不會刺激 IL-6 產生而導致發炎反應。而 F1 與 LPS 共培養的情況下，IL-6 生成量基本上隨著劑量增加而上升，除了在 10 及 100 ppm 劑量對細胞之 IL-6 生成量與 1 ppm LPS 相比具有顯著降低之外，其餘劑量對細胞之 IL-6 生成量則無顯著差異或顯著提高。表示 F1 僅於 100 ppm 劑量以內具有抑制 LPS 誘導之 IL-6 生成，但在高劑量卻反而會使細胞生成更多的 IL-6 而無法抑制發炎。

圖三十九為探討不同劑量 F1 於(a)無(b)有 1ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-10 產生量之影響。結果顯示 F1 在沒有 LPS



圖三十八、探討不同劑量 F1 於(a)無(b)有 1 ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-6 產生量之影響

Fig. 38. Effect of F1 (a)without or (b)with 1 ppm LPS induced and with different dosages on IL-6 production in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



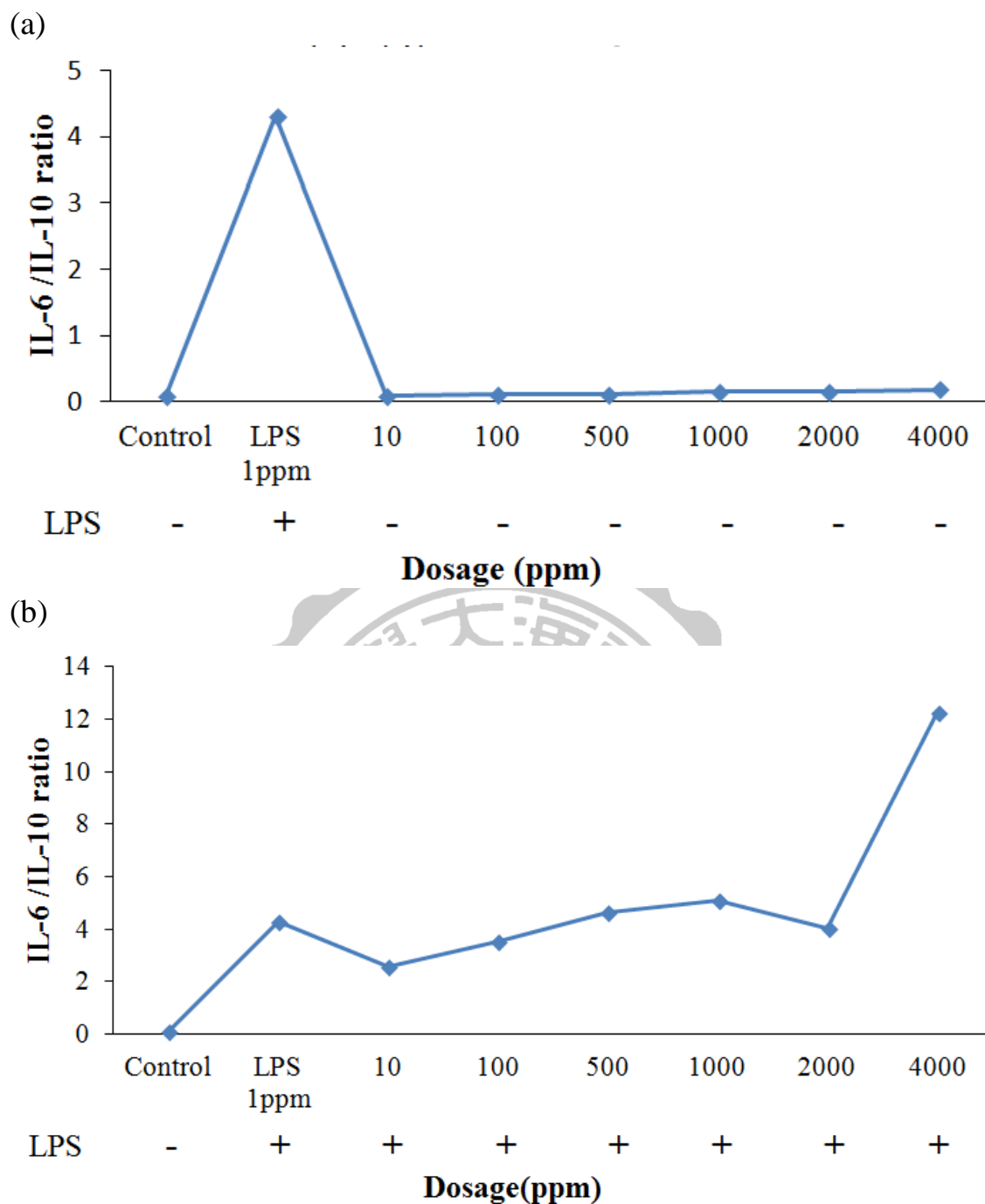
圖三十九、探討不同劑量 F1 於(a)無(b)有 1 ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 之細胞激素 IL-10 產生量之影響

Fig. 39. Effect of F1 (a)without or (b)with 1 ppm LPS induced and with different dosages on IL-10 production in mouse macrophage RAW264.7. Bar represent mean \pm SD. N=3. Mean with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

共培養時，除了 10 ppm 劑量對細胞之 IL-10 生成量與控制組相比沒有顯著差異，其餘劑量細胞之 IL-10 生成量與控制組相比皆顯著降低，表示 F1 會抑制 IL-10 的生成而不具有抗發炎之功效。在 F1 與 LPS 共培養的情況下，除了 100、1000 及 4000 ppm 劑量組顯著降低細胞 IL-10 之生成量，其餘組別之 IL-10 生成量與 1 ppm 陽性對照組相比皆無顯著差異，這表示 F1 對於 LPS 誘導之發炎反應不具有抑制的效果。另外 4000 ppm 劑量造成細胞 IL-10 顯著下降的原因，可能與圖三十之結果類似，推測應為高劑量造成細胞毒性使 IL-10 生成量降低。

圖四十為不同劑量 F1 於(a)無(b)有 1 ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 細胞激素 IL-6 與 IL-10 比値之影響，比値愈高表示細胞愈趨向發炎反應，結果顯示 F1 與 1P 同樣無法抑制 LPS 所誘導之發炎反應(圖 b)，但 F1 於 10~4000 ppm 劑量皆不會造成 IL-6 /IL-10 比値急遽上升，表示 F1 不會造成細胞過度發炎反應。

綜合圖三十四至四十可得知 1P 之管柱區分物中，F1 能夠顯著提升脾臟巨噬細胞及中性顆粒球之吞噬作用，且不會使促發炎細胞激素 IL-6 增加，但其僅在低劑量具有抑制 LPS 誘導之 IL-6 之生成，也無法提升 LPS 誘導的發炎反應中產生的抗發炎細胞激素 IL-10，且 F1

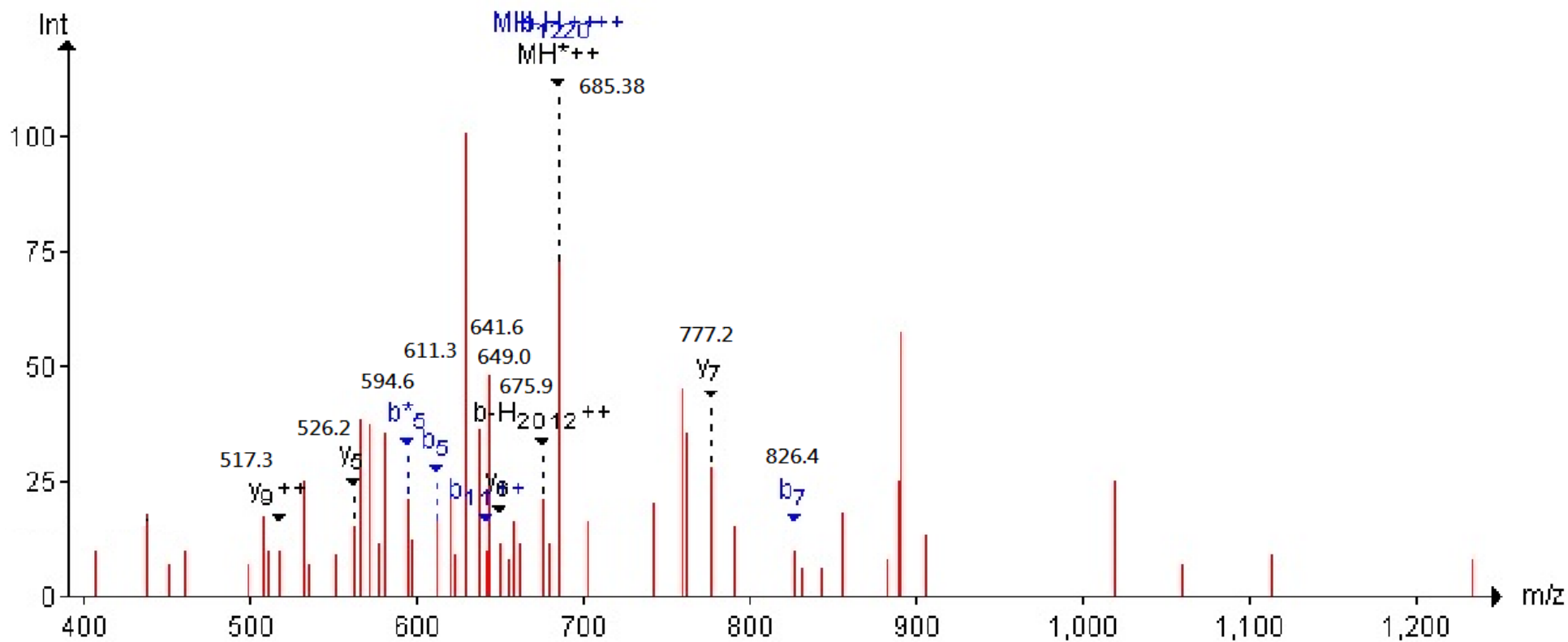


圖四十、探討不同劑量 F1 於(a)無(b)有 1 ppm LPS 共培養時對 RAW 264.7 細胞激素 IL-6 與 IL-10 比值之影響

Fig. 40. Effect of F1 (a)without or (b)with 1 ppm LPS induced and with different dosages on IL-6 /IL-10 ratio in mouse macrophage RAW264.7.

四、胜肽序列鑑定

為了得知 F1 中促吞噬活性之免疫調節肽的胺基酸序列，本實驗將 F1 以 LC-MS/MS 進行鑑定，所得質譜訊號以資料庫比對後，得到五個可信度最高之胜肽序列片段，分別為 EKPQQSSRRGS、TGDEPVVAISLLDTSNFNNQ、VVNCQGNAVFDGEL、NNLNALEPDHRVESEGGL 及 VVQGKGAIGFAFP，先前已有研究指出帶正電荷之胜肽較具有免疫調節之機能性(Hou *et al.*, 2012; Jacquot *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2008; Mercier *et al.*, 2004)，因此本研究選擇帶正電荷側鏈胺基酸較多之胜肽序列 EKPQQSSRRGS，圖四十一為胜肽序列 EKPQQSSRRGS 之質譜圖。此胜肽序列委託曜鴻生技公司進行合成，後續將以合成肽進行小鼠體內實驗分析胜肽片段之免疫調節功效以進一步了解其調節機制。



圖四十一、胜肽序列 EKPQQSSRRGS 之質譜圖

Fig. 41. The mass spectrum of peptide sequence EKPQQSSRRGS

伍、結論

本研究利用 pepsin 水解大豆分離蛋白探討水解物中胜肽之免疫調節活性，實驗首先探討不同水解時間對 P-ISPH 水解率及產量之影響，結果顯示水解率及產量皆隨水解時間增加而上升，兩者皆於 6 h 時達到最高，水解率於 6 h 時為 8.9%，產量於 6 h 時為 1.55 mg N/mL。接著探討不同水解時間對 P-ISPH 免疫調節活性之影響，結果顯示在 P-ISPH 濃度為 4000 ppm 下，水解時間為 0.5~4 h 時最能夠顯著增加巨噬細胞吞噬活性，且不會顯著增加 NO 生成量而導致發炎反應。綜合產量與免疫調節能力評估之結果，初步篩選出最具有促吞噬活性且產量最高之 P-ISPH4h 作為濾膜區分的對象。接著將 P-ISPH4h 進行 30 kDa、10 kDa 及 1 kDa 濾膜區分後，分析區分物之產量、回收率、分子量分佈及免疫調節活性。結果顯示 1P 在 1000~4000 ppm 劑量皆能顯著提升吞噬活性，且 NO 及 IL-6 生成量皆顯著低於 1 ppm LPS 陽性對照組而不會引起過度發炎反應，但 1P 之劑量若超過 2000 ppm 以上可能會因滲透壓過高導致細胞存活率顯著降低，且 1P 對於 LPS 誘導之發炎反應不具有抑制之功效。1P 之回收率為 6.6%，分子量分佈約小於 6 kDa。

將 1P 以逆向高相液相層析管柱區分，分析管柱區分物對小鼠

體內免疫調節活性試驗，結果顯示 F1 於 5 mg/kg 劑量下對小鼠脾臟巨噬細胞及中性顆粒球之吞噬活性皆有顯著上升，但其免疫調節活性並非來自細胞向 M1 或 M2 表型極化所致，且與 1P 相同無法抑制 LPS 誘導之 IL-6 生成量也無法提升 IL-10 生成量，表示 F1 不具有抗發炎活性，但能透過提升巨噬細胞及中性顆粒球的吞噬活性達到免疫調節的功能。接著將 F1 進行 LC-MS/MS 鑑定其中免疫調節肽之序列，結果可得五個可信度最高之胜肽序列，分別為 EKPQQSSRRGS、TGDEPVVAISLLDTSNFNNQ、VVNCQGNVDFGEL、NNLNALEPDHRVESEGGL 及 VVQGKGAIGFAFP，後續實驗將選擇含正荷電胺基酸最多之 EKPQQSSRRGS 進行合成，所得合成肽將進行小鼠動物實驗比對 F1 之免疫調節活性，以了解免疫調節肽之作用機制。

陸、參考文獻

- 林雨涵. (2013). 葡聚醣、葡聚醣硫酸及葡聚醣硫酸鈉活化巨噬細胞探討. 屏東科技大學, 屏東縣.
- 邱詩涵. (2008). 大豆蛋白對非酒精性脂肪變性肝炎影響機制之探討. 臺北醫學大學, 台北市.
- 黃惠煥. (2006). 大豆異黃酮素對更年期症狀改善之影響. 臺北醫學大學, 台北市.
- 歐依旻. (2014). 蛋白酵素水解物中免疫調節活性之研究. 東海大學, 台中市.
- 蔡宗堯. (2004). 酵素水解分離大豆蛋白以製備高血壓抑制胜肽. 東海大學, 台中市.
- 蔡映菡. (1987). 芝麻粕之蛋白質抽取條件之探討. 中興大學, 台中市.
- 關羽峻. (2009). 大豆蛋白對於餵食高膽固醇飲食倉鼠之血脂質與肝臟脂質的影響. 臺北醫學大學, 台北市.
- 蘇淑真、張基隆. (2003). 探討大豆異黃酮素 (isoflavones) 對蝕骨細胞, 造骨細胞及骨質密度消長之影響與其機制. 輔英科技大學, 高雄市.
- Adler-Nissen, J. (1986). Some fundamental aspects of food protein hydrolysis. *Enzymic hydrolysis of food proteins*, 9-24.
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75(6), 639-653.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357(3), 593-615.
- Appelberg, R. (2007). Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends in Microbiology*, 15(2), 87-92.
- Asadullah, K., Sterry, W., and Volk, H. D. (2003). Interleukin-10 therapy - Review of a new approach. *Pharmacological Reviews*, 55(2), 241-269.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845-859.
- Bodwell, C., Satterlee, L., and Hackler, L. (1980). Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by *in vitro* enzymic digestion methods. *The American journal of clinical nutrition*, 33(3), 677-686.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2(10), 907-916.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33(5), 657-670.
- Buttery, L. D. K., Evans, T. J., Springall, D. R., Carpenter, A., Cohen, J., and Polak, J.

- M. (1994). Immunochemical localization of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-treated rats. *Laboratory Investigation*, 71(5), 755-764.
- Caroff, M., and Karibian, D. (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 338(23), 2431-2447.
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., Diwan, P. V., Uday Kumar, P., Nimgulkar, C., and Dinesh Kumar, B. (2014). Immunomodulatory effects of protein hydrolysates from rohu (*Labeo rohita*) egg (roe) in BALB/c mice. *Food Research International*, 62, 1054-1061.
- Chen, D., Liu, Z., Huang, W., Zhao, Y., Dong, S., and Zeng, M. (2013). Purification and characterisation of a zinc-binding peptide from oyster protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 689-697.
- Cheng, X., Tang, X., Wang, Q., and Mao, X. Y. (2013). Antibacterial effect and hydrophobicity of yak κ -casein hydrolysate and its fractions. *International Dairy Journal*, 31(2), 111-116.
- Cheryan, M. (2000a). Food technology | membrane Separations. In Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science*, 2849-2855.
- Cheryan, M. (2000b). Membrane separations | ultrafiltration. In Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science*, 1797-1802.
- Clarke, C. J. P., Hales, A., Hunt, A., and Foxwell, B. M. J. (1998). IL-10-mediated suppression of TNF- α production is independent of its ability to inhibit NF κ B activity. *European Journal of Immunology*, 28(5), 1719-1726.
- Connolly, A., O’Keeffe, M. B., Piggott, C. O., Nongonierma, A. B., and FitzGerald, R. J. (2015). Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a brewers’ spent grain protein isolate. *Food Chemistry*, 176, 64-71.
- Cordle, C. T., Mahmoud, M. I., and Moore, V. (1991). Immunogenicity evaluation of protein hydrolysates for hypoallergenic infant formulae. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 13(3), 270-276.
- Corinti, S., Albanesi, C., La Sala, A., Pastore, S., and Girolomoni, G. (2001). Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *Journal of Immunology*, 166(7), 4312-4318.
- Endres, J. G. (2001). *Soy protein products: characteristics, nutritional aspects, and utilization*: The American Oil Chemists Society.
- Faurschou, M., and Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5(14), 1317-1327.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., and Mosmann, T. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine*, 170(6), 2081-2095.

- Fitzgerald, R. J., and Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 118-125.
- Gyorfy, Z., Duda, E., and Vizler, C. (2013). Interactions between LPS moieties and macrophage pattern recognition receptors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1–2), 28-36.
- Hamer, M., Endrighi, R., and Poole, L. (2012). Physical activity, stress reduction, and mood: Insight into immunological mechanisms. *Methods in Molecular Biology*, 934, 89-102.
- Hartmann, R., and Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163-169.
- He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., and Aluko, R. E. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 219-227.
- Holder, A., Birke, A., Eisele, T., Klaiber, I., Fischer, L., and Hinrichs, J. (2013). Selective isolation of angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides from micellar casein and β -casein hydrolysates via ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 31(1), 34-40.
- Horiguchi, N., Horiguchi, H., and Suzuki, Y. (2005). Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(12), 2445-2449.
- Hou, D. H.-j., and Chang, S. K.-C. (2004). Structural characteristics of purified glycinin from soybeans stored under various conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3792-3800.
- Hou, H., Fan, Y., Li, B., Xue, C., Yu, G., Zhang, Z., and Zhao, X. (2012). Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of Alaska pollock frame. *Food Chemistry*, 134(2), 821-828.
- Hubbard, A. K., and Giardino, C. (2000). Regulation of ICAM-1 expression in mouse macrophages. *Inflammation*, 24(2), 115-125.
- Huisman, I. H. (2000). MEMBRANE SEPARATIONS | Microfiltration. In Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science*, 1764-1777.
- Jacquot, A., Gauthier, S. F., Drouin, R., and Boutin, Y. (2010). Proliferative effects of synthetic peptides from β -lactoglobulin and α -lactalbumin on murine splenocytes. *International Dairy Journal*, 20(8), 514-521.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., and Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178-184.

- Johnson, L. A., White, P. J., Galloway, R., and Board, U. S. (2008). *Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization*: AOCS Press.
- Kim, H. J., Bae, I. Y., Ahn, C.-W., Lee, S., and Lee, H. G. (2007). Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. *Peptides*, 28(11), 2098-2103.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., and Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), 1317-1327.
- Kong, X., Guo, M., Hua, Y., Cao, D., and Zhang, C. (2008). Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresource Technology*, 99(18), 8873-8879.
- Lee, K. D., Lo, C. G., and Warthesen, J. J. (1996). Removal of Bitterness from the Bitter Peptides Extracted from Cheddar Cheese with Peptidases from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK111. *Journal of Dairy Science*, 79(9), 1521-1528.
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., and Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118(2), 403-410.
- Luo, S., Skerka, C., Kurzai, O., and Zipfel, P. F. (2013). Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Molecular Immunology*, 56(3), 161-169.
- Luoma, J. S., Strålin, P., Marklund, S. L., Hiltunen, T. P., Särkioja, T., and Ylä-Herttuala, S. (1998). Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: Colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(2), 157-167.
- Lusas, E. W., and Riaz, M. N. (1995). Soy protein products: processing and use. *The Journal of nutrition*, 125(3), 573-580.
- Mallet, J.-F., Duarte, J., Vinderola, G., Anguenot, R., Beaulieu, M., and Matar, C. (2014). The immunopotentiating effects of shark-derived protein hydrolysate. *Nutrition*, 30(6), 706-712.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677-686.
- Marques, A. H., Bjørke-Monsen, A.-L., Teixeira, A. L., and Silverman, M. N. (2015). Maternal stress, nutrition and physical activity: Impact on immune function,

- CNS development and psychopathology. *Brain Research*, 1617, 28-46.
- Maruyama, N., Sato, R., Wada, Y., Matsumura, Y., Goto, H., Okuda, E., Nakagawa, S., and Utsumi, S. (1999). Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin constituent subunits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5278-5284.
- Mayer, B., and Hemmens, B. (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(12), 477-481.
- Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry*, 12(16), 1905-1919.
- Mercier, A., Gauthier, S. F., and Fliss, I. I. (2004). Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *International Dairy Journal*, 14(3), 175-183.
- Minato, K. I., and Abe, C. (2013). Chapter 17 - Immunomodulating Effect of Polysaccharide. In Preedy (Ed.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, 241-250.
- Mocellin, S., Panelli, M., Wang, E., Rossi, C. R., Pilati, P., Nitti, D., Lise, M., and Marincola, F. M. (2004). IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes and Immunity*, 5(8), 621-630.
- Moncada, S., and Higgs, E. A. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation*, 21(4), 361-374.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Nakahara, T., Yamaguchi, H., and Uchida, R. (2012). Effect of temperature on the stability of various peptidases during peptide-enriched soy sauce fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(3), 355-359.
- Neurath, M. F., and Finotto, S. (2011). IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(2), 83-89.
- Nielsen, N. (1985). Structure of soy proteins. *New protein foods (USA)*.
- Nielsen, N. C. (1985). The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(12), 1680-1686.
- Nielsen, P., Petersen, D., and Dammann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of food science*, 66(5), 642-646.
- O'Garra, A., and Vieira, P. (2007). TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Reviews Immunology*, 7(6), 425-428.

- Peng, H., Yang, Y., and Racke, M. K. (2014). Immune System, Adaptive; Overview. In Aminoff and Daroff (Eds.), *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)*, 669-674.
- Pihlanto, A., and Korhonen, H. (2015). 3 - Bioactive peptides from fermented foods and health promotion. In Holzapfel (Ed.), *Advances in Fermented Foods and Beverages*, 39-74.
- Pistoia, V. (1997). Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunology Today*, 18(7), 343-350.
- Postel, S., and Kemmerling, B. (2009). Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(9), 1025-1031.
- Ranamukhaarachchi, S., Meissner, L., and Moresoli, C. (2013). Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 429, 81-87.
- Rho, S. J., Lee, J.-S., Chung, Y. I., Kim, Y.-W., and Lee, H. G. (2009). Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochemistry*, 44(4), 490-493.
- Rickert, D., Johnson, L., and Murphy, P. (2004). Functional properties of improved glycinin and β -nglycinin fractions. *Journal of food science*, 69(4), 303-311.
- Romagnani, S. (1995). Biology of human TH1 and TH2 cells. *Journal of Clinical Immunology*, 15(3), 121-129.
- Sagle, A., and Freeman, B. (2004). Fundamentals of membranes for water treatment. *the future of desalination in Texas*, 2, 137-154.
- Saha, B. C., and Hayashi, K. (2001). Debitting of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances*, 19(5), 355-370.
- Schumann, J. (2015). It is all about fluidity: Fatty acids and macrophage phagocytosis. *European Journal of Pharmacology*.
- Shono, J. i., Sakaguchi, S., Suzuki, T., Do, M. K. Q., Mizunoya, W., Nakamura, M., Sato, Y., Furuse, M., Yamada, K., and Ikeuchi, Y. (2013). Preliminary time-course study of antiinflammatory macrophage infiltration in crush-injured skeletal muscle. *Animal Science Journal*, 84(11), 744-750.
- Siemensma, A. D., Weijer, W. J., and Bak, H. J. (1993). The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends in Food Science & Technology*, 4(1), 16-21.
- Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S., and Bawa, A. (2008). Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 7(1), 14-28.

- Sorgentini, D. A., Wagner, J. R., and Anon, M. C. (1995). Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(9), 2471-2479.
- Sousa, S., and Määttä, J. A. (2015). Chapter 9 - Macrophages and pathophysiology of bone cancers. In Heymann (Ed.), *Bone Cancer (Second edition)*, 91-101.
- Sredni-Kenigsbuch, D., Kambayashi, T., and Strassmann, G. (2000). Neutrophils augment the release of TNF α from LPS-stimulated macrophages via hydrogen peroxide. *Immunology Letters*, 71(2), 97-102.
- Stenken, J. A., and Poschenrieder, A. J. (2015). Bioanalytical chemistry of cytokines – A review. *Analytica Chimica Acta*, 853, 95-115.
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., and Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*, 31(8), 318-324.
- Takahashi, M., Moriguchi, S., Yoshikawa, M., and Sasaki, R. (1994). Isolation and characterization of oryzatensin: A novel bioactive peptide with ileum-contracting and immunomodulating activities derived from rice albumin. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 33(6), 1151-1158.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Tang, J. F., Guan, S. H., and Wang, Z. G. (2012). Roles of interleukin-10 differentiated dendritic cell of allergic asthma patients in T-lymphocyte proliferation in vitro. *National Medical Journal of China*, 92(40), 2851-2854.
- Tsou, M.-J., Lin, S.-B., Chao, C.-H., and Chiang, W.-D. (2012). Enhancing the lipolysis-stimulating activity of soy protein using limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration. *Food Chemistry*, 134(3), 1564-1570.
- Van Ginderachter, J. A., Movahedi, K., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G., and De Baetselier, P. (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*, 211(6–8), 487-501.
- Vavrusova, M., Pindstrup, H., Johansen, L. B., Andersen, M. L., Andersen, H. J., and Skibsted, L. H. (2015). Characterisation of a whey protein hydrolysate as antioxidant. *International Dairy Journal*, 47, 86-93.
- Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neil, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D. C., and O'Garra, A. (2004). IL-10-Secreting Regulatory T cells do not express foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25 + regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 172(10), 5986-5993.

- Yang, H.-Y., Yang, S.-C., Chen, J.-R., Tzeng, Y.-H., and Han, B.-C. (2004). Soyabean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 507-512.
- Yuzhalin, A. E., and Kutikhin, A. G. (2015). Chapter 5 - IL-6 Family and Cancer. In Kutikhin (Ed.), *Interleukins in Cancer Biology*, 117-146.
- Zheng, H.-G., Yang, X.-Q., Ahmad, I., Min, W., Zhu, J.-H., and Yuan, D.-B. (2009). Soybean β -conglycinin constituent subunits: Isolation, solubility and amino acid composition. *Food Research International*, 42(8), 998-1003.
- Zheng, W., Zhao, T., Feng, W., Wang, W., Zou, Y., Zheng, D., Takase, M., Li, Q., Wu, H., Yang, L., and Wu, X. (2014). Purification, characterization and immunomodulating activity of a polysaccharide from flowers of *Abelmoschus esculentus*. *Carbohydrate Polymers*, 106, 335-342.
- Ziegler, F., Ollivier, J., Cynober, L., Masini, J., Coudray-Lucas, C., Levy, E., and Giboudeau, J. (1990). Efficiency of enteral nitrogen support in surgical patients: small peptides v non-degraded proteins. *Gut*, 31(11), 1277-1283.

