贾飘彩, 陆相辰, 高郁美, 等. 山羊乳酪蛋白活性肽制备工艺优化及其对铅暴露小鼠肝肾的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(17): 485−493. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030022

JIA Piaocai, LU Xiangchen, GAO Yumei, et al. Preparation Optimization of Goat Milk Casein-derived Bioactive Peptides and Their Hepatorenal Protective against Lead Exposed in Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(17): 485−493. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030022

·营养与保健·

山羊乳酪蛋白活性肽制备工艺优化及其对铅暴露小鼠肝肾的保护作用

贾飘彩, 陆相辰, 高郁美, 张海琳, 侯晓威, 赵丽丽*

（西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100）

摘　要: 目的：探究山羊乳酪蛋白活性肽对铅暴露小鼠肝肾的保护作用。方法：通过酶解法制备山羊乳酪蛋白活性肽，以铅离子螯合率为指标通过单因素实验结合响应面试验优化酶解工艺，通过紫外扫描、傅里叶变换光谱分析铅与活性肽的螯合特点。使用四周龄 ICR 雄性小鼠建立铅暴露动物模型，观察肝肾苏木精伊红染色切片、以氧化应激和炎症因子白细胞介素-6（Interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因子-α（Tumor necrosis factor-α，TNF-α）为指标评价活性肽对铅暴露小鼠肝肾的保护作用。结果：最优酶解条件为加酶量 3000 U/g、酶解时间 2.0 h、底物浓度 43.97 g/L、温度 47.60 ℃、酶解 pH 为 7.48，铅螯合率为 49.60%±0.51%。紫外扫描发现活性肽与铅结合，使其在 237 nm 吸收峰增大，傅里叶变换光谱得出铅与活性肽中游离的氨基、羧基发生反应。活性肽可以降低铅暴露小鼠的肝脏指数（P<0.05），对小鼠的正常发育具有保护作用，显著提高超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）的活性（P<0.01）和谷胱甘肽（Glutathione，GSH）的含量（P<0.01），降低丙二醛（Malondialdehyde，MDA）的含量（P<0.01），提高机体的抗氧化能力。同时活性肽降低肝肾炎症因子 IL-6、TNF-α 的含量（P<0.01），有降低肝肾炎症水平的作用。结论：山羊乳酪蛋白活性肽对铅暴露小鼠肝肾具有一定的保护作用，为其作为天然排铅物质提供依据，制备的活性肽也为排铅新产品开发提供一定技术支撑。

关键词: 山羊乳, 活性肽, 铅暴露, 氧化应激, 肝、肾保护

中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)17−0485−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030022　　本文网刊:

Preparation Optimization of Goat Milk Casein-derived Bioactive Peptides and Their Hepatorenal Protective against Lead Exposed in Mice

JIA Piaocai, LU Xiangchen, GAO Yumei, ZHANG Hailin, HOU Xiaowei, ZHAO Lili*

（College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China）

Abstract: Objective: To investigate the protective effects of goat milk casein-derived bioactive peptides on the liver and kidneys of lead-exposed mice. Methods: Goat milk casein-derived bioactive peptides were prepared via enzymatic hydrolysis. The enzymatic hydrolysis process was optimized using single-factor experiments combined with response surface methodology, with lead ion chelation rate as the evaluation index. Ultraviolet (UV) scanning and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) were employed to analyze the chelation characteristics between lead and the bioactive peptides. A lead-exposed animal model was established using four-week-old male ICR mice. The protective effects of the bioactive peptides on the liver and kidneys were evaluated by observing hematoxylin-eosin (HE) staining of liver and kidney sections, oxidative stress markers, and inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α). Results: The optimal enzymatic hydrolysis conditions were determined as follows: Enzyme dosage 3000 U/g, time 2.0 h, substrate concentration 43.97 g/L, temperature 47.60 ℃, and pH7.48, achieving a lead chelation rate of 49.60%±0.51%. UV scan-

收稿日期: 2025−03−05

基金项目: 陕西省重点研发计划（2021NY-176）。

作者简介: 贾飘彩（1998−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 乳品加工技术, E-mail: 921949594@qq.com。

*** 通信作者:** 赵丽丽（1987−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 乳品加工与营养, E-mail: lili.zhao@nwsuaf.edu.cn。

ning revealed that the binding of lead to the bioactive peptides increased the absorption peak at 237 nm. FTIR analysis indicated that lead reacted with free amino and carboxyl groups in the peptides. The bioactive peptides significantly reduce the liver index in lead-exposed mice (P<0.05), demonstrating protective effects on normal development. They also markedly enhanced superoxide dismutase (SOD) activity (P<0.01) and glutathione (GSH) levels (P<0.01), reduced malondialdehyde (MDA) levels (P< 0.01), and improved overall antioxidant capacity. Additionally, the peptides significantly decreased IL-6 and TNF-α levels in the liver and kidneys (P<0.01), indicating reduced inflammation. Conclusion: Goat milk casein-derived bioactive peptides exhibit protective effects on the liver and kidneys of lead-exposed mice. This study provides evidence for their potential as natural lead-chelating agents and offers technical support for developing novel lead-eliminating products.

Key words: goat milk; active peptide; lead exposure; oxidative stress; liver and kidney protection

铅是一种有毒且不可生物降解的重金属元素，因其在不同行业的广泛应用成为影响环境和人类健康的主要威胁之一。铅通过消化道、呼吸道及皮肤接触等途径进入人体，主要分布于肝脏、肾脏等器官以及皮肤、骨骼肌等软组织中，导致多器官系统的功能损伤，引发一系列与铅中毒相关的临床症状[1]。肾脏有调节水盐平衡的功能，也是个体接触铅后影响的关键器官。铅的过量接触会引起肾小管、肾小球等损伤，造成不可逆的肾脏疾病[2]。肝脏组织是新陈代谢的重要器官，也是人体内最大的解毒器官[3]，铅暴露影响的肝脏组织细胞核会显著减少，导致肝脏损伤及生理功能失调[4]。

改善与治疗铅中毒对人体的危害一直是食品、营养保健和医药学界关注的热点问题之一。铅中毒治疗药物虽有排铅作用，但是其副作用较为显著，可能导致患者出现不同程度的毒副作用，包括全身疲乏、食欲减退、发热和过敏性皮疹等[5]，因此亟需开发天然且安全的铅中毒治疗药物替代品。乳源活性肽主要来源于酪蛋白和乳清蛋白，可以通过蛋白或肽水解制剂、微生物发酵及在胃肠道中消化等途径产生活性[6]，目前已证实乳源活性肽具有抗炎[7]、抗高血压[8] 和抗氧化[9] 等活性。研究证明活性肽对铅中毒引发的机体氧化损伤有明显的改善和治疗效果，大豆蛋白活性肽（400 mg/kg·bw）可以减轻小鼠肝脏组织病理和氧化应激损伤[10]，亚麻籽活性肽（70、140 mg/kg·bw）可减轻由铅中毒引起的肝肾功能衰退，实现对小鼠肝肾的保护作用[11]。山羊乳源活性肽具有安全性高、特异性强等特点[12−13]，目前未见关于山羊乳源活性肽对铅暴露小鼠肝肾保护效果的研究报道。

因此，本研究制备山羊乳酪蛋白活性肽，通过建立铅暴露动物模型，探究山羊乳酪蛋白活性肽对铅暴露小鼠肝肾的保护作用，为促进铅中毒的治疗提供科学思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

40 只 SPF 级 4 周龄雄性 ICR 小鼠，体重为（18±1.5）g　成都达硕实验动物有限公司提供，许可证号为：SYXK（陕）20220-003，实验操作均符合西北农林科技大学实验动物伦理委员会要求（IACUC:2024-1019）；新鲜山羊乳　杨凌本地羊场；中性蛋白酶　5000 U/g，北京索莱宝科技有限公司；肌酐测定试剂盒、尿素氮测定试剂盒　南京建成有限公司；谷草转氨酶活性测定试剂盒、谷丙转氨酶活性测定试剂盒　上海麦克林生化科技有限公司；二巯基丁二酸　上海新亚药业闵行有限公司；醋酸铅、无水乙醇、硝酸、高氯酸等　均为国产分析纯。

TECAN 酶标仪　上海勒菲机械贸易有限公司；M20 膜过滤系统　丹麦 Alsa Laval 公司；HH-6 数显恒温水浴锅　常州国华电器有限公司；SB-500 超声波清洗机　宁波新芝生物科技股份有限公司；H1650 离心机　湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；UV-2600i 紫外分光光度计　岛津仪器苏州有限公司；HJ-4AB 恒温磁力搅拌器　拓赫机电科技有限公司；PHS-3E pH 计　上海仪电科学仪器股份有限公司；FD5-2.5 冷冻干燥机　金西盟科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 山羊乳酪蛋白活性肽的制备　参考李志成等[14] 的方法：新鲜羊乳过滤除杂，4 ℃、5000 r/min 离心 20 min，去除脂肪。用盐酸（2 mol/L）将其 pH 调至 4.2，静置 30 min，随后 5000 r/min 离心 5 min，除去上清液。用醋酸-醋酸钠缓冲液（pH4.2）洗涤沉淀 2 次，5000 r/min 离心 5 min，所得到的沉淀为酪蛋白，冻干备用。取适量酪蛋白于 100 mL 离心管中，用 NaOH（2 mol/L）调节 pH 至 7.0，按 3000 U/g 加入中性蛋白酶，于 50 ℃ 酶解 2 h，90 ℃ 灭酶 10 min，离心取上清液即为山羊乳酪蛋白活性肽。

1.2.2 肽铅复合物的制备　参考周桂成等[15] 的方法：将 5 mL 0.05 mol/L 醋酸铅溶液与 5 mL 山羊乳酪蛋白活性肽混合，用 0.5 mol/L 的盐酸调节 pH 为 5.0，在 47 ℃ 水浴反应 80 min。反应后加入 5 倍体积的无水乙醇混匀，在 4000 r/min 离心 20 min 去除游离铅，将所得沉淀用 50 mL 无水乙醇混匀，在 4000 r/min 的条件下离心 20 min 洗清。沉淀在 55 ℃ 烘箱干燥至恒重即为肽铅复合物。

1.2.3 铅螯合率测定　称量 1.2.2 制备的肽铅复合物，加入 10 mL 氨水-氯化铵缓冲溶液（pH 为 10.0），滴入 2 滴铬黑 T 指示剂，用 0.01 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠滴定，观察溶液从紫色变成淡蓝色，且 30 s 不变色为终点。记录消耗乙二胺四乙酸二钠的体积，

按公式(1)(2)计算铅的螯合率：

$$X(\%) = \frac{M \times C \times V}{m} \times 100 \quad \text{式（1）}$$

式中，X 为肽铅复合物含铅量，%；M 为铅的摩尔质量，g/mol；C 为乙二胺四乙酸二钠的浓度，mol/L；V 为消耗乙二胺四乙酸二钠的体积，L；m 为称取肽铅复合物的质量，g。

$$Y(\%) = \frac{m \times X}{m'} \times 100 \quad \text{式（2）}$$

式中，Y 为铅的螯合率，%；m 为肽铅复合物的质量，g；X 为肽铅复合物含铅量，%；m'为铅的投入量，g。

1.2.4　山羊乳酪蛋白活性肽制备工艺单因素实验　酶解条件影响活性肽的结构和功能，从而影响其对铅离子的螯合能力，铅螯合率可以反映活性肽与铅离子的特异性结合能力[10]。以铅螯合率为指标，优化山羊乳酪蛋白酶解条件，以期得到体外铅螯合能力较强的活性肽。

1.2.4.1　加酶量对活性肽铅螯合率的影响　按 1000、2000、3000、4000、5000 U/g 底物蛋白加入中性蛋白酶。在底物质量浓度 30 g/L，pH7.0，酶解温度 50 ℃ 的条件下酶解 2 h，灭酶、离心、测定上清液铅螯合率。

1.2.4.2　酶解时间对活性肽铅螯合率的影响　在适宜的加酶量，底物质量浓度 30 g/L，pH7.0，酶解温度 50 ℃ 的条件下分别酶解 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h，灭酶、离心、测定上清液铅螯合率。

1.2.4.3　底物浓度对活性肽铅螯合率的影响　在适宜的加酶量，底物质量浓度分别为 10、20、30、40、50 g/L，pH7.0，酶解温度 50 ℃ 的条件下酶解适宜时间，灭酶、离心、测定上清液铅螯合率。

1.2.4.4　酶解温度对活性肽铅螯合率的影响　在适宜的加酶量，适宜的底物质量浓度，pH7.0，酶解温度分别为 40、45、50、55、60 ℃ 的条件下酶解适宜时间，灭酶、离心、测定上清液铅螯合率。

1.2.4.5　酶解 pH 对活性肽铅螯合率的影响　在适宜的加酶量，适宜的底物质量浓度，pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5，适宜的酶解温度下酶解适宜时间，灭酶、离心、测定上清液铅螯合率。

1.2.5　山羊乳酪蛋白活性肽制备工艺响应面试验　选取底物浓度、酶解温度和 pH 为变量建立 Box-Behnken 模型，以铅螯合率为响应值构建二次回归方程，试验因素水平表见表 1。

表 1　响应面试验因素水平

Table 1　Factor level for response surface methodology

水平	试验因素		
	A 底物浓度(g/L)	B 酶解温度(℃)	C pH
−1	30	45	6.5
0	40	50	7.0
+1	50	55	7.5

1.2.6　山羊乳酪蛋白活性肽分离纯化　根据响应面试验结果确定的最优酶解条件制备活性肽，选用膜孔径为 3000 Da 的聚醚砜螺旋缠绕有机滤膜对活性肽超滤纯化，收集截留液和渗透液，分别得到分子质量>3000 Da 和<3000 Da 的 2 个活性肽组分，测定各组分活性肽的铅螯合能力，选出螯合能力强的组分冻干备用。

按照王家栩[16] 的方法测定多肽浓度：取 3 mL 还原型谷胱甘肽溶液（0.0、0.4、0.8、1.2、1.6 和 2.0 mg/mL），分别加入 2 mL 双缩脲试剂，混匀后室温放置 10 min，于 540 nm 处分别测定其吸光值。还原型谷胱甘肽浓度为横坐标 x（mg/mL），OD 值为纵坐标 y，得到标准曲线为：y=0.0951x+0.0192（R^2=0.9984）。取 3 mL 活性肽，加入 3 mL 10% 三氯乙酸，静置 30 min，4000 r/min 离心 20 min，取 3 mL 上清液，加入 2 mL 双缩脲试剂，静置 30 min，测定 540 nm 处紫外吸光度，代入标曲计算多肽浓度。

1.2.7　紫外扫描分析　取 1.2.6 的活性肽并制备肽铅复合物，分别配制成浓度为 10 g/L 的溶液。将配制的肽铅复合物稀释十倍和五倍得到肽铅复合物 1、2。用紫外分光光度计在 200~400 nm 进行全波长扫描，分析活性肽与铅螯合前后吸光度的变化[17]。

1.2.8　傅里叶变换红外光谱分析　取 1.2.6 的活性肽并制备肽铅复合物，各取 2 mg 和 200 mg 光谱级溴化钾混合研磨均匀，压片后参照刘卫震等[18] 的方法在 400~4000 cm^{-1} 测定其红外吸收光谱。

1.2.9　动物实验设计

1.2.9.1　动物分组及处理　40 只小鼠随机分成四组：正常组、模型组、阳性组和活性肽组，适应性喂养 7 d 后，参照《保健食品功能检验与评价方法（2023 年版）》建立预防性高铅动物模型：受试期间小鼠自由饮用 200 mg/mL 醋酸铅水。各组灌胃具体如下：阳性组灌胃阳性药物二巯基丁二酸，剂量为 100 mg/kg·bw；活性肽组灌胃活性肽，根据实验室前期研究成果剂量选用 60 mg/kg·bw；正常组、模型组灌胃生理盐水。灌胃体积为 0.2 mL/20 g。每 5 d 记录一次小鼠体重，灌胃饲养持续 30 d 后，各组小鼠禁食不禁水 12 h，异氟烷气体麻醉，摘眼球取血，离心收集血清并于−80 ℃ 保存。随后立即颈椎脱臼处死，取心、脾、肝、肾组织称重记录并把肝、肾组织存于 4% 多聚甲醛固定液中或−80 ℃ 冰箱中。

1.2.9.2　肝、肾组织病理学分析　固定在多聚甲醛固定液中的肝脏、肾脏样本送于北京伊诺凯科技有限公司制作 HE 病理切片，在光学显微镜下观察肝脏、肾脏病理变化。

1.2.9.3　小鼠生化指标的测定　采用试剂盒方法取血清测定谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)及尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)的水平，测定超氧化物歧化酶(SOD)活性和谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)的含量；取肝肾组织测定 TNF-α、IL-6 含量。

1.3 数据处理

所有实验重复 3 次, 使用 SPSS 22.0 对数据进行单因素方差分析, 使用 GraphPad Prism 9 进行作图。

2 结果与分析

2.1 不同酶解条件对酪蛋白活性肽螯合铅离子的影响

图 1A 显示加酶量对铅螯合率的影响。加酶量由 1000 U/g 提高到 3000 U/g 时铅螯合率显著增大(P<0.05), 可能是随着酪蛋白酶解, 生成了具有铅螯合能力的活性肽。加酶量 3000 U/g 时铅螯合率最大, 表明此条件下制备的活性肽铅结合位点最多。加酶量由 3000 U/g 提高到 5000 U/g 时螯合率显著减小(P<0.05), 可能是过量的酶使水解程度加深, 肽序列发生改变, 导致铅结合位点减少[19]。初步选择加酶量为 3000 U/g 进行后续优化。

图 1B 显示酶解时间对铅螯合率的影响。随着酶解时间的延长铅螯合率呈先增大再减小的趋势, 从 1.0 h 延长至 2.0 h 铅螯合率显著增大(P<0.05), 从 2.0 h 延长到 3.0 h 显著下降(P<0.05), 这可能是随着酶解时间加长, 中性蛋白酶已与酪蛋白充分反应, 酶切作用位点基本饱和, 并且游离氨基酸与小肽的增加, 也抑制了酶解反应[20]。初步选择酶解反应时间 2.0 h 进行后续优化。

图 1C 显示底物浓度对铅螯合率的影响。底物浓度在 10~50 g/L 范围, 铅螯合率逐渐升高, 在底物浓度由 30 g/L 升至 40 g/L 铅螯合率显著增大(P<0.05), 由 40 g/L 升至 50 g/L 铅螯合率变化不显著(P>0.05), 说明在这个浓度范围, 随着酪蛋白浓度增加, 酶解反应体系的流动性变差, 导致中性蛋白酶与酪蛋白接触不充分[21]。初步选择底物浓度 40 g/L 进行后续优化。

图 1D 显示酶解温度对铅螯合率的影响, 当温度由 40 ℃ 升至 50 ℃, 铅螯合率显著增大(P<0.05), 由 50 ℃ 升至 60 ℃, 铅螯合率显著减小(P<0.05), 可能是继续升高温度导致中性蛋白酶部分变性, 活性降低, 螯合率也降低。初步选择酶解温度 50 ℃ 进行后续优化。

图 1E 显示 pH 对铅螯合率的影响。pH 由 5.5 升至 7.0 时, 螯合率显著增大(P<0.05), 在 pH 由 7.0 升至 7.5 时螯合率显著减小(P<0.05), 说明已经超过螯合反应的最适 pH, 酶活受到影响, 不利于酶解反应的进行。初步选择 pH7.0 进行后续优化。

2.2 酪蛋白活性肽制备响应面优化试验结果

2.2.1 响应面试验结果及方差分析 根据单因素实验结果, 以铅螯合率为响应值, 选择底物浓度、温度和 pH 为试验因素, 建立响应面的回归模型, 响应面试验结果如表 2 所示。对表 2 中的数据进行回归处理, 得到二次多项回归方程为: Y=49.04+7.50A−

表 2 响应面试验结果

Table 2 Response surface experiment results

试验号	A 底物浓度	B 温度	C pH	Y 铅螯合率(%)
1	0	−1	−1	39.99
2	−1	0	1	41.60
3	1	0	1	50.40
4	0	1	−1	36.80
5	0	0	0	51.20
6	0	0	0	45.91
7	−1	−1	0	30.00
8	1	0	−1	40.81
9	1	−1	0	45.60
10	−1	0	−1	24.04
11	1	1	0	48.80
12	0	1	1	48.00
13	0	0	0	50.00
14	−1	1	0	30.00
15	0	−1	1	49.20

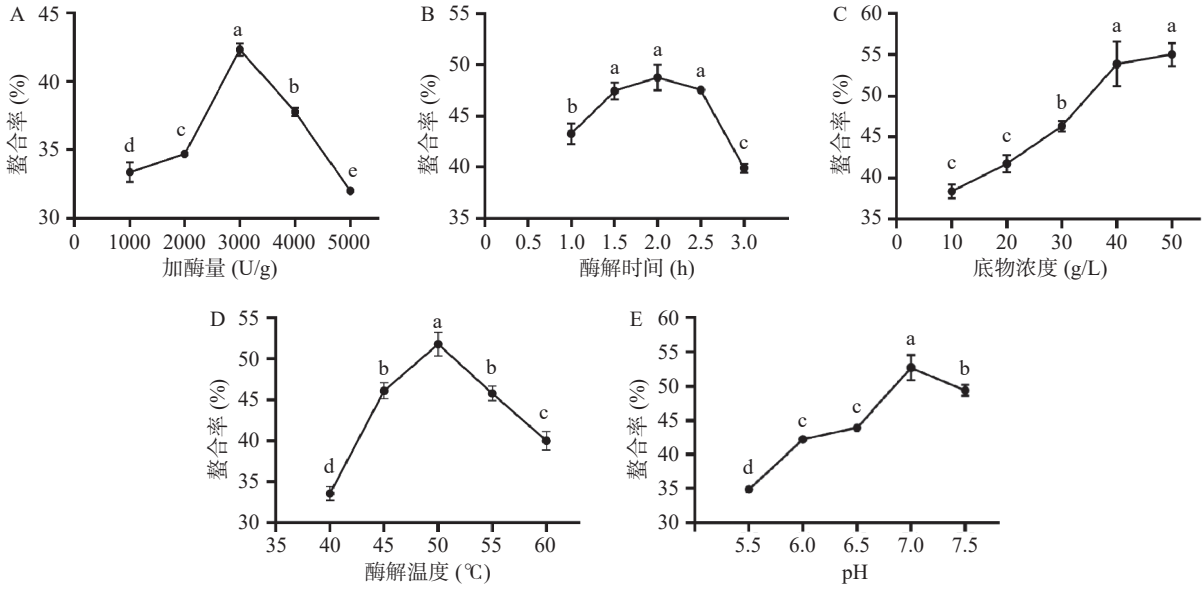


图 1 不同酶解条件制备的活性肽铅螯合率

Fig.1 Lead chelation rate of active peptide prepared under different enzymatic hydrolysis conditions

注: 小写字母不同表示均值之间具有显著差异(P<0.05); 图 3 同。

$0.1488B+5.94C+0.8AB-1.99AC+0.4975BC-7.36A^2-3.08B^2-2.46C^2$。

方差分析结果如表 3 所示，该模型影响极显著（$P<0.01$），失拟项不显著（$P>0.05$），因此试验结果可靠。模型的复合相关系数 $R^2=0.9629$，说明模型相关性良好。校正系数 $R^2_{Adj}=0.8961$，表明该模型的预测结果与真实值吻合良好，可以解释 89.61% 试验数据的变异性，实验误差较小。一次项因素 A（底物浓度）和 C（pH）对响应变量铅螯合率的影响极显著（$P<0.01$），二次项 A^2 的影响极显著（$P<0.01$），其余各项均不显著（$P>0.05$）。

表 3　响应面试验结果方差分析

Table 3　ANOVA of response surface experiment results

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	986.37	9	109.60	14.42	0.0045	**
A	449.55	1	449.55	59.14	0.0006	**
B	0.177	1	0.177	0.0233	0.8847	
C	282.74	1	282.74	37.19	0.0017	**
AB	2.56	1	2.56	0.3368	0.5869	
AC	15.88	1	15.88	2.09	0.208	
BC	0.99	1	0.99	0.1302	0.7329	
A^2	200.06	1	200.06	26.32	0.0037	**
B^2	34.93	1	34.93	4.60	0.0849	
C^2	22.40	1	22.40	2.95	0.1467	
残差	38.01	5	7.60			
失拟项	22.63	3	7.54	0.9805	0.5407	
纯误差	15.38	2	7.69			
总变异	1024.38	14				

注：**表示差异极显著（$P<0.01$），*表示差异显著（$P<0.05$）。

2.2.2　各因素交互作用分析及验证实验结果　各因素间交互作用如图 2 所示。从图中可知，各因素等高线近似为圆形，说明各因素之间的交互作用不显著，这与表 3 方差分析中的结果一致。根据分析结果得到最优酶解条件为底物浓度 43.97 g/L、温度 47.60 ℃、pH 为 7.48，预测值为 52.50%。经过验证实验，最优条件下测得铅螯合率为 49.60%±0.51%，与预测值相符，表明工艺参数可靠。

2.3　肽铅复合物结构分析

2.3.1　不同组分活性肽的铅螯合率及肽含量　膜过滤得到不同组分的活性肽，测定其铅螯合率。由图 3A 可知分子质量<3000 Da、>3000 Da 组分的活性肽铅螯合率为 54.52%±1.20%、39.05%±1.17%。分子量<3000 Da 的活性肽铅螯合效果更好，这可能是由于分子量较小的活性肽暴露的铅螯合位点更多，因此选择<3000 Da 组分活性肽进行后续实验。由图 3B 可知：在膜过滤之前对活性肽测定活性肽浓度为 3.11±0.01 mg/mL，膜过滤之后测定小于 3000 Da 组分活性肽浓度为 2.66±0.01 mg/mL。

2.3.2　紫外扫描分析　图 4 为山羊乳酪蛋白活性肽、肽铅复合物的紫外光谱图。在 200~300 nm 处，山羊乳酪蛋白活性肽最高峰在螯合铅后发生了蓝移，

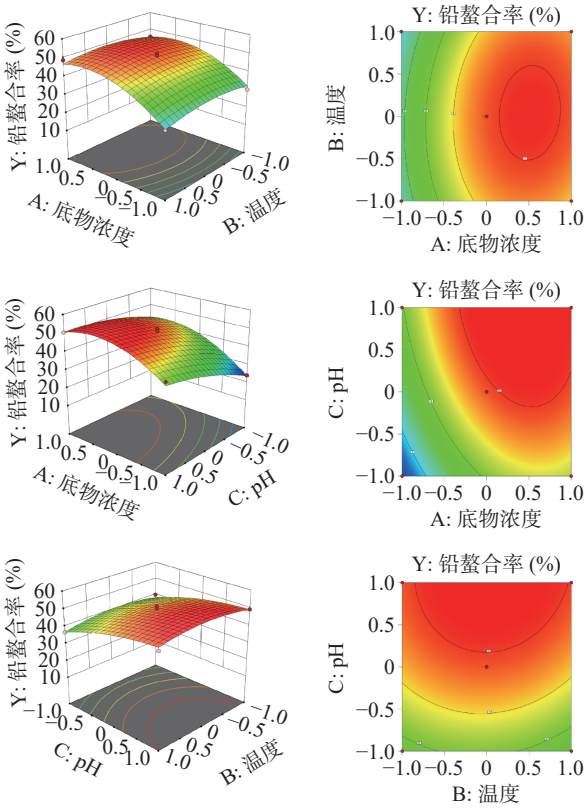


图 2　各因素交互作用的响应面与等高线图

Fig.2　Response surface and contour map of interaction of each factor

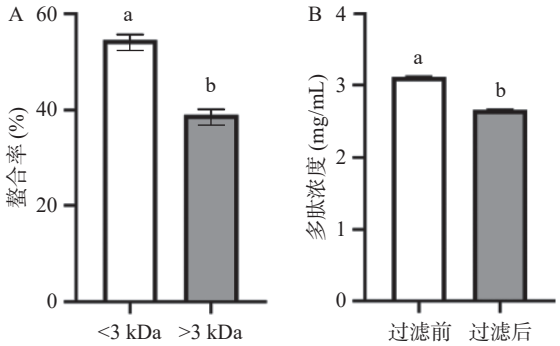


图 3　活性肽的铅螯合率及多肽含量

Fig.3　Lead sequestration rate and peptide content of active peptides

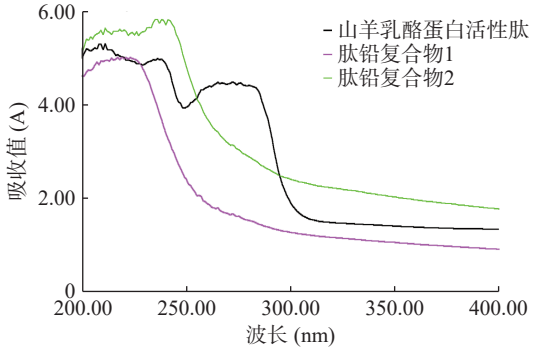


图 4　活性肽及肽铅复合物的紫外吸收光谱图

Fig.4　Ultraviolet absorption spectra of active peptides and peptide lead complexes

导致这一现象的原因可能是铅离子与羰基（C=O）络合，影响了羰基 n→δ^* 的电子跃迁[22]，故而发生蓝

移。此外，肽铅复合物 2 在 237 nm 处的吸收峰增强，且波长减小，吸收逐渐稳定，区别于活性肽，说明有活性肽与铅离子螯合反应的现象。

2.3.3 傅里叶变换红外光谱分析 傅里叶红外光谱吸收峰的特征变化可用于表征大分子中官能团的振动和蛋白质的二级结构，波数变化可以显示分子结构的变化，信号强度可代表相关官能团的浓度[23]。通过比较活性肽与肽铅复合物特征基团吸收峰的位移变化，可推断出铅的螯合位点。图 5 为活性肽和肽铅复合物在 400~4000 cm^{-1} 波数处的红外光谱。活性肽与铅离子螯合后，部分吸收峰的位置和强度发生改变。

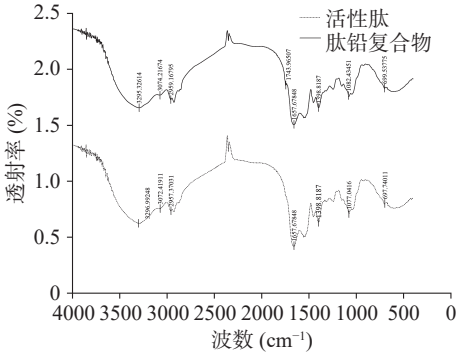


图 5 活性肽及肽铅复合物的傅里叶变换红外光谱图

Fig.5 Fourier transform infrared spectrogram of active peptides and peptide lead complexes

参考上海有机化学研究所数据库（https://organchem.csdb.cn）检索官能团的特征吸收波数。从图中可以看出：3296.99 cm^{-1} 附近，活性肽出现宽吸收峰，在 C=O（酸酐）伸缩振动 1900~1650 cm^{-1} 附近也存在吸收峰，说明在活性肽中存在-COOH 结构。肽铅复合物 3295.32 cm^{-1} 附近吸收峰变窄，1743.96 cm^{-1} 吸收峰减弱，说明裸露的-COOH 结构变少，这与 Wang 等[24] 的研究结果相似。胺的 N-H 伸缩振动出现在 3100 cm^{-1} 附近，活性肽在 3072.41 cm^{-1} 出现吸收峰，而肽铅复合物吸收峰在 3074.21 cm^{-1}，这表明 N 端氨基和侧链中的氨基参与了肽铅螯合，导致 N-H 键的振动频率发生变化[25]。肽铅复合物在 1082.43 cm^{-1} 处出现 C-N 强吸收峰，可能是氮原子的共用电子对铅作用导致 C-N 偶极性增强[26−27]。综上所述，铅离子与活性肽中游离的氨基和羧基发生反应形成了肽铅螯合物。

2.4 活性肽对铅暴露小鼠生长发育的影响

2.4.1 小鼠体重变化分析 图 6 显示了饲养期间小鼠体重的变化，饲养 30 d 时间内，各组小鼠体重均逐步增加。与正常组相比，阳性组小鼠的体重较低，这与卜丁东[10] 使用阳性药物二巯基丁二酸治疗后小鼠体重下降结果相同。活性肽对铅暴露小鼠治疗不会引起小鼠的体重下降，表明了活性肽的天然安全性。

2.4.2 小鼠脏器指数分析 小鼠脏器指数见表 4，模

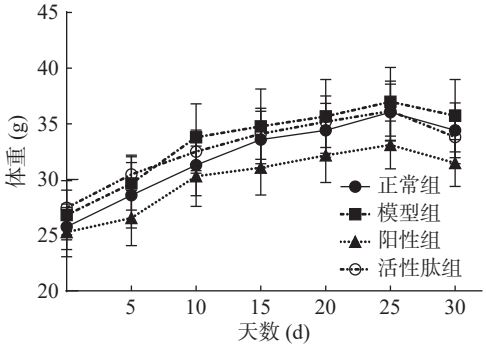


图 6 小鼠体重变化

Fig.6 Changes in body weight of mice

型组肝脏指数比正常组增加了 23.34%（P<0.01），表示铅暴露造成了肝脏组织的肿胀，灌胃治疗后，阳性组、活性肽组比模型组肝脏指数降低了 3.58%、12.15%（P<0.01），活性肽组的小鼠肝脏指数与正常组无显著差异（P>0.05）。模型组、阳性组和活性肽组小鼠的心脏指数分别比正常组降低了 16.67%（P<0.01）、16.67%（P<0.01）、8.33%，说明铅暴露可能会影响心脏的正常发育。小鼠的脾脏和肾脏指数各组间均无显著性差异（P>0.05）。

表 4 小鼠心脏、脾脏、肝脏和肾脏的脏器系数

Table 4 Organ coefficient of heart, spleen, liver, and kidney in mice

组别	肝脏指数(%)	心脏指数(%)	脾脏指数(%)	肾脏指数(%)
正常组	4.07±0.23	0.60±0.05	0.29±0.07	1.60±0.17
模型组	5.02±0.32**	0.50±0.07**	0.30±0.06	1.74±0.13
阳性组	4.84±0.52**	0.50±0.06**	0.26±0.06	1.63±0.24
活性肽组	4.41±0.33##	0.55±0.06	0.29±0.06	1.66±0.15

注：与正常组对比，*表示P<0.05，**表示P<0.01；与模型组对比，#表示P<0.05，##表示P<0.01。

2.5 活性肽对铅暴露小鼠肝脏和肾脏的保护作用

2.5.1 小鼠肝脏和肾脏 HE 染色病理学形态分析 铅暴露小鼠肝脏 HE 染色病理学结果如图 7 所示。

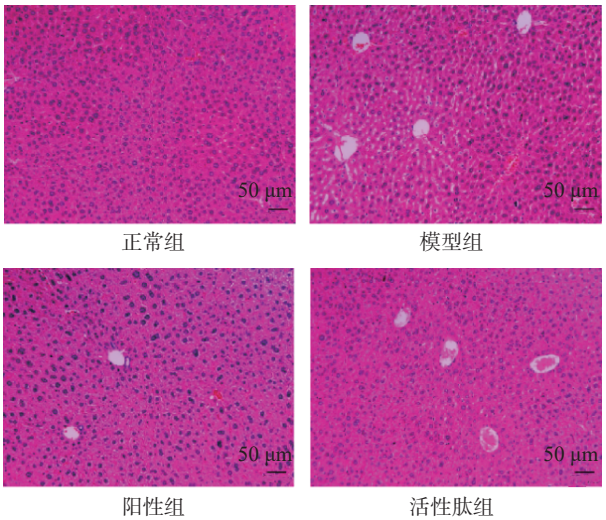


图 7 小鼠肝脏组织病理学形态变化

Fig.7 Histopathological morphological changes of mice liver

正常组小鼠肝脏组织学结构正常，肝细胞排列整齐，整体胶质空隙少，肝索清晰；模型组小鼠肝脏组织出现一定程度的退行性改变、肝索紊乱、整体胶质空隙变大；给予阳性药物二巯基丁二酸后出现肝细胞核肿大的现象，表明长期使用阳性药物对小鼠造成的肝损伤；活性肽组肝脏组织未出现肝索紊乱的现象，活性肽有效地缓解了铅暴露小鼠肝脏的组织损伤。

铅暴露小鼠肾脏的 HE 染色病理学结果如图 8 所示。正常组小鼠显示了正常的肾组织学结构，未见病理学损伤；而模型组小鼠的肾脏组织出现了肾小管肿胀、充血和边缘模糊以及肾小球萎缩等组织学损伤；阳性药物和活性肽治疗可改善铅暴露小鼠肾脏的组织学损伤，使肾脏组织呈现了正常的肾小球结构，并减轻了肾小管的肿胀和充血。

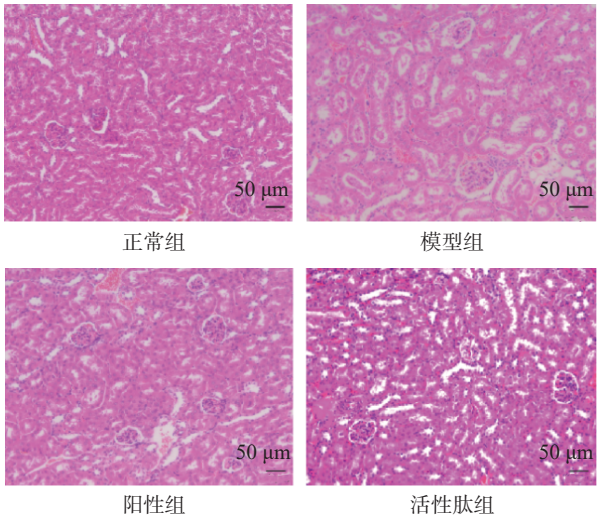


图 8　小鼠肾脏组织病理学形态变化

Fig.8　Histopathological morphological changes of mice kidney

2.5.2　小鼠肝脏和肾脏功能指标　血清中谷丙转氨酶（ALT）和谷草转氨酶（AST）活性测定可以用来评估小鼠肝功能状态，当肝细胞坏死，血清中 ALT、AST 的活性会显著升高[10−11]。如图 9 所示，与正常组相比，模型组小鼠血清中 AST 活性显著升高（P<0.05）；与模型组相比，阳性组和活性肽组 AST 活性有所下降但无显著性差异（P>0.05）。模型组 ALT 活性显著高于正常组（P<0.05），阳性组小鼠 ALT 活性显著高于模型组（P<0.05），可能是由于铅暴露引起肝功能受损，而肝功能受损不再适合使用阳性药物二巯基丁二酸[28]，长时间使用会对肝功能造成影响。

血清中尿素氮（BUN）和肌酐（Cr）浓度升高多见于肾功能损伤，可用于确定肾功能状态[10−11]。模型组的 BUN、Cr 含量与正常组相比极显著升高（P<0.01），表明铅暴露引起小鼠肾脏组织损伤。与模型组相比，活性肽组的 BUN 含量有所下降，且 Cr 含量极显著下降（P<0.01），说明活性肽可以有效地保护铅暴露小鼠的肾脏组织，降低铅对肾脏的损伤。

2.5.3　小鼠氧化应激指标　铅暴露引起的机体靶器官损伤与氧化应激水平升高有关，MDA 是在机体内

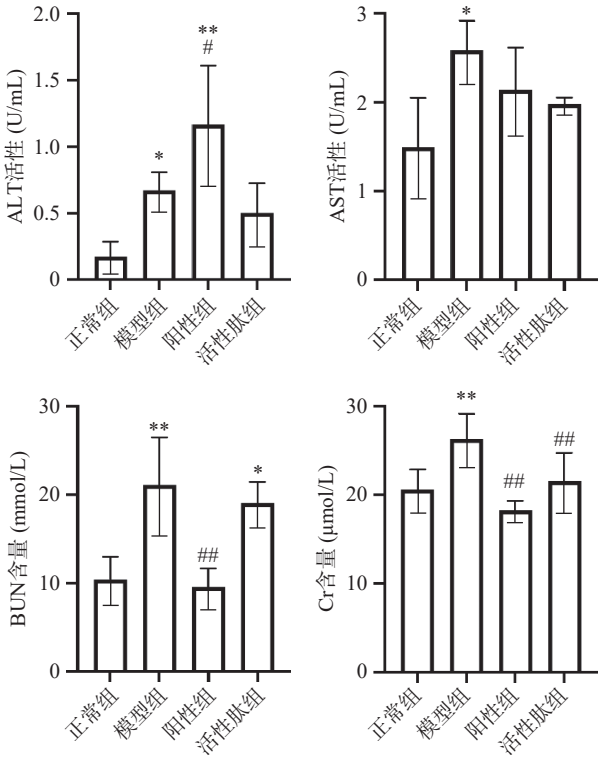


图 9　小鼠肝脏和肾脏功能指标

Fig.9　Liver and kidney function indexes of mice

注：与正常组对比，*表示 P<0.05，**表示 P<0.01；与模型组对比，#表示 P<0.05，##表示 P<0.01；图 10、图 11 同。

氧自由基代谢过程中生成的脂质过氧化产物，能够反映机体脂质过氧化自由基的存在及反应程度，内源抗氧化物 GSH 水平和 SOD 的活性也可以反映体内氧化应激水平[29−31]。铅暴露会导致活性氧的异常产生，加大抗氧化防御系统负担，引起机体的氧化应激[32]。

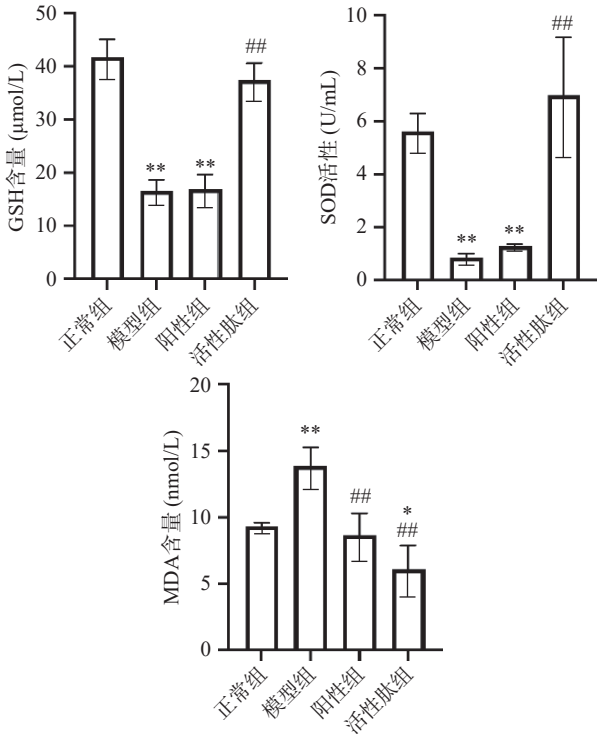


图 10　铅暴露对小鼠氧化应激的影响

Fig.10　Effect of lead exposure on oxidative stress in mice

由图 10 可知，模型组小鼠体内 GSH 含量和 SOD 活性极显著低于正常组（P<0.01），活性肽组 GSH 含量和 SOD 活性极显著高于模型组（P<0.01），表明灌胃活性肽可以提高小鼠抗氧化水平；模型组小鼠体内 MDA 含量极显著高于正常组（P<0.01），活性肽组 MDA 含量极显著低于模型组（P<0.01），表明活性肽可以有效抑制 MDA 的过量生成。

2.5.4 小鼠炎症因子指标 铅暴露对机体造成的炎症会使机体更容易被微生物入侵[33]，Nrf2 和 NF-κB 信号通路失调与铅诱导的神经毒性发病机制有关[34]。有研究发现铅暴露小鼠 TNF-α 和 IL-6 水平的变化可能是由于铅诱导 Nrf2 和 NF-κB 信号通路功能障碍[35]。促炎因子 IL-6 和 TNF-α 是典型的炎症介质，它们在免疫细胞激活和炎症细胞浸润的过程中发挥着关键作用，可以用来评判机体的炎症水平[36]。由图 11 可知，模型组的肝、肾炎症因子均极显著高于正常组（P<0.01），说明铅暴露小鼠肝、肾存在炎症现象；阳性、活性肽组肝、肾炎症因子 IL-6、TNF-α 均极显著低于模型组（P<0.01），表明阳性药物和活性肽具有改善铅暴露小鼠体内炎症现象的作用。

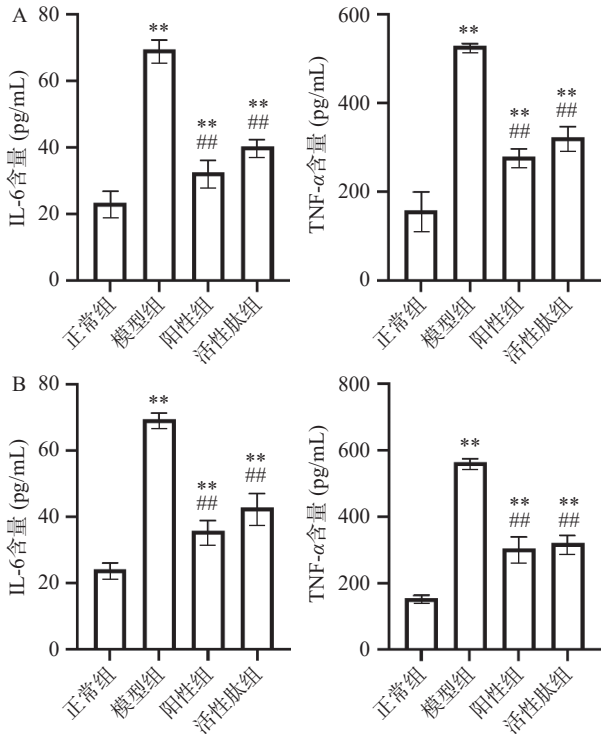


图 11 铅暴露对小鼠肝脏（A）、肾脏（B）炎症因子的影响

Fig.11 Effect of lead exposure on liver (A) and kidney (B) inflammatory factors in mice

3 结论

本实验以体外铅螯合率为指标对山羊乳酪蛋白活性肽的制备工艺进行优化，对最优条件下的活性肽分离纯化得到小于 3000 Da 的活性肽，体外铅螯合率为 54.52%±1.20%。紫外扫描分析观察到铅离子与羰基结合，发生了蓝移，从红外吸收峰的波数偏移分析发现游离-NH_2、-COOH 结合了铅离子。对铅暴露小鼠的生长发育评估，铅暴露会造成小鼠心脏指数降低，肝脏组织肿胀。模型组肝肾组织有明显损伤，活性肽在一定程度上缓解了铅暴露引起的损伤。铅暴露小鼠体内 GSH 含量、SOD 活性降低，MDA 含量升高，表明机体出现氧化损伤，灌胃活性肽可以有效降低铅暴露带来的氧化损伤。活性肽可以下调炎症因子 TNF-α 和 IL-6，减轻机体肝肾损伤。综上所述，山羊乳酪蛋白活性肽对铅暴露小鼠肝肾具有保护作用，可以减轻铅暴露对机体造成的氧化应激，提高机体免疫力，为山羊乳酪蛋白活性肽对铅中毒的预防与治疗提供理论基础。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 朱元州, 赵慧, 甘泉, 等. 成人铅中毒[J]. 巴楚医学, 2023, 6(4): 14−28. [ZHU Yuanzhou, ZHAO Hui, GAN Quan, et al. Lead poisoning in adults[J]. Bachu Medical Journal, 2023, 6(4): 14−28.]

[2] 曹春芽, 龚明, 仇成凤, 等. 丹参提取物对铅中毒小鼠肾氧化应激的保护作用[J]. 中成药, 2020, 42(2): 507−510. [CAO Chunyai, GONG Ming, QIU Chengfeng, et al. Protective effect of *Salvia miltiorrhiza* extract on renal oxidative stress in lead poisoning mice[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(2): 507−510.]

[3] 尉梦瑶, 陈华国, 赵超, 等. 环境中常见重金属致肝毒性的研究进展[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(4): 425−430. [YU Mengyao, CHEN Huaguo, ZHAO Chao, et al. Research progress on hepatotoxicity induced by common heavy metals in environment[J]. Journal of Environmental & Occupational Medicine, 2021, 38(4): 425−430.]

[4] SOTO-ARREDONDO K J, ROBLES J, DÍAZ-CERVANTES E, et al. Effects of lead and lead-melatonin exposure on protein and gene expression of metal transporters, proteins and the copper/zinc ratio in rats[J]. BioMetals, 2018, 31(5): 859−871.

[5] 乔增运, 李昌泽, 周正, 等. 铅毒性危害及其治疗药物应用的研究进展[J]. 毒理学杂志, 2020, 34(5): 416−420. [QIAO Zengyun, LI Changze, ZHOU Zheng, et al. Research progress on toxic harm of lead and its therapeutic drug application[J]. Journal of Toxicology, 2020, 34(5): 416−420.]

[6] ULUG S K, JAHANDIDEH F, WU Jianping. Novel technologies for the production of bioactive peptides[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 108: 27−39.

[7] 吕伟. 牛乳铁蛋白活性肽对奶牛隐性乳房炎的防治作用及对其生产性能的影响[J]. 中国奶牛, 2018(1): 1−3. [LÜ Wei. The effects of LFA-LFC on controlling subclinical mastitis and improving production performance in dairy cows[J]. China Dairy Cattle, 2018(1): 1−3.]

[8] 李云. 乳源酵母发酵牛乳产血管紧张素转换酶抑制肽的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015. [LI Yun. Research on dairy yeast fermented milk for the production of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.]

[9] 和金泽, 崔浩然, 李钰芳, 等. 中甸牦牛乳酪蛋白源生物活性肽的鉴定及抗氧化活性[J]. 乳业科学与技术, 2024, 47(6): 1−7. [HE Jinze, CUI Haoran, LI Yufang, et al. Identification and antioxidant activity of bioactive peptides derived from Zhongdian yak milk casein[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2024, 47(6): 1−7.]

［10］卜丁东. 大豆抗氧化肽的制备及其对铅暴露小鼠的拮抗作用研究[D]. 天津：天津科技大学, 2023. ［BU Dingdong. Preparation of soybean antioxidant peptides and their antagonistic effects on lead-exposed mice[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2023. ］
［11］李瑞. 富含巯基亚麻籽肽的制备及其对慢性铅中毒小鼠的保护作用[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学, 2022. ［LI Rui. Preparation of mercapto-rich flaxseed peptide and its protective effect on chronic lead poisoning in mice[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022. ］
［12］WANG Wen, LIANG Qi, ZHAO Baotang, et al. Functional peptides from yak milk casein: Biological activities and structural characteristics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(16): 9072.
［13］MIAO Jianyin, LIAO Wanwen, PAN Zhuoyong, et al. Isolation and identification of iron-chelating peptides from casein hydrolysates[J]. Food & Function, 2019, 10(5): 2372−2381.
［14］李志成, 蒋爱民, 熊清权, 等. 山羊乳酪蛋白酶解物制备及体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 82−86. ［LI Zhicheng, JIANG Aimin, XIONG Qingquan, et al. Enzymatic preparation and antioxidative activity of goat, s milk casein hydrolysates *in vitro*[J]. Food Science, 2011, 32(23): 82−86. ］
［15］周桂成, 肖珊, 王波, 等. 酪蛋白肽锌螯合物的制备及体外消化分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 270−279. ［ZHOU Guicheng, XIAO Shan, WANG Bo, et al. Preparation and *in vitro* digestive analysis of casein-derived peptide-zinc chelates[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 270−279. ］
［16］王家栩. 高产 ACE 抑制肽发酵乳的工艺优化及其肽谱研究[D]. 哈尔滨：东北农业大学, 2023. ［WANG Jiaxu. Optimization of the fermentation process of high-yielding ACE inhibitory peptides fermented milk and analysis of their peptide profiles[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2023. ］
［17］胡冠华. 羊骨肽钙螯合物的制备及其预防骨质疏松的作用机制研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学, 2024. ［HU Guanhua. Preparation of sheep bone peptide calcium chelate and its mechanism of action in preventing osteoporosis[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024. ］
［18］刘卫震, 王冠华, 袁延佩, 等. 酪蛋白磷酸肽-钙螯合物的分级、表征及持钙特性[J]. 食品工业科技, 2024, 45(10): 93−100. ［LIU Weizhen, WANG Guanhua, YUAN Yanpei, et al. Fractionation, characterization and calcium-holding properties of casein phosphopeptide-calcium chelates[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(10): 93−100. ］
［19］黄磊, 孙纪录, 甘俊甜, 等. 红鳍东方鲀骨胶原蛋白肽锌螯合物制备、结构表征及消化特性[J]. 食品工业科技, 2025, 46(14): 256−266. ［HUANG Lei, SUN Jilu, GAN Juntian, et al. Preparation, structural characterization and digestive properties of zinc chelates of *Takifugu rubripes* bone collagen peptide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(14): 256−266. ］
［20］GE Zhen, LIU Juncai, SUN Jianan, et al. Tyrosinase inhibitory peptides from enzyme hydrolyzed royal jelly: Production, separation, identification and docking analysis[J]. Foods, 2023, 12(11): 2240.
［21］张雨, 李崴, 王丽娟, 等. 螺旋藻肽亚铁螯合物的制备及结构表征[J]. 食品工业科技, 2024, 45(10): 165−175. ［ZHANG Yu, LI Wei, WANG Lijuan, et al. Preparation and structural characterization of ferrous chelates of *Spirulina platensis* peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(10): 165−175. ］
［22］邝小贤, 张敏婕, 何冠浩, 等. 乳源锌螯合肽酶解制备及其螯合特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(10): 135−141. ［KUANG Xiaoxian, ZHANG Minjie, HE Guanhao, et al. Enzymatic preparation of zinc chelating dairy peptides and their chelating characteristics[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(10): 135−141. ］
［23］WANG Xu, GAO Ang, CHEN Yue, et al. Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization[J]. Food Chemistry, 2017, 229: 487−494.
［24］WANG Bo, XIAO Shan, ZHOU Guicheng, et al. Novel casein-derived peptide-zinc chelate: Zinc chelation and transepithelial transport characteristics[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(18): 6978−6986.
［25］ZHANG Yijun, DING Xiangjun, LI Meiqing. Preparation, characterization and *in vitro* stability of iron-chelating peptides from mung beans[J]. Food Chemistry, 2021, 349: 129101.
［26］ZHAO Qiannan, LIANG Wei, XIONG Zhe, et al. Digestion and absorption characteristics of iron-chelating silver carp scale collagen peptide and insights into their chelation mechanism[J]. Food Research International, 2024, 190: 114612.
［27］ZHANG Chao, DU Bowei, SONG Zihao, et al. Antioxidant activity analysis of collagen peptide-magnesium chelate[J]. Polymer Testing, 2023, 117: 107822.
［28］FLORA S J S, JAIN K, PANGHAL A, et al. Chemistry, pharmacology, and toxicology of monoisoamyl dimercaptosuccinic acid: A chelating agent for chronic metal poisoning[J]. Chemical Research in Toxicology, 2022, 35(10): 1701−1719.
［29］赵越. 广叶绣球菌多糖调控高脂小鼠小鼠肝脏氧化应激的分子机制[D]. 太谷：山西农业大学, 2023. ［ZHAO Yue. Molecular mechanism of *Sparassis latifolia* polysaccharides regulating liver oxidative stress in high-fat mice[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2023. ］
［30］ERCAL N, NEAL R, TREERATPHAN P, et al. A role for oxidative stress in suppressing serum immunoglobulin levels in lead-exposed fisher 344 rats[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2000, 39(2): 251−256.
［31］DAISLEY B A, MONACHESE M, TRINDER M, et al. Immobilization of cadmium and lead by *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mitigates apical-to-basolateral heavy metal translocation in a Caco-2 model of the intestinal epithelium[J]. Gut Microbes, 2019, 10(3): 321−333.
［32］高汶静, 梅雪婷, 郑西雨, 等. 姜黄素拮抗重金属镉、铅毒性机制的研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(20): 7132−7143. ［GAO Wenjing, MEI Xueting, ZHENG Xiyu, et al. Research progress on antagonistic mechanism of curcumin against heavy metal cadmium and lead toxicity[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2024, 55(20): 7132−7143. ］
［33］李俊彦. PAS-Na 经 SIRT1/NF-κB 通路对染铅大鼠皮层炎症反应影响的体内外研究[D]. 南宁：广西医科大学, 2021. ［LI Junyan. Effects of PAS-Na on cortical inflammation in lead-exposed rats via SIRT1/NF-κB pathway *in vitro* and *vivo*[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2021. ］
［34］FANG Yuanyuan, LU Lili, LIANG Yuan, et al. Signal transduction associated with lead-induced neurological disorders: A review[J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 150: 112063.
［35］SINGH V, SHRI R, SOOD P, et al. 5,7-Dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavone mitigates lead induced neurotoxicity in rats via its chelating, antioxidant, anti-inflammatory and monoaminergic properties[J]. Food and Chemical Toxicology, 2024, 189: 114747.
［36］刘子微. 阿魏酸类似物对强的松诱导的小鼠氧化应激的影响[D]. 无锡：江南大学, 2020. ［LIU Ziwei. Effects of ferulic acid analogues on prednisone-induced oxidative stress in mice[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020. ］