

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

大豆蛋白質酵素水解物對於續發性高血壓的影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2320-B-038 -038

執行期間：2000 年 8 月 1 日至 2001 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳 俊榮

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：臺北醫學大學保健營養學系

中 華 民 國 九 十 年 十 月 三 十 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

大豆蛋白質酵素水解物對於續發性高血壓的影響

Effects of the hydrolysate derived from soybean protein on blood pressure in hypertension

計畫編號：NSC 89-2320-B-038 -038

執行期限：1999年8月1日至2000年7月31日

主持人：陳俊榮 臺北醫學大學保健營養學系

一、中文摘要

高血壓是人類最盛行的慢性疾病，其中一種治療的方式即是抑制腎素-血管收縮素系統中的 Angiotensin-Converting Enzyme (ACE)而達到降低血壓的效果。在體外實驗中發現，大豆蛋白質酵素水解物具有抑制 ACE 之生理活性，因此本研究將針對大豆蛋白質經酵素水解後之產物，探討其在自發性高血壓大白鼠(SHR)體內是否可藉由抑制 ACE 活性的作用而達到降低血壓的效果。結果顯示大豆蛋白質酵素水解物確實可抑制體內之 ACE 活性，進而達到減少血壓上升的效果。

關鍵詞：大豆，蛋白質水解物，peptide，血管收縮素轉換酵素，續發性高血壓

Abstract

Hypertension is the most common public problem in the developed countries. One of the useful way of lowering blood pressure is to treat the patients with inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE). Recently, hydrolysate from food proteins are found to have ACE inhibitor activity. Therefore, the aim of this study is to investigate the antihypertensive effects of soybean protein. Soybean protein hydrolysate were prepared by pepsin-digested SPI (Soybean protein isolate). SHR were fed with diet containing NaCl and treated with different does (1% or 0.5%) of soybean protein hydrolysate. Blood pressure was measured and ACE activity was analyzed by using Hip-Gly-Gly as a substrate. The results showed that soybean protein hydrolysate feeding

have no adverse effect on growth and can significantly lower blood pressure compared to control group. We also found that soybean protein hydrolysate can inhibit ACE activity in plasma. These data suggest that soybean protein hydrolysate inhibit ACE activity and have antihypertensive effect in rats.

Key words : soybean protein, peptide, hypertension, angiotensin converting enzyme

二、緣由與目的

血壓是血流衝擊血管壁所引起的一種壓力，而所謂高血壓即是一種持續性的動脈壓上升。高血壓為人類最盛行的慢性疾病，根據行政院衛生署民國 88 年度調查統計結果顯示，高血壓名列國民十大死亡原因；此外，高血壓亦是造成腦血管疾病和心臟病的重要因子之一。由於高血壓患者其早期症狀並不明顯，包括暫時性的頭暈、頭痛、沈重或頸部緊束感，使一般患者容易忽略它的存在，最後嚴重時可能會導致腦部、心臟及腎臟等器官病變，因而素有隱形殺手之稱，所以如果說高血壓為第一大死因也實不為過 (宋 2000)。高血壓病患中少部份為其他疾病所引起，稱之為續發性高血壓，而約有 90-95 %原因不明，且無特定有效的治療方式，稱之為原發性高血壓(essential hypertension)。目前原發性高血壓仍為可治療而無法治癒，但若改善生活習慣或由飲食來作調整，亦能有效地抑制血壓的上升，甚或可降低高血壓和相關退化性疾病的發生。

在治療方面，以往較常使用的方法有由藥物阻斷中樞或周圍神經的 α -腎上腺性受器、 β -腎上腺性受器或利用鈣離子通道

抑制劑來降低血管平滑肌的收縮程度，但長期使用上述治療方式可能會對正常生理代謝或精神狀態造成一些不利的影響(陳 1996)。因此，近年來血管收縮素轉化...抑制劑(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)已漸漸地取代其他抗壓藥物，它的降壓機轉為降低週邊阻力，但不影響心臟速率或心臟血液輸出量(Okunishi et al. 1991)。

食品中的蛋白質經消化後可提供人體正常生長所需之胺基酸是眾所皆知的，但近年來在生理與生物化學的研究中顯示，蛋白質不僅僅是胺基酸的提供者，其經食品加工之酵素水解或人體消化後，可產生某些具有生理活性之 α ：片段，而對人體健康有種種的影響(楊 1999)。在 1979 年 Oshima et al.就從食品蛋白質中分離出具有降低血壓功能之 α ：，這類物質統稱為 ACEI (ACE Inhibitors, 血管收縮素轉換酵素抑制劑)，ACEI 與 ACE 結合，抑制其去除不具生理活性之 Angiotensin I 末端 His-Leu，防止具促使血管收縮特性之 Angiotensin II 的生成。近年來，許多研究者利用自發性高血壓大白鼠 (Spontaneously Hypertensive Rat, SHR) 對於乳製品、魚肉蛋白及穀物中的蛋白質進行實驗，發現其中亦含有具降血壓特性之 α ：序列存在(Yamamoto 1997)。

在魚肉蛋白質方面，1993 年有體外實驗證實沙丁魚肉之蛋白質水解物具有抑制 ACE 的活性(Matsui et al. 1993)，而 2000 年又有學者以由沙丁魚中分離出的短鏈 α ：進行人體實驗，發現每日提供高血壓病患 3 mg 的 Val-Tyr，血壓即可有顯著地降低，且在四週實驗期結束後血漿中 Ag II 的濃度亦顯著地下降(Kawasaki et al. 2000)。又 1992 年以正常血壓的大白鼠進行實驗，先由靜脈注射 10 ng/kg 的 Ag I 可提升 20 mmHg 的血壓，但若同時由靜脈注射 10 mg/kg 由柴魚中所分離出的 Leu-Lys-Pro，即可防止血壓的上升(Yokoyama et al. 1992)。在乳製品方面，酸奶經發酵後可產生兩種具生理活性的 tripeptide (Val-Pro-Pro 和 Leu-Pro-Pro)。1996 年有體內實驗證實每日給供應高血壓病患 100 mL 之酸奶，經四週後血壓即顯著地下降(Hata et al. 1996)；而在 SHR 方面，經口投予每公斤體重 10 mL 的酸奶，六小

時後其血壓即有顯著下降的情形，而且立即將老鼠犧牲後分析主動脈中 ACE 的活性，可發現有顯著地降低(Masuda et al. 1996)。在植物性蛋白質方面，可由小麥胚芽中分離出之 Ile-Val-Tyr，將之以每公斤體重 5 mg 注射入 SHR 體內，8 分鐘後即可造成顯著地血壓降低；將 Ile-Val-Tyr 與人類血漿進行 24 小時培養，亦可發現 ACE 活性隨時間的增加而降低(Matsui et al. 2000)。此外，對於 SHR 以口服或腹腔注射玉米蛋白(α -Zein)水解液，亦發現有明顯的降壓功效(Miyoshi et al. 1991a & Miyoshi et al. 1991b)。

大豆是傳統東方飲食中重要的蛋白質來源之一，因其產量豐富且價格低廉，一直以來都廣泛地運用於各種食品加工之中。有流行病學研究指出攝取傳統含較多大豆製品之族群罹患心血管疾病之機率較攝取西式飲食者為低(Kagan et al. 1974)。1999 年 Nevala et al.比較飲食中以酪蛋白和大豆蛋白為蛋白質來源之 SHR，發現大豆蛋白組其收縮壓較酪蛋白組為低。此外，在體外實驗中發現，大豆蛋白質酵素水解物具有抑制 ACE 之生理活性(Chen et al. 1997)。基於以上背景，本實驗的目的即在探討大豆蛋白中部分具生理活性之 α ：類於體內是否可以藉由抑制 ACE 的活性而達到降低血壓之功能。本年度以精製大豆蛋白質及其酵素水解物、測定此酵素水解物的於動物體內之 ACE 抑制活性及對血壓的影響為工作重點。本結果將可以作為日後人體試驗之依據，以預防或改善高血壓，進而減少心血管疾病的發生。樣品處理如下：蛋白質及試料之製備：將脫脂大豆粉加入 Tris-HCl 緩衝液充分攪拌之後，以離心分離方式將沈澱除去。上清液調整 pH 值至等電點，經離心後，取沈澱物溶於磷酸緩衝液，裝入透析膜中，進行 72 小時透析之後，透析內液以冷凍乾燥機充分乾燥，所得到的酸沈澱蛋白質粉末作為本實驗之基質。酵素分解物的製作：首先將蛋白質基質溶於去離子水中，加入 pepsin，在 pH 2.0，37 $^{\circ}$ C 的條件下反應 24 小時。反應終了後，沈澱部份用離心法去除，以冷凍乾燥機充分乾燥，即作為本實驗之樣品。ACE 抑制活性之測定：上述之蛋白質酵素分解物藉由此測定法確認樣品是否具有 ACE 抑制活性。以 pH 8.3 的 0.1

M 硼酸緩衝液調製 ACE 2.5 mU/mL、合成基質 Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine 12.5 mM/mL 溶液，以改良 Lieberman 等 (1975) 的方法測定。動物飼養：實驗採用雄性八週齡 SHR 大白鼠 30 隻，隨機分為一組控制組及兩組實驗組，三組在飲水及飼料中各添加 0.9% 和 1% 之 NaCl 以誘使其血壓上升，此外在兩組實驗組飼料中分別添加 0.5% 和 1% 上述大豆蛋白酵素水解產物。實驗期為期 12 週，於第 0、2、4、6、8 及 12 週測量其血壓並抽血分析其中 ACE 活性變化。

三、結果與討論

本實驗初 30 隻實驗動物血壓皆無差異，於實驗飲食和飲水中添加 NaCl 皆使自發性高血壓大白鼠上升，然未添加大豆蛋白酵素水解物之控制組血壓上升顯著較兩組實驗組高，控制組和實驗組之血壓值自第二週起即有顯著的差異 ($p < 0.05$)，而添加不同劑量之兩組間則無顯著差異。在血液 ACE 分析方面，未添加大豆蛋白酵素水解物之控制組血壓上升顯著亦較兩組實驗組高，控制組和實驗組之血壓值自第二週起即有顯著的差異 ($p < 0.05$)，而添加不同劑量之兩組間則無顯著差異。本研究室先前 (陳等, 1997) 曾從大豆煮汁的酵素消化物中分離出 8 種具有 ACE 抑制活性的 peptide，這些低分子 peptide 的胺基酸組成主要為疏水性及芳香族胺基酸。ACE 的功能是將血管收縮素 I 的 C 末端 His-Leu 游離，而形成血管收縮素 II，因此推測 ACE 的活性中心存在有疏水性部分，對於特定的胺基酸具有親和力，換言之，對於 ACE 具有拮抗性抑制的 peptide 必須有一定的疏水性，與 ACE 產生疏水性相互作用。具有 ACE 抑制活性的 peptide，上述的理論或許可以部分的解釋其抑制 ACE 的活性與疏水性的關係。

自從 Ondetti (1977) 由蛇毒中分離出具有增強 bradykinin 作用的 peptide 之後，血管收縮素轉換機制已漸漸解明，並作為醫藥品設計的基本理論，目前被高血壓患者廣泛使用的 captopril (D-3-mercapto-2-methylpropanoyl-L-proline) 即為在此理論下所衍生出來的藥品。而藉由此研究成果的刺激，許多 ACE 抑制物質

因而被發現，例如：微生物的培養液、動物膠的酵素水解物、酪蛋白的酵素水解物及天然食品的萃取液等等 (Miyoshi et al., 1991; Wyvratt and Patchett, 1985)。疾病的發生、進展均與營養條件有密切的關係。我國近年來飲食生活豐裕，糖尿病、高脂血症、高血壓、高尿酸血症等生活習慣性疾病日益增加。而心血管疾病是造成人類主要的死亡因素之一，台灣心血管疾病的死亡率並沒有因為醫療水準的進步而下降，反而有逐漸上升的趨勢。如果從日常的飲食生活習慣中加以留意、維持規律生活習慣，不難達成其預防效果，因此要以飲食習性來提升生命體防禦機能、預防發病的觀點來看，有必要深入研究食品中的生理機能活性成份；而且藉由飲食的攝取來預防或減緩疾病是最有效而且是最經濟的方法。

四、計畫成果自評

高血壓、動脈硬化而導致的心血管疾病，目前所了解的是和食品中的成份有著重大的關係。一般高血壓在醫藥治療方面，目前使用一種 ACE 的抑制劑 captopril 或其衍生物，但是長期服用此藥，會造成氣喘、過敏等一些副作用，且持續時間只有 6~12 小時 (Lipworth, 1989)，本實驗使用之大豆蛋白質酵素分解物，為天然食品、沒有服用過量或不足之困擾，無副作用、低過敏原性及高安全性為其優點。面臨高齡化社會所帶來的社會問題，生物醫學的研究重心不再是延長壽命，而是轉為尋求降低因老化而漸增的罹病率。本研究為了有效應用此一大宗農作物，並有鑑於坊間價格高昂之健康食品、藥品充斥，為達到建立一般民眾正確的攝食、營養觀念為目的，以科學實驗方法來佐証大豆所具有之生理活性，其結果亦可對生理活性 peptide 在臨床上的應用提出貢獻。

五、參考文獻

- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y. and Takano, T. : A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr*;64:767-771(1996)
- Kagan, A., Harris, B. R., Winkelstein, W., Johnson, K. J., Kato, H., Syme, S. L., Rhoads, G.G., Gay,

- M. L., Nichaman, M. Z., Hamilton, H. B. and Tillotson, J.: Epidemiology studies of coronary heart disease and stroke on Japanese men living in Japan, Hawaii and California: demographic, physical, dietary and biochemical characteristics. *J Chron Dis* 27:345-364(1974)
- Kawasaki, T., Seki, E, Osajima, K., Yoshida, M., Asada, K., Matsui, T. and Osajima, Y. : Antihypertensive effect of valy-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on hypertensive subjects. *J Human Hyperten*, 14:519-523(2000)
- Langley, S. C., and Jackson, A. A.: Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clinical Science*, 86, 217-222(1994)
- Langley-Evans, S. C., Welham, S. J., Sherman, R. C., and Jackson, A. A.: Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clinical Science*, 91, 607-615(1996)
- Lieberman, J.: Elevation of serum angiotensin converting enzyme level in sarcoidosis. *Am J Med*, 59, 365-372(1975)
- Lipworth, BJ., McMurray, JJ., Clark, RA., and Struthers, AD.: Development of persistent late onset asthma following treatment with captopril. *European Respiratory Journal*, 2, 586-8(1989)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193, 265-275(1953)
- Masuda, O., Nakamura, Y. and Takano, T. : Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rat. *J Nutr*;126:3063-3068(1996)
- Matsui, T., Li, C. H., Tanaka, T., Maki, T., Osajima, Y. and Matsumoto, K. : Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma. *Biol Pharm Bull*, 23(4): 427-431(2000)
- Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., and Osajima, Y. : Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus Licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. *Biosci Biotech Biochem*, 57(6):922-925(1993)
- Messina, M.: Modern applications for an ancient bean: Soybeans and the prevention and treatment of chronic disease, *Journal of Materials Science Letters*, 125, 567-569(1995)
- Miyoshi, S., Kaneto, T., Yoshiyama, T., Fukui, Y., Tanaka, F. and Maruyama, H. : Hypotensive activity of enzymatic -Zein hydrolysate. *Agric Bio Chem*, 55(5):1407-1408 (1991)
- Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H., and Maruyama, S. : Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agri. Biol. Chem*, 55, 1313-1318(1991)
- Nagata, Y., Ishiwaki, N., and Sugano, M.: Studies on the mechanism of antihyper-cholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats. *J. Nutr.*, 112, 1614-1625(1982)
- Nevala, R., Vaskonen, T., Vehniäinen, J., Korpela, R. and Vapaatalo, H. : Soy based diet attenuates the development of hypertension when compared to casein based diet in spontaneously hypertensive rat. *Life Sci*, 60(2):115-124 (2000)
- Okunishi, H., Kawamoto, T., Kurobe, Y., Oka, Y., Ishii, K., Tanaka, T. and Miyazaki, M. : Pathogenetic role of vascular angiotensin-converting enzyme in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharm and Phys*, 18:649-659(1991)
- Ondetti, M A., Rubin, B., and Cushman, D. W.: Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 196, 441-444 (1977)
- Oshima, G., Shimabukuro, H., and Nagasawa, K.: Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 566, 128-137(1979)
- Savage, W. D., Sutherland, J. W., Wei, L. S., and Schmidt, S. J.: Biologically active components inactivation and protein insolubilization during heat processing of soybean, *J. Food Sci.*, 60, 164-168(1995)
- Sirtori, C. R., Manzoni, C., Pazzucconi, F., Lovati, M. R., Monetti, M., and Gatti, E.: Soy and cholesterol reduction : Clinical experience, *J. Nutr.*, 125, 598-605(1995)
- Sugiyama, K., Takada, K., Egawa, M., Yamamoto, I., Onzuka, H., and Oba, K.: Hypotensive effect of fish protein hydrolysate. *日本農藝化学會誌*, 65, 35-43(1991)
- Wyvratt, MJ., and Patchett, AA.: Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 5, 483-531(1985)

- Yamamoto, N. : Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopoly* 43:129-134(1997)
- Yamamoto, S., Toida, I. And Iwai, K. Re-examination of spectro-photometric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Nihon Kyobu Shikkann Shi*, 18:297-301(1989)
- Yokoyama, K., Chiba, H. and Yoshikawa, M. : Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci Biotech Biochem*, 56(10):1541-1545 (1992)
- Yamaguchi, M., Nishikiori, F., Nozaki, O., Ito, M., and Furukawa, Y.: Effect of long-term 'corn peptide' ingestion on alcohol metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats with alcohol loading. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 42, 567-80(1996)
- 丁予安：高血壓之致病機轉，*內科學誌*, 3:110-119 (1992)
- 丸山進：從食品蛋白質中生成的降血壓 peptide, *Bioscience and Bioindustry*, 47, 38-42(1989)
- 宋鴻樟：高血壓才是第一大死因，*中華衛誌*, 19(1): 16-19(2000)
- 家森幸男, 池田克己, 村田梅司, 奈良安雄, 管井隆二：酪蛋白的酵素分解物對腦中風的預防效果，*日本營養食糧學會誌*, 48: 307-311(1995)
- 陳俊榮, 楊素卿, 劉姚伶, 未綱邦男, 謝明哲：大豆煮汁的胃蛋白...水解物中具有抑制血管收縮素轉換酵素之 peptide, *中華民國營養學會雜誌*, 22: 435-444(1997)
- 陳培瑛：使用抗高血壓藥物於老年患者之效率與危險性，*藥學雜誌*, 12(3):49-54(1996)
- 楊詠翔：食品中抗高血壓 ° 的發展現況，*食品工業*, 31(1):9-18(1999)