行政院國家科學委員會專題研究計畫成 RRPC88020266 (5.P)

大豆蛋白質酵素水解物對於自發性高血壓大白鼠的降血壓效果

Effect of the hydrolysate derived from soybean protein on blood pressures in spontaneously hypertensive rats

計畫編號：NSC 88-2314-B-038 -007
執行期限： 87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日
主持人：陳俊榮　　執行機構：私立台北醫學院保健營養學系

一、中文摘要

本研究採用之大豆蛋白質酵素水解物係由大豆酸沈澱蛋白質經胃蛋白酶作用後精製而得。研究中測驗大豆蛋白質酵素水解物的抑制血管收縮素轉換酵素活性，以及在自發性高血壓大白鼠之降血壓功效。精製過程中得到 3 個劃分，分別為：SP-1、SP-2 及 SP-3。其中 SP-1 的抑制活性 IC_{50} 為 0.5mg/mL，比 SP-2 及 SP-3 具有更高的活性。經胺基酸成分分析的結果顯示，SP-1 比 SP-2 及 SP-3 具有較多的芳香族胺基酸，因此推論芳香族胺基酸與抑制血管收縮素轉換酵素的活性有密切的相關性。SP-1 在經口投予（1.0, 2.0, 4.0 mg/kg）實驗上均能顯著的降低自發性高血壓大白鼠的血壓。

關鍵詞：大豆，大豆蛋白質，胜，血管收縮素轉換酵素，自發性高血壓大白鼠，高血壓

Abstract

Soybean protein hydrolysate (SPH) prepared from soybean acid precipitated protein by treatment with pepsin was tested for inhibitory activity against angiotensin I converting enzyme (ACE) and for hypotensive effects on spontaneously hypertensive rats (SHR). Three inhibitory peptide fractions of ACE isolated from the SPH. SP-I at 0.5 mg/mL concentration provided 50% inhibition against ACE, and SP-I was more effective compared with SP-II and SP-III. The data showed that the characteristic of SP-I fractions was contained hydrophobic and aromatic amino acids, and it is related to the decrease of ACE activity. Also, the anti-hypertensive activity of the soybean broth SP-I fraction was investigated. SP-I (1.0, 2.0, 4.0 mg/kg, *pc*) markedly lowered the blood pressure of the SHR.

Keywords: soybean, soybean protein, peptide, angiotensin I converting enzyme (ACE), spontaneously hypertensive rat (SHR), hypertension

二、緣由與目的

食物對於生命體而言，是維持生命的重要物質之一；而食物本身也含有某些高次的機能性成份，能影響人體的健康。近年，由於飲食習慣的改變，癌症、心臟病及腦血管疾病，也就是所謂的成人病，佔死亡原因之首位，比例年年上昇，而且很難用醫藥方法來治療。腎衰竭、心血管疾病及腦血管疾病的主要原因為高血壓，一般治療方針為控制日常飲食習慣或以藥物控制（1）。高血壓的形成原因非常複雜，目前已知的大致可分為：自發性高血壓及後天性高血壓；後天性高血壓主要反應機制為：在腎臟產生之血管收縮素 I（angiotensin I, AI）藉血液循環，經過肺臟中之血管收縮素轉換酵素（angiotensin converting enzyme, ACE）作用，將 C 末端之 His-Leu 游離，並產生血管收縮素 II（angiotensin II, A II）。A II 能使平滑肌強烈地收縮，導致血壓上昇，因此如果能抑制 ACE 的活性，便能達到抑制血壓上昇之效果。自從 Ondetti（2）由蛇毒中分離出具有增強 bradykinin 作用的胜之後，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 即為在此理論下所衍生出來的藥品。

有許多研究報告指出，被生命體所攝取的蛋白質，經過腸道消化酵素的作用之後，以其特有的立體構造，對生命體的生

理系統造成種種的影響。例如：牛乳中除了含有免疫球蛋白、lactoferrin 之外，其主要蛋白質之一的酪蛋白在消化過程中，也會產生麻醉活性、促進鈣吸收、細胞生長因子等等，具有調節生理機能之物質（3）。近年來的研究發現，食物因子中除了鈉、鉀、鎂、酒精、膳食纖維、脂肪之外，蛋白質的質與量亦會對血壓造成影響（4）。食品蛋白質除了具有營養機能之外，經過腸道酵素的消化作用之後的水解產物，能夠發現其具有各種生理機能（5）。

最近的研究報告指出：蛋白質有降低血中膽固醇的功效，並預期能夠預防高血壓及腦中風的發生（6-11）。這些研究中發現，如果對於自發性高血壓腦中風易發症大白鼠（stroke-prone spontaneously hypertensive rat, SHR-SP）投與某些食品蛋白質，可以抑制血壓的上升，達到延長壽命的效果（12）。丸山（13）探討各種食品蛋白質的酵素水解物，包括：酪蛋白、玉米蛋白、膠原蛋白及其他日常食用植物中的抑制 ACE 的胜，並檢討各種有效胜的經口投與的可行性。Yamaguchi 等（14）將玉米蛋白質酵素水解物（corn peptide）投與負荷酒精的 SHR-SP，經長期的攝取，玉米蛋白質酵素水解物能增強肝功能，加速酒精的代謝。Saito 等（15）從酒粕中分離出 5 種 dipeptide（Val-Tyr, His-Tyr, Arg-Phe, Val-Trp, Tyr-Trp），將其投與幼齡及老齡的 SHR，均能有效地降低實驗動物的血壓。這說明了食品不僅有營養機能及嗜好機能，還具有增強生命體防禦能力、調節內分泌、疾病的抑制及回復、維持生命體的恆常性等等，具有調節身體機能的成份（16-21）。本研究室於 85 年度獲臺北醫學院學術研究委員會補助，進行大豆蛋白質酵素水解物中具有抑制血管收縮素轉換酵素成分的研究，從大豆煮汁的胃蛋白酶水解物中分離出 6 種具有抑制 ACE 活性之胜，其結果已發表於中華民國營養學會雜誌（22）。大豆因為含有豐富的蛋白質，經由動物實驗、流行病學調查發現，大豆是預防成人病之健康食品。本研究之動機在於利用胜多樣化的生理活性，並確認其易溶解、消化吸收等特性，進一步研究除了在氮源的補充優於蛋白質及胺基酸外，在預防成人病的效果上，是否有其具體之效果。

三、結果與討論

近年來心血管疾病是造成人類主要的死亡因素之一，但是這些成人病如果從日常的飲食習慣中加以留意、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成人病是最有效且經濟的方法。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。本研究主要之研究成果分述如下：

1. 精製大豆蛋白質酵素水解物：大豆酸沈澱蛋白質經酵素水解、限外過濾，得到淡黃色透明液體。再經離子交換樹脂、分子篩等充填管柱處理，獲得三種成分相異之劃分，分別命名為 SP-1，SP-2 及 SP-3。其分子量分佈推測約在 250~5000 之間，平均約在 1000 左右。

2. 測定大豆蛋白質酵素水解物的 ACE 抑制活性：精製過的 SP-1，SP-2 及 SP-3 三種劃分，分別測定 ACE 抑制活性，以 IC_{50} 表示其活性值。結果為 SP-1：0.51mg/mL；SP-2：1.5mg/mL；SP-3：1.3mg/mL，以 SP-1 具有較高之抑制活性。

3. 分析試料中胺基酸含量：經胺基酸成分分析的結果顯示，SP-1 比 SP-2 及 SP-3 具有較多的芳香族胺基酸及疏水性胺基酸，因此推論 SP-1 具有較多的此類胺基酸與其抑制 ACE 的活性有密切的相關性。一般而言，C 末端如果是 Trp、Phe、Pro 或 Tyr 者，而 N 末端為 Val、Ile 的短鏈胜，即具有 ACE 抑制活性。

4. 確認大豆蛋白質酵素水解物對於 SHR 的降血壓效果：以 SP-1 投予 SHR 並

觀察其血壓及脈搏變化，結果顯示於圖一及圖二。對照組在投予前的血壓為 183~185mmHg，投予後並無顯著的變化；而 SP-1 投予組（1.0g/kg）在投予後 30 分時，血壓降至 171.8± 9.0 mmHg，投予後 1 小時血壓恢復至原來的水準。投予量為 2.0 及 4.0g/kg 時，在投予後 30 分時，血壓分別降至 165.4 ± 12.5 及 167.4± 13.1 mmHg，之後血壓值緩緩上升，約在投予後 2 小時血壓恢復至原來的水準。對照組、實驗組（1.0、2.0 及 4.0g/kg）在投予前的平均脈搏數分別為：377.2、371.1、372.8 及 388.3 次/分。各組在投予後 30 分至 6 小時觀察脈搏數的變化，組間並無顯著的差異。在本實驗室先前的實驗顯示：大豆蛋白質酵素水解物中確實含有多種抑制 ACE 之 peptide（16）。最近的研究報告指出：從大豆所分離出的蛋白質中有降低血中膽固醇的功效，並預期能夠預防高血壓及腦中風的發生。Maruyama，Suetsuna，Sugiyama（25-27）等研究者發現，如果對於自發性高血壓腦中風易發症大白鼠（SHR-SP）投與食品蛋白質或及其酵素分解物等，可以抑制血壓的上升，達到延命的效果。從這些研究報告中可以推測：蛋白質在消化吸收過程中，發揮了其生理機能。

四、計畫成果自評

在各先進國家中如將心血管疾病加上腦血管疾病的死亡率，比惡性腫瘤死亡率要高。高血壓症狀並不會引發致命性的結果，但會誘發腦栓塞、心肌梗塞等等併發症，因此高血壓的預防為當務之急。鈴木等曾經報告各種抑制血管收縮素轉換酵素的食品成分。本研究應用大豆中富含的蛋白質成分，以胃蛋白酶消化，探討其對自發性高血壓大白鼠（spontaneously hypertensive rats, SHR）的降血壓效果。一般高血壓在醫藥治療方面，目前使用一種 ACE 的抑制劑 Captopril，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（28）。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。本計畫之結果亦可對生理活性胜在臨床上的應用提出貢獻。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胜在臨床上的應用提出貢獻。本計畫預計完成之工作項目為：精製大豆蛋白質酵素水解物；測定大豆蛋白質酵素水解物的 ACE 抑制活性；分析試料中胺基酸含量；確認大豆蛋白質酵素水解物對於 SHR 的降血壓效果等工作均已如期完成。將來仍應繼續探討胜之胺基酸組成與 ACE 抑制活性之相關性，以及吸收率等等相關課題，也就是說如何篩選（或設計）出具有高抑制活性之胜，經由口服方式能保持其原有之活性由腸道吸收並由血液運送到標的組織或器官發揮其作用。本研究之結果將儘速整理，並在學術期刊上發表。

五、參考文獻

1. Lardinois, C. K.: Nutritional factors and hypertension. *Archives of Family Medicine*, 4(8):707-713(1995)
2. 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(4288), 441-4(1977)
3. 藤巻正生：*食品機能*，學會出版中心(日本)(1988)
4. Obarzanek, E., Velletri, P. A., and Cutler, J. A.: Dietary protein and blood pressure. *JAMA*, 275(20), 1598-1603(1996)
5. 吉川正明：Biologically functional peptides derived from food protein. *食品與開發*, 23(4), 39-43(1988)
6. Sirtori, C. R., Manzoni, C., Pazzucconi, F., Lovati, M. R., Monetti, M., and Gatti, E.: Soy and

cholesterol reduction: Clinical experience, *J. Nutr.*, 125(Mar), 598-605(1995)

7. 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(1), 164-168(1995)

8. Messina, M.: Modern applications for an ancient bean: Soybeans and the prevention and treatment of chronic disease, *Journal of Materials Science Letters*, 125(Mar), 567-569(1995)

9. Nagata, Y., Ishiwaki, N., and Sugano, M.: Studies on the mechanism of antihypercholesterolemic 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)

10. 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(5), 607-615(1996)

11. 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(2), 217-222(1994)

12. 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(4), 307-311(1995)

13. 丸山進：從食品蛋白質中生成的降血壓胜, *Bioscience and Bioindustry*, 47(11), 38-42(1989)

14. 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(6), 567-80(1996)

15. Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., and Imayasu, S.: Antihypertensive effects of peptide in sake and its by-products on spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(5), 812-816(1994)

16. Parker, N. T., and Goodrum, K. J.: A comparison of casein, lactalbumin, and soy protein effect on the immune response to a T-dependent antigen. *Nutrition Research*, 10, 781-792(1990)

17. Fujiwara, S., Kadooka, Y., Hirota, T. and Nakazato, H.: Screening for mitogenic activity of food microorganisms and their skim milk culture supernatants. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 43, 203-208(1990)

18. Chen, J. R., Suetsuna, K., and Yamauchi, F.: Isolation and characterization of immunostimulative peptides from soybean. *J. Nutr. Biochem.*, 6, 310-313(1995)

19. Shinohara, K., Kuroki, S., Miwa, M., Kong, Z.L., and Hosoda, H.: Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1369-1375(1988)

20. Hara, Y., Matsuzaki, T., and Suzuki, T.: Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components. *日本農藝化學會誌*, 61, 803-808(1987)

21. Moriguchi, S., Jackson, J. C., and Watson, R. R.: Effects of retinoids on human lymphocyte functions *in vitro*. *Hum. Toxicol.*, 4, 365-378(1985)

22. 陳俊榮, 楊素卿, 劉姚伶, 末綱邦男, 謝明哲：大豆煮汁的胃蛋白酶水解物中具有抑制血管收縮素轉換酵素之胜, *中華民國營養學會雜誌*, 22(4), (1997)

23. 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(1951)

24. Lieberman, J.: Elevation of serum angiotensin converting enzyme level in sarcoidosis. *Am. J. Med.*, 59, 365-372(1975)

25. Maruyama, S. and Suzuki, H.: Peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, 46(5), 1393-1394(1982)

26. Suetsuna, K., Chen, J. R., and Yamauchi, F.: Biological properties of angiotensin I converting enzyme inhibitor, dipeptides derived from *Allium sativum*. *The Clinical Report*, 25, 4349-4355(1991)

27. Sugiyama, K., Takada, K., Egawa, M., Yamamoto, I., Onzuka, H., and Oba, K.: Hypotensive effect of fish protein hydrolysate. *日本農藝化學會誌*, 65, 35-43(1991)

28. 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)

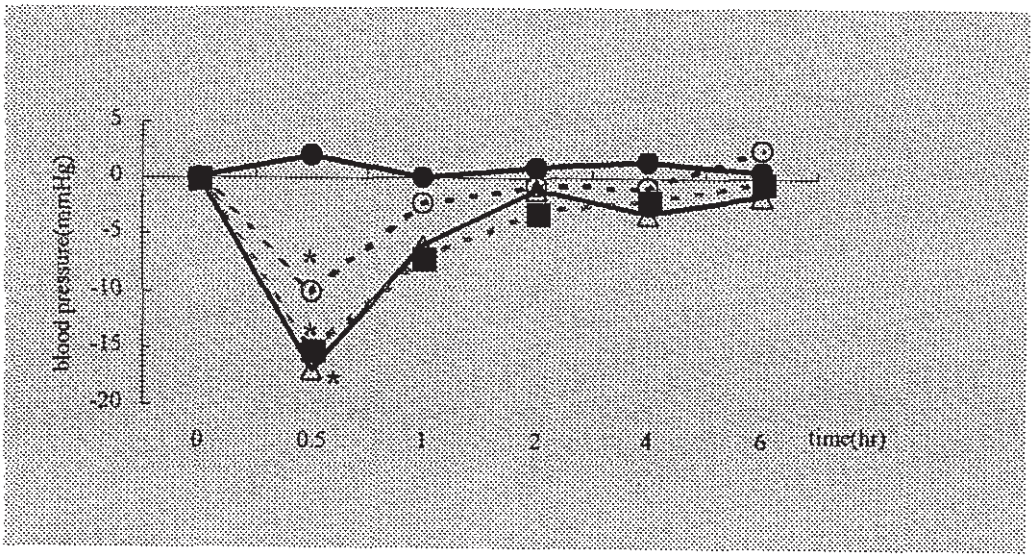

Figure 1 Time course of difference blood pressure in SHR after oral administration with peptide fraction (SP-1).

●; Control, ○; peptide (1.0 g/Kg), △; peptide (2.0 g/Kg), ■; peptide (4.0 g/Kg). *; $p<0.05$.

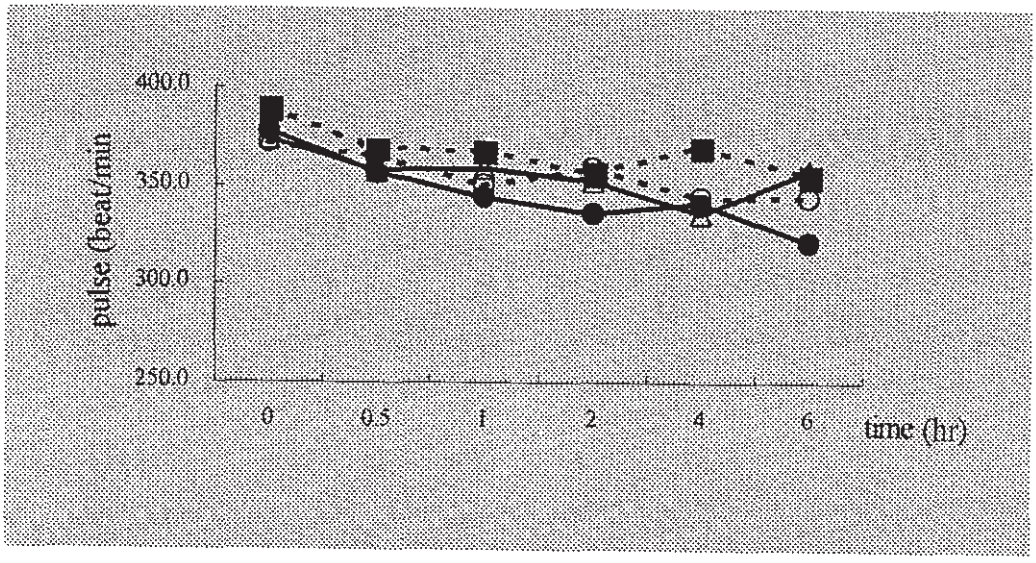

Figure 1 Time course of pulse in SHR after oral administration with peptide fraction (SP-1).

●; Control, ○; peptide (1.0 g/Kg), △; peptide (2.0 g/Kg), ■; peptide (4.0 g/Kg).