

太平洋鲑鱼肠道中小肽与血液循环中肽关系的研究^{*}

刘栋辉¹, 冯 健¹, 田丽霞¹, 刘永坚¹, 黄仲立²

(1. 中山大学水生经济动物研究所, 广东 广州 510275;

2. 中山大学分析测试中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 为了研究太平洋鲑鱼 *Oncorhynchus* spp. 肠道完整吸收小肽与肠道中小肽的关系, 用 20% 酶解酪蛋白、酸解酪蛋白、酪蛋白和生理盐水 4 组溶液分别进行各 5 尾太平洋鲑 (体质量为 300 ± 13.8 g) 肠道灌注试验 ($1 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)。20 min 后尾静脉采血制备血浆, 高效液相色谱分析结果表明: 灌注酶解酪蛋白溶液的太平洋鲑鱼血液循环中总肽量和某些肽量极显著 ($P < 0.01$) 高于灌注生理盐水、酪蛋白、酸解酪蛋白溶液; 较灌注生理盐水、酪蛋白、酸解酪蛋白溶液的太平洋鲑鱼血液循环中总肽量分别提高了 167.3%、40.2% 和 48.3%。实验结果表明, 太平洋鲑鱼血浆中肽量的增加与肠道提供的肽种类和数量有关, 太平洋鲑鱼肠道能够一定程度地完整吸收某些小肽进入血液循环。

关键词: 小肽; 生理学; 太平洋鲑鱼 *Oncorhynchus* spp.; 高效液相色谱

中图分类号: Q175; S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) S1-0069-04

动物肠道对蛋白质的吸收方式, 除了传统的游离氨基酸模式, 越来越多的研究证明, 小肽也是一种重要途径。小肽经肠道上皮细胞膜转运较游离氨基酸有耗能低、转运快、载体不易饱和的优越性^[1, 2]。一般认为, 肠道吸收的小肽主要是在肠上皮细胞内进一步完全水解, 以游离氨基酸 (FAA) 的形式进入血液循环中^[3]。但鱼类血液中小肽的数量、性质与肠道中小肽的关系尚不清楚。关于小肽在冷水性鱼类中的营养生理作用目前尚未见正式相关报道。因此, 本实验研究了典型冷水性鱼类—太平洋鲑鱼 *Oncorhynchus* spp. 肠道中小肽与血液循环中肽量变化的关系, 了解太平洋鲑鱼是否能完整吸收肠道中小肽进入血液循环; 血液循环中小肽种类及数量, 与肠道底物小肽的关系, 这对于认识小肽在鱼类体内蛋白质代谢中的作用及其形式具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验鱼与基础日粮组成

20 条体质量为 (300 ± 13.8) g 的太平洋鲑鱼 *Oncorhynchus* spp. 由中山大学水生经济动物研究所试验场提供。饲料日粮配方由鱼粉、豆粕、面粉、鱼油、玉米蛋白粉、复合维生素、复合矿物盐等组成, 其营养成分 (w) 为: 粗蛋白 38.0%, 粗脂肪 16.1%, 总糖 24.2%, 粗纤维 2.0%, 粗灰分

5.3%。

1.2 试验分组与水质条件

试验太平洋鲑鱼分 4 组, 每组 5 条, 每条饲养于 0.25 m^3 水族箱, 每天换水 $1/3$, 饲养期为 2 周。投饲量为体质量的 2%, 每天投喂 2 次, 分别为 9:00 和 16:00。其水质条件为水温 (18.0 ± 1.3) $^{\circ}\text{C}$, 溶解氧为 (8.33 ± 0.32) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 ± 0.1 , 氨氮为 (0.119 ± 0.011) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 总硬度为 1.51 ± 0.16 , 钙为 (25.8 ± 0.2) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 亚硝酸盐为 (0.154 ± 0.05) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 硝酸盐为 (0.110 ± 0.014) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 灌注液的制备

酪蛋白由 Sigma 公司提供, 含氮量 $w = 12.7\%$, 酪蛋白中氨基酸摩尔分数 (%) 为 Lys 9.395, Asp 6.528, Glu 20.043, Ser 5.438, Gly 1.926, His 2.759, Arg 6.200, Thr 4.345, Ala 4.115, Pro 6.981, Tyr 4.054, Val 6.665, Met 2.771, Ile 6.002, Leu 8.507, Trp 0.858, Phe 4.493, Cys 0.902。酶解酪蛋白参考 Buchmann 等方法, 由胰酶、肠肽酶水解酪蛋白制备^[6]。根据水解前后氨基酸含量计算酶解酪蛋白的平均链长为 2.98 (平均链长 = $\frac{\text{水解小肽样 AA 含量} - \text{FAA}}{\text{FAA}}$)。HPLC 分析结果

表明酶解酪蛋白主要含的为二肽和三肽, 用 Cu-Sephadex G 10 柱 ($10 \mu\text{m}$, $8 \times 250 \text{ mm}$) 分离 FAA

* 收稿日期: 2004-01-02

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (2002722)

作者简介: 刘栋辉 (1971 年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 冯健; E-mail: fengjian08@163.com

后,测定出肽占氨基氮 82.36%。酸解酪蛋白由酪蛋白经 6 mol/L HCL,在真空条件下于 110℃水解 24 h (含 $\varphi=0.1\%$ 酚),用 Cu Sephadex G 10 柱分离 FAA 后,测定出游离氨基酸含量为 87.65%。试验前酪蛋白、酶解酪蛋白、酸解酪蛋白配置成 20% 的灌注液。对照组灌注液为生理盐水。

1.4 试验设计和方法

试验前太平洋鲑鱼饥饿 24 h,按 10 mL·kg⁻¹ 灌注含量为 20% 的酶解酪蛋白、酸解酪蛋白、酪蛋白溶液和生理盐水。使用硬度适中的塑料管从口腔插入太平洋鲑鱼胃中,注入灌注液,然后将太平洋鲑鱼放入水中。20 min 时,将太平洋鲑鱼捞出,尾静脉采血 (根据预实验,20 min 时,血浆中小肽为最大值)。

血液经 2 000 g 离心 10 min 分离血浆,等体积加入 0.6 mol·L⁻¹ 高氯酸溶液混匀,3 000 g 4℃离心 10 min,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取上清液用截留相对分子质量 10 000 限外滤器离心过滤,收集滤液用于液相色谱分析。

1.5 分析方法

血浆中肽的反相液相色谱分析,参照王之盛等 (1998 年) 方法进行^[4]。选用 Cu Sephadex C¹⁸ 柱 (10 μm, 8×250 mm),使用 HP-1000 液相色谱仪测定。

1.6 数据处理及统计

对各组血浆肽峰面积采用 SPSS 11.5 统计软件,进行非平衡均数的方差分析。

2 结 果

2.1 肠道灌注酶解酪蛋白、酸解酪蛋白、酪蛋白溶液对循环中肽的影响

肠道灌注生理盐水、酪蛋白、酸解酪蛋白、酶解酪蛋白溶液 20 min 后,太平洋鲑鱼血浆中的小肽含量肽谱图见图 1。肠道灌注酶解酪蛋白溶液的太平洋鲑鱼血液循环中总肽量和某些肽量极显著 ($P<0.01$) 或显著 ($P<0.05$) 高于灌注生理盐水、酪蛋白、酸解酪蛋白溶液;较灌注生理盐水、酪蛋白、酸解酪蛋白溶液的太平洋鲑鱼血液循环中总肽量分别提高了 167.3%、40.2% 和 48.3%;血浆中的肽峰峰面积除第 1 肽峰无显著差异,第 10、11 肽峰为负增长外,其余各肽峰峰面积均显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 地高于灌注生理盐水组;第 2、4—9、12 峰面积比例增加最大。血浆中的大部份肽峰峰面积 (第 2—5、7—10、12 肽峰) 分别显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 地高于灌注酪蛋白溶液组;第 3、5、7、9、10 峰峰面积比例增加最大,第 11、13 峰为负增长。血浆中的部份肽峰峰面积 (第 2—5、7、8、10、13 肽峰) 分别显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 地高于灌注酸解酪蛋白溶液组;第 2、3、4、5、7 峰峰面积比例增加最大,第 9 峰峰面积为负增长 (表 1)。从肠道吸收酶解酪蛋白、酪蛋白、酸解酪蛋白溶液后血液循环中肽分析可见,血液循环中增加比例较大的肽集中在第 2、4—6、8 肽组分中。

表 1 太平洋鲑鱼胃灌注酶解酪蛋白、生理盐水、酪蛋白和酸解酪蛋白对太平洋鲑鱼血浆小肽组分峰面积 ($10^3\times U_V^2, 100\mu L^{-1}$) 的影响¹⁾

Tab 1 Effects of stomach infusion of CSP, saline, CA and FAA chromatographic peak area of plasma in Pacific salmon							
肽峰	酶解酪蛋白	生理盐水	酪蛋白	酸解酪蛋白	增加/%		
F1	679	552	622	620	22.9	9.1	9.5
F2	570 ^{Aa}	249 ^B	431 ^b	334 ^B	128.9	32.4	70.5
F3	266 ^{Aa}	215 ^a	136 ^{Bb}	136 ^{Bb}	23.4	94.9	94.9
F4	1385 ^{Aa}	350 ^B	780 ^C	483 ^B	296.1	77.6	186.6
F5	1452 ^{Aa}	504 ^B	970 ^c	885 ^c	188.4	49.8	64.1
F6	1589 ^A	507 ^B	1395 ^A	1179 ^A	213.6	13.9	34.7
F7	237 ^{Aa}	111 ^B	158 ^c	147 ^c	112.6	49.5	61.4
F8	2969 ^{Aa}	228 ^B	2113 ^c	2249 ^c	1200.1	40.5	32.0
F9	255 ^A	87 ^B	76 ^B	268 ^A	191.6	236.6	-5.0
F10	544 ^A	622 ^A	325 ^b	374 ^b	-12.5	67.3	45.2
F11	81 ^{Aa}	136 ^{Bb}	256 ^C	72 ^{Aa}	-40.3	-68.3	12.0
F12	94 ^A	46 ^B	68 ^{AB}	84 ^A	103.6	38.7	12.3
F13	532 ^a	405 ^b	592 ^a	394 ^b	31.5	-10.1	35.0
FT	10651 ^{Aa}	4012 ^B	7921 ^c	7245 ^c	167.3	40.2	48.3

1) 同一行数据右上角不同上标小写字母代表有显著差异 ($P<0.05$),大写字母代表有极显著差异 ($P<0.01$)

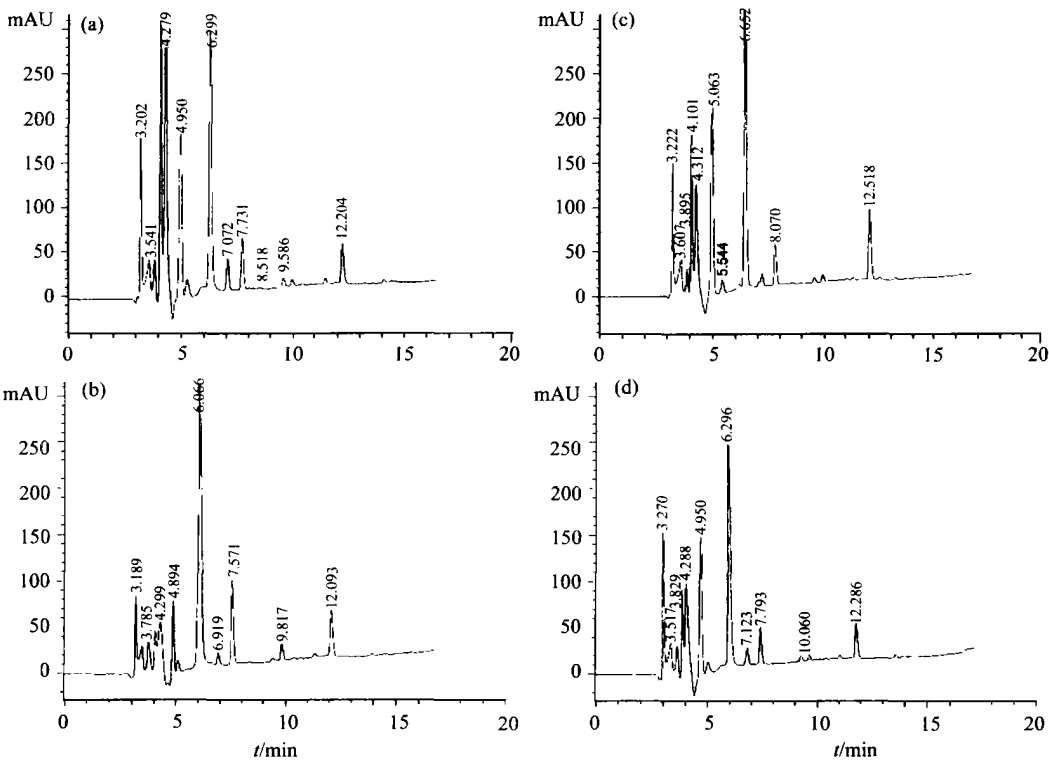


图1 太平洋鲑鱼血浆小肽 HPLC 分析

Fig 1 HPLC analyse of plasma peptides in Pacific salmon

(a) 灌注酶解酪蛋白; (b) 灌注生理盐水 (对照组); (c) 灌注酪蛋白; (d) 灌注酸解酪蛋白

2.2 肠道酶解酪蛋白溶液中小肽与太平洋鲑鱼血液循环中肽总类和数量的比较

灌注酶解酪蛋白溶液后太平洋鲑鱼血浆中各肽组份较灌注生理盐水组除第 10、11 肽峰面积为负增长外，其余各肽峰峰面积和总肽量均有不同程度的增加。若以肽峰面积表示浓度，血浆中的 F4、F5、F6、F8 肽组分增加量最为明显 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，分别是酶解酪蛋白溶液灌注量的 28.0%、25.9%、56.9%、77.2%(表 2)。

3 讨论

灌注酶解酪蛋白溶液组太平洋鲑鱼血浆中小肽总量较灌注生理盐水组、酪蛋白、酸解酪蛋白溶液组太平洋鲑鱼有极显著增加 ($P<0.01$)，分别增加了 167.3%、40.2%和 48.3%，表明太平洋鲑鱼胃灌注酶解酪蛋白溶液后，血液循环中小肽总量和绝大部分肽组份有明显的增加。其原因为酶解酪蛋白溶液中小肽含量最高，酸解酪蛋白溶液中也含有部分小肽，而酪蛋白经过消化道消化吸收，也有部分小肽进入血液循环。试验结果可以清楚表明，太平洋鲑鱼血液循环中一定种类和数量小肽的存在，并直接受肠道中小肽种类与数量的影响。

表 2 酶解酪蛋白溶液与太平洋鲑鱼血浆中主要小肽的峰面积($10^3 \times U_v^2, 100 \mu L^{-1}$) 和比例的比较¹⁾

Tab 2 The comparison of peak area and ratio(%) of peptides between CSP and plasma in Pacific salmon

肽峰	酶解酪蛋白	酶解酪蛋白(B)	生理盐水(B)	峰面积比例/%		增加量/%
F1	5527	679	552	12.3	10.0	2.3
F2	2260	570	249	25.2	11.0	14.2
F3	3386	266	215	7.8	6.4	1.5
F4	3699	1385 ^A	350 ^B	37.4	9.5	28.0
F5	3665	1452 ^A	504 ^B	39.6	13.7	25.9
F6	1902	1589 ^A	507 ^B	83.5	26.6	56.9
F7	1061	237 ^A	111 ^B	22.3	10.5	11.8
F8	3551	2969 ^A	228 ^B	83.6	6.4	77.2
F9	1487	255 ^A	87 ^B	17.1	5.9	11.3
F10	2027	544	622	26.8	30.7	-3.8
F11	4536	81 ^a	136 ^b	1.8	3.0	-1.2
F12	541	94 ^A	19 ^B	17.4	3.6	13.9
F13	3001	532	405	17.7	13.5	4.2
FT	36643	10651 ^A	4012 ^B	29.1	10.9	18.2

1) 同一行数据右上角不同上标小写字母代表有显著差异 ($P<0.05$), 大写字母代表有极显著差异 ($P<0.01$)

太平洋鲑鱼血液循环中小肽肽量的变化与肠道中某些肽的完整吸收有关。一些研究认为, 二、三肽被肠道吸收摄入肠上皮细胞后, 除了被肠上皮细胞

中的肽酶水解,进而以游离氨基酸的形式进入血液循环,部分完整的小肽能够通过肠黏膜上皮细胞的肽载体进入血液循环^[5,6]。通过鼠等动物试验结果表明血液循环中肽的重要来源是食物中的肽^[7,8]。从本试验太平洋鲑鱼血浆肽组分分析表明,灌注酶解酪蛋白溶液后太平洋鲑鱼的血浆中,许多与酶解酪蛋白溶液中小肽相同的肽峰面积增加,灌注的酶解酪蛋白溶液是经胰酶和肠肽酶充分水解的产物,其中的小肽可能大多具有抗消化道酶解的性质,在肠道中不易进一步被水解,而较完整地吸收进入血液循环。从灌注的酶解酪蛋白溶液组太平洋鲑鱼血浆小肽量看,大部分与酶解酪蛋白灌注溶液相同肽峰的浓度较对照组(灌注生理盐水)大幅度升高。如以太平洋鲑鱼单位体质量中的血浆含量 $200 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 分析,完整吸收量大的 4 个肽组分增加值均在 20% 以上,最大肽组分为灌注酶解酪蛋白溶液中相应小肽量的 77.2%。考虑小肽在血液循环中清除率很快,半衰期较短,则实际上完整吸收的小肽量可能更高。

试验结果还显示,太平洋鲑鱼血液循环中小肽量的变化还与消化道和机体其它组织代谢有关。太平洋鲑鱼灌注酪蛋白溶液后,血浆中的小肽并不完全与酶解酪蛋白溶液的小肽呈平行变化,如酶解酪蛋白溶液中小肽组分含量很高的 F1、F3、F10、F11、F13 肽段对血液循环中相应肽段的小肽量影响不大,而在酶解酪蛋白溶液中,尽管 F6 肽段小肽含量并不高,但灌注酶解酪蛋白后的相应小肽峰面积明显提高。因此影响太平洋鲑鱼血液循环中小肽含量的因素不仅是肠道中的小肽,消化道或机体其它组织代谢活动可能也是血液循环中小肽的重要来源。

太平洋鲑鱼肠道对底物蛋白质的吸收过程中,完整吸收进入血液循环的小肽数量较大,一些完整吸收进入血液循环的小肽数量受其种类和肠道中小肽浓度的影响。血液循环中小肽的种类与被吸收的完整小肽的氨基酸组成可能有特殊的联系,进一步研究太平洋鲑鱼血浆中各个肽峰小肽氨基酸组成将有助于揭示它们间的作用和关系。并可能发现在鱼类机体中具有不同特殊生理功能的生物活性小肽。

参考文献:

- [1] GANAPATHY V, LEIBACK F H. Is intestinal transport energized by a proton gradient[J]. *Am J Physiol*, 1985, 249: 153—160.
- [2] WEBB K E. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: A review[J]. *J Anim Sci*, 1990, 68: 3011—3022.
- [3] BUCHMANN N B, BOZA J. Protein v. enzymic protein hydrolysates: Nitrogen utilization in starved rats[J]. *J Agric Food Chem*, 1979(30): 583—589.
- [4] 王之盛, 乐国伟, 施用晖, 等. 来航鸡门静脉血浆中寡肽的高效液相色谱法分析[J]. *四川农业大学学报*, 1998, 16(4): 459—463.
- [5] GARDNER M L G. Absorption of amino acids and peptides from a complex mixture in the isolated small intestine of the rat[J]. *J Physiol(Lond)*, 1975, 253: 233—256.
- [6] INFANTE J L Z. Nutritional rehabilitation of malnourished rats by di- and tripeptides: nitrogen metabolism and intestinal response[J]. *J Nutr Biochem*, 1992(3): 285—290.
- [7] DANEIL H, BAUMANN S A. Physiological importance and characteristics of peptide transport in intestinal epithelial cells[M]. New York: EAAP Publication, 1994.
- [8] MARIA K K, BAMBA T. Iron speciation in intestinal contents of rats fed meal composed of meat and non meat sources of protein and fat[J]. *Food Chem*, 1995(52): 47—56.

The Relationship between the Small Peptides in Intestinal and the Peptides Amount in Blood Circulation on Pacific Salmon *Oncorhynchus* spp.

LIU Dong hui, FENG Jian, TIAN Li xia, LIANG Gui ying, HUANG Zhong li

(Institute of Aquatic Animal, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: To investigate the special and amount of peptides whom could be directly absorbed in intestine into blood circulation of Pacific salmon *Oncorhynchus* spp.. 20 Pacific salmon of $(300 \pm 13.8) \text{ g}$ were divided into four groups and were infused differently into stomach with 20% casein (CA), casein enzymatic hydrolysate (CSP), casein acidized (FAA) solution and physiological saline ($1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ weight). The blood of test fishes was sampled 20 min. after infusion from trail vein. The results respecting showed that the total amount of peptides and the amount of some peptides in plasma given CSP were significantly higher than those given physiological saline, CA and FAA ($P < 0.01$). The total amount of peptides in plasma given CSP was increased by 173.9%, 41.0% and 48.3% than those given physiological saline, CA and FAA. The study indicated that the increase of peptides in plasma was closely related with the kind and amount of peptides in intestine and some kinds of small peptides could be absorbed part into blood circulation on Pacific salmon.

Key words: small peptides; physiology; Pacific salmon *Oncorhynchus* spp.; HPLC