

文章编号:1000 - 0615(2004)05 - 0505 - 05

草鱼肠道中小肽与血液循环中肽的关系

冯 健, 刘栋辉, 刘永坚, 田丽霞, 梁桂英

(中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要:为了研究草鱼肠道完整吸收小肽与肠道中小肽的关系,用 6.25% 酶解酪蛋白、酸解酪蛋白、酪蛋白溶液和生理盐水进行草鱼肠道灌注试验(1mL·100g⁻¹体重)。20min 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草鱼血液循环中总肽量和某些肽量显著($P < 0.05$)高于灌注生理盐水、酸解酪蛋白、酪蛋白溶液;较灌注生理盐水草鱼血液循环中总肽量提高 18.73%。肠道灌注酸解酪蛋白、酪蛋白溶液对血液循环中总肽量影响不大,无显著性差异($P > 0.05$)。草鱼血浆中肽量的增加与肠道提供的肽种类和数量有关。实验结果表明,草鱼肠道能够完整地吸收某些小肽进入血液循环。

关键词:草鱼;小肽;高效液相色谱;吸收

中图分类号:S917

文献标识码:A

The relationship between the intestinal small peptides and the peptides amount of blood circulation in *Ctenopharyngodon idella*

FENG Jian, LIU Dong-hui, LIU Yong-jian, TIAN Li-xia, LIANG Gui-ying

(*Institute of Aquatic Animal and Key Lab. of Breed on Aquatic Seed in Guangdong,*

Guangzhou 510275, China)

Abstract: The study was designed to investigate the special amount of peptides which could be completely absorbed in blood circulation of grass carp. Four groups of grass carp were infused into the front intestine with 6.25% casein (CA), casein enzymatic hydrolysate (CSP), casein acidized (FAA) solution and normal saline (1mg·100g⁻¹ weight). Blood was collected after 20 min infusion from tail vein. The results of analyses by HPLC showed that the total amount of peptides and the amount of some peptides in plasma of grass carp given CSP were significantly higher than those of the grass carp given CA, FAA and normal saline ($P < 0.05$). The total amount of peptides in plasma of grass carp given CSP was increased by 18.73% compared with those given FAA. There was no significant difference of total amount of peptides in plasma of grass carp given CA, FAA and normal saline ($P > 0.05$). The increase of peptides in plasma was closely related with the kind and amount of peptides in intestine. The study indicated that small peptides could be absorbed into blood circulation of grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; small peptides; HPLC; absorption

收稿日期:2003-11-18

资助项目:广东省自然科学基金资助(2001382)

作者简介:冯 健(1958-),男,四川成都人,博士,主要从事动物营养与营养性疾病的研究。现工作单位:四川雅安四川农业大学动物科技学院,邮编:625014

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,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,鱼类肠道吸收的小肽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。但草鱼血液中小肽的数量、性质与肠道中小肽的关系尚不清楚。比较研究从草鱼的肠道完整吸收进入血液循环的小肽种类及数量,与肠道小肽的关系,对于认识小肽在鱼类体内蛋白质周转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尾均重为 $1300 \pm 100\text{g}$ 的草鱼由中山大学水生经济动物研究所鱼场提供。饲料日粮配方由豆粕、小麦、鱼油、玉米油、统糠、复合维生素、复合矿物盐组成,其营养成分为粗蛋白23%、粗脂肪为4%、糖为40%、粗纤维为24%、粗灰分为9%。

1.2 试验分组与水质条件

试验草鱼分4组,每组5条,每条饲养于 0.25m^3 水族箱,每天换水 $1/3$,饲养期为2周。投饲量为体重的2%,每天投喂2次,分别为9:00和16:00。其水质条件为水温 27.8 ± 3.0 ,溶解氧为 $7.35 \pm 0.36\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 7.0 ± 0.1 ,氨氮为 $0.119 \pm 0.011\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,总硬度为 1.51 ± 0.16 ,钙含量为 $25.8 \pm 0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,亚硝酸盐为 $0.154 \pm 0.05\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,硝酸盐为 $0.110 \pm 0.014\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 灌注液的制备

酪蛋白由Sigma公司生产,含氮量12.7%,酪蛋白中氨基酸摩尔比(%)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。酶解酪蛋白由胰酶、肠肽酶水解酪蛋白制备。酸解酪蛋白由盐酸水解酪蛋白制备。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[链长计算:平均链长=(水解小肽AA含量-FAA)/FAA]。HPLC分析结果表明酶解酪蛋白主要含的为二、三肽,用Cu-Sephadex G 10柱($10\mu\text{m}$, $8 \times 250\text{mm}$)分离FAA后,测定出肽占氨基氮82.36%。酸解酪蛋白游离氨基酸含量为氨基氮

72.28%。试验前酪蛋白、酶解酪蛋白、酸解酪蛋白配置成6.25%的灌注液。对照组灌注液为生理盐水。

1.4 试验设计和方法

试验前草鱼饥饿24h,按 $1\text{mL} \cdot 100\text{g}^{-1}$ 体重灌注含量为6.25%酶解酪蛋白、酸解酪蛋白、酪蛋白溶液和生理盐水。草鱼用MS-200麻醉液,按 3×10^{-4} 浓度麻醉后,使用硬度适中的塑料管从口腔插入草鱼前肠,注入灌注液,然后将草鱼放入水中,使其苏醒。20min后,将草鱼捞出,再次麻醉后,尾静脉采血。

血液经 2000g 离心10min分离血浆,等体积加入 $0.6\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸溶液混匀, 3000g 离心10min,用 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取上清液用截留分子量 10kDa 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^[3]的方法进行。选用Cu-Sephadex C^{18} 柱($10\mu\text{m}$, $8\text{mm} \times 250\text{mm}$),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SAS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、酪蛋白对循环中肽的影响

肠道灌注酶解酪蛋白溶液20min后,草鱼血浆中的小肽含量肽谱图见图1。草鱼血浆中的小肽含量与对照组(生理盐水)相比,总量增加18.73,差异显著($P < 0.05$),血浆中的第1、3、8、9、10、12肽峰面积分别显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)地高于对照组;第9、12、8、10峰面积比例增加最大,第5、7、11峰为负增长。肠道灌注酸解酪蛋白、酪蛋白溶液对循环中肽总量的影响不大,分别增加5.86%和3.66%,无显著性差异($P > 0.05$)。但某些肽量峰面积相互间差异显著($P < 0.05$)(表1)。

2.2 肠道酶解酪蛋白中肽与草鱼血液循环中肽总类和数量的比较

从肠道吸收酶解酪蛋白、酸解酪蛋白、酪蛋白中肽总类与血液循环中肽分析可见,酶解酪蛋白中的一些主要肽峰与草鱼血浆中的肽峰具有相同

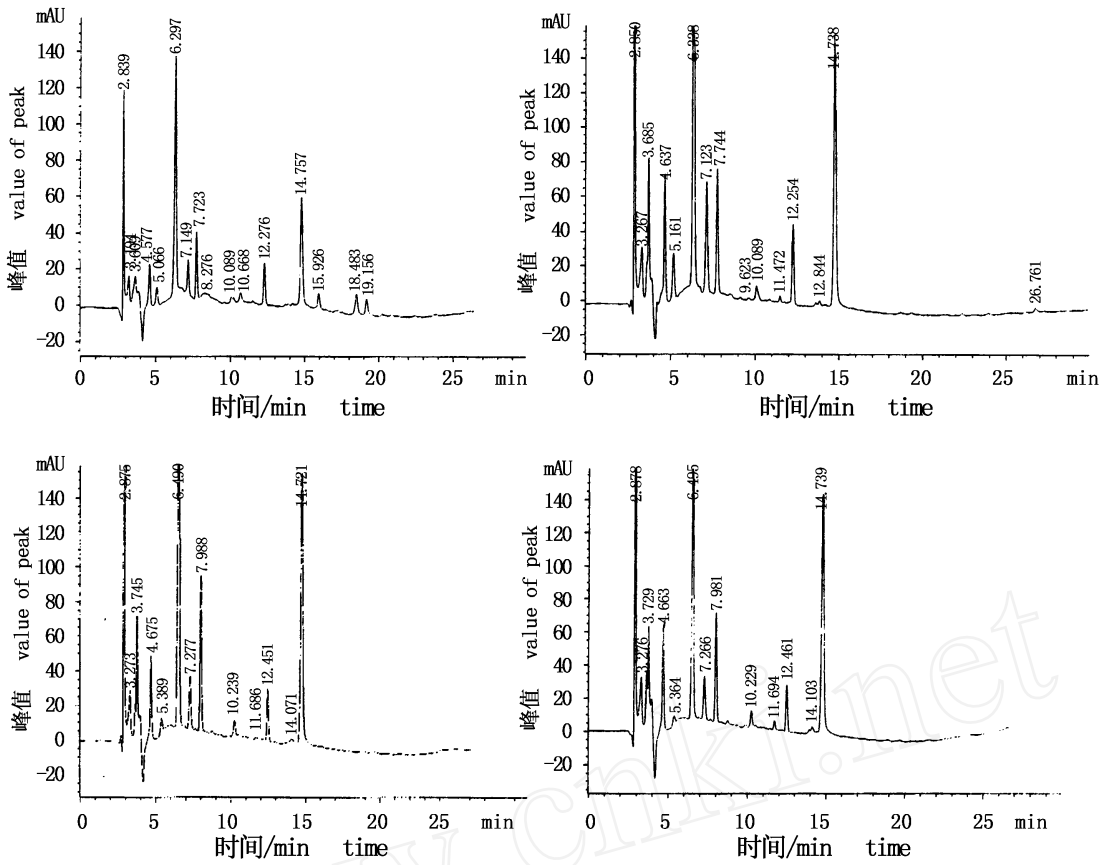


图 1 草鱼血浆小肽 HPLC 分析

Fig. 1 HPLC analysis of plasma peptides in grass carp

A. 灌注生理盐水(对照组); B. 灌注酶解酪蛋白; C. 灌注酸解酪蛋白; D. 灌注酪蛋白

A. saline infusion (control); B. CSP infusion; C. FAA infusion; D. CA infusion

表 1 草鱼前肠灌注酶解酪蛋白、酸解酪蛋白、酪蛋白和生理盐水对草鱼血浆小肽组分峰面积($10^3 \times Uv^2 \cdot 100\mu L^{-1}$)的影响

Tab. 1 Effects of front intestinal infusion of ECSP, ACSP, CSP and saline chromatographic peak area ($10^3 \times Uv^2 \cdot 100\mu L^{-1}$) of plasma in grass carp

肽峰 fraction	生理盐水 saline (control)	酶解酪蛋白 CSP	酸解酪蛋白 FAA	酪蛋白 CA	增加 (%) increment		
F1	1762.94 ^a	2057.08 ^b	1984.00 ^b	1854.81 ^{ab}	16.68	12.54	5.21
F2	668.40 ^a	728.27 ^a	682.03 ^a	647.89 ^a	8.96	2.04	-3.03
F3	1320.39 ^a	1489.71 ^b	1531.90 ^b	1422.94 ^{ab}	12.82	16.02	7.77
F4	1449.51 ^a	1466.79 ^a	1648.22 ^b	1373.96 ^a	1.19	13.71	-5.21
F5	908.77 ^a	783.01 ^b	777.70 ^b	982.40 ^a	-13.94	-14.42	8.10
F6	5089.44Z ^a	5509.81 ^{ab}	4380.84 ^a	3764.95 ^c	8.26	-13.92	-26.02
F7	1408.31 ^a	863.56 ^B	1341.21 ^a	1330.68 ^a	-38.68	-5.76	-5.51
F8	1250.10 ^a	2657.87 ^B	1338.49 ^a	1754.19 ^C	112.61	7.07	40.32
F9	569.01 ^a	1357.69 ^B	936.03 ^C	1016.95 ^C	138.61	64.50	78.72
F10	782.06 ^a	1134.05 ^B	736.09 ^a	489.78 ^c	45.01	-5.86	-37.37
F11	546.48 ^a	307.38 ^B	565.80 ^a	537.37 ^c	-33.75	3.54	-11.67
F12	679.62 ^a	1513.60 ^B	565.80 ^c	275.01 ^D	122.71	-15.63	-59.53
F13	312.33 ^a	15.38 ^B	300.85 ^a	1909.64 ^C	-95.08	382.23	511.42
FT	16747.3 ^a	19884.20 ^b	17729.30 ^a	17360.60 ^a	18.73	5.86	3.66

注: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 ($P < 0.01$)

Notes: values with different superscript of small letters within same row indicate significantly difference ($P < 0.05$); values with different superscript of capital letters within same row indicate significantly highly difference ($P < 0.01$)

的保留时间,酶解酪蛋白中比例较大的肽集中在F3、6、7、8、9、10、11、12、13等几个肽组分中。灌注酶解酪蛋白后草鱼血浆中的F8、9、10、12占总肽峰面积的比例提高。若以肽峰面积表示浓度、草

鱼体中含血浆 $6.5\text{ml}\cdot 100\text{g}^{-1}$ 计,血浆中的F8、9、10、12肽组分增加量分别是酶解酪蛋白灌注量的46.6%、24.5%、12.4%和9.6%(表2)。

表2 酶解酪蛋白与草鱼血浆中主要小肽的峰面积($10^3 \times \text{Uv}^2 \cdot 100\mu\text{L}^{-1}$)和比例的比较
Tab. 2 The comparison of peak area($10^3 \times \text{Uv}^2 \cdot 100\mu\text{L}^{-1}$) and ratio(%) of peptides between CSP and plasma in grass carp

肽峰 fraction	酶解酪蛋白 CSP	酶解酪蛋白(B) CSP(blood)	生理盐水(B) saline(blood)	峰面积比例(%) percent of peak area		增加量(%) increment
F1	1025.06	2057.08 ^b	1762.94 ^a	200.7	172.0	28.7
F2	1422.04	728.27 ^a	668.40 ^a	51.2	47.0	4.2
F3	5582.00	1489.71 ^b	1320.39 ^a	26.7	23.7	3.0
F4	1179.00	1466.79 ^a	1449.51 ^a	124.4	122.9	1.5
F5	2188.44	783.01 ^b	908.77 ^a	35.8	41.5	- 5.7
F6	14121.11	5509.81 ^a	5089.44 ^a	39.0	36.0	3.0
F7	3557.41	863.56 ^b	1408.31 ^a	24.3	39.6	- 15.3
F8	3019.28	2657.87 ^b	1250.10 ^a	88.0	41.4	46.6
F9	3224.35	1357.69 ^b	569.01 ^a	42.1	17.6	24.5
F10	2833.18	1134.05 ^b	782.06 ^a	40.0	27.6	12.4
F11	4500.18	307.38 ^b	546.48 ^a	6.8	12.1	- 5.3
F12	8695.68	1513.60 ^b	679.62 ^a	17.4	7.8	9.6
F13	6076.17	15.38 ^b	312.33 ^a	0.3	5.1	- 4.9
FT	57423.93	19884.20 ^b	16747.3 ^a	34.6	29.2	5.5

注:同表1

Notes:same as table 1

3 讨论

灌注酶解酪蛋白、酸解酪蛋白、酪蛋白后草鱼血浆中小肽总峰面积较灌注生理盐水草鱼增加了18.73%、5.86%和3.66%。因酶解酪蛋白中小肽含量最高,酸解酪蛋白中也含有部分小肽,而酪蛋白被消化和吸收进入血液循环的小肽需要较长的过程。试验结果表明,草鱼血液循环中低分子小肽的存在,并受肠道中小肽种类与数量的影响。

草鱼血液循环中小肽含量的变化与肠道中某些肽的完整吸收有关。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^[4, 5]。通过雏鸡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^[6]。从本试验草鱼血浆肽组分分析表明,灌注酶解酪蛋白草鱼的血浆中,许多与酶解酪蛋白中小肽相同的肽峰面积增加,灌注的酶解酪蛋白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。从血浆小肽量看,相同小肽的浓度较对照组大幅度升高。如从草鱼单位体重中的血浆含量 $6.5\text{mL}\cdot 100\text{g}^{-1}$ 分析,完整吸收量最大的肽组分几乎接近灌注酶解酪蛋白中相应小肽量的46.6%。因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,草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。草鱼灌注酪蛋白后,血浆中的小肽并不完全与酶解酪蛋白的小肽呈平行变化,如酶解酪蛋白中小肽组分含量很高的F3、6、7肽段对血液循环中相应肽段的小肽量影响不大,而在酶解酪蛋白中,尽管F1肽段小肽含量较低,但灌注酶解酪蛋白后的相应小肽峰面积明显提高。乐国伟等^[6]的试验证实,雏鸡的体内游离氨基酸的吸收过程中,有小肽的合成并影响血液循环中的肽量。因此,影响草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。

草鱼肠道对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,一些完整吸收入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,进一步研究草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,同时,将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: G153 - G160.
- [2] Webb K E. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review[J]. *J Anim Sci*, 1990, 68: 3011 - 3022.
- [3] Wang Z S, Le G W, Shi Y H, *et al.* Determination of oligopeptides in portal plasma of the Leghorn by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *J Sichuan Agricul*, 1998, 16 (4): 459 - 463. [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.]
- [4] Galibosis I, Park D S. Analysis of bound amino acids in the plasma of fed rats: a new preparation procedure [J]. *J Nutri Biochem*, 1991, 2: 25 - 30.
- [5] Gardner M L. 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] Le G W, Shi Y H, Hu Z Y. Effect of casein hydrolysate and free amino acids on the amount of portal plasma peptides in chickens [J]. *Chinese Journal of Animal and Vet Sciences*, 1997, 28 (6): 481 - 488. [乐国伟, 施用晖, 胡祖禹. 小肽与游离氨基酸对雏鸡血液循环中肽的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 1997, 28(6): 481 - 488.]

《海洋水产研究》2005 年征订启事

《海洋水产研究》学报,是由中国水产学会和中国水产科学研究院黄海水产研究所共同主办、科学出版社出版的水产学术性期刊。现为中国科技核心期刊、中文核心期刊。

主编由黄海水产研究所所长唐启升院士担任。副主编及编委由中国科学院海洋研究所、中国海洋大学、南京大学、上海水产大学、大连水产学院、国家海洋局一所、南海水产研究所、东海水产研究所等国内外著名的专家教授担任,稿源来自全国各地。

《海洋水产研究》学报为双月刊,主要刊载与海水养殖生态、病害、育种、营养、海洋生物资源、环境保护、增养殖工程、食品工程、水产品质量检测和渔业捕捞技术等有关的水产基础与应用研究方面的报告、综述、研究简报和动态信息等。

2005 年始每册定价 20 元,全年 120 元(含邮资)。国内外公开发行人。邮发代号:24 - 153,欢迎投稿和订阅。

编辑部地址:山东省青岛市南京路 106 号,黄海水产研究所

邮政编码:266071

电话:0532 - 5833580 联系人:陈 严

E-mail: Liusl@ysfri.ac.cn; Chenyan@ysfri.ac.cn

http://www.ysfri.ac.cn