

酪蛋白小肽和氨基酸对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)血液循环和组织蛋白质合成的影响*

蒋步国¹ 冯 健¹ Raembek W² 黄 钧¹ 罗 波¹ 潘燕云¹

(1. 广西大学水产研究所 南宁 530004; 2. 德国慕尼黑大学动物生理生化研究所 慕尼黑 80089)

提要 采用草鱼前肠灌注和 ³H-Tyr 同位素标记方法, 进行酪蛋白小肽和氨基酸对草鱼血液循环和组织蛋白质合成的影响研究。结果表明, 灌注酶解酪蛋白(CSP)溶液组的草鱼血液循环中总肽量为 19430.82 $\mu\text{v}/\mu\text{l}$, 灌注游离氨基酸(FAA)溶液组的草鱼血液循环中总肽量为 16033.00 $\mu\text{v}/\mu\text{l}$, 前者显著高于后者($P<0.05$), 同时前者的大多数肽段肽量也高于后者, 2 组血浆中某些肽段肽量有显著($P<0.05$)或极显著差异($P<0.01$)。CSP 与 FAA 组草鱼肠道、肝脏、背肌组织蛋白质合成率(%/d)分别为 96.84 和 72.25, 98.64 和 81.65, 65.38 和 46.59, CSP 组草鱼显著或极显著高于 FAA 组($P<0.05$ 或 $P<0.05$)。草鱼血浆中总肽量和某些肽段肽量分别与草鱼肠道、胰脏和背肌组织蛋白质合成率有明显的正相关。实验表明, 肠道对酪蛋白小肽的迅速吸收和进入血液循环中的某些小肽可能是促进草鱼组织蛋白合成的重要因素。

关键词 小肽, 氨基酸, 蛋白质合成, 草鱼

中图分类号 S963.73

传统的营养学认为蛋白质营养就是氨基酸营养, 消化道中的蛋白质必需水解成游离的氨基酸才能被机体吸收利用。但当动物喂以按理想氨基酸模式配置的纯和日粮, 并不能产生最佳的生产性能(Colnago, 1991)。近来的研究表明蛋白质在动物消化道中消化酶的作用下的水解终产物部分是 2 个或 3 个氨基酸残基的小肽, 它们以完整的形式被吸收到循环系统而被组织利用(Infante, 1992; Poullain, 1995)。Agar 等(1975)首先观察到肠道能完整地吸收转运双甘肽, 此后研究者提出了令人信服的小肽可被完整吸收的论据, 证实了完整的甘氨酸被转运吸收, 大量小肽可直接以肽的形式被吸收进入体循环。蛋白质在消化道中的消化终产物部分是小肽而不是游离氨基酸(FAA)(Shibata *et al*, 1991)。消化生理的研究已经证实小肽(SP)在吸收上比游离氨基酸具有优越性, 小肽能被完整吸收并在机体蛋白质合成中具有重要作用观点逐步被人们接收。营养性功能小肽研究已成为世

界生理学和营养学方面的一个令人关注的领域。但目前氨基酸的不同供给形式在鱼类体内对组织蛋白质合成的影响和其作用机理尚不了解, 尚未见到鱼类中具有营养生理功能的小肽报道。本文研究了酪蛋白小肽与相应的氨基酸对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)血液循环中小肽含量、种类和对草鱼组织蛋白质代谢的影响, 对于探讨小肽对鱼类营养生理的影响与机理具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 试验鱼与饲养

30 尾均重为 $1100 \pm 150\text{g}$ 的 2 龄草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)购于广西南宁某养殖场。饲养 1 周, 日粮按中国草鱼成鱼营养标准配制, 由豆粕、次粉、鱼粉、菜籽粕、玉米油、统糠、复合维生素、复合矿物质组成, 其营养成分为粗蛋白 23.5%、粗脂肪为 4.6%、糖为 40.2%、粗纤维为 14.6%、粗灰分为 9.3%。

* 广西科技厅基金计划项目资助, 0815006-1-1 号。蒋步国, E-mail: 354454798@qq.com

通讯作者: 冯 健, 广西大学教授, 德国慕尼黑大学博士(VMD), E-mail: fengjian08@163.com

收稿日期: 2009-01-12, 收修改稿日期: 2009-03-19

每天投喂 2 次, 分别为 9:00 和 16:00。其水质条件分别为: 水温 27.8 ± 3.0 , 溶解氧 7.35 ± 0.36 mg/L, pH 7.0 ± 0.1 , 氨氮为 0.133 ± 0.014 mg/L, 总硬度 1.59 ± 0.21 , 钙含量 26.7 ± 0.6 mg/L, 亚硝酸盐 0.169 ± 0.06 mg/L, 硝酸盐 0.118 ± 0.019 mg/L。

1.2 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(CSP)由胰酶、肠肽酶水解酪蛋白制备。酸解酪蛋白(FAA)由盐酸水解酪蛋白制备。根据水解前后氨基酸含量计算 CSP 的平均链长为 2.90 [链长计算: 平均链长 = (水解中样 AA 含量 - FAA)/FAA]。HPLC 分析结果表明, CSP 主要含的二、三肽, 用 Cu-Sephadex G10 柱($10 \mu\text{m}$, 8×250 mm)分离 FAA 后, 测定出肽占氨基氮 83.47%。FAA 游离氨基酸含量为氨基氮 73.69%。试验前将 CAP、FAA 配置成 6.25% 的灌注液。

1.3 试验设计和方法

1.3.1 试验 1 由于小肽在血液循环中代谢较快, 须首先了解其在血液循环中的变化。15 尾草鱼饥饿 24h 后, 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, 按 1ml/kg 体重灌注 6.25% CSP 后, 然后将鱼放入水中, 使其苏醒, 于 10、15、20、25 和 30min 通过尾静脉采血各 3 尾鱼。血液经 2000g 离心 10min 分离血浆, 等体积加入 0.6mol/L 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。以确定小肽灌注后在血液循环高峰时段。

1.3.2 试验 2 10 尾草鱼饥饿 24h, 分为 2 组, 每组 5 尾, 按上述方法, 1ml/kg 体重灌注 6.25% CSP 和 FAA, 20min 后, 将草鱼捞出, 尾静脉采血。之后对草鱼进行解剖, 分别取背肌、肝脏、前肠组织各 2—5g。

血液经上述处理收集滤液用于液相色谱分析。背肌、肝胰脏、肠道组织加入等体积 10% 三氯乙酸(TCA) (W/V), 超声破碎仪(Virsonic 300, USA)匀浆 5min, 然后 4000g 离心 15min, 收取上清液再用等体积的 5% TCA 洗涤沉淀, 离心, 合并两次上清液。用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, -28 保存待测 $^3\text{H-Tyr}$ 放射性强度及酪氨酸含量。

1.4 分析方法

1.4.1 血浆中肽的反相液相色谱分析 选用 Cu-Sephadex C18 柱($10 \mu\text{m}$, 8×250 mm), 使用 HP-1000 液相色谱仪测定。

1.4.2 样品单位容积游离 $^3\text{H-Tyr}$ 放射性强度的测定 分别取组织 2.0g 加入等体积(W/V)的 10% TCA, 在塑料离心管中, 用超声破碎仪(Virsonic 300, USA)匀浆, 然后 4000g 离心 5min, 收取上清液, 再加入等体积 5% TCA 溶液洗涤沉淀、离心、合并两次上清液, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 分别取制备样品 200 μl 溶于 8ml 闪烁液[0.018mol/L PPO, 0.25mmol/L POPOP, 二甲苯/乙二醇乙醚(7:3)]中, 用液体闪烁分析仪(TRI-CARB 2000CA, Packard, U.S.A)计数, 外标准源进行淬灭校正。

1.4.3 组织中游离及结合酪氨酸的测定 按上海市医学化验所的 $^3\text{H-Tyr}$ 荧光法测定, 使用 Shimadzu RF540 荧光分析仪。

1.4.4 蛋白质合成率的计算

$$Ks(\%/d) = \frac{Sb \times 1440}{Sa \times 20} \times 100$$

其中, Sb 为组织结合酪氨酸的放射性强度(dpm/mg Try), Sa 为 20min 时游离酪氨酸比放射性强度(dpm/mg Try)。

1.5 数据处理及统计

2 种不同形式的氨基酸灌注液灌注后, 组织的比放射性强度、反相 HPLC 分析的血浆肽各组分及总量, 及其与组织蛋白质合成率间的相关关系, 均用 SAS13.0 统计软件 GLM 处理, 进行相关、方差分析及显著性检验。

2 结果

2.1 肠道灌注 CSP 后不同时间对草鱼血液循环中肽量的影响

肠道灌注 CSP 10、15、20、25、30min 后, 草鱼血液循环中肽量的变化见表 1。血液循环中肽量在灌注 20min 后最高, 与灌注 10、15min 后有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 肠道灌注 CSP、FAA 对草鱼组织蛋白质合成的影响

灌注 CSP 和 FAA 组草鱼前肠、肝胰脏与背肌组织结合 $^3\text{H-Tyr}$ 比放射性强度、组织蛋白质合成率见表 2, 草鱼前肠、肝胰脏与背肌组织蛋白质合成率(%/d)分别为 96.84 和 72.25, 98.64 和 81.65, 65.38 和

表 1 肠道灌注 CSP 后不同时间对草鱼血液循环的肽量($n = 3$)

Tab.1 The front intestinal infusion of CSP and chromatographic peak area of plasma in different times ($n = 3$)

灌注后时间(min)	血液循环中肽量 ($10^3 \mu\text{v}^2/\text{ml}$)
10	11852.80 + 1156.31 ^a
15	14767.42 + 966.84 ^b
20	19612.33 + 1302.78 ^c
25	18321.89 + 1397.05 ^c
30	17738.96 + 1467.51 ^c

注: 同一列数据右上角不同上标小写字母表示有显著差异($P < 0.05$)

46.59。CSP 组草鱼的 2 种指标数据均显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)高于 FAA 组。

表 2 不同氨基酸形式灌注液对草鱼组织结合 $^3\text{H-Tyr}$ 比放射性强度、组织蛋白质合成率的影响($n = 5$)

Tab.2 Effects of duodenal infusion of casein hydrolysate-CSP or amino acids on tissues bound $^3\text{H-Tyr}$ radioactives and synthesis rates in fish tissue ($n = 5$)

组织	组织结合 $^3\text{H-Tyr}$ 比放射性强度 (dpm/ $\mu\text{mol Try}$)		组织蛋白质合成率(%/d)		
	FAA	CSP	FAA	CSP	增加(%)
前肠	414.25+44.31 ^b	465.79+35.61 ^a	72.25+10.56 ^A	96.84+8.44 ^B	25.39
肝胰脏	682.08+67.24 ^b	793.72+45.61 ^a	81.65+9.73 ^a	98.64+11.65 ^b	17.22
背肌	991.53+110.23 ^b	1236.96+134.78 ^a	46.59+9.31 ^B	65.38+6.35 ^A	28.74

注: 同一行数据右上角不同上标小写字母表示有显著差异($P < 0.05$), 大写字母表示有极显著差异($P < 0.01$)

表 3 草鱼前肠灌注 CSP 和 FAA 对草鱼血液循环中肽量与组分的影响($n = 5$)

Tab.3 Effect of front intestinal infusion of CSP and FAA on the chromatographic peak area of plasma in fish ($n = 5$)

肽峰	CSP($10^3 \mu\text{v}^2/\text{ml}$)	FAA($10^3 \mu\text{v}^2/\text{ml}$)	增加(%)
F12	2014.79	1925.58	4.43
F2	633.89	622.48	1.80
F3	1469.33	1501.46	- 2.19
F4	1598.41	1612.47	- 0.88
F5	731.24	718.61	1.73
F6	5498.12 ^b	4244.55 ^a	22.80
F7	796.73 ^B	1274.66 ^A	- 59.99
F8	2569.91 ^B	1248.57 ^A	51.42
F9	1297.56 ^B	887.93 ^A	31.57
F10	1067.48 ^B	674.04 ^A	36.86
F11	259.47 ^B	514.44 ^A	- 98.27
F12	1467.31 ^B	509.89 ^A	65.25
F13	26.58 ^B	298.32 ^A	- 1022.35
FT	19430.82 ^b	16033.00 ^a	17.49

注: 同一行数据右上角不同上标小写字母表示有显著差异($P < 0.05$), 大写字母表示有极显著差异($P < 0.01$)。F1、F2、……、F13 分别表示不同肽峰, FT 为总肽峰面积

2.3 肠道灌注 CSP、FAA 对血液循环中肽量的影响及其与组织蛋白质合成的关系

肠道灌注 CSP 和 FAA 溶液 20min 后, 草鱼血浆中的肽峰面积见表 3。CSP 组草鱼血浆中的小肽含量与 FAA 组相比, 总量增加 17.49%, 差异显著($P < 0.05$), CSP 组草鱼血浆中的第 6、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 FAA 组; 第 7、11、13 峰面积比例分别显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)地低于 FAA 组, 为负增长。CSP 组草鱼肝胰脏组织蛋白质合成率增加值与血浆中小肽总量和 F6 肽峰增加值, 前肠、背肌组织蛋白质合成率增加值与血浆中小肽总量和 F6、F9、F10 肽峰增加值具有较的相关性。

3 讨论

十二指肠同时灌注标记蛋白质中不同形式的氨基酸, 可以研究不同氨基酸形式对氨基酸吸收和组织蛋白质合成率的影响。对鸡 $^3\text{H-Tyr}$ 吸收分析表明, 灌注 20min 时, CSP 组 94% 以上的 $^3\text{H-Tyr}$ 已从肠道内容物中消失, 但 FAA 组在肠组织的游离 $^3\text{H-Tyr}$ 的量仍较大, 说明不同氨基酸形式对 $^3\text{H-Tyr}$ 吸收的影响(Nieto, 1994)。本试验中草鱼肝胰脏、前肠组织蛋白质合成率与 Nieto 等对鸡的试验结果相近(Nieto, 1994), 但草鱼背肌蛋白质合成率明显高于鸡的胸肌蛋白质合成率(24%/d—27.5%/d), 这可能与动物种类的差异有关。氨基酸的不同供给形式明显影响雏鸡组织蛋白质合成率, 灌注 CSP 组草鱼各组织蛋白质合成率显著或极显著高于灌注相应的 FAA。Funabiki (1990)在研究测定蛋白质周转代谢的方法时, 观察到饲喂小肽日粮的大鼠整体蛋白质合成率比 FAA 日粮组高 26%。作者在对草鱼生长试验也证实, 小肽日粮可使草鱼氮沉积高于相应的氨基酸日粮(冯健等, 2005)。小肽的迅速吸收及其产生的机体生理变化, 可

能是影响组织蛋白质代谢的重要因素。Funabiki(1990)认为,组织蛋白质合成率调控,受血浆亮氨酸、蛋氨酸、精氨酸等氨基酸的影响,它们可能作为胰岛素的促泌素促进蛋白质合成。一些吸收试验中也观察到 SP 吸收迅速,能够迅速提高血浆胰岛素的浓度(Rerat, 1988)。本试验中 CSP 组草鱼去蛋白血浆中放射强度高于 FAA 组,说明 SP 形式的氨基酸吸收速度,尤其是摄入肠细胞后转运进入血液的速度快于 FAA 组。CSP 组草鱼背肌、肝胰脏和肠道组织结合的 $^3\text{H-Tyr}$ 以及血浆的 $^3\text{H-Tyr}$ 放射强度较高,反映了 CSP 组氨基酸的迅速吸收和组织对它们的利用率较高。

组织蛋白质合成代谢可能受完整吸收进入循环的小肽的影响。一些试验观察到 SP 与相应的 FAA 在代谢上存在差异,Shibata 等(1991)报道大鼠饲喂小肽日粮时,色氨酸-尼克酰胺转化率较 FAA 日粮的低,小肽的色氨酸更易进入蛋白质合成。Wang(1994)观察到二、三蛋氨酸肽对 $^3\text{H-Leu}$ 掺入组织蛋白质的促进作用大于蛋氨酸。Nielsen 等(1994)观察到相同营养价值和氨基酸模式日粮下,水解酪蛋白和完整酪蛋白的饲料同时提高大鼠整体蛋白质的合成率和降解率,而水解大豆蛋白却降低蛋白质降解率;两种蛋白饲料下血浆胰岛素, EAA、NEAA 水平相近。Nam(1990)发现,尿中酸性肽中亮氨酸+缬氨酸的排出量与蛋白质合成、胰岛素样生长因子高度相关。灌注 CSP 组草鱼血液循环中的肽总量和某些肽量高于 FAA 组(表 3),并且某些肽量与组织蛋白质合成率存在显著的相关,说明循环中肽的种类、数量可能是影响组织蛋白质合成的重要因素。

综上所述,肠道吸收底物中的小肽,能够促进草鱼组织蛋白质的合成,这种作用一方面可能与肠道对小肽氨基酸的迅速吸收有关;另一方面,直接吸收进入血液循环中的小肽或某些小肽类,影响着组织蛋白质合成速度。具有生物活性的小肽在蛋白质的消化、吸收及其代谢中有着特殊的重要作用。

参 考 文 献

- 冯 健, 刘栋辉, 2005. 草鱼日粮中小肽对幼龄草鱼生长性能的影响. 水生生物学报, 29(1): 20—25
- Agar N S, 1975. Glutathione polymorphism in the sheep red blood cells. *International Journal of Biochemistry*, 6(12): 843—852
- Colnago G L, 1991. Effects of responses of starting broiler chicks to incremental reduction in intact protein on performance during the grower phase. *Poul Sci*, 70: (Suppl.1): 67—78
- Funabiki R, 1990. Measurement of the rate of whole body protein synthesis by intraperitoneal injection of a large dose of alanyltyrosine with [^{14}C]Tyrosine. *Agric Biol Chem*, 54: 113—119
- Infante J L Z, 1992. Nutritional rehabilitation of malnourished rats by di. and tripeptides: nitrogen metabolism and intestinal response. *J Nutr Biochem*, 3: 285—290
- Nam T J, 1990. Correlation between the urinary excretion of acid soluble peptides, fractional synthesis rate of whole body proteins, and plasma immunoreactive insulin-like growth factor 1 / somatomedinc concentration in the rat. *Brit J Nutr*, 63: 515—520
- Nielsen K, 1994. Casein and soybean protein have different effects on whole body protein turn over at same nitrogen balance. *Brit J Nutr*, 72: 69—81
- Nieto R, 1994. Effect of dietary protein quality, feed restriction and short-term fasting on protein synthesis and turnover in tissues of the growing chicken. *Brit J Nutr*, 72: 499—507
- Poullain M G, 1995. Effect of whey proteins, their oligopeptide hydrolysates and free amino acids mixtures on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. *J Parent Enter Nutr*, 13: 382—386
- Rerat A, 1988. Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in non-anaesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids. *Brit J Nutr*, 60: 121—136
- Shibata K, Onodera M, 1991. Effects of three kinds of dietary nitrogen sources on the metabolic rate of tryptophan. *Agric Biol Chem*, 55: 2945—2949
- Wang S, 1994. Utilization of methionyl peptides as a source of methionine for the synthesis of secreted protein by mouse mammary explants and cultured and cultured bovine mammary epithelial cells. *J Dair Sci*, 77(Suppl): 354

EFFECTS OF SMALL PEPTIDE AND AMINO ACID ON PEPTIDE CIRCULATION AND TISSUE PROTEIN SYNTHESIS IN GRASS CARP *CTENOPHARYNGODON IDELLA*

JIANG Bu-Guo¹, FENG Jian¹, Raembek W², HUANG Jun¹,
LUO Bo¹, PAN Yan-Yun¹

(1. *Institute of Aquaculture, College of Animal Science, Guangxi University, Nanning, 530004;*

2. *Institute of Animal Physiology and Biochemistry, Munich University, Munich, 80089)*

Abstract An experiment to study the role of small peptides in amino acid absorption and in protein synthesis of grass carp *Ctenopharyngodon idella* that administered with a large dose of glycylytyrosine and a tracer doses of ³H-Tyr and casein enzymatic hydrolysate-CSP or the same composition of FAA. Five fish individuals were sampled for trail vein blood and then sacrificed in nonanaesthesia 20min later. The fractional rates of tissue protein synthesis (FRS) were estimated by measuring the specific radioactivities of free and protein bound ³H-Tyr post administration. The peptides of plasma were analyzed by HPLC after deproteinization and filtration with 10kDa weight cut-off filters. The total amount of peptides in the blood of both groups was 19430 and 16033 μ v/ μ l, respectively, showing much higher value for fish given CSP than that given FAA ($P<0.05$). Significant difference was found between the two groups in some peptides amounts. The protein bound specific radioactivity of tissue in CSP-given fish was more significant ($P<0.05$ or 0.01) than that of the FAA-given. The FRSs of intestine, hepatopancreas, and backside muscle in CSP and FAA groups were 96.84%/d and 72.25%/d, 98.64%/d and 81.65%/d, 65.38%/d and 46.59%/d, respectively. There was a significant correlation between the amount of total peptides and some peptides with the FRS of liver and intestinal protein. The results suggest that peptides could promote the tissues protein synthesis in the grass carp.

Key words Small peptide, Free amino acids, Fractional rate of protein synthesis (FRS), Grass carp *Ctenopharyngodon idella*