

酶解酪蛋白与相应氨基酸混合物对雏鸡组织蛋白质合成的影响

乐国伟 施用晖 蔡学林 端木道 杨 凤

(四川农业大学动物营养研究所, 雅安 625014)

摘 要 试验用主要由小肽组成的酶解酪蛋白(CSP)和相应氨基酸组成的混合物(FAA), 进行了灌注和³H-Tyr同位素标记试验。由十二指肠同时灌注³H-Tyr 和 CSP 或相应 FAA 混合物后 20min, CSP 组雏鸡肠道、肝脏和胸肌组织蛋白质合成率分别显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)高于 FAA 组。CSP 与 FAA 组胸肌、肝脏和肠道组织蛋白质部分合成率分别为 46.43%/日和 34.20%/日; 98.54%/日和 69.39%/日; 86.73%/日和 50.24%/日。血浆反相 HPLC 分析结果表明: 灌注 CSP 组雏鸡血浆肽的总含量极显著地($P < 0.05$)高于 FAA 组, 两组血浆中某些肽的含量存在显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)的差异。雏鸡血浆某些肽含量和肽的总含量分别与雏鸡肝脏、肠道蛋白质合成率存在显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)的正相关。肝脏与肠道蛋白质合成, 肠道与胸肌蛋白质合成率间存在显著($P < 0.05$)的正相关。CSP 的迅速吸收和完整吸收进入循环中的某些肽, 可能是促进雏鸡组织蛋白质合成的重要因素。

关键词 小肽, 游离氨基酸, 蛋白质合成, 液相色谱分析, 雏鸡

近年的研究表明, 氨基酸的供给形式可能是影响动物蛋白质代谢的一个重要因素。一些动物饲养试验观察到, 饲喂小肽日粮动物氮沉积高于 FAA 日粮^[1,6,10]。Colnago 等 1991 年报道, 即使在必需氨基酸充分平衡的基础上, 饲粮蛋白质水平由 23% 降至 19%、完整蛋白质与 FAA 之比由 110:1 降至 14:1 时, 肉鸡的增重, 饲料转化效率下降^[2]。反映出动物对完整蛋白或肽有某种特殊的需要。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更多的优越性^[3], 但氨基酸的不同供给形式, 在动物体内对组织蛋白质合成的影响及其作用机制尚不清楚。

本文旨在研究氨基酸不同供给形式对雏鸡氨基酸的吸收、循环中肽含量、种类及其对雏鸡组织蛋白质合成代谢的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验设计 及方法

1.1.1 动物及饲养: 1 日龄来航公鸡饲喂三周玉米、豆饼实用日粮后(按 NRC1994 家禽营养需要配制), 进行灌注试验。

1.1.2 试验分组及方法: 试验 1. 选用体重相近的三周龄(约 120g)公雏 22 只, 饥饿 12h 后,

* 本研究由国家自然科学基金资助。

** 收稿日期 1996-09-24。

灌注³H-Tyr 和 FAA 混合物,于 5、10、15、20、30min 心脏采血,对照组灌注³H-Tyr 后 20min 采血(制备血浆),并迅速取下肠道,用冷生理盐水冲出内容物,用滤纸吸干,刮取肠粘膜,-20℃冻存至测定。试验 2. 选用体重相近(约 110g)三周龄白色来航公雏 10 只,均分为两组,饥饿 12h 后分别灌注 CSP 和 FAA,20min 后心脏采血(制备血浆)、处死,迅速取下胸肌、肝脏、小肠(十二指肠至结肠末端),用预冷生理盐水冲洗肠道内容物,收集冲洗液,5 000g 4℃离心 10min,取上清液冻存。肠道用滤纸吸干,液氮速冻,-20℃冷冻保存至测定。

1.1.3 灌注方法:同乐国伟等(1997)的试验方法^[14],试验 1、2 分别按 1.000 和 1.500ml/100g 体重,由十二指肠注入灌注液。

1.2 试验材料

酶解酪蛋白(CSP)含氮量 12.7%,氨基氮 5.1%(Singma,USA)。CSP 中氨基酸组成同乐国伟等(1997)^[14]。用 25mmol/L pH7.4 磷酸缓冲液分别配制成含 5%山梨醇(g/V)的 18.5% CSP 灌注液,相同氨基酸组成的 21%FAA 灌注液和 0%的对照灌注液。

试验 1.FAA 和对照组灌注液中都含 150μmol Tyr 和 12.2μci L-[3,5]³H Tyr。试验 2.CSP、FAA 灌注液含 100μmol/L Tyr、20μci/ml ³H-Tyr(L-[3,5]³H-Tyr 比放射性强度 26ci/mol,中国科学院上海核技术开发公司)。为提高溶解性,FAA 溶液中谷氨酸和酪氨酸、甘氨酸分别由谷氨酰胺和甘氨酸酪氨酸代替,CSP 中酪氨酸不足部分由甘氨酸酪氨酸补足,对照灌注液中的 Tyr 由甘氨酸酪氨酸(Gly-Tyr)提供。

1.3 测定指标和分析方法

1.3.1 组织中游离与结合酪氨酸比放射性强度:组织比放射性强度的样品处理参照 Funabik 等 1990 及 Attaix 等 1986 年的方法^[4]。分别将胸肌、肝脏、肠道剪碎或刮下肠粘膜,取约 0.5~2g 组织加入等体积 10%TCA(W/V),超声破碎仪(Virsonic 300,USA)匀浆 5min,然后 4 000g 4℃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 0.45μm 滤膜过滤,-20℃保存待测³H-Tyr 放射性强度及酪氨酸含量。

样品单位容积游离³H-Tyr 放射性强度的测定:分别取制备样品 200μl 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。

1.3.2 组织中游离及结合酪氨酸的测定:按上海市医学化验所的 α-亚硝基-β 萘胺荧光法测定,使用 Shimadzu RF540 荧光分析仪。

1.3.3 蛋白质合成率的计算:
$$K_s(\%/d) = \frac{S_b \times 1440}{S_a \times 20} \times 100$$

S_b 为组织结合酪氨酸的比放射性强度(dpm/mg Tyr),S_a 为 20min 时游离酪氨酸比放射性强度(dpm/mg Tyr)。

1.3.4 血浆中肽的反相液相色谱分析:血浆中肽分析同乐国伟等(1997)的方法^[14]。

1.4 数据处理及统计分析

不同形式 AA 灌注后,组织的比放射性强度、反相 HPLC 分析的血浆肽各组份及总量及其与组织蛋白质合成率间的相关关系,用 SAS 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 雏鸡同时灌注³H-Tyr和FAA后去蛋白血浆及肠粘膜的放射性强度

试验1. 雏鸡灌注³H-Tyr与FAA液后,去蛋白血浆的放射性强度随时间而提高(表1),15min后的各时间处理组间无显著的差异($P>0.05$)。对照组血浆放射性强度分别显著($P<0.05$)或极显著地($P<0.01$)高于灌注FAA后30min和15min组。肠粘膜的游离放射性强度随时间而降低,15min后各灌注时间组间没有显著的差异($P>0.05$),但均显著($P<0.05$)或极显著地($P<0.01$)高于对照组。

试验2. 灌注FAA和CSP后,两组肠道³H-Tyr吸收率差异不显著($P>0.05$),分别为94.92和97.29%。CSP组去蛋白血浆比放射强度高于FAA组,但差异不显著($P>0.05$)。而FAA组的肠道中游离³H-Tyr比放射性强度高于CSP组,详见乐国伟等(1997)^[15]。

2.2 灌注CSP、FAA混合物对雏鸡组织蛋白质合成的影响

灌注CSP组肠道、肝脏、胸肌组织结合³H-Tyr比放射性强度,组织蛋白质合成率显著($P<0.05$)高于FAA组(表2)。CSP组肝脏蛋白质合成率(%/d)为98.54%,高于FAA组的69.39%,肠道组织分别为86.73%和50.24%,胸肌组织分别为46.63%,34.20%。

表1 雏鸡去蛋白血浆游离³H-Tyr放射强度(dpm/100 μ l)
和去蛋白肠粘膜游离³H-Tyr放射强度(dpm/mg)

Table 1 The free ³H-Tyr radioactivities of deproteinized plasma (dpm/ μ l)
and intestine (dpm/mg) in chicks

处 理 Treatments	灌注时间 After infusion		去蛋白血浆放射强度 Average radioactivity of deproteinized plasma		去蛋白肠粘膜上清液放射强度 Average radioactivity of deproteinized intestine		
	(min)		平均数 Lsmean	标准误 SE	样品数 Number	平均数 Lsmean	标准误 SE
缓冲溶液对照 Buffer control	20	4	19221.625 \pm 1185.590 ^D		4	172.820 \pm 69.859 ^a	
游离氨基酸组 FAA	5	3	5270.233 \pm 1369.002 ^a		3	665.800 \pm 80.667 ^C	
	10	3	9605.233 \pm 1369.002 ^b		4	493.475 \pm 69.859 ^{BC}	
	15	4	12285.150 \pm 1185.590 ^{Bc}		4	449.113 \pm 69.859 ^B	
	20	2	15328.900 \pm 1676.678 ^{cd}		2	462.200 \pm 98.796 ^{BC}	
	30	3	14755.133 \pm 1369.002 ^C		4	388.665 \pm 69.859 ^b	

同列肩号不同,相邻小写字母表示差异显著($P<0.05$);大写字母差异极显著($P<0.01$)。

Values with different superscript letters within the line indicate significantly different ($P<0.05$); values with different superscript capital letters are differ highly significant ($P<0.01$).

表 2 不同氨基酸形式灌注液对雏鸡组织结合³H-Tyr 比放射性强度 (dpm/ μ mol Tyr)和组织蛋白质合成率(%/day)的影响

Table 2 Effect of duodenal infusion of casein hydrolysate-CSP or same composition amino acids mixture on tissues bound ³H-Tyr radioactivities (dpm/ μ mol Tyr) and synthesis rate of tissues (%/day) of 3wks old chicks

组织 Tissues	组织结合 ³ H-Tyr 比放射性强度 Tissues bound ³ H-Tyr radioactivities		组织蛋白质合成率(%/day) Fractional rate of tissue protein synthesis	
	灌注形式 AA form of infusion		FAA	CSP
	FAA	CSP	FAA	CSP
肝 Liver	657.20 \pm 137.42 ^{a*}	848.11 \pm 63.28 ^b	69.3924 \pm 17.0332 ^{a*}	98.5417 \pm 6.1515 ^B
肠道 Intestine	378.80 \pm 97.16 ^a	550.06 \pm 75.91 ^b	50.2438 \pm 9.7644 ^a	86.7259 \pm 23.9894 ^b
胸肌 Breast	757.75 \pm 77.45 ^a	1052.01 \pm 165.97 ^b	34.1988 \pm 4.2564 ^a	46.6306 \pm 6.8133 ^b

同行肩号不同,小写字母差异显著(P<0.05);大写字母差异极显著(P<0.01)。

Values with different superscript letters within row indicate significantly different(P<0.05); values with different superscript capital letters are highly significant(P<0.01).

2.3 灌注 CSP、FAA 对外周循环中肽量的影响及其与组织蛋白质合成的关系

各灌注组血浆反相 HPLC 分析结果见表 3, CSP 组血浆肽的总峰面积(f14)显著地(P<0.01)高于 FAA 组;第 3、5、9 峰肽面积与 FAA 组也存在着显著的(P<0.05)差别。血浆肽与组织的蛋白质合成率的相关分析表明;F3, F6, f14 分别与肝脏组织(r=0.750, p=0.032; r=0.740, p=0.036; r=0.836, p=0.009);与肠道组织蛋白质合成率(r=0.669, p=0.070; r=0.614, p=0.105; r=0.674, p=0.067);肝脏与肠组织(r=0.75, p=0.032);肠组织与胸肌(r=0.773, p=0.024)蛋白质合成率间存在着相关关系。

表 3 十二指肠灌注 FAA 与 CSP 对来航雏鸡外周血液肽量与组份(10⁴ \times μ v²/12.5 μ l)的影响

Table 3 Effect of duodenal casein hydrolysate-CSP or same composition amino acids mixture infusion on the chromatographic peak area of peptides (10⁴ \times μ v²/12.5 μ l) in plasma of 3wks old chicks

处理 Treatment	氨基酸组 FAA	CSP 组 CSP	POOLED SEM
f1	66.725 ^{a*}	67.375 ^a	\pm 9.748
f2	29.427 ^a	38.139 ^a	\pm 8.566
f3	49.459 ^a	73.344 ^b	\pm 8.844
f4	47.718 ^a	50.677 ^a	\pm 6.009
f5	16.569 ^b	8.465 ^a	\pm 2.423
f6	24.489 ^a	39.429 ^a	\pm 11.030
f7	410.174 ^a	458.378 ^a	\pm 9.469
f8	47.380 ^a	64.902 ^a	\pm 11.535
f9	109.609 ^a	170.047 ^B	\pm 2.424
f10	15.623 ^a	20.766 ^a	\pm 8.527
f11	12.638 ^a	16.566 ^a	\pm 8.025
f12	21.389 ^a	23.835 ^a	\pm 4.901
f13	141.024 ^a	105.841 ^a	\pm 23.197
f14	996.738 ^a	1292.394 ^B	\pm 73.493

f1, f2, …, 分别表示不同肽峰, f14 为总峰面积; * 见表 2。

f1, f2, …, means different peptides, f14 means total amount of peptides. * See table 2.

3 讨论

十二指肠同时灌注标记氨基酸和不同形式氮源,可以研究氨基酸形式对氨基酸吸收和组织蛋白质合成率的影响。从 $^3\text{H-Tyr}$ 吸收分析,灌注20min时,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^[14],反映了氨基酸形式对 $^3\text{H-Tyr}$ 吸收的影响;本试验肝脏、肠道组织蛋白质合成率测值与前人的试验结果相近,但胸肌蛋白质合成率高于Mauryama等1978年报道的二周龄白来航鸡的胸肌蛋白质合成率18%~21%/日的测值,而与Nieto等1994年等报道的18日龄白洛克鸡的肌肉的24.5~27.5%/日接近^[9],胸肌组织蛋白质合成率较高,可能与灌注后氨基酸处于一迅速吸收状态有关。

氨基酸的供给形式能够影响雏鸡组织蛋白质合成率。灌注CSP组雏鸡各组织蛋白质合成率高于灌注相应的FAA混合物。Funabiki等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%^[4];其它试验也证实,小肽日粮可使动物氮沉积高于相应的氨基酸日粮^[1,6,10]。氮沉积增加意味着蛋白质合成率相对增加或降解率的相对减少。小肽的迅速吸收及其继之而产生的机体内分泌变化,可能是影响组织蛋白质代谢的重要因素。Funabiki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^[5]。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^[11]。作者在另一试验观察到CSP中的支链氨基酸、蛋氨酸等的吸收速度都快于相应的游离氨基酸。本试验中FAA组和CSP组肠道对 $^3\text{H-Tyr}$ 吸收虽无显著差异,但CSP和对照组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组鸡胸肌、肝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。

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和Onodera(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^[12]。Wang等观察到二、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^[13]。Nielsen等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^[8]。Nam等1990年发现,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^[7]。灌注CSP组雏鸡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。

4 结论

肠道吸收底物中的小肽,能够促进雏鸡组织蛋白质的合成,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肽或某些肽,影响着组织蛋白质合成速度。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

- [1] Boza J J et al. Protein v. enzymic protein hydrolysates. Nitrogen utilization in starved rats. Brit. J. Nutr., 1995, 73: 65~71
- [2] Colnago G L et al. Effects of responses of starting broiler chicks to incremental reduction in intact protein on performance during the grower phase. Poul. Sci, 1991, 70: (Suppl. 1)
- [3] Daniel H et al. Physiological importance and characteristics of peptide transport in intestinal epithelial cells. In: Souffrant W B, Hagemester H. (Ed.) Vth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs. Dummerstorf Publ, 1994, Vol. 1, 1
- [4] Funabiki R et al. Measurement of the rate of whole body protein synthesis by intraperitoneal injection of a large dose of alanyltyrosine with [¹⁴C] Tyrosine. Agric. Biol. Chem, 1990, 54: 113~119
- [5] Funabiki R et al. *In vivo* effect of L-leucine administration on protein synthesis in mice. J. Nutr. Biochem, 1992, 3: 401~407
- [6] Infante J L Z et al. Nutritional rehabilitation of malnourished rats by di- and tripeptides; nitrogen metabolism and intestinal response. J. Nutr Biochem, 1992, 3: 285~290
- [7] Nam T J et al. Correlation between the urinary excretion of acid soluble peptides, fractional synthesis rate of whole body proteins, and plasma immunoreactive insulin-like growth factor-1/somatomedin concentration in the rat. Brit. J. Nutr, 1990, 63: 515~520
- [8] Nieto R et al. 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, 1994, 72: 499~507
- [9] Nielsen K et al. Casein and soybean protein have different effects on whole body protein turn over at same nitrogen balance. Brit. J. Nutr, 1994, 72: 69~81
- [10] Poullain M G et al. 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
- [11] Rerat A et al. 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, 1988, 60: 121~136
- [12] Shibata K and Onodera M. Effects of three kinds of dietary nitrogen sources on the metabolic rate of tryptophan. Agric. Biol. Chem, 1991, 55: 2945~2949
- [13] Wang S et al. 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, 1994, 77, Suppl 354
- [14] 乐国伟等. 小肽与游离氨基酸对雏鸡血液循环中肽的影响. 畜牧兽医学报, 1997, 28(6): 481~488

THE EFFECT OF SMALL PEPTIDES AND MIXTURES OF AMINO
ACIDS ON THE AMOUNT OF CIRCULATING PEPTIDES
AND RATE OF TISSUE PROTEIN SYNTHESIS IN CHICKS

Le Guowei, Shi Yonghui, Cai Xuelin, Duan Mudao, Yang Feng
(Animal Nutrition Reserach Institute, Sichuan Agricultural
University, Yaan 625014)

Abstract

An experiment was conducted to investigate the role of small peptides in amino acid absorption and in protein synthesis. The information of tissue protein synthesis in chicks was obtained by a modified large dose method. A large dose of glycytyrosine was administered to duodenum together with a tracer dose of L-³H-Tyr and casein enzymatic hydrolysate-CSP or the same composition of AA mixture into chicks. Heart blood samples were collected from five birds and then sacrificed under nonanaesthesia after 20 min. The fractional rate of tissue protein synthesis (FRS) were estimated by measuring the specific radioactivities of the free and protein bound ³H Tyr after the administrations. The radioactivity of deproteinized plasma of chicks given CSP were higher than that of chicks given FAA, but the difference was not significant ($P > 0.05$) between two groups. The protein-bound-specific radioactivities of tissues in chicks given CSP were higher significantly ($P < 0.05 \sim 0.01$) than the values of chicks given FAA. The FRS of liver, intestine and breast muscle were 98.54%/day and 69.39%/day, 86.73%/day and 50.24%/day, 46.43%/day and 34.2%/day, respectively in the chicks of CSP group and FAA group. The peptides of plasma were analyzed by HPLC after sample deproteinizing and filtration by 10 kDa weight cut off filters. The amount of peptides in blood of chicks given CSP were significantly ($P < 0.05$) higher than that of chicks given FAA. There was a significant difference in the some peptide amount of the two groups. There was a significant correlation between the amount of total peptides and some peptides with the FRS of liver and intestinal protein. The results suggested that peptides could promote the tissues protein synthesis in chicks.

Key words Small peptide, Free amino acids, Fractional rate of protein synthesis (FRS), HPLC, Chick