

文章编号: 1001-411X(2000)03-0071-04

酪蛋白水解物对小鼠生长及免疫功能的影响

郑 华, 傅伟龙

(华南农业大学动物科学系, 广东 广州 510642)

摘要: 80 只 5 周龄雄性昆明种小鼠随机分为 5 组, 第 I 组为空白对照组, 每只小鼠每天胃饲 0.2 mL 生理盐水; 第 II 组为酪蛋白对照组, 每只小鼠按体重胃饲酪蛋白 0.03 mg/(g·d); 第 III、IV、V 组每只按体重分别胃饲酪蛋白水解物肽 0.01、0.03 和 0.09 mg/(g·d)。实验期 36 d 观察试验小鼠的体重及体增重、脾脏指数以及淋巴细胞转化率。结果表明, 从试验的第 24 d 开始, 第 V 组小鼠体重显著高于第 I 组($P < 0.05$); 试验至第 36 d 时, 第 IV 组、第 V 组小鼠的体重极显著高于第 I 组($P < 0.01$), 第 V 组显著高于第 II 组($P < 0.05$)。酪蛋白水解物对小鼠脾脏重及脾脏指数的影响不明显; 酪蛋白水解物对小鼠脾淋巴细胞的增殖有明显的抑制作用。结果提示: 酪蛋白水解物对提高小鼠的体重及体增重有显著的促进效果; 对小鼠 T 淋巴细胞的增殖有明显的抑制作用; 但对小鼠的脾脏指数、T 淋巴细胞刺激指数(SI)的影响均不明显。

关键词: 酪蛋白水解物; 小鼠; 生长; 免疫功能

中图分类号: S879.1; S852.4

文献标识码: A

酪蛋白(casein)是一种富含生物活性序列的蛋白质, 在特异性内切酶(如胰蛋白酶等)及类似生理环境的条件下, 这些生物活性序列能够被释放, 得到具有生物活性的酪蛋白生物活性肽^[1]。酶解酪蛋白后所释放的活性肽包括: 抑制血管紧张素转换酶 I (angiotensin I-converting enzyme, ACE)活性的酪蛋白肽, 即 ACE 活性抑制肽^[2,3], 免疫调节活性肽^[4~6], 促进钙吸收的酪蛋白磷酸肽(casein phospho-peptide, CPP)^[7], 促进乳酸球菌生长的肽类^[8], 抗血栓肽^[1]等。此外, 水解物中还含有丰富的游离氨基酸, 包括丰富的必需氨基酸和含 2~6 个氨基酸残基的小肽^[1]。

以上研究提示, 酪蛋白水解物中可能存在着某些对动物生长有促进作用的物质。本文研究酪蛋白水解物对小鼠的生长和免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

酪蛋白(生化纯, 杭州微生物试剂厂)。选用约 5 周龄(体重约 20 g)的雄性昆明种小鼠 80 只(购自第一军医大学实验动物中心)。

1.2 酪蛋白水解物的制备

酪蛋白水解条件: 胰蛋白酶(酶活力 1.078 IU/mg), 底物浓度 50 g/L, pH 7.4, 温度 45℃, 酶用量 E:S=1:1000。

将酪蛋白水解 2 h, 取出水解液, 在沸水中水浴 15 min, 使酶失活, 冷却, 然后进行低温真空冷冻干燥, 即得到经胰蛋白酶水解 2 h 的酪蛋白水解物冻干

品。

1.3 酪蛋白水解物的肽含量测定

福林(Folin)酚法^[9]。测定 0.05 g/mL 的水解物冻干品溶液的肽为 34.8 g/L, 换算为干粉的肽含量为 $w=69.6\%$ 。

1.4 肽相对分子质量分布的测定

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[10]。 ρ (浓缩胶)=0.04 g/mL, ρ (分离胶)=0.17 g/mL。水解物相对分子质量分布于 2 500~3 400 之间。

1.5 游离氨基酸含量测定

方法参照文献[11]。测定 0.05 g/mL 的水解物冻干品溶液的 ρ (游离氨基酸)=3.841 $\times 10^5$ μ g/L, 换算为水解物干粉的 ρ (游离氨基酸)=7.68 mg/g。游离氨基酸含量最高的有精氨酸, 其次是赖氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和亮氨酸。

1.6 试验小鼠的分组

以未水解酪蛋白与酪蛋白水解物, 按小鼠体重配制为相应浓度的溶液, 胃饲(灌胃方法)小鼠。

将 80 只小鼠随机分为 5 组, 每组 16 只, 实验前逐只称重, 并调整使组间初重差异不显著($P > 0.05$)。I 组为空白对照组, 每只小鼠每天胃饲 0.2 mL 生理盐水; II 组为酪蛋白对照组, 每只小鼠每天胃饲 0.2 mL 未水解的酪蛋白溶液按体重喂给 0.03 mg/(g·d); III、IV、V 组为酪蛋白水解物处理组, 每只小鼠每天胃饲 0.2 mL 酪蛋白水解物溶液, 分别按体重喂给酪蛋白肽 0.01、0.03、0.09 mg/(g·d)。

收稿日期: 1999-12-15

作者简介: 郑 华(1966—), 男, 讲师, 硕士。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39830290); 华南农业大学校长基金资助项目(5100-K97026)

1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.7 饲养方法

小鼠按不同组别分笼饲养在 5 个试验鼠笼中, 自然光照, 饲料(购自第一军医大学试验动物中心)自由采食和饮水.

试验期间, 每天上午 9:00~10:00 按时胃饲小鼠. 试验前称初重, 每 6 d 称重 1 次, 试验期 36 d. 实验结束称末重, 计算体重及平均体增重.

在整个试验的过程中, 由专人负责胃饲和观察、记录小鼠的生长情况.

1.8 脾脏指数测定

饲养试验结束前 2 d, 每组随机取 8 只小鼠, 分别称重, 用断头法处死, 分离脾脏, 称重, 按下式计算脾脏指数(Spleen Index). 脾脏指数=脾脏重量(mg)/体重(g)

1.9 淋巴细胞转化率测定

采用³H-TdR 掺入法(incorporation)^[12]. 主要试

剂: PRMI—1640 培养液(GIBCO/BRL); 伴刀豆球蛋白 A(ConA, Sigma); ³H-胸腺嘧啶(³H-TdR, 北京, 中国原子能研究院同位素室); 闪烁液(Beckman Inc. 原装). 根据每分钟的实际衰变数(decay per min, 简称 dpm), 按下式计算刺激指数(stimulating index, 简称 SI).

$$SI = \frac{\text{加 ConA 的 dpm}}{\text{不加 ConA 的 dpm}}$$

1.10 数据统计处理

全部数据采用方差分析方法进行数据分析, 以最小显著差数(LSD)法进行多重比较.

2 结果与分析

2.1 酪蛋白水解物对小鼠体重及体增重的影响

酪蛋白水解物对小鼠体重和平均体增重影响的结果见表 1 和表 2

表 1 酪蛋白水解物对小鼠体重(g)的影响¹⁾
Tab. 1 The effect of casein hydrolysate on body weight(g) of mice

组别 group	试验时间 test time/d						
	0	6	12	18	24	30	36
I	22.28±1.56	27.59±2.44	28.44±2.88	32.36±3.49	34.29±3.69	35.04±3.60	35.04±3.94
II	22.66±1.61	27.87±2.49	29.27±2.36	32.30±3.49	34.73±2.34	35.87±2.58	36.85±2.89
III	22.56±0.82	27.39±1.53	28.58±2.26	31.58±2.10	33.54±2.30	34.95±2.52	35.48±2.84
IV	22.79±1.08	28.39±1.66	29.59±1.82	33.09±2.18	35.39±2.37	37.04±2.90	38.13±2.69**
V	22.44±1.04	28.28±1.59	29.58±1.73	33.68±2.16	36.29±2.20*	37.15±2.67*	38.99±2.86**#

1) 每组小鼠数均为 16 只. *与空白对照组相比, $P<0.05$; **与空白对照组相比, $P<0.01$; #与酪蛋白对照组相比, $P<0.05$

表 1 数据显示, 试验进行到第 24 d 后, V 组与 I 组小鼠体重差异达到显著水平($P<0.05$); 试验进行到第 36 d 时, IV 组、V 组与 I 组小鼠体重差异达到极显著水平($P<0.01$), V 组小鼠体重还显著高于 II 组($P<0.05$). 在试验的整个过程中, IV 组、V 组小鼠

体重在试验的各个阶段, 均高于空白对照组和酪蛋白对照组.

表 2 数据显示, 小鼠在不同的试验阶段的体增重有所不同, IV 组与 V 组的体增重效果优于两个对照组.

表 2 酪蛋白水解物对小鼠平均体增重(g)的影响
Tab. 2 The effect of casein hydrolysate on body weight(g) increase of mice

组别 group	小鼠数 number of mice	试验时间 test time/d						
		1~6	7~12	13~18	19~24	25~30	31~36	1~36
I	16	5.31	0.85	3.92	1.93	0.75	0.00	12.76
II	16	5.21	1.40	3.03	2.43	1.14	0.98	14.19
III	16	4.83	1.19	3.00	1.96	1.41	0.53	12.92
IV	16	5.60	1.20	3.50	2.30	1.65	1.09	15.34
V	16	5.84	1.30	4.10	2.61	0.86	1.84	16.55

2.2 酪蛋白水解物对小鼠脾脏指数的影响

酪蛋白水解物对小鼠脾脏指数的影响结果见表 3.

表 3 数据显示, 酪蛋白水解物对提高小鼠的脾脏指数有一定的促进作用, 其中以低剂量组效果较好, 但差异不显著.

表 3 酪蛋白水解物对小鼠脾脏指数的影响
Tab 3 The effect of casein hydrolysate on spleen index of mice

组别 group	小鼠数/只 number of mice	体重 body weight/ g	脾重 spleen weight /mg	脾脏指数 ¹⁾ spleen index
I	8	34.63±2.37	87.25±11.95	2.450±0.31
II	8	39.85±3.51	105.75±28.73	2.644±0.62
III	8	38.11±2.31	117.25±27.65	3.089±0.67
IV	8	41.13±1.49	121.63±18.65	2.952±0.39
V	8	41.21±2.14	109.88±31.45	2.683±0.78

1) 与空白对照组相比, $P>0.05$

表 4 酪蛋白水解物对小鼠淋巴细胞转化率的影响
Tab. 4 The effect of casein hydrolysate on the ratio of lymphocyte transformation of mice

组别 group	小鼠数/只 number of mice	$dpm^{1)}$		SI
		不加 ConA without ConA	加 ConA with ConA	
I	8	55 657.88±19 824.2	59 313.74±9 972.12	1.150±0.300
II	7	28 871.64±10 099.5 **	41 961.81±14 525.8 **	1.535±0.542 *
III	8	45 746.89±15 066.5 **	34 360.30±14 491.4 **	0.811±0.356 *
IV	8	33 785.01±8 171.19 **	26 646.60±4 801.15 **	0.835±0.271
V	8	18 634.26±8 088.96 **	17 324.58±4 620.49 **	0.992±0.228

1) dpm 为 3 次重复的平均值, 由“第一军医大学分析检测中心同位素室”测定; * 与空白对照组相比, $P<0.05$; ** 与空白对照组相比, $P<0.01$

3 讨论

3.1 酪蛋白水解物对小鼠生长的影响

酪蛋白经酶水解后能够释放出具有生物活性的序列——酪蛋白活性肽。有资料报道, CPP 能够有效地提高大鼠的钙吸收率及储留率^[13], 酪蛋白水解物中肽分子质量的分布是促进乳酸球菌生长的主要因素^[8]。酪蛋白水解物中含有丰富的小分子肽和必需氨基酸^[1]。以上文献提示, 酪蛋白水解物中的某些肽类可能与动物的生长有关, 它们对动物的生长可能具有促进作用。

本试验结果表明, 酪蛋白水解物对试验小鼠的体重增长有显著的促进效果。由于酪蛋白在被酶水解时, 除了释放出特定的生物活性肽以外, 还伴有小分子肽和游离氨基酸的释放, 其中含量较高的游离氨基酸如精氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸等是动物的必需氨基酸, 而某些小分子肽可能是对动物生长具有促进作用的生物活性肽, 它们对促进小鼠的生长具有良好的效应, 游离氨基酸对促进小鼠的生长也有良好的效应。具体是哪些成分在促进小鼠的生长过程中起主要的作用, 有待进一步的研究。

3.2 酪蛋白水解物对小鼠免疫功能的影响

本试验通过对小鼠几项免疫指标进行测定分析, 结果表明: 酪蛋白水解物对促进小鼠的脾脏指数的提高有一定作用, 但作用不明显; 对小鼠 T 淋巴细

2.3 酪蛋白水解物对小鼠淋巴细胞转化率影响

酪蛋白水解物对试验小鼠淋巴细胞转化率的影响结果见表 4。

表 4 显示, 不加 ConA 时的 dpm , 空白对照组明显高于其它各组, 3 个酪蛋白水解物处理组的 dpm 随剂量增加而降低。加 ConA 后, 空白对照组和酪蛋白对照组的 dpm 高于不加 ConA 的 dpm , 而 3 个酪蛋白水解物处理组的 dpm 则低于不加 ConA 时的 dpm , 反映为刺激指数(SI)小于 1.0。

胞的增殖有明显的抑制作用, 并使 T 淋巴细胞的刺激指数略有降低($SI<1.0$)。

值得注意的是, 在本试验中, 随着酪蛋白水解物剂量的增加脾脏指数略有降低, 这说明低剂量的酪蛋白水解物对提高试验小鼠的脾脏指数的效果较高剂量好。Migliore-samoure^[4]认为, 酪啡肽对新生儿的免疫系统有刺激作用, Otani^[9]则认为, 胰酶与胰蛋白酶的 α_1 -CN 及 β -CN 消化物都显著性地抑制促细胞分裂素诱导小鼠脾淋巴细胞及兔 Peyer's 斑纹细胞的增殖。

在本试验中, 酪蛋白水解物对小鼠 T 淋巴细胞的增殖表现为负向调节, 与 Otani^[9]的研究结果比较一致。但具体的作用机制还有待更进一步的研究。

本试验虽对酪蛋白水解物肽含量进行了测定, 但未对肽进行分离、纯化及鉴定。酪蛋白水解物对小鼠体重和免疫功能的影响可能是由于某些活性片段或氨基酸的影响, 还有待深入研究。

致谢: 本试验的完成得到江青艳博士、刘丽博士、高萍、朱晓彤、杨崇、高淑静等老师及第一军医大学实验中心罗奕尧教授的帮助, 在此表示衷心的感谢!

参考文献:

[1] ケビン・R・マーシャル. 乳中の微量成分と生理活性機能、食品への応用[J]. 食品と開発, 1995, 30(3): 23-26
[2] YAMAMOTO N, AKINO A, TAKANO T. Antihypertensive ef-

- fect of peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790[J]. *Dairy Sci*, 1994, 77: 919—922
- [3] SERKIYA S. Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers[J]. *Japanese society of nutrition and food science*, 1992, 45(6): 513—517.
- [4] MIGLIORE-SAMOURE D, FLOC H F, JOLLES P. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation[J]. *Dairy Research*, 1989, 56: 357—362
- [5] MEISEL H, FRISTER H. Chemical characterization of bioactive peptides from *in vivo* digests of casein[J]. *Dairy Research*, 1989, 56: 343—349.
- [6] OTANI H, HATA I. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests[J]. *Dairy Research*, 1995, 62: 339—348
- [7] ADAMSON N J, REYNOLDS E C. Characterization of multiply phosphorylated peptides selectively precipitated from a pancreatic casein digest[J]. *Dairy Science*, 1995, 78: 2 653—2 659
- [8] ST-GELAIS D, ROY D, HACHES, et al. Growth of nonproteolytic *Lactococcus lactis* in culture medium supplemented with different casein hydrolyzates[J]. *Dairy Sci*, 1993, 76: 3 327—3 337
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997, (2): 137—138.
- [10] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997(2): 100—106.
- [11] 中村哲郎, 宿野部幸孝, 土岐良一, 等. 乳カゼインの酵素加水分解によるペプチド混合物の製造[J]. *日本食品工业学会志*, 1991, 38(5): 377—383.
- [12] 张冬青, 沈伯华, 高颖, 等. 牡蛎提取物对小鼠免疫功能正向调节作用[J]. *上海免疫学杂志*, 1995, 15(1): 18—21.
- [13] 张亚非, 周羽井, 吴凤兰, 等. 酪蛋白磷酸肽(CPP)对大鼠钙吸收利用的影响[J]. *营养学报*, 1994, 16(1): 73—77.

The Effects of Casein Hydrolysates on Growth and Immune Function of Mouse

ZHENG Hua, FU Wei-long

(Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Eighty 5-week old male Kunming mice were randomly divided into 5 groups. The mice in Group I served as control, each fed with 0.2 mL saline per day. The mice in Group II were each fed with intact casein at a dose of 0.03 mg per gram of body weight per day. Mice in Group III, IV and V were each fed with the lyophilized hydrolysate peptides at the doses of 0.01, 0.03 and 0.09 mg per gram of body weight per day respectively. The experiment lasted for 36 days. The body weight, gain weight, the spleen index and the ratio of lymphocyte transformation were determined. The results showed that the body weights of mice fed with hydrolysates were higher than those in control group after 24 days of experiment, with significant difference existing between the group V and the control group ($P < 0.05$). After 36 days of the experiment, the body weights of mice treated with 0.03 mg/g and 0.09 mg/g of hydrolysate peptides were significantly higher than those in control group ($P < 0.01$). The body weights of mice fed with 0.09 mg/g hydrolysate peptides was higher than those in the intact casein treated group ($P < 0.05$). No obvious differences in the weights of mice spleen, spleen indexes were observed. The casein hydrolysates inhibited the proliferative responses of mice spleen lymphocytes. In conclusion, the casein hydrolysates had positive effects on mice growth; and significantly inhibited the proliferative of mouse T-lymphocytes. The hydrolysates had no effects on the spleen weight of mice and the spleen indexes as well as the stimulating indexes of mice T-lymphocytes.

Key words: casein hydrolysate; mouse; growth; immune function

【责任编辑 柴 焰】