

酪啡肽及其酪蛋白水解肽对早期断奶仔猪分泌型免疫球蛋白 A 和细胞因子水平的影响

张源淑 邓 艳 宋晓丹 邹思湘*

(南京农业大学农业部重点开放动物生理生化研究室,南京 210095)

摘 要: 本文旨在研究酪啡肽及其酪蛋白水解肽对早期断奶仔猪分泌型免疫球蛋白 A(SIgA)和细胞因子水平的影响。24 头仔猪随机分为对照组(正常哺乳 28 d 断奶)、试验 I 组(添加 β -酪啡肽-7)和试验 II 组(添加酪蛋白酶解物)。试验组于 21 d 断奶,再连续添加酪蛋白胃蛋白酶解液或 β -酪啡肽-7 10 d,每天 2 次(共 20 mL),至 32 d,3 组动物各随机取 6 头同时剖杀,取血、胃食糜和空肠食糜。观察其血清 IL-2、TNF- α 和胃肠内容物中 SIgA 的含量变化。结果表明:添加酪蛋白水解液组仔猪血清中 IL-2 的水平比对照组高 75.9%,差异极显著($P<0.01$);试验 I 组血清中 IL-2 水平比对照组高 35.7%,差异显著($P<0.05$)。血清中 TNF- α 水平试验组略低于对照组。在对照组、试验 I 和 II 组仔猪的空肠食糜中均检测到 SIgA,平均含量分别为 (6.48 ± 0.85) ng/g、 (6.30 ± 0.85) ng/g 和 (8.71 ± 0.54) ng/g。与对照组相比,试验 II 组差异极显著($P<0.05$);胃食糜中未检测到 SIgA。提示乳源活性肽对早期断奶仔猪细胞免疫和黏膜免疫活性具有一定的促进作用。

关键词: β -酪啡肽-7;酪蛋白水解肽;断奶仔猪;细胞因子;SIgA

酪啡肽(casomorphin, CM)是一个具有多种生物活性的乳源活性肽,通过肠道黏膜吸收。已经证明可以影响胃肠蠕动、吸收和分泌。近来也有调节免疫系统的报道^[1-3]。目前关于酪啡肽对机体免疫的研究,主要是小鼠或体外研究的资料,多是限于淋巴细胞转化、红细胞免疫等,而且所得的结果不一^[4-7]。有关酪啡肽对新生动物血液中细胞因子和胃肠内容物中分泌型免疫球蛋白 A 水平的研究尚未见报道。本试验通过研究添加 β -酪啡肽-7 和酪蛋白水解液对 21 日龄断奶仔猪血清中若干细胞因子和胃肠内容物中分泌型免疫球蛋白 A 水平的影响,探讨酪啡肽及其蛋白水解物与新生动物细胞免疫和黏膜免疫之间的关系,以期酪啡肽在断奶期新生动物免疫系统功能发育中的作用及其机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

三元杂交仔猪由南京雨润良种畜禽研究中心提供。来源于 6 窝、头胎、21 日龄的仔猪公猪 24 头(长

×大×二、大×大×二三元杂交)。按体重相近、性别相同原则,随机分为 3 组,每组 8 头,初始体重平均为 (4.25 ± 0.12) kg,各组间仔猪平均初始体重无显著差异。

仔猪料采用普瑞纳均衡营养乳猪配合饲料。其中粗蛋白质(玉米、豆粕、进口鱼粉) $\geq 20.0\%$,粗纤维 $\leq 6.0\%$,粗灰分 $\leq 9.0\%$,钙 $0.6\% \sim 1.02\%$,总磷 $\geq 0.4\%$,食盐 $0.15\% \sim 0.8\%$,赖氨酸 $\geq 1.3\%$,水分 $\leq 13.0\%$ 。

1.2 酪啡肽和酪蛋白酶解肽制备

标准酪啡肽(β -Casomorphin-7, β -CM-7)(Try-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile),纯度 99%,为 Sigma 公司产品。

酪蛋白酶解肽制备参考潘翠玲等^[8]所建方法。称取干酪素 697.30 mg(含酪蛋白 600.03 mg),酪蛋白:胃蛋白酶 = 30:1(质量分数),37℃,pH 1.4,消化 120 min,用 10 mol/L NaOH 终止反应,调 pH 至中性。16 000 g,4℃离心 15 min,取上清液用微量凯氏定氮法测定该酪蛋白酶解产物的含氮量为 20.44%。

收稿日期:2007-06-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30070565)

作者简介:张源淑(1962-),女,甘肃兰州人,副教授,博士,研究方向:泌乳和营养生理生化。E-mail: zhangyuanshu@sina.com.cn

* 通讯作者:邹思湘,教授,博士生导师, E-mail: sixiangzou@njau.edu.cn

1.3 试验设计

将来源于 6 窝、头胎、体重相近、21 日龄的仔猪 24 头,随机分为 3 组,各组在同一栏饲养。对照组饲喂仔猪料+自由吮母乳;试验 I 组饲喂仔猪料+10 μmol/L 的 β-酪啡肽-7 20 mL;试验 II 组饲喂仔猪料+2 g 酪蛋白水解液 20 mL。试验前和试验过程中疫病防治均按该场的常规方案进行。

每组 8 头仔猪公猪(长×大×二和大×大×二各占 1/2)。对照组随母猪饲养在产仔室,28 日龄断乳后,与母猪隔离饲养在封闭式的保育室。其他 2 组仔猪于 21 日龄断奶后,与母猪隔离饲养在封闭式的保育室,每天添料 4 次,自由饮水,各组每头每天分别饲喂试验料 2 次,共 20 mL(个体饲喂),连续饲喂 10 d。以红外灯供热保温,室内温度(25±2)℃,湿度 81%~85%。试验前和试验过程中疫病防治均按该场的常规方案进行。

1.4 血样和胃肠内容物制备

在试验期内每天观察仔猪的精神状况、采食及腹泻情况并做记录,断奶和宰杀时称重。对照组与试验组均随机挑选 6 头仔猪于 32 日龄放血宰杀。取抗凝血制备血清,取胃和空肠食糜,放入样品袋,-20℃保存。

室温下分别称取胃和空肠食糜 1.0 g,用 1.0 mL 生理盐水充分混匀,3 000 r/min,4℃,离心 15 min,取上清液测定其中 SIgA 的含量。

1.5 检测方法及项目

放射免疫法测定血清 IL-2、肿瘤坏死因子(TNF-α)和胃肠内容物中 SIgA 的水平。

1.6 试剂及仪器

TNF-α 放射免疫分析测定试剂盒:购自解放军总医院科技开发中心放免所;TNF 测定范围 0.3~24.3 ng/mL,灵敏度<0.3 pg/mL,批内变异系数 5.0%,批间变异系数 8%。结果以每毫升血清中 TNF-α 含量(ng)计算。

IL-2 放射免疫分析测定试剂盒:购自解放军总医院科技开发中心放免所;IL-2 测定范围 1~81 ng/mL,灵敏度 100 pg/mL,批内变异系数<7.0%,批间变异系数<15%。结果以每毫升血清中 IL-2 含量(pg)计算。

SIgA 放射免疫分析测定试剂盒:购自中国原子能科学研究院同位素研究所。SIgA 检测灵敏度:0.12 μg/mL。结果以每毫升内容物中 SIgA 含量(μg)计。

FMJ-182 放射免疫 γ-计数器:上海原子核研究所日环仪器一厂生产。

1.7 数据处理

采用 SPSS 分析软件,平均值以 Mean±SD 表示;采用 *t* 检验法进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 仔猪血清中 IL-2 和 TNF-α 的测定结果

由表 1 可见,添加酪蛋白水解液组仔猪血清中 IL-2 的水平比对照组高 75.9%,差异极显著(*P*<0.01);β-CM-7 组血清中 IL-2 水平比对照组高 35.7%,差异显著(*P*<0.05)。血清中 TNF-α 水平试验组略有降低,但差异不明显。

表 1 断奶仔猪血清中 IL-2 和 TNF-α 的含量
Table 1 Level of Interleukin-2 and TNF-α on serum in weaning piglet (*n* = 6) (ng/mL)

项目 Items	对照组 Control	试验 I 组 Experiment I	试验 II 组 Experiment II
IL-2	1.99 ± 0.12	2.70 ± 0.20 *	3.50 ± 0.39 **
TNF-α	8.57 ± 0.43	8.13 ± 0.24	8.21 ± 0.41

同一行中,*表示差异显著(*P*<0.05);**表示差异极显著(*P*<0.01),下同。
In the same row, * mean significant difference (*P*<0.05); ** mean extremely significant difference (*P*<0.01). The same as below.

2.2 仔猪胃、肠内容物中 SIgA 的测定结果

由表 2 可见,添加酪蛋白水解液组仔猪空肠食糜中 SIgA 含量高于对照组,差异显著(*P*<0.05);β-CM-7 组空肠食糜中 SIgA 水平略低于对照组。胃内容物中未检测到 SIgA,说明 SIgA 主要是由肠

相关淋巴组织产生。

3 讨论

动物体的免疫包括主动免疫和被动免疫,对于仔猪而言,在出生到哺乳阶段的前 3 周,机体主要依

靠母体提供的被动免疫。随着母猪泌乳高峰的到来(3~4 周龄),仔猪由母乳获得的被动免疫力将逐渐减弱,而此时仔猪的主动免疫功能还尚未完善。断奶会使仔猪肠道的形态结构及机能受影响,引起机

体免疫力下降,早期断奶会使这种情况更为严重,改善或提高断奶仔猪的免疫功能,对提高仔猪成活率、降低成本、提高效益乃至养猪业的发展都是十分重要的。

表 2 断奶仔猪空肠和胃食糜中 SIgA 的含量

Table 2 Content of SIgA in weaning piglet's digesta in jejunum and stomach (n = 6)

($\mu\text{g/g}$)

项目 Items	对照组 Control	试验 I 组 Experiment I	试验 II 组 Experiment II
空肠食糜中 SIgA SIgA in jejunum digesta	6.48 \pm 0.32	6.30 \pm 0.85	8.71 \pm 0.54 [*]
胃食糜中 SIgA SIgA in stomach digesta	—	—	—

酪啡肽作为腔内信号分子具有阿片样、免疫调节、金属离子结合、抗菌等多种生物活性^[9]。以往的试验已经证明在人和牛的酪蛋白酶解产物中能分离到具有免疫活性的肽,这些分离或合成的肽在体外试验中有明显促进人和绵羊吞噬细胞的作用,提高试验鼠抵御肺炎菌感染的能力^[10]。还有试验认为 β -酪啡肽-7(50 $\mu\text{mol/L}$)对成年人消化道黏膜免疫有影响,抑制 PHA 诱发的人肠黏膜固有层淋巴细胞转化,但能提高 NK 细胞毒作用,并引起外周血淋巴细胞和肥大细胞释放组胺。CM 的作用可以被纳洛酮逆转,表明 CM 对人黏膜免疫的影响可能通过阿片受体介导^[11]。实验室以往的研究结果表明: β -酪啡肽对大鼠淋巴细胞转化、腹腔巨噬细胞吞噬活性、红细胞免疫等机体免疫方面具有一定的促进作用;略能促进早期断奶仔猪免疫器官及免疫组织的发育^[4,12]。本研究中,我们利用胃蛋白酶模拟体内环境,制备酪蛋白水解肽,研究其对早期断奶仔猪免疫功能的影响,试验结果显示:添加 β -酪啡肽-7 的仔猪空肠食糜中 SIgA 的含量略低于对照组,与 Elitsur^[12]的结果一致;而给仔猪饲喂酪蛋白水解液能显著提高空肠食糜中 SIgA 的含量,提示酪蛋白酶解液中含有的活性成分对动物的黏膜免疫有一定增强作用。酪蛋白经酶水解可以产生免疫刺激肽等其他生物活性肽,其对 SIgA 分泌的促进作用可能是水解液中其他生物活性肽(如免疫刺激肽)作用的结果。

Kawanishib 等^[13]在 20 世纪 80 年代早期的体外试验中就证实 IgA 介导的应答依赖于 T 细胞的协助,并且还发现来自黏膜相关淋巴组织的 T 细胞对 IgA 的分泌比来自体内其他部位的 T 细胞更有效,然而仅仅和 T 细胞接触是不够的,还需要细胞因子的参与。试验对血清中 IL-2 和 TNF- α 进行了

测定,发现试验组 IL-2 水平高于对照组,添加酪蛋白水解液组差异极显著;TNF- α 试验组略低于对照组。由于 T 淋巴细胞在免疫反应和免疫调节中发挥重要作用,因而其对断奶应激特别敏感。断奶应激会导致仔猪淋巴细胞免疫功能降低^[14-15]。体外试验发现,酪蛋白水解液可以促进 T 淋巴细胞转化,本试验中,早期断奶仔猪饲料中添加酪蛋白水解液可以提高仔猪血清中 IL-2 水平,提示酪蛋白水解液中的生物活性肽可能通过活化 T 淋巴细胞转化提高血清 IL-2 的水平。

总之,早期断奶仔猪补充 CM 和其水解液,对其黏膜免疫和细胞因子都有促进作用,其中, β -CM-7 组与正常断奶组相近,这与其他 CM 研究结果一致,但正常断奶组表现在 SIgA、IL-2 等方面的指标与添加酪蛋白水解液比较差异显著。这些都说明外源补充 CM 对克服畜牧生产中的早期断奶应激有一定的缓解作用。此外,实际生产中,CM 的纯化和价格高的问题,使水解液替代 CM 对抗动物断奶应激展示了潜在的应用前景。

4 结 论

乳源活性肽对早期断奶仔猪细胞免疫和黏膜免疫活性具有一定的促进作用。早期断奶仔猪外源补充酪啡肽和其水解液,对克服畜牧生产中的早期断奶应激有一定的缓解作用。

参考文献:

[1] Fiat A M, Migliore-Samour D, Jollès P, Drouet L, Bal dit Sollier C, Caen J. Biological active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76: 301-310.

- [2] Migliore-Samour D, Floch F, Jolles P. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *Journal of Dairy Science*, 1989, 56: 357-362.
- [3] Walker W A. Breast milk and the prevention of neonatal and preterm gastrointestinal disease states: a new perspective. *Chung Hua Min Guo Hsiao Erh Hui Tsa Chih*, 1997, 38(5): 321-331.
- [4] 周文华,陈伟华,邹思湘,张源淑. 饲喂 β -酪啡肽对大鼠免疫功能的影响研究. *畜牧与兽医*, 2002, 34(2): 13-15.
- [5] 潘翠玲,陈伟华,邹思湘. Beta-casomorphin-7 对大鼠免疫功能影响的研究. *畜牧与兽医*, 2003, 34(2): 13-15.
- [6] 谈寅飞,陈伟华,邹思湘. β -酪啡肽对 10 日龄仔猪淋巴细胞转化的影响. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2002, 20(4): 275-279.
- [7] Brandzae G. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 2000, 103: 1-19.
- [8] 潘翠玲,陈伟华,邹思湘. Beta-casomorphin-7 对早期断奶仔猪免疫器官及内分泌功能的影响. *南京农业大学学报*, 2003, 26(2): 67-70.
- [9] Froetschel M A. Bioactive peptides, in digesta that regulate gastrointestinal function and intake. *Journal of Animal Science*, 1996, 74: 2500-2508.
- [10] 罗治彬,吴嘉惠. 肠道黏膜 SIgA 免疫系统的研究进展. *细胞与分子免疫学杂志*, 1997, 13: 39.
- [11] Xu R J. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. *Food Reviews International*, 1998, 14(1): 1-16.
- [12] Elitsur Y G D. β -casomorphin(BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *Clinical & Experiment Immunology*, 1991, 85, 493-497.
- [13] Kawanishib H, Mirabella S. Regulation of mucosal IgA production in vitro by autoreactive immunoregulatory T cells from murine Peyer's patches. *Cellular Immunology*, 1988, 114(2): 324-335.
- [14] Tsuma V T, Einarsson S, Madej A, Lundeheim N. Cortisol and beta-endorphin levels in peripheral circulation around weaning in primiparous sows. *Animal Reproduction Science*, 1995a, 37(2): 175-182.
- [15] Teppo A, Maury C P J. Radioimmunoassay of tumor necrosis factor in serum. *Clinical Chemistry*, 1987, 33: 2024.

Effects of β -Casomorphin-7 or Casein Peptides on Cytokines and Secretory-Immunoglobulin A in 21 days' Weaning Piglets

ZHANG Yuan-shu DENG Yan SONG Xiao-dan ZOU Si-xiang*

(Key Lab of Animal Physiology and Biochemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Twenty-four healthy male-piglets were randomly divided into two experimental groups (β -CM-7 group and casein hydrolysate peptides group) and a control group (given normal milk). The piglets of experiment groups, weaning in 21 days, were successively fed with casein hydrolysate peptides or β -CM-7 (2 times every day, 10 mL every time). After 10 days, six piglets randomly selected from every group were killed and collected their serum and stomach and jejunum digesta. SIgA in stomach and jejunum digesta as well as IL-2 and TNF- α in serum were detected by radioimmunoassay. The results showed the level of IL-2 in serum was increased in experiment group I and II. Compared with the control, casein hydrolysate peptides group was more than 75% and rose significantly ($P < 0.01$). β -CM-7 group was more than 40.7% ($P < 0.05$). There was a little lower in serum TNF- α of two Experiment groups than that of the control. SIgA can be detected from jejunum digesta of three groups. Their average concentration were (6.48 ± 0.32) ng/g jejunum digesta (Control group), (6.30 ± 0.85) ng/g jejunum digesta (β -CM-7 group) and (8.71 ± 0.54) ng/g jejunum digesta (casein hydrolysate peptides group), respectively. Casein hydrolysate peptides group rose significantly ($P < 0.05$) compared with the control. We can not find SIgA in stomach digesta for all three groups. This experiment demonstrated that feeding the β -CMs to the weaning piglets could enhance their mucosal and cellular immunity. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2008, 20(2): 196-199]

Key words: β -casomorphin-7; Casein hydrolysate peptides; Early weaning piglet; Cytokines; SIgA