

文章编号:1673-1689(2005)06-0053-07

酶解鸡蛋清寡肽混合物对小鼠体外免疫功能的影响

田 刚, 陈代文*, 余冰, 张克英, 唐仁勇, 雷胡龙

(四川农业大学 动物营养研究所, 四川 雅安 625014)

摘 要: 考察了用 Alcalase(AL)、Flourezyme(FL)、木瓜蛋白酶(PA)、胃蛋白酶(PE)和胰蛋白酶(TR)酶解鸡蛋清制得的 5 种酶解鸡蛋清寡肽混合物(MOEE)对小鼠体外免疫功能的影响. 采用体外培养, 细胞吞噬试验和细胞增殖试验, 观察同一 MOEE 不同剂量以及同一剂量不同 MOEE 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能和脾细胞增殖能力的影响. 结果发现, 所有 MOEE 均能显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力, 促进小鼠脾淋巴细胞增殖, 且表现出一定的剂量效应关系. 其中, 1.0 mg/mL 不同 MOEE 促进巨噬细胞吞噬能力(PI)大小顺序为: $FL_{1-5} > PA_{1-5} > TR_{1-5} > AL_{1-5} > PE_{1-5} > \text{对照}$; 促脾淋巴细胞增殖能力(SI)大小顺序为: $FL_{1-5} > AL_{1-5} > PA_{1-5} > TR_{1-5} > PE_{1-5} > \text{对照}$ (无丝裂原), $FL_{1-5} > PA_{1-5} > TR_{1-5} > AL_{1-5} > PE_{1-5} > \text{对照}$ (LPS 刺激), $FL_{1-5} > TR_{1-5} > PE_{1-5} > PA_{1-5} > AL_{1-5} > \text{对照}$ (ConA 刺激). 结果表明, 所有 MOEE 都具有免疫增强活性, 且以 FL_{1-5} 的活性最强.

关键词: 鸡蛋清; 酶解鸡蛋清寡肽混合物; 吞噬指数; 刺激指数; 免疫功能; 小鼠

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

Effects of Mixtures of Oligopeptides from Enzymic Hydrolysates of Egg White on Immune Functions of Mice in vitro

TIAN Gang, CHEN Dai-wen*, YU Bing, ZHANG Ke-ying, TANG Ren-Yong, LEI Hu-long

(Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract: To investigate the effects of 5 kinds of mixtures of oligopeptides from enzymic hydrolysates of egg white (MOEE) on immune functions of mice in vitro. Neutral red and MTT were used to observe the effects of different MOEE and different concentration of the same MOEE on phagocytosis of mouse peritoneal macrophage and proliferation of mouse splenic lymphocytes. All of the MOEEs improved quadratically the phagocytic index of macrophage and the stimulation index of splenic lymphocytes significantly. Supplementation with different MOEE at the dose of 1.0 mg/mL enhanced phagocytic index of macrophage with the order from the highest to lowest of $FL_{1-5} > PA_{1-5} > TR_{1-5} > AL_{1-5} > PE_{1-5} > \text{control}$, and the order of stimulation index of splenic lymphocytes is, $FL_{1-5} > AL_{1-5} > PA_{1-5} > TR_{1-5} > PE_{1-5} > \text{control}$ (without mitogen), $FL_{1-5} > PA_{1-5} > TR_{1-5} > AL_{1-5} > PE_{1-5} > \text{control}$ (with LPS), $FL_{1-5} > TR_{1-5} > PE_{1-5} > PA_{1-5} > AL_{1-5} > \text{control}$ (with ConA). The results indicated that, all of the MOEEs could enhance

收稿日期: 2005-05-16; 修回日期: 2005-06-17.

基金项目: 四川省“十五”攻关重点项目.

作者简介: 田刚 (1974-), 男, 重庆黔江人, 营养与免疫博士研究生. * 责任作者.

immune function in mice, and FL₁₋₅ has the highest effect.

Key words: egg white; MOEE; phagocytic index; stimulation index; immune function; mice

众多的文献报道,食物蛋白经蛋白酶降解后可释放出大量的具有不同生物学活性的寡肽^[1~5],其中,一些寡肽具有免疫调节活性^[5~8].但在这些研究中所采用的食物蛋白主要是乳蛋白,蛋白酶绝大多数为消化道内源蛋白酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶等),而用蛋白酶特别是外源蛋白酶(如植物蛋白酶和微生物蛋白酶)酶解鸡蛋清制备生物活性寡肽的研究报道很少.有限的研究表明,鸡蛋清经消化道内源蛋白酶降解后可获得抗高血压肽^[9~11]、抗菌肽^[12~14]等.然而,通过酶解鸡蛋清能否制得具有免疫调节活性的寡肽,尚未见报道.为此,作者初步考察并比较了5种蛋白酶酶解鸡蛋清制得的5种酶解鸡蛋清寡肽混合物(Mixtures of oligopeptides from enzymic hydrolysates of egg white, MOEE)对小鼠体外免疫功能的影响,旨在为通过酶解鸡蛋清生产具有免疫调节活性的寡肽,提高鸡蛋附加值提供理论依据和积累实验数据.

1 材料与方法

1.1 主要试剂、溶液与设备

主要试剂:RPMI 1640 培养基(HyClone)、胎牛血清(FCS)(HyClone)、中性红(NR)(Sigma)、脂多糖(LPS, E. coli. 0111:B4)(Sigma)、刀豆蛋白 A(Ⅳ)(ConA(Ⅳ))(Sigma)、噻唑蓝(MTT)(Amresco)、二甲基亚砷(DMSO)(Amresco)等. 以上试剂

为细胞培养级或分析纯.

主要溶液: Hank's 液(按常规配制)、0.072% 中性红(用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 配制)、细胞裂解液 V(乙酸): V(无水乙醇)=1:1, 5.0 mg/mL MTT(用 0.01 mol/L PBS 配制)以及用不完全 RMPI 1640 培养液(不含 FCS)配制的 3 种浓度(0.1 mg/mL, 1.0 mg/mL 和 5.0 mg/mL)的 5 种 MOEE 液, 250 mg/mL LPS 和 100 mg/mL ConA. 除 Hank's 液(高压灭菌)和细胞裂解液外,其余溶液均用 0.22 μm 滤膜滤过除菌.

主要仪器设备: 96 孔细胞培养板、超净工作台、全自动 CO₂ 培养箱、酶标仪等.

1.2 MOEE 的制备

在一定条件下用 Alcalase(AL)、Flourenzyme(FL)、木瓜蛋白酶(PA)、胃蛋白酶(PE)和胰蛋白酶(TR)酶解鸡蛋清制备酶解液^[15]. 酶解液离心(4 000 r/min, 15 min)弃沉淀,上清液先经截留相对分子质量为 5 000 的超滤膜超滤,超滤液再经 1 000 的超滤膜超滤(超滤条件均为:进口压力 20 psi(1.4 kg/cm²),出口压力 14 psi(1.0 kg/cm²),温度(24±1)℃,超滤时间约 3 h),滞留物经冷冻干燥得到 5 种相对分子质量为 1 000~5 000 的 MOEE,即 AL₁₋₅、FL₁₋₅、PA₁₋₅、PE₁₋₅、和 TR₁₋₅. 各种 MOEE 的氨基酸组成见表 1.

表 1 不同 MOEE 的氨基酸含量

Tab. 1 The percentage of amino acids of different MOEE

氨基酸 种类	AL ₁₋₅		FL ₁₋₅		PA ₁₋₅		PE ₁₋₅		TR ₁₋₅	
	FAA	TAA	FAA	TAA	FAA	TAA	FAA	TAA	FAA	TAA
Asp	0.279 9	7.982 1	0.461 6	8.788 6	0.398 7	6.427 9	0.417 8	5.891 0	0.204 3	4.201 2
Glu	1.309 6	14.679 7	0.160 7	12.026 1	0.435 5	11.264 1	1.407 4	11.626 9	0.800 6	6.229 0
Ser	0.000 0	5.880 2	0.809 3	4.716 1	0.305 7	4.052 9	0.418 2	4.097 1	0.000 0	2.166 2
His	0.189 7	1.020 4	0.272 7	1.279 5	0.000 0	0.749 4	0.482 2	0.791 4	0.216 0	0.769 0
Gly	0.310 8	5.727 4	0.291 1	6.214 7	0.779 2	6.170 0	1.117 4	3.934 9	0.441 6	3.326 1
Thr	0.830 9	3.070 2	0.612 2	3.298 4	0.904 1	3.067 8	1.478 6	2.182 8	0.697 4	1.873 4
Ala	0.000 0	5.447 6	0.714 8	4.230 1	0.817 7	4.669 9	0.333 8	4.485 7	0.264 9	2.090 7
Arg	0.061 1	3.393 3	0.918 9	2.891 1	0.240 0	1.820 0	0.004 0	2.759 1	0.162 5	2.507 5
Tyr	0.000 0	3.310 2	1.036 0	3.813 8	0.694 7	2.932 5	0.000 0	3.738 3	0.000 0	2.460 2

续表 1

氨基酸 种类	AL ₁₋₅		FL ₁₋₅		PA ₁₋₅		PE ₁₋₅		TR ₁₋₅	
	FAA	TAA	FAA	TAA	FAA	TAA	FAA	TAA	FAA	TAA
Val	0.623 0	2.594	0.364 4	4.267 1	0.265 9	3.454 8	0.244 4	3.466 7	0.105 8	1.404 0
Met	0.152 5	2.018 6	0.503 3	1.849 8	0.324 1	2.133 8	0.210 5	2.690 3	0.197 7	1.223 3
Phe	0.549 7	3.116 4	0.610 1	3.682 6	0.723 8	2.821	0.910 7	4.515 6	0.731 9	2.428 4
Ile	0.099 4	3.194 5	0.426 5	3.360 5	0.228 1	3.069 9	0.195 6	4.722 3	0.164 0	1.570 8
Leu	0.203 9	5.668	1.130 0	5.899 9	0.446 2	4.528 7	0.379 3	5.869 3	0.415 4	3.724 8
Lys	0.452 8	3.366 4	0.831 4	3.820 5	0.901 5	2.9	0.944 9	2.731 2	0.602 4	2.012 6
Pro	0.364 3	2.524 4	0.884 6	3.822 8	0.977 4	3.015 7	0.941 4	2.719 8	0.739 1	2.461 9
总计	5.427 6	72.993 4	10.027 6	73.961 6	8.442 6	63.078 4	9.486 2	66.222 4	5.743 6	40.449 1

注:FAA 表示游离氨基酸,TAA 表示总氨基酸,FL₁₋₅、AL₁₋₅、PA₁₋₅、PE₁₋₅和 TR₁₋₅ 中的肽结合形式的氨基酸占总氨基酸的百分含量分别为:92.56%、86.44%、86.62%、85.68%和 85.80%,其计算公式为:100-(FAA/TAA×100).

Note: FAA is free amino acids,TAA is total amino acids. The percentage of peptide bound amino acids of FL₁₋₅,AL₁₋₅,PA₁₋₅,PE₁₋₅,and TR₁₋₅ is 92.56%,86.44%,86.625,85.68%,and 85.80%,respectively. The formula for the percentage of peptide bound amino acids is 100-(FAA/TAA×100).

1.3 动物

(20±2)g 健康雄性昆明种小白鼠(约 6~8 周龄)(购自四川大学华西医学院实验动物中心).

1.4 腹腔巨噬细胞吞噬试验——吞噬中性红试验

按常规制备细胞浓度约 2×10⁶ 个/mL 的小鼠腹腔巨噬细胞悬液.96 孔细胞培养板中加细胞悬液 100 μL/孔,对照组加不完全 PRMI1640 培养液 50 μL/孔,实验组分别加 3 种浓度的不同 MOEE 液 50 μL/孔,且每个处理设 4 个重复,混匀后置 37℃、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 24 h,加 0.072% 中性红 100 μL/孔并继续培养 30 min,Hank’s 液洗板 3 次,加细胞裂解液 200 μL/孔,置 4℃冰箱过夜,酶标仪测 540 nm 的 OD 值^[16].结果以吞噬指数(phagocytic index,PI)表示:PI=实验孔 OD₅₄₀ 值/对照孔 OD₅₄₀ 均值

1.5 脾淋巴细胞增殖实验——MTT 法

按常规制备细胞浓度约 2×10⁶ 个/mL 的小鼠脾细胞悬液.96 孔细胞培养板中加细胞悬液 100 μL/孔,对照组加不完全 PRMI1640 培养液 90 μL/孔,实验组分别加 3 种质量浓度的各种 MOEE 液 80 μL/孔,再在实验组的无有丝分裂原诱导组、

LPS 诱导组和 ConA 诱导组分别加不完全 PR-MI1640 培养液 10 μL/孔、LPS 液 10μl/孔、ConA 液 10μl/孔,且每个处理设 4 个重复,混匀后置 37℃、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 68 h,轻轻吸弃上清液 100 μL/孔,加 MTT 液 10 μL/孔并继续培养 4 h,然后加 DMSO 100 μL/孔并充分振荡 2 min,静置 20 min 后用酶标仪测 570 nm 的 OD 值^[17].结果以刺激指数(stimulation index,SI)表示:SI=实验孔 OD₅₇₀ 值/对照孔 OD₅₇₀ 均值

1.6 数据处理

数据用 SPSS11.0 进行方差分析和 Duncan 多重比较.结果以($\bar{X} \pm s$)表示.

2 结 果

2.1 MOEE 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响

由表 2 可见,与对照组相比,不同剂量的各种 MOEE 均能提高小鼠腹腔巨噬细胞的 PI,且除了 5.0 mg/mL 和 0.1 mg/mL PE₁₋₅ 的 PI 与对照组差异不显著外,其余不同剂量的各种 MOEE 的 PI 均极显著高于对照组($P<0.01$).

表 2 不同 MOEE 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力(PI)的影响($n=4,\bar{X} \pm s$)

Tab.2 Effect of different MOEE on phagocytic index of macrophages in mice($n=4,\bar{X} \pm s$)

剂量/(mg/mL)	AL ₁₋₅	FL ₁₋₅	PA ₁₋₅	PE ₁₋₅	TR ₁₋₅
5.0	1.13 ^{Bb} ±0.04	1.15 ^{Bb} ±0.05	1.25 ^{BCb} ±0.01	1.04 ^{ABab} ±0.01	1.25 ^{Cc} ±0.04
1.0	1.17 ^{Bb} ±0.05	1.32 ^{Cc} ±0.05	1.31 ^{Cc} ±0.02	1.10 ^{Bb} ±0.03	1.25 ^{BCc} ±0.05
0.1	1.11 ^{Bb} ±0.05	1.24 ^{BCc} ±0.08	1.23 ^{Bb} ±0.05	1.03 ^{ABab} ±0.07	1.15 ^{Bb} ±0.06
对照	1.00 ^{Aa} ±0.05	1.00 ^{Aa} ±0.02	1.00 ^{Aa} ±0.02	1.00 ^a ±0.05	1.00 ^{Aa} ±0.02

注:同列数据肩注不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: A,B为方差数据.01, a,b,c: $P<0.05$ compared with control.

由表 2 还可看出,随着 MOEE 剂量的增加 PI 均呈现先升高后降低的趋势. 比较 1.0 mg/mL MOEE 的 PI 发现(表 3),PI 大小顺序为:FL₁₋₅ > PA₁₋₅ > TR₁₋₅ > AL₁₋₅ > PE₁₋₅ > 对照. 其中,FL₁₋₅ 与 PA₁₋₅ 间的 PI 差异不显著,但极显著高于 AL₁₋₅ 和 PE₁₋₅ ($P<0.01$),显著高于 TR₁₋₅ ($P<0.05$);TR₁₋₅ 的 PI 极显著高于 PE₁₋₅ ($P<0.01$),显著高于 AL₁₋₅ ($P<0.05$);AL₁₋₅ 的 PI 显著高于 PE₁₋₅ ($P<0.05$).

2.2 MOEE 对小鼠脾细胞增殖能力的影响

2.2.1 无有丝分裂原刺激下,MOEE 对小鼠脾淋巴细胞增殖能力的影响 由表 4 可见,在无有丝分裂原刺激下,不同剂量的不同 MOEE 均有不同程度地促进小鼠淋巴细胞增殖的功能,且表现出一定的剂量效应关系. 其中,1.0 mg/mL 和 0.1 mg/mL AL₁₋₅、5.0 mg/mL 和 1.0 mg/mL FL₁₋₅ 以及 0.1 mg/mL PA₁₋₅ 的 SI 极显著高于对照组 ($P<0.01$); 1.0 mg/mL PA₁₋₅ 和 TR₁₋₅ 的 SI 显著高于对照组 ($P<0.05$);3 个剂量的 PE₁₋₅ 以及其余剂量的其余 4 种 MOEE 的 SI 也有高于对照组的趋势,但差异不显著.

由表 4 还可看出,在无有丝分裂原刺激下,随

着剂量的增加,AL₁₋₅、FL₁₋₅ 和 TR₁₋₅ 的 SI 先增加后降低,PA₁₋₅ 和 PE₁₋₅ 的 SI 呈降低趋势. 比较 1.0 mg/mL 不同 MOEE 的 SI 发现(表 5),SI 大小顺序为:FL₁₋₅ > AL₁₋₅ > PA₁₋₅ > TR₁₋₅ > PE₁₋₅ > 对照. 其中,FL₁₋₅ 的 SI 与 AL₁₋₅ 差异不显著,但显著高于 PA₁₋₅ ($P<0.05$),极显著高于 TR₁₋₅ 和 PE₁₋₅ ($P<0.01$); AL₁₋₅ 显著高于 TR₁₋₅ ($P<0.05$),极显著高于 PE₁₋₅ ($P<0.01$);PA₁₋₅ 显著高于 PE₁₋₅ ($P<0.05$);其余组间差异不显著.

2.2.2 LPS 刺激下,MOEE 对脾淋巴细胞增殖能力的影响 由表 6 可见,在 LPS 刺激下,除了 5.0 mg/mL AL₁₋₅ 的 SI 有低于对照组的趋势外,其余不同剂量的不同 MOEE 均有促进淋巴细胞增殖的功能,且表现出一定的剂量效应关系. 其中,3 个剂量的 FL₁₋₅ 和 PA₁₋₅ 的 SI 极显著高于对照组 ($P<0.01$); 1.0 mg/mL AL₁₋₅、5.0 mg/mL PE₁₋₅ 以及 1.0 mg/mL 和 0.1 mg/mL TR₁₋₅ 的 SI 也极显著高于对照组 ($P<0.01$);1.0 和 0.1 mg/mL PE₁₋₅ 的 SI 显著高于对照组 ($P<0.05$);其余剂量 MOEE 间的 SI 有高于对照组的趋势,但差异不显著.

表 3 1.0 mg/mL MOEE 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力 (PI) 的影响 (n=4, $\bar{X} \pm s$)					
Tab.3 Effect of 1.0 mg/mL MOEE on phagocytic index (PI) of macrophages in mice(n=4, $\bar{X} \pm s$)					
AL ₁₋₅	FL ₁₋₅	PA ₁₋₅	PE ₁₋₅	TR ₁₋₅	对照 (n=8)
1.17 ^{BCc} ± 0.05	1.32 ^{De} ± 0.05	1.31 ^{De} ± 0.02	1.10 ^{Bb} ± 0.03	1.25 ^{CDd} ± 0.05	1.00 ^{Aa} ± 0.04

注:同行数据肩注不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$).
Note: A,B,C,D; $P<0.01$, a,b,c,d,e; $P<0.05$ compared with control.

表 4 无有丝分裂原刺激下,不同 MOEE 对小鼠脾淋巴细胞增殖能力 (SI) 的影响 (n=4, $\bar{X} \pm s$)					
Tab.4 Effect of different MOEE on stimulation index (SI) of splenic lymphocytes in mice without mitogen(n=4, $\bar{X} \pm s$)					
剂量/(mg/mL)	AL ₁₋₅	FL ₁₋₅	PA ₁₋₅	PE ₁₋₅	TR ₁₋₅
5.0	1.01 ± 0.01 ^{Aa}	1.14 ± 0.02 ^{BCb}	1.08 ± 0.08 ^{ABab}	1.03 ± 0.08 ^{Aa}	1.05 ± 0.03 ^{Aab}
1.0	1.20 ± 0.05 ^{Bb}	1.24 ± 0.07 ^{Cc}	1.14 ± 0.07 ^{ABbc}	1.03 ± 0.09 ^{Aa}	1.11 ± 0.01 ^{Ab}
0.1	1.13 ± 0.06 ^{Bb}	1.07 ± 0.03 ^{ABab}	1.22 ± 0.02 ^{Bc}	1.08 ± 0.05 ^{Aa}	1.08 ± 0.09 ^{Aab}
对照	1.00 ± 0.03 ^{Aa}	1.00 ± 0.07 ^{Aa}	1.00 ± 0.07 ^{Aa}	1.00 ± 0.03 ^{Aa}	1.00 ± 0.03 ^{Aa}

注:同列数据肩注不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$).
Note: A,B,C; $P<0.01$, a,b,c; $P<0.05$ compared with control.

表 5 1.0 mg/mL MOEE 对小鼠脾淋巴细胞增殖能力 (SI) 的影响 (n=4, $\bar{X} \pm s$)						
Tab.5 Effect of 1.0 mg/mL MOEE on stimulation index of splenic lymphocytes (SI) in mice(n=4, $\bar{X} \pm s$)						
处理	AL ₁₋₅	FL ₁₋₅	PA ₁₋₅	PE ₁₋₅	TR ₁₋₅	对照 (n=24)
无有丝分裂原	1.20±0.05 ^{CDde}	1.24±0.07 ^{De}	1.14±0.07 ^{BCDcd}	1.03±0.09 ^{ABab}	1.11±0.01 ^{ABCbc}	1.00±0.04 ^{Aa}
LPS	1.23±0.11 ^{BCb}	1.43±0.03 ^{De}	1.35±0.04 ^{CDc}	1.15±0.07 ^{Bb}	1.24±0.03 ^{BCb}	1.00±0.04 ^{Aa}
ConA	1.04±0.02 ^{ABab}	1.15±0.04 ^{Cc}	1.08±0.03 ^{BCbc}	1.09±0.06 ^{BCbc}	1.12±0.02 ^{BCc}	1.00±0.04 ^{Aa}

注:同行数据肩注不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$).
Note: A,B,C,D; $P<0.01$, a,b,c,d,e; $P<0.05$ compared with control.

表 6 LPS 刺激下,不同 MOEE 对脾淋巴细胞增殖能力(SI)的影响($n=4,\bar{X}\pm s$)

Tab. 6 Effect of different MOEE on stimulation index of splenic lymphocytes (SI) in mice with LPS($n=4,\bar{X}\pm s$)

剂量/(mg/mL)	AL ₁₋₅	FL ₁₋₅	PA ₁₋₅	PE ₁₋₅	TR ₁₋₅
5.0	0.98±0.09 ^{Aa}	1.37±0.10 ^{Bb}	1.34±0.10 ^{Bb}	1.23±0.02 ^{Bb}	1.13±0.11 ^{ABab}
1.0	1.23±0.11 ^{Bb}	1.43±0.03 ^{Bb}	1.35±0.04 ^{Bb}	1.15±0.07 ^{ABb}	1.24±0.03 ^{Bb}
0.1	1.11±0.06 ^{ABab}	1.39±0.04 ^{Bb}	1.41±0.01 ^{Bb}	1.15±0.01 ^{ABb}	1.22±0.08 ^{Bb}
对照	1.00±0.05 ^{Aa}	1.00±0.01 ^{Aa}	1.00±0.01 ^{Aa}	1.00±0.05 ^{Aa}	1.00±0.01 ^{Aa}

注:同列数据肩注不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: A,B,C; $P<0.01$, a,b,c; $P<0.05$ compared with control.

由表 6 还可看出,在 LPS 刺激下,随着剂量的增加,AL₁₋₅、FL₁₋₅ 和 TR₁₋₅ 的 SI 先增加后降低,PA₁₋₅ 的 SI 呈降低趋势,PE₁₋₅ 的 SI 呈增加趋势.比较 1.0 mg/mL MOEE 发现(表 5),SI 大小顺序为:FL₁₋₅>PA₁₋₅>TR₁₋₅>AL₁₋₅>PE₁₋₅>对照.其中,FL₁₋₅ 的 PI 与 PA₁₋₅ 差异不显著,但极显著高于其余 3 种 MOEE($P<0.01$);PA₁₋₅ 的 PI 显著高于 AL₁₋₅ 和 TR₁₋₅ ($P<0.05$),极显著高于 PE₁₋₅ ($P<0.01$);其余组间差异不显著.

2.2.3 ConA 刺激下,MOEE 对脾淋巴细胞增殖

表 7 ConA 刺激下,不同 MOEE 对脾淋巴细胞增殖能力(SI)的影响($n=4,\bar{X}\pm s$)

Tab. 7 Effect of different MOEE on stimulation index of splenic lymphocytes (SI) in mice with ConA($n=4,\bar{X}\pm s$)

剂量/(mg/mL)	AL ₁₋₅	FL ₁₋₅	PA ₁₋₅	PE ₁₋₅	TR ₁₋₅
5.0	0.96±0.04 ^{Aa}	1.09±0.07 ^{ABab}	1.05±0.08 ^{Aab}	1.06±0.02 ^{Aa}	1.08±0.03 ^{ABb}
1.0	1.04±0.02 ^{Ab}	1.15±0.04 ^{Bb}	1.08±0.03 ^{Aab}	1.09±0.06 ^{Aa}	1.12±0.02 ^{Bb}
0.1	1.06±0.05 ^{Ab}	1.07±0.05 ^{ABab}	1.10±0.03 ^{Ab}	1.15±0.15 ^{Aa}	1.08±0.01 ^{ABb}
对照	1.00±0.03 ^{Aab}	1.00±0.01 ^{Aa}	1.00±0.01 ^{Aa}	1.00±0.06 ^{Aa}	1.00±0.01 ^{Aa}

注:同列数据肩注不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: A,B,C; $P<0.01$, a,b,c; $P<0.05$ compared with control.

由表 7 还可看出,在 ConA 刺激下,随着剂量的增加,AL₁₋₅、PA₁₋₅ 和 PE₁₋₅ 的 SI 呈降低趋势,FL₁₋₅ 和 TR₁₋₅ 的 SI 呈先增加后降低的趋势.比较 1.0 mg/mL 不同 MOEE 的 SI 发现(表 5),SI 大小顺序为:FL₁₋₅>TR₁₋₅>PE₁₋₅>PA₁₋₅>AL₁₋₅>对照.其中,FL₁₋₅ 的 SI 极显著高于 AL₁₋₅ ($P<0.01$),TR₁₋₅ 的 SI 显著高于 AL₁₋₅ ($P<0.05$),其余 MOEE 间的 SI 差异不显著.

3 讨 论

吞噬细胞吞噬能力的强弱是反映机体非特异性免疫能力高低的重要指标之一.本实验发现,5 种 MOEE 均能不同程度地提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬异物(中性红)的能力.这与酪蛋白酶解产物中一

能力的影响 由表 7 可见,在 ConA 刺激下,除 5.0 mg/mL AL₁₋₅ 外,其余剂量的不同 MOEE 均有促进脾淋巴细胞增殖的功能,且表现出一定的剂量效应关系.其中,1.0 mg/mL FL₁₋₅ 和 TR₁₋₅ 的 SI 极显著高于对照组($P<0.01$);1.0 和 0.1 mg/mL AL₁₋₅、0.1 mg/mL PA₁₋₅ 以及 5.0 和 0.1 mg/mL TR₁₋₅ 的 SI 显著高于对照组($P<0.05$);其余剂量的不同 MOEE 的 SI 也有高于对照组的趋势,但差异不显著.

些寡肽具有提高小鼠腹腔或外周血巨噬细胞吞噬绵羊(人)红细胞或细菌的能力的报道相一致^[8,18~20].同时,本实验还发现,随着 MOSS 剂量的增加,巨噬细胞的吞噬能力呈先增加后降低的曲线变化,且 1.0 mg/mL 的 5 种 MOEE 中,FL₁₋₅ 促进巨噬细胞吞噬异物的能力最强.表明,一定浓度的 5 种 MOEE 均具有提高机体吞噬细胞的吞噬能力进而提高机体免疫力的作用.

体外淋巴细胞增殖能力的强弱可反映机体免疫功能的好坏^[21,22].本实验发现,除了 5.0 mg/mL AL₁₋₅ (LPS、ConA 刺激)外,无论是否有丝分裂原刺激,不同剂量的 5 种 MOEE 都有促进小鼠脾淋巴细胞增殖的作用,但不同 MOEE 促脾淋巴细胞增殖的效果存在较大差异.该结果与不同蛋白酶以及酶解条件所制得的酶解酪蛋白寡肽对淋巴细胞增

殖的影响不同的结论相吻合^[8,23]. 有丝分裂原 LPS 和 ConA 能分别激活 B、T 细胞,促进 B、T 细胞增殖^[23]. 本实验发现,在一定剂量范围内,5 种 MOEE 均能与 LPS 和 ConA 协同并分别促进 B、T 细胞增殖,但协同促 B、T 细胞增殖能力的大小有差异,促 B 细胞增殖更有效. 该结果与不同蛋白酶以及酶解条件所制得的酶解酪蛋白寡肽对淋巴细胞增殖的影响不同相一致^[8,19,24~32]. 另外,本试验还发现,无论是否有丝分裂原刺激,不同 MOEE 促脾淋巴细胞增殖能力表现出一定的剂量效应关系,在 1.0 mg/mL 时,5 种 MOEE 都以 FL₁₋₅ 促进淋巴细胞增殖的能力最强. 表明,5 种 MOEE 不仅本身具有有丝分裂原活性,而且还能与有丝分裂原(LPS、Co-

nA)协同促进淋巴细胞增殖,从而提高机体免疫力的能力. 但 MOEE 促淋巴细胞增殖以及不同 MOEE 促增殖能力的大小存在差异的具体机制尚不清楚,有待进一步研究.

综上可见,本研究发现,一定条件下制备的酶解鸡蛋清寡肽混合物具有免疫增强作用. 由此推之,鸡蛋作为人类的膳食除提供蛋白质氨基酸等养分外,还可能在消化降解过程中产生一些具有免疫增强活性的寡肽,进一步保障人类健康. 另外,本研究结果还暗示,通过体外酶解技术可生产制备出具有增强机体免疫力的安全生物产品,为研究开发高附加值的蛋品提供了新的思路并积累了一些实验数据以及提供了一定的理论依据.

参考文献:

[1] Britton J R, A J Kastin. Biologically active polypeptides in milk[J]. **American Journal of Medical Science**,1991,301:124—135.

[2] Schlimme E, H Meisel. Bioactive peptides derived from milk protein. Structural,physiological and analytical aspects[J]. **Die Nahrung**. 39:1—20.

[3] Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins[J]. **Biopolymer**,1997,43:119—128.

[4] Shah N P. Effects of milk-derived bioactives:an overview[J]. **British Journal of Nutrition**, 2000,84:S3—S10.

[5] Clare D A, H E Swaisgood. Bioactive milk peptides:A prospectus[J]. **Journal of Dairy Science**,2000, 83:1187—1195.

[6] Migliore-Samour D F, Floc’h, G Jollès. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation[J]. **Journal of Dairy Research**,1989,56:357—362.

[7] Fiat A M, D Migliore-Samour, P Jollès, *et al.* Biologically active peptides from milk protein with emphasis on two exmples concerning antithrombotic and immunomodulating actives[J]. **Journal of Dairy Science**,1993,76:301—310.

[8] Gill H S, F Dohll, K J Rutherford, *et al.* Immunoregulatory peptides in bovine milk[J]. **British Journal of Nutrition**, 2000,84(1): S111—S1117.

[9] Fujita H R Sasaki, M Yoshikawa. Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**,1995, 59(12): 2344—2345.

[10] Fujita H H, Usui K Kurahashi, M Yoshikawa. Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin[J]. **Peptides**, 16(5): 785—790.

[11] Matoba N, H Usui, H Fujita,*et al.* A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery[J]. **FEBS Lett**,1999,452(3):181—184.

[12] Ibrahim H R, E Iwamori, Y Sugimoto,*et al.* Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1998, 1401(3): 289—303.

[13] Ibrahim H R, Y Sugimoto, T Aoki. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism[J]. **Biochim Biophys Acta**,2000,1523(2—3): 196—205.

[14] Mine Y S Lauriau, F Ma. Novel antibacterial peptides derived from hen egg lysozyme[D]. California: Annual Meeting and Food Expo-Anaheim,2002.

[15] 田刚,陈代文,余冰,等. 酶解鸡蛋清小肽混合物对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志,2005,41(5):14—17.

[16] 黄林清,周世文,张诗平,等. 蚕蛹多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 解放军药学报. 2002,18(1):11—13.

[17] Mosmann T. Rapid coloirimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. **J Immunol Methods**, 1983, 65:55—63.

[18] Joll S G, F Parker, F Floc’h, *et al.* Immunostimulating substances from human casein[J]. **Journal of Pharmacology**, 1981—1982, 29:1361—1365.

[19] Migliore-Samour D, G Jollès. Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn[J]. **Experientia**, 1988, 44:188—193.

[20] Lahov E, W Regelson. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides[J]. **Fd. Chem. Toxic**, 1996, 34(1):131—145.

[21] 毕爱华. 医学免疫学[M]. 北京:人民军医出版社, 1995, 315—317.

[22] 谈寅飞. β -酪啡肽对仔猪胃泌素分泌、垂体细胞和 T 细胞功能影响的机理研究[D]. 南京:南京农业大学学位论文, 2000.

[23] Otani H, I Hata. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer’s patch cells by bovine milk casein and their digests[J]. **Journal of Dairy Research**, 1995, 62:339—438.

[24] Nakamura A, K Nagai, S Suzuki, *et al.* A novel method of screening for immunomodulating substances, establishment of an assay system and its application to culture broths of microorganisms[J]. **Journal of Antibiotics**, 1986, 39:1148—1154.

[25] Coste M, V Rochet, Jlé onil, *et al.* Identification of C-terminal paptides of bovine β -casein that enhance proliferation of rat lymphocytes[J]. **Immunology Letters**, 1992, 33:41—45.

[26] Kayser H, H Meisel. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins[J]. **FEBS Letters**, 1996, 383:18—20.

[27] Elitsur Y, G D Luk. Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation[J]. **Clinical and Experimental Immunology**, 1996, 85:493—497.

[28] Yun S S, Y Sugita-Konish, S Kumagai, *et al.* Isolation of mitogenic glycophosphopeptides from cheese whey protein concentrate[J]. **Biosci. Biotech. Biochem**, 1996, 60(3):429—433.

[29] 潘翠玲, 陈伟华, 邹思湘, 等. 蛋白酶解物对 10 日龄仔猪淋巴细胞转化的影响[J]. **畜牧与兽医**, 2003, 35(4):7—9.

[30] Miyauchi H, I Shinoda Y Fukuwatari, H Hayasawa. Immunostimulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocyte and Peyer’s patch cells[J]. **J Dairy Sci**, 1998, 80: 2330—2339.

[31] Wong K F, N Midleton, M Montgomery, *et al.* Immunostimulation of murine spleen cells by materials associated with bovine milk fractions[J]. **J Dairy Sci**, 1998, 81: 1825—1832.

[32] Yun S S, Y Sugita-Konish, S Kumagai, *et al.* Isolation of mitogenic glycophosphopeptides from cheese whey protein concentrate[J]. **Biosci. Biotech. Biochem**, 1996, 60(3):429—433.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 52 页)

参考文献:

[1] 张炳文, 郝真红, 杜红霞. 低温真空油炸技术综述[J]. **粮油食品科技**, 1997, 5: 10—15.

[2] 沈泽洞, 黄键豪. 鲢鱼低温真空油炸的研究[J]. **食品工业科技**, 2001, 22: 26—29.

[3] 刘勤生, 蔡振群. 果蔬脆片生产中冷冻及油炸条件对脆片质量的影响[J]. **食品科学**, 1998, 19: 19—23.

[4] 王肇慈. 粮油食品品质分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999.

[5] Ufheil G, Escher F. Dynamics of oil uptake during deep fat frying of potato slices[J]. **Lebensm Wiss U Technol**, 1996, 29: 640—644.

[6] Howard L R, Braswell D D. Chemical composition and color of strained carrots as affected by processing[J]. **Journal of Food Science**, 1996, 61:327—330.

[7] Markowski, M. Air drying of vegetables: evaluation of mass transfer coefficient[J]. **Journal of Food Engineering**, 1997, 34:55—62.

(责任编辑:朱 明)