

文章编号:1673-1689(2009)01-0131-05

黄鳍金枪鱼头蛋白酶解液及其分级组分 对小鼠免疫功能的影响

杨萍¹, 蔡本利¹, 洪鹏志¹, 饶子亮², 章超桦¹

(1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524025; 2. 广东省医学实验动物中心, 广东 南海 528248)

摘 要: 研究黄鳍金枪鱼头蛋白酶解液(EPTH)及其截留相对分子质量(MWCO)10 000和5 000超滤膜的分级组分Ⅰ(>10 000)、组分Ⅱ(5 000~10 000)与组分Ⅲ(<5 000)对小鼠免疫功能的影响。采用灌胃给药, 每天1次, 分别于第14、19、32及35天测定有关免疫功能指标。结果表明: 组分Ⅱ显著提高小鼠胸腺指数、脾脏指数、廓清指数, 显著促进小鼠脾细胞抗体形成功能, 提高骨髓细胞DNA含量, 对小鼠淋巴细胞转化能力无显著影响; EPTH显著提高小鼠骨髓细胞DNA含量; 组分Ⅰ、组分Ⅲ显著提高小鼠脾脏指数。组分Ⅱ富集了更多的免疫活性物质, 具有增强小鼠免疫功能的作用。

关键词: 金枪鱼; 酶解蛋白; 小鼠; 免疫

中图分类号: TS 254.1

文献标识码: A

Effect of Tuna Head Enzymatic Hydrolysate and Its Portions on Immune Function in Mice

YANG Ping¹, CAI Ben-li¹, HONG Peng-zhi¹, RAO Zi-liang², ZHANG Chao-hua¹

(1. School of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. Guangdong Medical Laboratory Animal Centre, Nanhai 528248, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of tuna heads enzymatic hydrolysate (EPTH) and its portions of ultrafiltration membrane with molecular weight cut-off (MWCO) of 10 000 and 5 000 on immune function in mice. In oral every day, immunity functions were measured at 14 th, 19 th, 32 th and 35 th day respectively. The results indicated that portion Ⅱ (5 000~10 000) significantly improved the thymus index, spleen index, carbon clearance index, antibody-producing cells of spleen and quantity of DNA in marrow cell of mice. Furthermore, EPTH could improved the quantity of DNA in marrow cell of mice; portion Ⅰ (>10 000) and portion Ⅲ (<5 000) could improved the spleen index. This study suggested portion Ⅱ enriched immune ingredients and could enhance immunity function in mice.

Key words: Tuna; enzymatic hydrolysate; mice; immunity

收稿日期: 2007-12-12

基金项目: 广东省海洋与渔业局科技兴海项目。

作者简介: 杨萍(1964-), 女, 广东信宜人, 工学硕士, 副教授, 主要从事水产品深加工及综合利用方面的研究。

Email: 50299052@163.com

金枪鱼(tunas)又叫鲔鱼、吞拿鱼,是远洋渔业的重要经济鱼类。作为一种深海鱼类,金枪鱼肉质鲜美,营养全面,是现代人所喜爱的美食。研究表明,金枪鱼保健功能显著,具有防止动脉硬化、保护肝脏、治疗贫血等多方面的功效^[1],其加工品更是国际抢手,附加值非常高。目前,金枪鱼除少部分冰鲜销售外,一般都经冷冻制成冷冻金枪鱼肉,通常都用来制成鱼生、寿司、调味品或罐装食品。金枪鱼加工过程中会出现大量的下脚料,包括鱼头、内脏、鳃、鱼皮等,产生的下脚料大约占总质量的50%~70%,下脚料中含有大量的蛋白质、脂肪、矿物质及多种生物活性物质,是值得开发利用的资源。海洋生物中不但蛋白质含量丰富,而且在长期特异闭锁环境中进化的蛋白质组成、结构与功能与陆地动植物有较大差异,因此是生产功能性活性物质很好的特定的蛋白质资源。目前,海洋生物中免疫活性物质的研究主要集中在贝类,主要有牡蛎提取物^[2]、扇贝多肽^[3]、文蛤提取物^[4]、鲍鱼酶解提取物^[5]等以及褐藻硫酸多糖^[6],海洋鱼类来源的免疫活性物质的研究少见有报道。作者对金枪鱼属中产量最大的黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)鱼头的营养成分^[7]、蛋白酶解条件^[8]进行了研究,研究了黄鳍金枪鱼头蛋白酶解液及其超滤组分对小鼠免疫功能的影响,旨在探讨金枪鱼头蛋白酶解物的免疫调节活性,为进一步开发这些下脚料,生产高附加值产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8周龄,SPF级昆明种小鼠(合格证编号:0020000)240只,体重18~22g,雌雄各半,由广东省医学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂与仪器

黄鳍金枪鱼头,由广东省广远远洋渔业集团有限公司提供;木瓜蛋白酶(650 000 IU/g),中性蛋白酶(300 000 IU/g),南宁庞博生物有限公司产品;RPMI1640培养液,青霉素/链霉素(10 000 IU/mL),吉诺生物医药技术有限公司提供;新生牛血清,杭州四季清生物技术公司产品;ConA,Calbiochem产品;MTT,MBCHEM产品;绵羊静脉血,南方医院动物实验中心提供;豚鼠血清,广东省医学实验动物中心提供。

杯式超滤器,CO₂培养箱,酶标仪,紫外可见分光光度计,倒置显微镜,24孔板、96孔板。

1.3 实验方法

1.3.1 黄鳍金枪鱼头蛋白酶解液及超滤组分的制备 金枪鱼头热水浸提后取肉,绞碎,匀浆,按文献[8]条件进行酶解,100℃水浴灭酶10min,冷却后以4 000 r/min离心10min,弃去上层油脂、杂质和下层沉淀,中间清液即为金枪鱼头蛋白酶解液EPH(以下简称酶解液)。酶解液在0.25 MPa压力下,先后经过截留限为10 000、5 000的醋酸纤维素平板膜进行超滤,得到相对分子质量为10 000以上、5 000~10 000、5 000以下3级组分,并浓缩至蛋白质含量与酶解液相同。121℃高压杀菌10min后冷藏保存,分别记为组分I、组分II、组分III。

1.3.2 实验动物分组与处理 取小鼠240只,雌雄各半,随机分为4批,分别进行碳粒廓清实验、淋巴细胞转化实验、抗体生成实验和骨髓细胞DNA含量实验;每个实验设空白对照组、酶解液组、组分I、组分II、组分III组,共5组。各组小鼠除饲喂日常鼠粮外,每日上午9:00灌胃相应受试样品,每鼠10g体重灌0.2mL,空白对照组以相应体积蒸馏水代替。

1.3.3 对小鼠单核巨噬细胞吞噬能力与免疫脏器的影响 小鼠饲养至第19日,称重后以每鼠10g体重0.1mL尾静脉注射5倍稀释的印度墨汁,于注射后2min、10min后眼眶采血20μL,溶于2mL质量分数0.1% Na₂CO₃溶液中,摇匀后,以Na₂CO₃溶液做空白对照,于紫外分光光度计600nm波长处测定吸光度,以廓清指数比较单核巨噬细胞吞噬能力:

$$\text{廓清指数 } k = \frac{\lg A_1 - \lg A_2}{t_2 - t_1}$$

A₁、A₂分别为在时间t₁、t₂时所取血样的吸光度;t₂-t₁为取两血样的时间差。

末次取血后,将小鼠脱颈处死,取出肝脏、脾脏、胸腺分别称重。按照下式计算胸腺指数、脾脏指数并比较各组间差异。

胸腺指数=胸腺质量(mg)/体重(10g),

脾脏指数=脾脏质量(mg)/体重(10g)

1.3.4 对小鼠淋巴细胞增殖的影响 饲养至第32日,拉颈处死小鼠,无菌取脾(小鼠脾脏全部单独处理),剪刀剪碎,于200目筛网上研磨,Hank's冲洗过滤,收集细胞悬液。无菌条件下1 000 r/min离心5min,弃去上清液,以Hank's冲洗积压的细胞;重复2次,弃上清液后,用2mL RPMI1640完全培养液重悬脾细胞,台盼蓝染色计数,调整其细胞浓度为2×10⁶/mL,活细胞数大于95%。无菌条件

下,向 24 孔板中加入上述脾细胞悬液 1 mL,设不加 ConA 的对照组与加 ConA(每孔终质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$)的刺激组两组,各组设 12 个复孔。置于 37 $^{\circ}\text{C}$,质量分数 5% CO_2 、饱和湿度条件下孵育 72 h,培养结束前 4 h,每孔轻轻吸去上清液 0.7 mL,补加 0.7 mL 不含牛血清的培养液,同时加入 MTT 溶液(5 mg/mL)50 μL ,振荡均匀,继续培养 4 h。培养结束后,加入新配制的酸性异丙醇 1 mL 终止反应,振荡,待甲瓖沉淀溶解后,将溶解液分装到 96 孔培养板中,每孔分装 3 孔作为平行样,每孔 200 μL ,在主波长 570 nm 波长下测定吸光度。

1.3.5 对小鼠脾细胞抗体形成能力的影响 采用定量溶血分光光度法^[9]。饲养至第 35 日,每只小鼠腹腔注射质量分数 5% 绵羊红细胞(SRBC)悬液 0.2 mL。第 39 日,处死小鼠,按照淋巴细胞转化实验方法制备细胞悬液,以 RPMI1640 培养液调整其细胞浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$,于 5 mL 小试管中依次加入细胞悬液 1 mL,10 g/dL SRBC 0.5 mL 和体积比 1:10 的豚鼠血清 1 mL,另设培养液、10 g/dL SRBC、豚鼠血清混合液为对照管。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温孵育 30 min,冰浴 10 min 终止反应。2 000 r/min 离心 10 min,取上清液于紫外分光光度计波长 413 nm 处测 OD 值。

1.3.6 对小鼠骨髓细胞 DNA 含量的影响 饲养至第 14 日,处死小鼠,取右侧完整股骨,除净肌肉及软组织,剪刀小心剪开两端,用 10 mL 0.005 mol/L CaCl_2 将全部骨髓冲入离心管中,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷却 30 min,2 500 r/min 离心 15 min,弃去上清液,将沉淀物中加入 5 mL 0.2 mol/L HClO_4 溶液,充分混合后,90 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min,冷却,滤纸过滤,紫外分光光度计于 268 nm 处测定滤液 OD 值。

1.4 数据处理

实验结果以 Spss13.0 软件统计处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,LSD 法进行显著性分析并统计各组间差异。

2 实验结果

2.1 金枪鱼头蛋白酶解液及分级组分对小鼠免疫脏器指数的影响

酶解液及各组分对小鼠免疫脏器指数的影响见表 1。与空白对照组相比,酶解液与各组分均能不同程度地提高小鼠的胸腺指数。其中,组分 II 能显著提高小鼠的胸腺指数($p < 0.01$),其余组分均无显著作用。

与空白对照组相比,酶解液与各组分均能不同程度提高小鼠的脾脏指数,其中,组分 II 能显著提

高小鼠的脾脏指数,差异性极显著($p < 0.001$);组分 I、组分 III 能显著提高小鼠脾脏指数($p < 0.01$, $p < 0.05$);酶解液无显著作用;相比酶解液及组分 III,组分 II 有显著作用($p < 0.001$, $p < 0.01$),说明组分 II 中富集了更多的提高小鼠脾脏指数的功能因子。

表 1 金枪鱼头蛋白酶解液及分级组分对小鼠免疫脏器指数的影响

Tab. 1 Effects of EPTH and its portions on the indexes of immune organs of normal mice

组别	n/只	胸腺指数	脾脏指数
空白对照组	12	0.323 9 $\pm$ 0.065 5 ^{bb}	0.231 7 $\pm$ 0.023 5 ^{dc丙}
酶解液组	12	0.393 1 $\pm$ 0.054 6 ^{abAB}	0.240 6 $\pm$ 0.031 6 ^{cdBC乙丙}
组分 I 组	12	0.404 6 $\pm$ 0.080 6 ^{abAB}	0.279 0 $\pm$ 0.041 8 ^{abAB甲乙丙}
组分 II 组	12	0.456 0 $\pm$ 0.117 0 ^{aA}	0.308 6 $\pm$ 0.058 5 ^{aA甲}
组分 III 组	12	0.368 6 $\pm$ 0.061 5 ^{abAB}	0.265 7 $\pm$ 0.040 3 ^{bcABC甲乙丙}

注:任意两组间 不含相同小写字母, $p < 0.05$; 不含相同大写字母, $p < 0.01$; 不含相同文字, $p < 0.001$ 。

2.2 金枪鱼头蛋白酶解液及分级组分对小鼠廓清指数的影响

廓清指数反映了小鼠巨噬细胞吞噬功能的强弱,见图 1。与空白对照组相比,酶解液及各分级组分均显示出不同程度的促进巨噬细胞吞噬功能的作用,只有组分 II 显示出较强的促进吞噬功能活性($p < 0.001$),组分 II 与组分 I、组分 III 相比,差异性极显著($p < 0.001$),与酶解液相比,差异性显著($p < 0.05$),说明组分 II 中富集了更多的免疫吞噬功能促进因子。

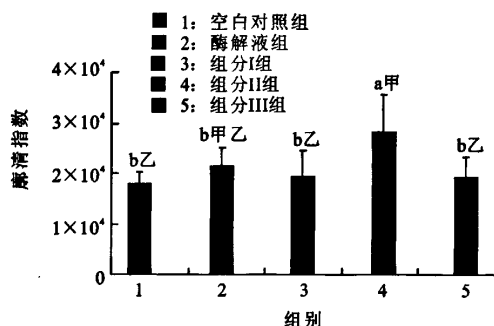


图 1 金枪鱼头蛋白酶解液及分级组分对小鼠廓清指数的影响

Fig. 1 Effects of EPTH and its portions on carbon clearance index of normal mice

2.3 金枪鱼头蛋白酶解液及分级组分对小鼠淋巴细胞增殖活性的影响

酶解液及各分级组分对小鼠淋巴细胞增殖能力的影响见表 2。不加 ConA 时,与空白对照组相比,组分 I 能显著促进小鼠淋巴细胞增殖($p < 0.05$),其余组分 OD 值均大于空白对照组,但没有显著影响。加 ConA 后,各组间的 OD 值均比未加时明显提高,除组分 III,其余各组的 OD 值均大于空白对照组,但无显著性,其中组分 II 的 OD 值最大。

表 2 金枪鱼头蛋白酶解液及分级组分对小鼠淋巴细胞增殖能力的影响

Tab. 2 Effects of EPTH and its portions on proliferation of spleen lymphocyte in normal mice

组别	n/只	OD _{570 nm}	
		ConA(-)	ConA(+)
空白对照组	12	0.084 2± 0.011 6 ^b	0.149 0± 0.031 6
酶解液组	12	0.088 5± 0.006 4 ^{ab}	0.156 9± 0.027 6
组分 I 组	12	0.092 5± 0.009 5 ^a	0.162 1± 0.042 2
组分 II 组	12	0.089 9± 0.008 0 ^{ab}	0.167 9± 0.032 1
组分 III 组	12	0.087 8± 0.010 5 ^{ab}	0.148 4± 0.026 5

注:任意两组间 不含相同小写字母, $p < 0.05$; 不含相同大写字母, $p < 0.01$; 不含相同文字, $p < 0.001$ 。

2.4 金枪鱼头蛋白酶解液及分级组分对小鼠脾细胞抗体形成能力的影响

酶解液及各分级组分对小鼠脾细胞抗体形成能力的影响见图 2。除组分 I 组外,各组 OD 值均高于空白对照组,其中酶解液与组分 III 组无显著性;组分 II 组的 OD 值提高了 20.83%,差异性显著($p < 0.05$),显示了组分 II 较强的促进抗体生成活性。

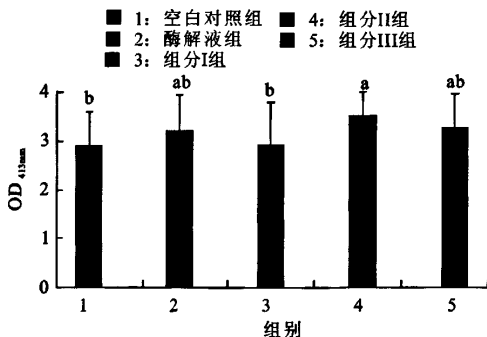


图 2 金枪鱼头蛋白酶解液及分级组分对小鼠脾细胞抗体形成能力的影响

Fig. 2 Effects of EPTH and its portions on the antibody-forming ability in normal mice

2.5 金枪鱼头蛋白酶解液及分级组分对小鼠骨髓细胞 DNA 含量的影响

酶解液及分级组分对小鼠骨髓细胞 DNA 含量的影响见图 3。与空白对照组相比,酶解液和组分 II 组的 DNA OD 值提高了 19%,差异性显著($p < 0.05$, $p < 0.05$),表现出较强的促进骨髓增殖能力。组分 I、III 组的 DNA OD 值均高于空白对照组,但无显著差异。

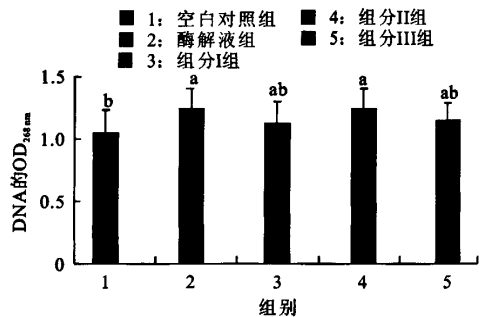


图 3 金枪鱼头蛋白酶解液及分级组分对小鼠骨髓细胞 DNA 含量的影响

Fig. 3 Effects of EPTH and its portions on quantity of DNA in marrow cell in normal mice

3 结 语

自 1981 年 Jolles 从人乳中分离出免疫活性肽以来^[11],免疫肽就成为免疫功能食品研究的新热点。研究表明,酪蛋白免疫活性肽以无活性的形式存在于酪蛋白前体物中,用适当的蛋白酶水解并从酪蛋白中释放出来后才成为具有生理活性的肽段。目前,免疫活性肽的研究和制备主要采用酶解的方法获得。机体的免疫系统是由非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫共同构成的防御系统。免疫调节在机体的健康中发挥着重要的作用。

作者以蛋白酶水解黄鳍金枪鱼头蛋白得到酶解液,酶解液经超滤分级分离得到组分 I ($> 10\ 000$)、组分 II ($5\ 000 \sim 10\ 000$)和组分 III ($< 5\ 000$)。骨髓是重要的免疫器官,酶解液能显著提高小鼠骨髓细胞 DNA 含量(< 0.05),说明酶解液具有提高免疫功能的作用;组分 II 显著提高小鼠的胸腺指数(< 0.01)和脾脏指数(< 0.001),显著促进小鼠单核巨噬细胞吞噬能力(< 0.01),显著促进小鼠脾细胞抗体形成能力(< 0.05),对小鼠淋巴细胞转化能力无显著影响,说明组分 II 有促进小鼠的非特异性免疫和体液免疫功能的作用;组分 II 显著提高骨髓细胞 DNA 含量(< 0.05),提示其能促进骨髓细胞 DNA 的合成,加速骨髓细胞分裂增殖,从

而提高机体的免疫力。组分 I 和组分 III 能显著提高小鼠脾脏指数($p < 0.01$, $p < 0.05$);可见,相比于组分 I 与组分 III,组分 II 富集了更多的促进免疫功能的活性物质。本结果为进一步探讨黄鳍金枪鱼

头蛋白酶解液中的免疫活性物质的分离纯化、结构组成、免疫活性机理及开发免疫功能食品奠定了理论基础。

参考文献(References):

- [1] 李桂芬,乐建盛. 金枪鱼的营养功效与开发加工[J]. 食品科技, 2003(9):41—44.
LI Gui-fen, YUE Jian-sheng. The nutritive effect of the Tuna and its processing development[J]. *Food Science and Technology*, 2003, 9:41—44. (in Chinese)
- [2] 张冬青,沈伯华,高颖,等. 牡蛎提取物对小鼠免疫功能的正向调节作用[J]. 上海免疫学杂志, 1995, 15(1):18—21.
ZHANG Dong-qing, SHEN Bo-hua, GAO Ying, et al. Positive regulation effect of the oyster extracts on immune function of mice[J]. *Shanghai Journal of Immunology*, 1995, 15(1):18—21. (in Chinese)
- [3] 杜卫,刘晓萍,梁惠,等. 扇贝多肽对淋巴细胞的保护作用 and 反相液相色谱分析[J]. 中国海洋药物, 2000, 19(5):27—29.
DU Wei, LIU Xiao-ping, LIANG Hui, et al. The protective action of PCF on lymphocyte and the analysis of it by a reversed phase high performance liquid chromatography(RPLC) [J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2000, 19(5):27—29. (in Chinese)
- [4] 何雅军,吴谦,朱瑞斐,等. 文蛤多糖与文蛤提取物对小鼠免疫调节影响的对比研究[J]. 广东药学, 1994(3):50—53.
HE Ya-jun, WU qian, ZHU Rui-fei, et al. Comparison of immunomodulating action of meretrix polysaccharides and meretrix extracts on mice[J]. *Guangdong Pharmaceutical Journal*, 1994(3):50—53. (in Chinese)
- [5] 彭汶铎,陈启亮,赵金华. 鲍鱼酶解提取物的营养成分及对免疫低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(6):494—497.
PENG Wen-duo, CHEN Qi-liang, ZHAO Jin-hua. Nutrients of enzymolytic extract of abalone and immunomodulating effect on immunosuppressed mice[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2005, 17(6):494—497. (in Chinese)
- [6] 王文涛,周黄金,邢善田,等. 海藻硫酸多糖对正常及免疫低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1994, 8(3):199—202.
WANG Wen-tao, ZHOU Huang-jin, XING Shan-tian, et al. Immunomodulating action of marine algae sulfated polysaccharides on normal and immunosuppressed mice[J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1994, 8(3):199—202. (in Chinese)
- [7] 洪鹏志,杨萍,章超桦,等. 金枪鱼头的营养成分及其蛋白酶解物的应用[J]. 食品研究与开发, 2007, 128(5):140—143.
HONG Peng-zhi, YANG Ping, ZHANG Chao-hua, et al. Nutrition component of tuna head and application of its enzymolysis protein[J]. *Food Research and Development*, 2007, 128(5):140—143. (in Chinese)
- [8] 洪鹏志,杨萍,曾少葵,等. 黄鳍金枪鱼头蛋白酶解条件的研究[J]. 食品科技, 2007(3):100—103.
HONG Peng-zhi, YANG Ping, ZENG Shao-kui, et al. Study on enzymatic hydrolysis to protein from yellow fin tuna head [J]. *Food Science and Technology*, 2007(3):100—103. (in Chinese)
- [9] 江振友,林晨,刘小澄,等. 灵芝多糖对小鼠体液免疫功能的影响[J]. 暨南大学学报, 2003, 24(2):51—53.
JIANG Zhen-you, LIN Chen, LIU Xiao-cheng, et al. Effect of ganoderma polysaccharides on humoral immunity function of mice[J]. *Journal of Jinan University*, 2003, 24(2):51—53. (in Chinese)
- [10] 陈建济,张瑜,王秀敏,等. 灵芝多糖的药效学研究[J]. 海峡药学, 2000, 12(4):15—17.
CHEN Jian-ji, ZHANG Yu, WANG Xiu-min, et al. Studies on the pharmacological effects of the polysaccharides of *Ganoderma lucidum* [J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2000, 12(4):15—17. (in Chinese)
- [11] Jolles P, Parker P, Migliore D, et al. Immunostimulating substances from human casein[J]. *Journal of Immunopharmacology*, 1981(3):363.

(责任编辑:李春丽)