

伴大豆球蛋白水解肽对小鼠抗大肠杆菌感染的作用

沈仓良, 陈伟华, 邹思湘

沈仓良, 陈伟华, 邹思湘, 南京农业大学动物医学院 江苏省南京市 210095
沈仓良, 男, 1981-05-18 生, 江苏省苏州市人, 汉族. 2004 年南京农业大学
动物医学院硕士生, 从事动物营养生化研究.

通讯作者: 邹思湘, 210095, 江苏省南京市, 南京农业大学动物医学院.
sixiangzou@njau.edu.cn

电话: 025-84396763 传真: 025-43986669

收稿日期: 2005-03-22 接受日期: 2005-04-01

Anti-infection effect of hydrolysates from conglycinin on *E.coli* in mice

Cang-Liang Shen, Wei-Hua Chen, Si-Xiang Zou

Cang-Liang Shen, Wei-Hua Chen, Si-Xiang Zou, College of Veterinary
Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu
Province, China

Correspondence to: Si-Xiang Zou, College of Veterinary Medicine,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province,
China. sixiangzou@njau.edu.cn

Received: 2005-03-22 Accepted: 2005-04-01

Abstract

AIM: To elucidate anti-infection effect of hydrolysates from
conglycinin on *E.coli* in mice.

METHODS: Male KM mice were assigned randomly in
five treatments. After feeding basal diet three days, *E.coli*O₁₃₈
was fed in five treatments from 2×10^{11} to 2×10^7 CFU/L, di-
luted (in decuple) ordinally. The LD₅₀ of mice feeding *E.*
*coli*O₁₃₈ after 56 h was 4.73×10^{10} CFU/L. Two batch of
Male KM mice were randomly assigned to six treatments
respectively: normal (NOR) group, feeding-*E.coli* control
(FEC), Basal diet + physiological saline, Basal diet + Hcl-
full hydrolysis of conglycinin (HCL-FHC), Basal diet +
conglycinin (Conglycinin), Basal diet + pepsin-hydrolysate
conglycinin (PTC), and Basal diet + purified fraction B of
pepsin hydrolysates of conglycinin (P2-PTC) group. The
mice were fed with a dose of 0.2 mL/g (containing equal
amount of nitrogen) except the ones in NOR and FEC
group. Twenty days after feeding, each mouse in FEC,
HCL-FHC, Conglycinin, PTC and P2-PTC group was fed
with *E.coli*O₁₃₈ (2×10^9 CFU/L and 2×10^{11} CFU/L for the two
batch, respectively, 0.2 mL/g) in the 22nd day (midday).
The actions of the mice were observed until 48 h after
feeding with *E.coli*O₁₃₈. Then all the mice were killed. The
blood, spleen and the whole length of intestines were
collected. The immune index was determined by
radioimmunoassay.

RESULTS: The KM mice reacted differently when infected
with different levels of *E.coli* after feeding the pepsin-hy-
drolysate conglycinin. In mice fed with 2×10^9 CFU/L of *E.*
*coli*O₁₃₈, the pepsin-hydrolysate conglycinin significantly
increased the level of spleen IL-2 ($19.2 \pm 9.6 \mu\text{g/g}$ vs
 $11.5 \pm 4.7 \mu\text{g/g}$ in P2-PTC and NOR group respectively,
 $P < 0.05$; $19.2 \pm 9.6 \mu\text{g/g}$ vs $9.4 \pm 3.7 \mu\text{g/g}$ in P2-PTC and
FEC group respectively, $P < 0.01$), the intestinal sIgA
concentration, and significantly decreased spleen IL-6
($127.1 \pm 52.8 \text{ ng/g}$ vs $276.4 \pm 60.1 \text{ ng/g}$ in P2-PTC and
NOR respectively, $P < 0.01$; $127.1 \pm 52.8 \text{ ng/g}$ vs $224.5 \pm$
 38.9 ng/g in P2-PTC and FEC respectively, $P < 0.05$) and
TNF- α ($9.1 \pm 2.0 \mu\text{g/g}$ vs $16.3 \pm 3.9 \mu\text{g/g}$ in PTC and NOR
group respectively, $P < 0.05$) level, but had no significant
effect on serum IL-2. In mice fed with 2×10^{11} CFU/L of
*E.coli*O₁₃₈, the pepsin-hydrolysate conglycinin significantly
increased the levels of spleen IL-6 ($480.5 \pm 184.7 \text{ ng/g}$ vs
 $206.7 \pm 72.3 \text{ ng/g}$ in P2-PTC and NOR respectively,
 $P < 0.05$) and TNF- α ($43.3 \pm 5.8 \mu\text{g/g}$ vs $10.5 \pm 4.1 \mu\text{g/g}$
in P2-PTC and NOR group respectively, $P < 0.01$; $43.3 \pm$
 $5.8 \mu\text{g/g}$ vs $19.7 \pm 9.0 \mu\text{g/g}$ in P2-PTC and FEC group
respectively, $P < 0.01$), and decreased the serum IL-6 and
TNF- α (P2-PTC group $2.8 \pm 1.0 \mu\text{g/L}$ vs FEC group $4.6 \pm$
 $2.0 \mu\text{g/L}$ in P2-PTC and FEC group respectively, $P < 0.05$)
concentrations.

CONCLUSION: The hydrolysates from conglycinin with
pepsin can increase the immune function in mice, defend
the invasion of *E.coli* and keep the gut healthy.

Key Words: Conglycinin; Pepsin; Hydrolysate; *E.coli*O₁₃₈;
sIgA; IL-2; IL-6; TNF- α

Shen CL, Chen WH, Zou SX. Anti-infection effect of hydrolysates
from conglycinin on *E.coli* in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi
2005;13(11):1299-1304

摘要

目的: 研究伴大豆球蛋白水解肽对小鼠抗大肠杆菌感染
的作用。

方法: 选用 21 日龄昆明系清洁级雄性小鼠, 随机分为
5 个处理组, 饲喂基础日粮 3 d 后, 将 *E.coli* O₁₃₈ (菌
浓为 2×10^{11} CFU/L) 依次 10 倍稀释, 分别灌喂 5 个处
理组, 每组 0.2 mL/只, 计算灌菌 56 h 后, 其 LD₅₀ 值
为 4.73×10^{10} CFU/L. 分两批选用 21 日龄昆明系清洁级

雄性小鼠,随机分为6个处理组:NOR组(正常对照组)和FEC组(灌菌对照组):基础日粮+生理盐水;HCL-FHC组:基础日粮+盐酸彻底水解伴大豆球蛋白液;Conglycinin组:基础日粮+伴大豆球蛋白;PTC组:基础日粮+伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽;P2-PTC组:基础日粮+水解肽提纯B组分;除NOR组和FEC组外,各处理组灌喂液体总含氮量相等,0.2 mL/只.连续灌喂21 d后,第22 d中午将*E.coli* O₁₃₈ (第1批菌浓为 2×10^9 CFU/L,第2批菌浓为 2×10^{11} CFU/L)分别灌喂FEC至P2-PTC组,0.2 mL/只.观察小鼠发病及死亡情况直至灌菌后48 h,处死各组小鼠,取血、脾脏和整段小肠,用放射免疫分析(RIA)法测定免疫学指标.

结果:小鼠灌喂伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽后,对感染不同剂量*E.coli*,反应不同.伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽能显著提高灌喂 2×10^9 CFU/L *E.coli* O₁₃₈后小鼠脾脏IL-2水平(P2-PTC组 $19.2 \pm 9.6 \mu\text{g/g}$ vs NOR组 $11.5 \pm 4.7 \mu\text{g/g}$, $P < 0.05$; P2-PTC组 $19.2 \pm 9.6 \mu\text{g/g}$ vs FEC组 $9.4 \pm 3.7 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$),能提高肠黏膜sIgA水平;显著降低脾脏IL-6(P2-PTC组 $127.1 \pm 52.8 \text{ ng/g}$ vs NOR组 $276.4 \pm 60.1 \text{ ng/g}$, $P < 0.01$; P2-PTC组 $127.1 \pm 52.8 \text{ ng/g}$ vs FEC组 $224.5 \pm 38.9 \text{ ng/g}$, $P < 0.05$)和TNF- α (PTC组 $9.1 \pm 2.0 \mu\text{g/g}$ vs NOR组 $16.3 \pm 3.9 \mu\text{g/g}$, $P < 0.05$)水平;但对血清IL-2水平无显著性影响;能显著提高灌喂 2×10^{11} CFU/L *E.coli* O₁₃₈后小鼠脾脏IL-6水平(P2-PTC组 $480.5 \pm 184.7 \text{ ng/g}$ vs NOR组 $206.7 \pm 72.3 \text{ ng/g}$, $P < 0.05$),能极显著提高脾脏TNF- α 水平(P2-PTC组 $43.3 \pm 5.8 \mu\text{g/g}$ vs NOR组 $10.5 \pm 4.1 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$; P2-PTC组 $43.3 \pm 5.8 \mu\text{g/g}$ vs FEC组 $19.7 \pm 9.0 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$);降低血清IL-6, TNF- α 水平(P2-PTC组 $2.8 \pm 1.0 \mu\text{g/L}$ vs FEC组 $4.6 \pm 2.0 \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$).

结论:伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽能提高动物机体免疫机能,抵御外源性大肠杆菌的侵袭感染,预防胃肠道疾病的发生.

关键词: 伴大豆球蛋白; 胃蛋白酶; 水解肽; 大肠杆菌 O₁₃₈; sIgA; IL-2; IL-6; TNF- α

沈仓良, 陈伟华, 邹思湘. 伴大豆球蛋白水解肽对小鼠抗大肠杆菌感染的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(11):1299-1304
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1299.asp>

0 引言

大豆贮藏蛋白主要包括大豆球蛋白和伴大豆球蛋白^[1-2].大豆多肽是大豆蛋白质酶解的产物,具有降低胆固醇^[3],降低血压^[4-7],抗氧化^[8],提高免疫力^[9]等多种生理活性作用.本组的工作已经证明伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对人和动物胃肠道优势菌—双歧杆菌具有促生长作用^[10-11].目前有学者报道有的蛋白水解物(如酪蛋白水解物)对有害细菌有明显的抗菌作用^[12].伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽是否也具有抗有害细菌

的作用,目前未见有报道.*E.coli*是一种广泛存在于人和动物胃肠道的病原菌,可引起腹泻^[13]、溃疡性肠炎^[14]、断奶仔猪水肿^[15]等疾病.我们观察灌喂伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽的小鼠在感染*E.coli*后的健康状况,以及对肠道黏膜免疫的影响,和与免疫相关的细胞因子变化情况,旨在探讨伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对小鼠抗*E.coli*感染的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康昆明系清洁级雄性小鼠21日龄,体重10-13 g,购于中国科学院上海斯莱卡实验动物中心.伴大豆球蛋白、伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽、水解肽提纯B组分、盐酸彻底水解伴大豆球蛋白液:均由本组分离纯化制备^[10-11].*E.coli* O₁₃₈由南京农业大学动物医学院预防兽医学系吴耀妹老师馈赠.白介素-2,白介素-6, TNF- α 放射免疫试剂盒购于北京解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所;sIgA放射免疫试剂盒购于中国原子能科学研究所.

1.2 方法 (1)小鼠30只随机分为5组,饲喂基础日粮3 d后,将*E.coli* O₁₃₈ (菌浓为 2×10^{11} CFU/L)依次10倍稀释,分别灌喂5个处理组,每组0.2 mL/只.计算各组小鼠灌菌56 h后LD₅₀值. (2)小鼠67只,随机分为6组,饲喂基础日粮预饲1 wk后进行实验.每天12:00分别灌喂生理盐水(NOR正常对照组、FEC灌菌对照组),盐酸彻底水解伴大豆球蛋白液(HCL-FHC组),伴大豆球蛋白(conglycinin组),伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽(PTC组),水解肽提纯B组分(P2-PTC组)各0.2 mL/只,折合蛋白含量为3 g/L,即各处理组灌喂液体含氮量相等.连续灌喂21 d后,第22 d 12:00将*E.coli* O₁₃₈ (菌浓为 2×10^9 CFU/L)分别灌喂感染FEC至P2-PTC处理组,每组0.2 mL/只.观察小鼠发病及死亡情况,直至灌菌后48 h.处死各组小鼠,取血分离血清,取脾脏,整段小肠(除去内容物)迅速放入液氮中保存,待测.用放射免疫分析(RIA)法测定小肠黏膜sIgA水平,血清IL-2和脾脏IL-2, IL-6, TNF- α 水平. (3)小鼠67只参照(2)的方法分6组灌喂.连续灌喂21 d后,第22 d中午将*E.coli* O₁₃₈ (菌浓为 2×10^{11} CFU/L)分别灌喂感染FEC至P2-PTC处理组,每组0.2 mL/只.观察小鼠发病及死亡情况,直至灌菌后48 h,处死各组小鼠,取血分离血清,取脾脏迅速放入液氮中保存,待测.用放射免疫分析(RIA)法测定血清IL-6, TNF- α 和脾脏IL-6, TNF- α 水平.

统计学处理 数据用SPSS 12.0软件包作t检验,数据以mean \pm SD表示,计量资料采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结果

2.1 24 日龄小鼠灌喂 *E.coli* O₁₃₈ 56 h 后 LD₅₀ 值 根据有关公式^[16]计算 LD₅₀ 值为 4.73×10^{10} CFU/L (表 1). 实验设计 (2) 和 (3) 所用灌菌剂量分别为 0.042 LD₅₀ 和 4.2 LD₅₀. 另外还每隔 6 h 连续观察了 56 h, 观察各组小鼠的发病情况, 发现表现出行动迟缓, 腹泻等亚健康状况的小鼠, 能通过自身的抵抗力逐渐恢复健康, 所以 (2) 和 (3) 所测指标来自各组健康和亚健康小鼠.

表 1 24 日龄小鼠灌喂 *E.coli* O₁₃₈ 56 h 后的死亡率($n=6$)

分组	CFU/L	死亡(%)
1	2×10^{11}	4(66.7)
2	2×10^{10}	2(33.3)
3	2×10^9	1(16.7)
4	2×10^8	0(0.0)
5	2×10^7	0(0.0)

2.2 伴大豆球蛋白水解肽对小鼠灌喂 *E.coli* O₁₃₈ 48 h 后健康状况的影响 灌喂 *E.coli* O₁₃₈ 48 h 后, PTC 组和 P2-PTC 组健康小鼠的数量明显多于其余 3 个处理组. 小鼠灌喂感染 2×10^9 CFU/L *E.coli* O₁₃₈ 48 h 后的健康率 PTC 和 P2-PTC 组分别比 FEC 组提高了 133.2% 和 200%; 灌喂 2×10^{11} CFU/L *E.coli* O₁₃₈ 48 h 后的健康率 PTC 和 P2-PTC 组分别比 FEC 组提高了 201.2% 和 301.2% (表 2).

2.3 伴大豆球蛋白水解肽对小鼠血清和脾脏 IL-2, 肠黏膜 sIgA 水平的影响 小鼠灌喂 2×10^9 CFU/L *E.coli* O₁₃₈ 血清 IL-2 水平 PTC 组和 P2-PTC 组与 NOR 组和 FEC 组相比差异不显著. 脾脏 IL-2 水平 PTC 组比 NOR 和 FEC

组分别升高了 17.6, 43.8%, 但统计分析差异不显著; P2-PTC 组比 NOR 和 FEC 组分别升高了 66.4% ($P<0.05$), 103.5% ($P<0.01$). 肠黏膜 sIgA PTC 组比 NOR 和 FEC 组分别升高了 4.4%, 21.4%, P2-PTC 组比 NOR 组降低了 3.2%, 比 FEC 组升高了 12.5%, 统计分析差异都不显著. 实验结果表明: 灌喂伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽, 能显著提高感染 2×10^9 CFU/L *E.coli* O₁₃₈ 后小鼠脾脏 IL-2 水平, 能提高肠黏膜 sIgA 水平; 但对血清 IL-2 水平无显著性影响 (表 3).

2.4 伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对小鼠血清和脾脏 IL-6, TNF- α 水平的影响 小鼠灌喂 2×10^9 CFU/L *E.coli* O₁₃₈ 脾脏 IL-6 水平, PTC 组比 NOR 和 FEC 组分别降低了 31.3%, 15.4%, 统计分析差异不显著; P2-PTC 组比 NOR 和 FEC 组分别降低了 54.0% ($P<0.01$), 43.4% ($P<0.05$). 脾脏 TNF- α 水平 PTC 组比 NOR 和 FEC 组分别降低了 43.9% ($P<0.05$), 9.9% 差异不显著; P2-PTC 组比 NOR 组降低了 6.8%, 比 FEC 组升高了 49.6%, 差异都不显著. 实验结果表明: 灌喂伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽, 能显著降低感染 2×10^9 CFU/L *E.coli* O₁₃₈ 后小鼠脾脏中 IL-6 和 TNF- α 水平 (表 3).

小鼠灌喂 2×10^{11} CFU/L *E.coli* O₁₃₈ 血清 IL-6 水平 PTC 组比 NOR 和 FEC 组分别升高了 23.2% 和 39.6%, 但差异不显著; P2-PTC 组比 NOR 和 FEC 组分别降低了 20.7% 和 10.0%, 但差异不显著. 血清 TNF- α 水平 PTC 组比 NOR 组降低了 34.0% 差异不显著, 比 FEC 组降低了 50.9% ($P<0.05$); P2-PTC 组比 NOR 组降低了 18.2% 差异不显著, 比 FEC 组降低了 39.1% ($P<0.05$). 脾脏 IL-6 水平 PTC 组比 NOR 和 FEC 组分别升高了 122.6%

表 2 伴大豆球蛋白水解肽对小鼠灌喂 *E.coli* O₁₃₈ 48 h 后健康状况的影响

<i>E.coli</i> O ₁₃₈	分组	<i>n</i>	健康	发病(<i>n</i>)		死亡(<i>n</i>)
			<i>n</i> (%)	亚健康	濒死	
2×10^9 CFU/L	NOR	7	7(100)	0	0	0
	FEC	12	3(25)	3	4	2
	HCL-FHC	12	4(33.3)	2	3	3
	Conglycinin	12	4(33.3)	3	4	1
	PTC	12	7(58.3)	3	2	0
	P2-PTC	12	9(75)	1	2	0
2×10^{11} CFU/L	NOR	7	7(100)	0	0	0
	FEC	12	2(16.6)	3	4	3
	HCL-FHC	12	3(25)	3	4	2
	Conglycinin	12	3(25)	4	3	2
	PTC	12	6(50)	3	3	0
	P2-PTC	12	8(66.6)	2	2	0

健康: 灌菌后的小鼠正常摄食, 饮水, 并有正常的跳跃, 爬笼行为. 亚健康: 灌菌后的小鼠行动迟缓, 伴有腹泻或剖解时发现肠黏膜糜烂. 濒死: 灌菌后的小鼠被毛极度粗乱, 原地呆立不动或缩成一团, 不食, 剖解时血液极度黏稠.

表3 伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对小鼠血清IL-2, 脾脏IL-2, IL-6, TNF- α , 肠道黏膜分泌sIgA的影响

分组	<i>n</i>	血清IL-2(μ g/L)	脾IL-2(μ g/g)	sIgA(ng/g)	脾IL-6(ng/g)	脾TNF- α (μ g/g)
NOR	7	6.0 \pm 0.9	11.5 \pm 4.7	483.0 \pm 46.7	276.4 \pm 60.1	16.3 \pm 3.9
FEC	6	6.1 \pm 0.9	9.4 \pm 3.7	415.5 \pm 64.9	224.5 \pm 38.9	10.1 \pm 2.6
HCL-FHC	6	5.5 \pm 0.5	5.3 \pm 1.6	353.3 \pm 59.8 ^b	124.8 \pm 37.7 ^{bc}	5.4 \pm 1.7 ^a
Conglycinin	7	5.0 \pm 0.5 ^a	13.1 \pm 3.0	418.5 \pm 47.0	176.8 \pm 56.2 ^a	15.5 \pm 3.9
PTC	10	5.4 \pm 0.3	13.6 \pm 4.2	504.5 \pm 81.0	189.9 \pm 83.0	9.1 \pm 2.0 ^a
P2-PTC	10	5.4 \pm 0.4	19.2 \pm 9.6 ^{ad}	467.3 \pm 68.0	127.1 \pm 52.8 ^{bc}	15.2 \pm 8.4

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs NOR; ^c P <0.05, ^d P <0.01 vs FEC.

(P <0.05), 25.6% 差异不显著;P2-PTC 组比 NOR 组升高了 132.5% (P <0.05), 比 FEC 组升高了 31.1%, 但差异不显著. 脾脏 TNF- α 水平 PTC 组比 NOR 和 FEC 组分别升高了 300.5% (P <0.01), 113.3% (P <0.01); P2-PTC 组比 NOR 和 FEC 组分别升高了 317.8% (P <0.01), 120.4% (P <0.01). 实验结果表明:灌喂伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽,能显著提高感染 2×10^{11} CFU/L *E. coli* O₁₃₈ 后小鼠脾脏 IL-6 水平,能极显著提高脾脏 TNF- α 水平;降低血清 IL-6, TNF- α 水平(表 4).

3 讨论

我们应用胃蛋白酶模拟体内环境,制备伴大豆球蛋白水解肽,研究其对小鼠抗 *E. coli* 感染的作用.在前后两批小鼠灌喂 *E. coli* 后每隔 6 h 的连续观察中发现:灌喂水解肽的小鼠都没有出现死亡情况,并且在摄食、精神状态、活动等方面优于其他各组小鼠.而灌喂生理盐水、HCL-FHC、Conglycinin 的各组小鼠都出现了死亡情况,另有一些处于濒死状态,并且大多数被毛粗乱、精神沉郁,同时伴有腹泻,肠黏膜糜烂等现象发生.结果提示:伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽能维持感染一定剂量 *E. coli* 后小鼠的健康,抵御外源性 *E. coli* 的感染.表明伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽能促进人和动物胃肠道的益生菌—双歧杆菌的生长^[10-11].有文献报道^[17] 双歧杆菌可降低肠腔 pH 值和氧化还原电势,并通过与其他细菌竞争有限的特殊营养

物直接抑制有害细菌的生长.灌喂该水解肽 21 d 的小鼠,大多数在感染 *E. coli* 48 h 后依然保持健康,很可能与此种水解肽促进了肠内双歧杆菌的生长,改变了肠道微环境,促进肠蠕动,从而使外源性的 *E. coli* 难与肠黏膜表面接触有关^[18].

IL-2 是由 133 个氨基酸组成的糖蛋白^[19],主要由活化的 T 细胞产生,在机体的免疫系统中发挥重要作用^[20],具有广泛的生物活性.有关研究发现^[21],IL-2 在激活机体的免疫功能和维持体内平衡中具有重要意义.本实验中 PTC 组和 P2-PTC 组的小鼠在感染 *E. coli* 后,血清 IL-2 水平与 NOR 组差异不显著,比 FEC 组有所下降,提示 IL-2 可能参与维持机体内环境的稳定.有文献报道^[21] 血清中高浓度的 IL-2 水平往往伴随着自身免疫系统疾病如硬皮病和风湿性关节炎的发生,而血清中低水平的 IL-2 与人类免疫缺陷疾病(HIV)密切相关.该实验结果表明伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽能将灌喂 *E. coli* 后小鼠血清 IL-2 保持在正常水平,从而维持机体内环境的稳定.脾脏是动物体内最大的免疫器官,本实验观察到伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽能显著提高脾脏 IL-2 水平.这在一定程度上提示这种肽参与了机体免疫机能上调.有研究表明^[21],一些药物增强剂通过增强 TCR(T 细胞表面受体)传递信号来显著提高组织中的 IL-2 水平.伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽是否也具有相同作用机制,还有待进一步论证.

表4 伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对小鼠血清和脾脏IL-6, TNF- α 的影响

分组	<i>n</i>	血清IL-6(ng/L)	脾IL-6(ng/g)	血清TNF- α (μ g/L)	脾TNF- α (μ g/g)
NOR	7	248.6 \pm 82.6	206.7 \pm 72.3	3.4 \pm 0.6	10.5 \pm 4.1
FEC	5	218.9 \pm 83.4	366.4 \pm 100.4	4.6 \pm 2.0	19.7 \pm 9.0
HCL-FHC	6	324.4 \pm 99.6 ^a	299.1 \pm 100.7	3.6 \pm 1.7	15.6 \pm 3.7
Conglycinin	7	318.1 \pm 105.1	356.6 \pm 126.4	2.8 \pm 1.0 ^c	26.5 \pm 10.0 ^d
PTC	9	305.5 \pm 75.5	460.1 \pm 292.4 ^a	2.3 \pm 1.0 ^c	41.9 \pm 8.3 ^{bd}
P2-PTC	10	197.0 \pm 69.6	480.5 \pm 184.7 ^a	2.8 \pm 1.0 ^c	43.3 \pm 5.8 ^{bd}

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs NOR; ^c P <0.05, ^d P <0.01 vs FEC.

分泌型 IgA (secretory immunoglobulin A, sIgA) 是胃肠道和黏膜表面主要免疫球蛋白, 对消化道黏膜防御起着重要作用, 是防御病菌在肠道黏膜黏附和定植的第一道防线^[22]. sIgA 的分泌与位于肠黏膜上皮细胞中 J 链和 SC 片段形成的 IgA-J 链-分泌片复合体有关. 该复合体经胞吞作用进入肠上皮细胞内, 以小泡形式向细胞游离面转运, 从游离面释放入肠腔^[23]. 有关研究表明, 侵袭性 *E. coli* 是慢性腹泻的主要致病菌, 其作用机制可能为细菌黏附于肠细胞表面, 破坏了肠道屏障^[24]. 我们发现, FEC 组和 HCL-FHC 组的肠黏膜 sIgA 水平下降, 很可能是 *E. coli* 侵入胃肠道后黏附于肠黏膜上皮, 破坏了 IgA-J 链-分泌片复合体. 而 PTC 组肠黏膜 sIgA 水平略有升高 (差异不显著), 提示可能是伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽抑制 *E. coli* 生长, 保护肠黏膜上的 IgA-J 链-分泌片复合体, 使肠黏膜 sIgA 的分泌处于正常水平.

IL-6 主要由单核巨噬细胞产生, 有广泛的促炎作用, 如促进 B 细胞活化、增生并最终分化为浆细胞, 增加免疫球蛋白合成; 并能促进 T 细胞增生, 刺激毒性 T 细胞反应^[14]. TNF- α 是一种具有广谱生理和病理效应的细胞因子, 主要由单核和巨噬细胞分泌, 在一些消化道疾病如炎症性肠病的发生中起着重要的作用^[25]. 有研究表明^[26-27], *E. coli* 侵入大鼠体内后, 其细胞壁外膜中的脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 通过与 CD14 等受体结合后, 激活相应的信号传导通路^[23], 诱导血清中的 IL-6 和 TNF- α 水平升高, 参与机体的炎症反应. 本实验结果中 HCL-FHC 组 IL-6 和 FEC 组 TNF- α 水平都较 NOR 组升高, 证实了这种说法. 而 P2-PTC 组小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平比 FEC 和 HCL-FHC 组降低, 再次提示可能是伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽通过抑制 *E. coli* 生长减少了 LPS 的产生, 从而降低了血清 IL-6 和 TNF- α 水平. 有文献指出^[14], 在一些消化道疾病如溃疡性结肠炎时体内 IL-6 水平明显升高并可与 TNF- α 相互作用介导炎症反应, 同时 TNF- α 还可诱导肠上皮细胞凋亡和细胞间紧密连接蛋白装配功能改变, 导致肠上皮通透性增加^[25]. 本实验中还发现, 伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽能显著降低灌喂 2×10^9 CFU/L *E. coli* O₁₃₈ 后小鼠脾脏中 IL-6 和 TNF- α 水平; 但却能提高灌喂 2×10^{11} CFU/L *E. coli* O₁₃₈ 后小鼠脾脏 IL-6 和 TNF- α 水平. 表明当动物机体受到较低浓度病原菌刺激时, 这种水解肽可降低机体促炎因子的水平, 减少胃肠道炎症的发生, 保护机体健康; 而当动物机体受到较高浓度病原菌刺激时, 这种水解肽可以诱导机体产生细胞因子参与炎症反应, 有利于机体的抗感染防御作用^[28], 抵御 2×10^{11} CFU/L *E. coli* O₁₃₈ 的侵袭.

E. coli 是一种引起人和动物胃肠道疾病的病原菌, 同时还可导致体内腐败物质、致癌物和毒素的增加, 促使机体各器官功能的退化^[29]. 最新研究还发现大肠杆菌与糖尿病有关^[29], 并且还是是一些发展中国家初生婴儿高死亡率的重要原因^[30]. 伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽通过促进体内益生菌的生长, 提高机体的免疫功能, 抑制病原性 *E. coli* 的生长, 帮助机体抵御外源性 *E. coli* 的感染. 这对于预防和辅助治疗由于 *E. coli* 引起的各种疾病具有重要意义, 其不易产生抗药性的独特优势吸引人们开发利用.

致谢: 对左伟勇博士的支持和帮助表示感谢.

4 参考文献

- 1 许月, 朱长甫, 石连旋, 盛艳敏, 苗以农. 大豆种子贮藏蛋白的研究概况. 大豆科学 1998;17:262-267
- 2 Maruyama N, Fukuda T, Saka S, Inui N, Kotoh J, Miyagawa M, Hayashi M, Sawada M, Moriyama T, Utsumi S. Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins. *Phytochemistry* 2003;64:701-708
- 3 Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G, Yamamoto K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. *J Nutr* 1999;129:1725-1730
- 4 吴建平, 丁霄霖. 大豆降压肽的研制(II)--酶 E 作用条件的优化. 中国油脂 1998;23:6-8
- 5 Yang HY, Yang SC, Chen JR, Tzeng YH, Han BC. Soybean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* 2004;92:507-512
- 6 Shin ZI, Yu R, Park SA, Chung DK, Ahn CW, Nam HS, Kim KS, Lee HJ. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *J Agr Food Chem* 2001;49:3004-3009
- 7 Wu JP, Ding XL. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy bean on spontaneously hypertensive rats. *J Agr Food Chem* 2001;49:501-506
- 8 Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. *J Agr Food Chem* 1995;43:574-578
- 9 Yamauchi F, Suetsuna K. Immunological effects of dietary peptide derived from soybean protein. *J Nutr Biochem* 1993;4:450-457
- 10 Zuo WY, Chen WH, Zou SX. Separation of growth-stimulating peptides for *Bifidobacterium* from soybean conglycinin. *World J Gastroenterol* 2005(In Press)
- 11 左伟勇, 陈伟华, 邹思湘. 伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对双歧杆菌增殖的影响. 食品与发酵工业 2004;30:10-13
- 12 Malkoski M, Dashper SG, O'Brien-Simpson NM, Talbo GH, Macris M, Cross KJ, Reynolds EC. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2309-2315
- 13 郭红, 邹全明, 赵晓晏, 吴超. 幽门螺杆菌 HspA 与大肠杆菌 LTB 基因融合及表达. 世界华人消化杂志 2003;11:1475-1479
- 14 周婷, 林平, 潘慧, 梅林. 溃疡性结肠炎发病机制及其研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1782-1786
- 15 Frydendahl K, Jensen TK, Andersen JS, Fredholm M, Evans G. Association between the porcine *Escherichia coli* F18 receptor genotype and phenotype and susceptibility to colonization and postweaning diarrhoea caused by *E. coli* O138:F18. *Vet Microbiol* 2003;93:39-51
- 16 沈建忠. 动物毒理学. 第 1 版. 北京: 中国农业出版社, 2002:92-93
- 17 王伟岸, 胡品津. 益生菌和肠易激综合征. 世界华人消化杂志

- 2004;12:172-176
- 18 Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Roeland I, Cherbut C, Klaenhammer TR. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2003;12:105-118
- 19 You TG, Wang HS, Yang JH, Qian QJ, Fan RF, Wu MC. Transfection of IL-2 and/or IL-12 genes into spleen in treatment of rat liver cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:2190-2194
- 20 Kaiser P, Rothwell L, Avery S, Balu S. Evolution of the interleukins. *Dev Comp Immunol* 2004;28:375-394
- 21 Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 2004;28:109-123
- 22 武金宝, 王继德, 张亚历. 肠黏膜屏障研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:619-623
- 23 van Egmond M, Damen CA, van Spriel AB, Vidarsson G, van Garderen E, van de Winkel JG. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 2001;22:205-211
- 24 智发朝. 我国小肠疾病的研究现状. 世界华人消化杂志 2003;11:499-501
- 25 宋红丽, 吕颢, 马力, 李颖, 刘沛. TNF- α 影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004;12:1303-1306
- 26 Shaked G, Czeiger D, Dukhno O, Levy I, Artru AA, Shapira Y, Douvdevani A. Ketamine improves survival and suppresses IL-6 and TNF α production in a model of Gram-negative bacterial sepsis in rats. *Resuscitation* 2004;62:237-242
- 27 Nicaise P, Gleizes A, Forestier F, Sander C, Quero AM, Labarre C. The influence of *E. coli* implantation in axenic mice on cytokine production by peritoneal and bone marrow-derived macrophages. *Cytokine* 1995;7:713-719
- 28 许夕海, 施光峰. 感染性休克中脂多糖的信号传导机制研究进展. 中国抗感染化疗杂志 2003;3:47-50
- 29 孙艳, 刘波, 赵静玫, 王海岩, 徐和利, 李雪妮. 大连地区糖尿病患者与健康成年人肠内菌群的比较. 世界华人消化杂志 2003;11:863-865
- 30 Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:83-98

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

旅美华人科学家揭示细胞膜伸展突起机制

本刊讯 细胞膜的突起伸展是如何调控的?与疾病发生发展关系如何?旅美华人科学家陈贤明完成的一项研究揭示了其中的奥秘,该研究为感染性疾病及肿瘤的临床治疗提供了新的思路.这一成果发表在 2005-04-25 在线出版的《美国科学院院刊》上,审稿人认为,该研究具有很广泛的影响.

细胞膜伸展突起与细胞正常运动、肿瘤细胞的浸润转移、免疫细胞对异物的吞噬等紧密相关,但细胞调控细胞膜伸展突起的分子机理目前还不清楚,以往的研究也多局限于细胞结构蛋白重组对细胞膜突起的调控方面.

陈贤明研究员是山西医科大学客座教授,曾在山西医科大学从事肝病机制等的研究工作.由陈贤明领衔的研究小组,在以研究消化性疾病见长的美国梅奥医学中心消化病基础研究所,利用体外胆管上皮细胞感染模型,探讨了隐孢子虫的子孢子进入宿主细胞膜内的过程,发现隐孢子虫的子孢子在侵入宿主细胞膜内时,诱发大量宿主细胞膜载体及水通道聚集,导致细胞膜的膜局部快速水内流,从而促使局部细胞膜伸展突起,首次证实了局部水内流在细胞膜伸展突起中所具有的重要作用.该研究得到了美国国立卫生研究院(NIH)的资助.

在谈到该项研究的意义时,项目负责人、原美国胃肠病学会主席、梅奥消化病基础研究所所长 Nicholas F. LaRusso 教授说:“该研究具有广泛的基础研究与临床应用意义,它从一个全新的角度揭示了细胞膜伸展突起调控的分子机理,为微生物感染或肿瘤细胞的浸润转移等疾病的防治提供了新的途径.”

在抗微生物感染方面, Nicholas F. LaRusso 指出:尽管现在所取得的研究成果仅仅只是一个开端,但由于隐孢子虫感染是一种全球性常见病,尤其是对免疫缺陷患者(如艾滋病)和新生婴儿的危害性更大,而目前临床上还没有有效的治疗药物.因此这项研究提示人们,抑制宿主细胞膜突起的形成,可阻断隐孢子虫的子孢子进入宿主细胞,从而阻断其感染途径;同样原理亦可能适用于其它依赖宿主细胞膜感染的病原微生物感染所致疾病的防治.

Nicholas F. LaRusso 说,更为重要的是该研究将有望为人类肿瘤治疗提供一个新的方向.肿瘤细胞的浸润和转移是当前国际医学界研究的热点之一,而肿瘤细胞的浸润转移与肿瘤细胞膜的伸展突起相关,现在已经有不少研究发现,许多肿瘤细胞表达的水通道分子是增强的,因此进一步探讨水通道相关的细胞膜突起在肿瘤细胞浸润转移中的作用,将具有十分重要的临床意义.(2005-05-01 张海宁)