

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

彭汶铎¹ 陈启亮² 赵金华³

(1. 中山大学药学院,广东 广州 510275;2. 汕尾市金海宝有限公司,广东 汕尾 516600;3. 海王药业有限公司,广东 深圳 518054)

摘要:为有效利用鲍鱼资源,研究了鲍鱼酶解提取物(Enzymolytic extracts of abalone, EEA)的营养成分及对免疫功能的影响。EEA 游离氨基酸总量为 8.53 g/L,第一限制氨基酸为 Leu,其氨基酸价为 81,牛磺酸含量为 7.80 g/L,磷脂总量为 153 mg/L,富含维生素和 Se、Zn 等矿物质。EEA 可依剂量改善氢化可的松型免疫低下小鼠的体重、胸腺和脾重,增加肝脏 DNA 和 RNA 含量以及外周血 T 细胞比例,提高胸腺和脾脏淋巴细胞增殖能力。EEA 对胸腺的作用大于脾脏。结果表明,EEA 含有丰富的营养成分,对免疫低下有明显的改善作用,对细胞免疫的作用大于体液免疫,其机制可能是促进免疫细胞 DNA 的合成。

关键词:鲍鱼;组织提取物;营养;免疫抑制

Nutrients of enzymolytic extract of abalone and immunomodulating effect on immunosuppressed mice

PENG Wen-duo, CHEN Qi-liang, ZHAO Jin-hua

(School of Drug Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangdong Guangzhou 510275, China)

Abstract: This study was intended to investigate the nutrients in the enzymolytic extract of abalone (EEA) and their effect on immune function. It was determined that the EEA contained free amino acids 8.53 g/L (first limiting amino acid leucine, amino acid score 81), taurine 7.80 g/L, phosphate 153 mg/L, and was rich in vitamins and mineral elements such as Se, Zn. In mice with hydrocortisone-induced immunosuppression, EEA improved the weight of body, thymus, and spleen, increased liver DNA and RNA and peripheral blood T

准入门槛;指导酱油生产企业应用和建立 HACCP 体系,走规范化的可持续健康发展的道路,为人民群众提供卫生、安全的调味食品。

参考文献

- [1] 卫祥云,白燕. 中国酱油产业发展状况[J]. 卫生研究, 2003,32(增刊):6-7.
- [2] 内贸局、卫生部、国家技术监督局,等.《关于加强调味品生产销售管理的通知》(内贸局联发消费字〔2000〕第17号)[Z].
- [3] CAC. Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) System and Guidelines for its Application[Z]. Annex to CAC/PCR 1-1969 Rev3,1997,60-62.
- [4] 张永慧,陈卫东,黄伟雄,等. 广东省酱油生产企业现

状及监管对策研究[J]. 中国食品卫生杂志,2006,18(1):待发表.

- [5] 卫生部.《消毒技术规范》(第一分册 实验技术规范)[Z].
- [6] 曾庆孝,许喜林. 食品生产的危害分析与关键控制点(HACCP)原理与应用[M]. 广州:华南理工大学出版社,2000.11.
- [7] 赵同刚,徐科,主编. 食品企业危害分析关键控制点(HACCP)质量控制体系[M]. 北京:经济管理出版社,2003.95.
- [8] 中国轻工业联合会. 广东省食品饮料工业产业竞争力研究报告[Z]. 2003.

[收稿日期:2005-05-10]

中图分类号:R15;TS264.21 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)06-0487-08

基金项目:广东省自然科学基金(940631)
作者简介:彭汶铎 男 副教授

This work was supported by the Science and Technology Plan of the Guangdong Province, China. (940631)

lymphocyte, and enhanced lymphocyte proliferations of thymus and spleen, in a dose-dependent manner. EEA's actions on thymus were more effective than those on spleen. The results indicated that EEA was rich in nutrients and possessed significant immunomodulatory effects, especially on cellular immunity, which was probably related to its promoting activity on DNA synthesis of immunocytes.

Key word: Abalone; Tissue Extract; Nutrition; Immunosuppression

鲍鱼为传统高档滋补食品,早在《名医别录》里已有记载。随着鲍鱼人工养殖技术的应用,广东省汕尾市形成了全国最大的鲍鱼养殖基地,年产鲍鱼 900 t(占全国同期产量的 40%以上),并呈持续上升趋势,但有关鲍鱼的加工、营养成分和生理活性的研究甚少报道,有文献指出,鲍鱼水溶性多糖能明显抑制裸鼠移植人鼻咽癌的生长、诱导肿瘤细胞凋亡和坏死^[1],对艾氏腹水型小鼠和肝癌腹水型小鼠有延长寿命的作用、对 S180 实体瘤小鼠有明显的抑瘤作用^[2]。肿瘤细胞的生长、死亡与机体免疫功能有直接的关系。本实验研究鲍鱼酶法提取物的营养组成以及对免疫功能的影响,为鲍鱼的深加工与综合利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 鲜活鲍鱼(杂色鲍, *Haliotis diversicolor* Reeve)广东省汕尾市双湖鲍鱼养殖工业基地提供;木瓜蛋白酶活力 600 000 ~ 700 000 U/g,广州农业科技研究所酶制剂厂;氢化可的松(Hydrocortisone, Hy)批号 981013,上海信谊药厂;RPMI 1640 培养基美国 Gbco 公司;新生小牛血清,中国科学院血液研究所。

ESI 60-4 电子分析天平,沈阳龙腾电子有限公司;DG 3022A 酶联免疫检测仪,华东电子管厂;751 紫外分光光度计,成都医用仪器厂;LDZ-52 离心机,北京医用离心机厂。

雄性 NIH 纯系成年小白鼠,体重(22.6 ± 1.2)g,购自广东省医用动物中心。

1.2 EEA 的制备 取鲍鱼肉质部分洗净,胶体磨浆机制浆,木瓜蛋白酶水解 2 h,煮沸灭酶,冷却,过滤制备澄清透明的酶解提取物(Enzymatic extracts of abalone, EEA),每克鲍鱼肉制成 EEA 2.5 ml。

为检验本提取方法的稳定性和重复性,先后制备了 10 批 EEA,结果氨基氮(甲醛滴定法)和总磷脂的含量分别为 4.58 ± 0.21 (4.27 ~ 4.84) mg/ml 和 151 ± 13 (139 ~ 168) μg/ml,最高与最低含量相差不超过 21%,这在生物反应中属于正常,说明本提取具有较好的重复性和稳定性。

1.3 EEA 成分测定 常规方法测定 EEA 主要成分,并折算为在鲍鱼肉质部分中的含量。总磷脂:钼

蓝比色法;氨基酸:用日立 835-50 高速氨基酸自动分析仪直接测定游离氨基酸;矿物质:等离子体发射光谱法;维生素:高效液相色谱法。

1.4 免疫低下模型小鼠的制备与实验分组 小鼠 80 只,按体重分为正常组(16 只)和免疫低下模型组(64 只),正常组腹腔注射生理盐水,免疫低下模型组腹腔注射 Hy (20 mg/kg BW),隔天 1 次,共 5 次。在注射 Hy 期间,动物逐渐出现体重减轻、活动减少、反应迟钝、蜷缩弓背、毛松等免疫低下的体征^[3],正常组小鼠无明显变化。末次注射后记录小鼠体重,将免疫低下鼠按体重均分 4 组(每组 16 只),分别为 EEA 0、4、8 和 16 ml/kg BW 组。各组小鼠每天定时灌胃 1 次给予 EEA(其中正常组和 EEA 0 ml/kg BW 组小鼠给予等容量水),连续 14 d,第 15 天测定有关指标。

1.5 免疫功能指标的测定 测定指标包括:(1)小鼠体重,计算给予 EEA 14 d 后的体重变化;(2)胸腺和脾脏重量;(3)外周血淋巴细胞中 T 淋巴细胞的比例^[4];(4)紫外吸收法^[5]测定肝脏 DNA 和 RNA 含量;(5)比色法^[6]测定胸腺和脾脏淋巴细胞增殖能力,结果以吸光度(A)表示。

1.6 统计 实验数据经 *t* 检验。

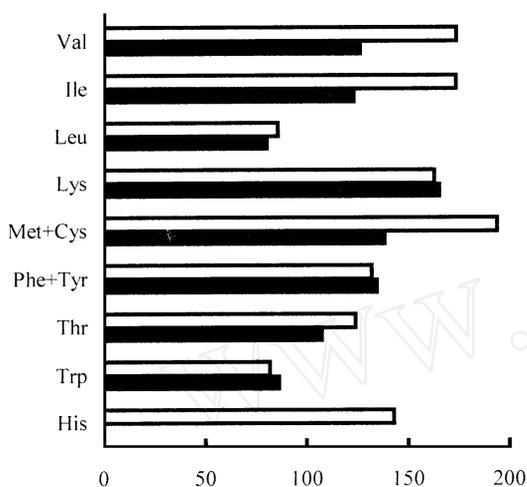
2 结果

2.1 EEA 的游离氨基酸组成 EEA 游离氨基酸总量为 8.53 g/L,其中 Ala、Asp、Glu、Gly、Pro、Ser 等 6 种呈味氨基酸占 44.8%(表 1)。从营养价值来看,以 1973 年 FAO/WHO 推荐的氨基酸模式(常规水平)为基准,计算 EEA 的氨基酸价(图 1),第一限制氨基酸为 Leu,其氨基酸价为 81,第二限制氨基酸为 Trp(氨基酸价为 87)。与几种海洋贝类比较,EEA 氨基酸价高于扇贝(氨基酸价为 71,第一限制氨基酸为 Val)和牡蛎(氨基酸价为 77,第一限制氨基酸为 Val),与文蛤(氨基酸价为 81,第一限制氨基酸为 Val)、赤贝(氨基酸价为 81,第一限制氨基酸为 Val)和马氏珍珠贝(氨基酸价为 82,第一限制氨基酸为含硫氨基酸)^[7]持平,低于翡翠贻贝(氨基酸价为 93,第一限制氨基酸为含硫氨基酸)^[8]。再以 1985 年 FAO/WHO/UNU 推荐的氨基酸模式(学龄前水平)为基准计算 EEA 的氨基酸价(图 1),第一限制氨基

酸为色氨酸,氨基酸价为82。此外 EEA 的牛磺酸含量高达 7.80 g/L,几乎与游离氨基酸总量持平。

表1 EEA 和鲍鱼中游离氨基酸组成

氨基酸	EEA (g/L)	鲍鱼 (g/kg)	氨基酸	EEA (g/L)	鲍鱼 (g/kg)
Ala	0.70	1.8	Met	0.18	0.4
Arg	2.40	6.0	Phe	0.19	0.5
Asp	0.31	0.8	Pro	0.54	1.3
Cys	0.06	0.2	Ser	0.42	1.0
Glu	0.93	2.3	Tau	7.80	19.5
Gly	0.89	2.2	Thr	0.22	0.5
His	0.11	0.3	Tip	0.04	0.1
Ile	0.25	0.6	Tyr	0.22	0.6
Leu	0.28	0.7	Val	0.32	0.8
Lys	0.47	1.2			



: 按 1973 年 FAO/WHO 推荐的氨基酸模式计算
: 按 1985 年 FAO/WHO/UNU 推荐的氨基酸模式 (学龄前水平) 计算

图1 EEA 的氨基酸价

2.2 EEA 的磷脂含量 EEA 的磷脂含量为 153 mg/L,折算为鲍鱼肉质部分的内容量为 382 mg/kg。

2.3 EEA 的维生素和矿物质含量 EEA 的维生素和矿物质含量见表 2。矿物质中最引人注目的是 Se 的含量高达 1.52 mg/L,折算为鲍鱼肉质部分的内容量为 3.8 mg/kg,大大高于贻贝、牡蛎、文蛤和马氏珍珠贝^[7]。

表2 EEA 的维生素和矿物质含量 mg/L

维生素	含量	矿物质	含量
A	19.50	Zn	52.80
B1	0.75	Fe	122.00
B2	9.12	Cu	2.18
B6	18.30	Mg	1464.00
B12	0.18	Ca	290.00
C	144.00	Ni	0.46
D	0.20	I	6.77
E	10.20	F	3.84
Vpp	1470.00	Se	1.52

2.4 增加免疫抑制小鼠的体重以及胸腺和脾重 Hy 使小鼠的胸腺和脾脏显著萎缩(其重量分别为正

常鼠的 54.0%和 74.0%),EEA 可改善此现象并呈明显的剂量效应关系(表 3),4、8、16 ml/kg BW 分别使胸腺重量增加 23.9%、35.6%和 55.0%,分别达到正常的 66.8%、73.2%和 83.6%,但未能完全恢复正常。EEA 对脾脏重量的影响,仅在 16 ml/kg BW 有明显作用,使脾重达至正常鼠的 89.5%。EEA 还能对抗 Hy 引起的小鼠体重减轻。

表3 EEA 对免疫低下小鼠体重、胸腺和脾脏重量的影响 (n = 16, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mL/kg BW d)	胸腺重 (mg)	脾重 (mg)	体重变化 (g)
正常		69.1 ±10.3	122.5 ±19.7	3.8 ±0.5
EEA	0	37.3 ±6.5 ^c	90.7 ±16.4 ^c	0.2 ±0.1 ^c
	4	46.2 ±8.0 ^{c,f}	94.9 ±20.2 ^{c,d}	1.4 ±0.5 ^{c,f}
	8	50.6 ±11.4 ^{c,f}	98.2 ±17.0 ^{b,d}	1.9 ±0.6 ^{c,f}
	16	57.8 ±9.2 ^{b,f}	109.6 ±16.1 ^{a,e}	3.0 ±1.0 ^{b,f}

注:与正常组比较,(a) $P > 0.05$, (b) $P < 0.05$, (c) $P < 0.01$; 与 EEA 0 ml/kg BW 组比较,(d) $P > 0.05$, (e) $P < 0.05$, (f) $P < 0.01$ 。

2.5 增加免疫抑制小鼠肝脏 DNA 和 RNA 含量以及外周血 T 细胞数 小鼠注射 Hy 后,肝脏 DNA 和 RNA 含量均明显减少,外周血 T 淋巴细胞比例降低。再给予 EEA 后,各项指标随 EEA 剂量的增加而逐渐恢复正常,EEA 8 和 16 ml/kg BW 组小鼠肝脏 DNA 含量分别上升至正常的 83.8%和 91.4%,肝脏 RNA 含量分别上升至正常的 92.6%和 95.1%,外周血 T 淋巴细胞比例分别提高 13.9%和 18.4%(表 4)。EEA 的 3 个剂量均能使外周血 T 淋巴细胞比例明显升高。

表4 EEA 对免疫低下小鼠外周血 T 细胞、肝脏 DNA 和 RNA 含量的影响 (n = 16, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (ml/kg BW d)	DNA (mg/g)	RNA (mg/g)	T 细胞 (%)
正常		1.85 ±0.27	5.13 ±0.96	54.2 ±3.1
EEA	0	1.23 ±0.18 ^c	3.92 ±0.80 ^c	30.4 ±2.0 ^c
	4	1.41 ±0.27 ^{c,d}	4.06 ±0.91 ^{c,d}	38.7 ±2.2 ^{c,f}
	8	1.55 ±0.26 ^{c,f}	4.75 ±1.02 ^{a,f}	44.3 ±2.6 ^{c,f}
	16	1.69 ±0.30 ^{a,f}	4.88 ±0.98 ^{a,e}	48.8 ±2.6 ^{b,f}

注:与正常组比较,(a) $P > 0.05$, (b) $P < 0.05$, (c) $P < 0.01$; 与 EEA 0 ml/kg BW 组比较,(d) $P > 0.05$, (e) $P < 0.05$, (f) $P < 0.01$ 。

2.6 提高淋巴细胞增殖能力 Hy 明显抑制小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞增殖,抑制率分别为 56.0%和 43.2%(均 $P < 0.01$)。EEA 具有依剂量地拮抗 Hy 的作用,4、8、16 ml/kg BW 分别使胸腺淋巴细胞增殖能力达到正常的 59.7% ($P < 0.01$)、74.2% ($P < 0.01$)和 85.9% ($P < 0.05$),8 和 16 ml/kg BW 分别使脾脏淋巴细胞增殖能力达到正常的 68.3%和

80.6% (均 $P < 0.01$)。相比之下,EEA 对胸腺淋巴细胞增殖能力的作用大于对脾脏淋巴细胞的作用。

表5 EEA 对免疫低下小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞增殖能力的影响 ($n = 14, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mL/kg BW d)	胸腺(A)	脾脏(A)
正常		0.461 \pm 0.075	0.243 \pm 0.041
EEA	0	0.203 \pm 0.047 ^b	0.138 \pm 0.023 ^b
	4	0.275 \pm 0.065 ^{b,d}	0.155 \pm 0.034 ^{b,c}
	8	0.342 \pm 0.050 ^{b,e}	0.166 \pm 0.030 ^{b,d}
	16	0.396 \pm 0.078 ^{a,e}	0.196 \pm 0.031 ^{b,e}

注:与正常组比较,(a) $P < 0.05$, (b) $P < 0.01$;与 EEA 0 ml/kg BW 组比较;(c) $P > 0.05$, (d) $P < 0.05$; (e) $P < 0.01$ 。

3 讨论

EEA 含有全部的必需氨基酸,但氨基酸价不很突出。呈味氨基酸丰富,是制作高级海鲜调味料的优良原料。EEA 中赖氨酸、精氨酸和牛磺酸的含量极高。赖氨酸可以起到增进食欲、促进幼儿生长与发育的作用,还能提高钙的吸收及积累,加速骨骼生长;精氨酸对成人来说虽然不是必需氨基酸,但在儿童生长发育期中是非常重要的^[10];牛磺酸具有广泛的生理功能,尤其是维持和促进儿童神经系统的发育以及学习、记忆能力的形成,目前美国、日本等发达国家已经在婴幼儿配方奶粉和牛奶中强化牛磺酸,使其接近母乳^[11]。EEA 还含有较高浓度的磷脂、维生素 A、维生素 E、Se、Zn 等物质,这些物质已被证明与机体免疫机能密切相关,也是目前人体普遍摄入不足的营养素。本实验结果表明,EEA 对免疫低下确有显著的改善作用。

EEA 能提高 Hy 模型小鼠免疫器官重量、肝脏 DNA 和 RNA 含量以及外周血 T 细胞数,提示 EEA 可从多途径拮抗 Hy 的免疫抑制作用,使机体免疫功能趋于正常。免疫细胞上有皮质激素受体,Hy 与其结合后作用于 DNA,促使核酸内切酶 mRNA 的转录,诱导合成多种特异性抑制蛋白,从而抑制了机体的免疫功能^[12]。据此推测,EEA 拮抗 Hy 免疫抑制作用的机制可能与促进淋巴细胞 DNA 的合成有关。

研究表明,在一定剂量范围内,Hy 主要抑制机体细胞免疫功能^[9]。在免疫器官的重量和淋巴细胞增殖能力方面,EEA 对胸腺的影响均大于脾脏,表现为起效剂量低、作用强度大,提示在特异性免疫方面,EEA 对细胞免疫功能的调节作用可能强于对体

液免疫的作用,这一推论还基于 EEA 较高的 Se 含量。目前一般认为,这些免疫活性与肿瘤和病毒的免疫监视系统有密切关系,有利于提高机体免疫监视系统的功能^[13],这为进一步研究和利用 EEA 作为肿瘤免疫和病毒免疫的调节剂提供了线索。

参考文献

- [1] 王兵,蒋建敏,许东晖,等. 鲍鱼多糖对荷人鼻咽癌裸鼠抗癌作用的研究[J]. 中草药,2000,31(8):597-599.
- [2] 陈倩超. 鲍鱼多糖的提取及抗肿瘤试验[J]. 中国现代应用药学,1998,15(1):8-10.
- [3] 徐静华,于庆海. 北豆根总碱对氢化可的松模型小鼠的免疫调节作用[J]. 中药药理与临床,1998,14(1):24-26.
- [4] 李仪奎,王钦茂. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科技出版社,1991,155-167.
- [5] 北京大学生物系编. 生物化学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,1991,155-158.
- [6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immun Meth, 1983, 65(1):55-58.
- [7] 章超桦,吴红棉,洪鹏志,等. 马氏珠母贝肉的营养成分及其游离氨基酸组成[J]. 水产学报,2000,24(2):180-184.
- [8] 洪鹏志,章超桦,杨文鸽,等. 翡翠贻贝肉酶解动物蛋白营养评价及其生理活性初探[J]. 水产学报,2002,26(1):86-90.
- [9] 马玲,王红梅,闫向东,等. 免疫失衡动物模型复制初探[J]. 中国食品卫生杂志,2001,13(6):11-13.
- [10] 洪鹏志,章超桦,杨文鸽,等. 翡翠贻贝肉酶解动物蛋白营养评价及其生理活性初探[J]. 水产学报,2002,26(1):85-89.
- [11] 陈文雄,陈文嫻,陈光达. 牛磺酸与生长发育[J]. 国外医学妇幼保健分册,2000,11(1):3-6.
- [12] Voris B P, Young D A. Glucocorticoid-induced proteins in rat thymus cells [J]. J Biol Chem, 1981, 256(21):11319-11329.
- [13] 王文涛,周金黄,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.

[收稿日期:2005-03-02]

中图分类号:R15;TS218 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)06-0494-04