

十二指肠灌注饲料寡肽对鸡肠道氨基酸吸收的影响

王丽娟 计成 郭宝海 岳洪源

(中国农业大学 动物科技学院,北京 100094)

摘要 用十二指肠灌注法在不麻醉状态下研究饲料寡肽对鸡肠道氨基酸吸收的影响。灌注用寡肽分别是4种常规饲料(鱼粉、豆粕、棉粕、菜粕)体外酶水解产物的2组低分子量组分(<3 kD和<1 kD)。试验1:十二指肠灌注豆粕<3 kD寡肽(S3)后,测定不同时间肝门静脉血浆游离氨基酸(FAA)浓度,结果表明,灌注后总FAA浓度迅速上升,20 min时最高。试验2:采用吸收强度和吸收平衡系数作为评价肠道氨基酸吸收效率的指标,比较十二指肠灌注8种饲料寡肽后20 min时的氨基酸吸收效率。结果表明,各种饲料<3 kD寡肽组的氨基酸吸收效率均显著高于其<1 kD组($P<0.05$);在同一种分子量寡肽组中鱼粉、豆粕寡肽组显著高于棉粕和菜粕寡肽组($P<0.05$);氨基酸吸收效率与灌注底物的寡肽含量(PAA/TAA)存在显著正相关($P<0.05$)。本研究结果显示,鱼粉、豆粕等优质蛋白质在动物胃肠道中产生较多寡肽,因而具有较高的氨基酸吸收效率。

关键词 鸡;饲料寡肽;十二指肠灌注;肠道吸收;门脉血浆 FAA

中图分类号 S 816.7

文章编号 1007-4333(2003)03-0081-04

文献标识码 A

Effects of duodenal infusion of feed peptides on portal absorption of amino acids in chickens

Wang Lijuan, Ji Cheng, Guo Baohai, Yue Hongyuan

(College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Two experiments were conducted using duodenal infusion method to investigate the effect of feed oligo-peptides on portal absorption of amino acids in chickens under unanesthetized condition. The oligo-peptides used in experiments were enzymatic hydrolysates of fish meal, soybean meal, cottonseed meal and rapeseed meal with the average molecular weight of <3 kD and <1 kD. Experiment 1: Portal Blood were collected at different minute after administration of enzymatic hydrolysate of soybean meal with the average molecular weight <3 kD (S3). Plasma concentrations of free amino acids (FAA) were measured. The results showed that total plasma FAA concentrations immediately increased and reached maximum level at 20 min after infusion. Experiment 2: Absorptive intensity and balance were used to estimate the intestinal absorption rate of amino acids. FAA concentrations of portal blood at 20 min after duodenal administrations were determined. Amino acid absorption rates of eight infusion groups were compared. Results showed that amino acid absorption rates of <3 kD groups were significantly higher than those of <1kD groups; Absorption rates of fish meal and soybean meal groups were markedly higher than those of cottonseed meal and rapeseed meal groups among <3 kD groups or <1 kD groups; There existed positive correlation between absorption rates and proportions of peptide bound amino acids (PAA) in infused substrates. The results of this investigation suggest that the fish meal and soybean meal are hydrolyzed into more oligo-peptides in animal gastrointestinal tract and consequently utilized more effectively by body tissues and had higher nutritive value.

Key words chickens; feed oligo-peptide; duodenal infusion; intestinal absorption; portal FAA

寡肽是蛋白质在动物胃肠道消化终产物的主要组分,在动物蛋白质营养中具有特殊重要的作用^[1,2]。研究表明,寡肽在肠道粘膜细胞的转运和吸收比游离氨基酸具有更多的优势如速度快、耗能

低、载体不易饱和、无竞争抑制性等^[2~5]。因此,寡肽是高效吸收的氨基酸供体,可以快速吸收进入肠粘膜,在粘膜刷状缘上或粘膜细胞内进一步水解,再以游离氨基酸的形式进入血液^[6,7]。

收稿日期:2003-01-14

作者简介:王丽娟,博士研究生;计成,教授,博士生导师,主要从事单胃动物营养研究,E-mail:jicheng@pubic.fhnet.cn.net

很多关于寡肽吸收的试验表明,其在肠道的吸收强度和速度都显著高于相应游离氨基酸的混合物^[4,8-11]。但这些研究中所采用的寡肽多是标准的二肽、三肽或一些特殊蛋白质如酪蛋白、白蛋白、乳清蛋白等的酶解产物,使结果具有一定局限性。另外,一些体外和体内的研究报道,优质饲料蛋白水解产生的寡肽含量显著高于劣质饲料蛋白^[12,13]。可见,饲料蛋白的寡肽释放量很可能是造成氨基酸利用率差异的一个重要因素。本研究通过十二指肠灌注的方法,比较常规饲料蛋白质酶解寡肽对鸡肠道氨基酸吸收的影响,旨在进一步认识蛋白质肠道释放寡肽影响饲料氨基酸利用率的机理。

1 材料和方法

1.1 灌注寡肽(表1)

4种常规饲料(鱼粉、豆粕、棉粕和菜粕)在体外条件下用胃蛋白酶和胰蛋白酶消化的水解产物,经过中空纤维超滤组件处理获得8组平均分子量<3 kD和<1 kD的超滤液。根据每mL寡肽液中总氨基酸(TAA)和FAA含量,制备8组含等摩尔TAA的寡肽灌注液,一只鸡的灌注量为5 mL,含TAA100 μmol。

1.2 十二指肠灌注试验

试鸡试验前饥饿24 h,饥饿期间自由饮用加有

葡萄糖多维(每只鸡50 g)的自来水。试验时,试鸡不经麻醉处理,在右腹部接近龙骨突处开一小口,用注射器由十二指肠注入寡肽灌注液,之后将肠段整理好放回体腔,让试鸡自由活动,于指定时间点采血。

试验1:确定达到血浆最高FAA浓度的时间点。6周龄艾维因小公鸡54只,平均体重(1.5 ± 0.1) kg,随机分为9组,每组3个重复,每重复2只鸡。其中1组试鸡作为灌注前对照组,其余8组试鸡全部灌注制备好的豆粕<3 kD寡肽(S3)灌注液5 mL,分别在灌注后5、10、15、20、30、40、60和90 min时采肝门静脉血液,制备血浆。测定血浆中FAA的浓度,将血浆FAA浓度达到最高水平的时间点最作为试验2的采血时间点。

试验2:选择6周龄艾维因小公鸡42只,平均体重(1.5 ± 0.1) kg,随机分为7组,每组3个重复,每重复2只鸡。7组试鸡分别灌注F3、C3、R3、F1、S1、C1和R1灌注液5 mL。根据试验1的结果,在灌注后20 min采肝门静脉血液。测定血浆FAA浓度,计算20 min内鸡肠道氨基酸的吸收效率,分析氨基酸吸收效率与灌注底物寡肽含量之间的相关性。

1.3 血液采集和去蛋白血浆样品制备

在指定采血时间点打开腹腔,肝门静脉采血10 mL,置于装有肝素钠抗凝剂的带盖离心管。4

5 000 g离心20 min,分离出的血浆中等体积加入

表1 各组灌注液中氨基酸的摩尔百分比和寡肽含量(PAA/TAA)

Table 1 Molar percent of AA and peptide content in infused peptides

氨基酸	鱼粉寡肽		豆粕寡肽		棉粕寡肽		菜粕寡肽	
	<3 kD(F3)	<1 kD(F1)	<3 kD(S3)	<1 kD(S1)	<3 kD(C3)	<1 kD(C1)	<3 kD(R3)	<1 kD(R1)
天冬氨酸	6.58	4.46	6.08	5.34	4.76	5.35	4.27	6.58
丝氨酸	2.74	3.77	6.35	8.74	3.11	4.14	6.99	2.74
谷氨酸	5.70	8.72	8.90	8.01	6.19	8.37	9.79	5.70
苏氨酸	2.06	2.19	2.48	4.06	1.81	2.05	2.03	2.06
丙氨酸	6.52	5.10	9.22	8.25	4.16	3.97	5.43	6.52
甘氨酸	12.21	18.66	16.77	20.23	18.25	19.19	17.84	12.21
酪氨酸	2.46	0.69	2.16	0.44	2.64	3.64	4.60	2.46
脯氨酸	9.47	3.84	6.82	7.79	6.35	4.75	4.00	9.47
缬氨酸	19.90	32.00	8.02	6.03	26.19	15.20	24.85	19.90
苯丙氨酸	1.78	0.91	5.51	5.35	8.08	9.36	3.40	1.78
异亮氨酸	1.19	0.52	3.61	2.66	2.56	3.11	2.07	1.19
亮氨酸	3.47	5.16	4.69	5.24	2.82	4.15	2.53	3.47
组氨酸	19.48	10.91	17.02	14.96	11.20	14.23	10.41	19.48
赖氨酸	6.43	3.09	2.37	2.89	1.87	2.49	1.78	6.43
总氨基酸	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
PAA/TAA	87.85%	77.16%	86.05%	73.95%	83.96%	71.15%	75.74%	70.34%

0.6 mol L⁻¹高氯酸,沉淀大分子蛋白,4 8 000 g 离心 15 min,等比例混和每重复 2 只鸡同一采血时间点去蛋白血浆上清液,-20 冻存待测定。

1.4 去蛋白血浆样品 FAA 含量测定

准确量取去蛋白血浆上清液 5 mL 于 25 mL 容量瓶中,65 旋转蒸发仪上蒸干,加入 2 mL 牛磺酸内标,FMOC (9-Fluorenylmethyl Chloroformate) 衍生后上机测定。

色谱条件:高效液相色谱仪(HPLC)固定相 Superspher 60 RP-8 色谱柱;流动相 A 液中乙腈与 pH4.1 醋酸钠的比例为 20 80,B 液中乙腈与 pH4.1 醋酸钠比例为 70 30,在 A 和 B 液中各加入 3 滴优级纯三乙氨;荧光检测波长: = 260 nm,EM = 310 nm。

由于蛋氨酸、胱氨酸和色氨酸未测,且色谱柱对精氨酸不敏感,因此本试验测定的 FAA 包括除蛋氨酸、胱氨酸、色氨酸及精氨酸以外的 14 种氨基酸,TAA 指这 14 种氨基酸的总和。

1.5 肠道氨基酸吸收效率的评价

采用氨基酸吸收强度和吸收平衡系数作为评价肠道氨基酸吸收效率的指标。吸收强度是指灌注前后 20 min 内门静脉血浆 FAA 浓度的变化速率。吸收强度越大,表明鸡肠道对氨基酸的吸收速率越大。氨基酸吸收平衡系数是指吸收进入门脉血中各种氨基酸与灌注底物中相应氨基酸之间差异的总和。吸收平衡系数越小,表明灌注底物中各种氨基酸在肠道吸收的程度越高。

氨基酸吸收强度 Slope ($\mu\text{mol L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) = $(c_1 - c_0)/t$,其中, c_1 和 c_0 分别表示灌注后和灌注前门静脉血浆中某氨基酸的浓度, t 表示从灌注到采血的时间。

氨基酸吸收平衡系数 $X^2 = (f_i - F_i)^2 / F_i$,其中 f_i 是指在从灌注到采血的一段时间内某种氨基酸的吸收强度占总吸收强度的百分比; F_i 是灌注底物中某氨基酸的摩尔百分比。

1.6 统计分析

采用 SPSS10.0 ANOVA 程序对试验数据进行方差分析,采用 Dunbcane's 方法进行多重比较,采用一元线性回归程序进行回归分析。

2 结果

2.1 十二指肠灌注豆粕寡肽 < 3 kD(S3) 后门脉血浆 FAA 浓度的变化(图 1)

试鸡十二指肠灌注 S3 后,门静脉血浆总 FAA

的浓度迅速上升,在灌注后 20 min 时达到最高水平,之后开始下降,在 60~90 min 恢复灌注前水平。

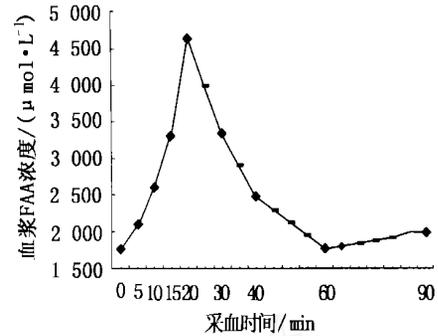


图 1 十二指肠灌注 S3 后门脉血浆 FAA 浓度的变化

Fig. 1 Changes in concentration of plasma total FAA after duodenal infusion of S3

2.2 不同饲料寡肽对肠道氨基酸吸收效率的影响

与灌注前相比,灌注不同饲料寡肽后 20 min 试鸡门脉血浆总 FAA 浓度均显著升高;各灌注组之间存在显著差异, $F3$ 和 $S3 > C3 > R3$ 和 $F1 > S1 > C1 > R1$ ($P < 0.05$); $F3$ 和 $S3$ 组、 $R3$ 和 $F1$ 组之间差异不显著 ($P > 0.05$) (表 2)。

不同饲料寡肽灌注组的氨基酸吸收效率存在显著差异。从吸收强度看, $F3$ 和 $S3 > C3$ 、 $R3$ 和 $S1 > F1 > C1 > R1$ ($P < 0.05$), $C3$ 和 $R3$ 、 $R3$ 和 $S1$ 之间差异不显著 ($P > 0.05$);从吸收平衡系数看 $F3$ 和 $S3 < R3$ 和 $C3 < F1 < C1$ 和 $S1 < R1$, $F3$ 和 $S3$ 、 $R3$ 和 $C3$ 、 $C1$ 和 $S1$ 之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 十二指肠灌注不同饲料寡肽对肠道氨基酸吸收效率的影响

Table 2 Comparison of absorptive intensity and balance of AA from different peptides

观测指标	血浆总 FAA 浓度/ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	总 Slope/ ($\mu\text{mol L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	2
灌注前*	1 759.47 \pm 135.86 b		
F3	4 655.67 \pm 221.21	144.81 \pm 3.78	42.20 \pm 0.81
F1	3 529.95 \pm 197.64 a	81.69 \pm 7.09 c	69.34 \pm 3.98 c
S3*	4 632.85 \pm 203.80	143.67 \pm 4.93	41.88 \pm 1.43
S1	3 393.31 \pm 195.74 d	88.52 \pm 11.34 b	88.19 \pm 5.04 b
C3	3 650.33 \pm 193.73 c	94.54 \pm 10.54 a	64.15 \pm 4.51 a
C1	3 203.53 \pm 168.75 e	72.20 \pm 2.72 d	86.47 \pm 3.24 b
R3	3 544.80 \pm 188.30 a	89.27 \pm 9.44 ab	63.26 \pm 6.77 a
R1	2 959.70 \pm 143.63 f	60.01 \pm 2.03 e	92.87 \pm 3.84 d

注: 同列字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

* 数据引自试验一

2.3 氨基酸吸收效率与灌注底物寡肽含量的相关性分析

以灌注底物寡肽含量作为自变量,分别以氨基

酸吸收强度和吸收平衡系数作为因变量进行 2 次回归分析。结果表明,灌注底物寡肽含量与氨基酸吸收强度之间呈显著正相关($R^2 = 0.92$),与氨基酸吸收平衡系数之间呈显著负相关($R^2 = 0.93$)。说明灌注底物寡肽含量越高,氨基酸吸收速率越大,吸收入门脉血中的各种氨基酸与灌注底物中相应氨基酸之间差异的总和越小,底物氨基酸吸收程度越高。

3 讨论

Hara 等^[4]和 Silk 等^[9]在大鼠上曾采用十二指肠灌注结合安装导管或门脉血瘵的方法比较了寡肽及其组成游离氨基酸混合物在肠道吸收的不同情况。乐国伟等^[11]的十二指肠灌注法是在试鸡麻醉的状态下进行。本研究考虑鸡的生理特点,综合前人的方法,在不麻醉的条件下,较好保持了试鸡肠道的正常吸收活动和血流速度以及在试验时间内正常的生理和代谢机能。

本研究引入了氨基酸吸收强度和吸收平衡系数作为评价肠道氨基酸吸收效率的指标,同时考虑了肠道氨基酸的吸收速率和底物氨基酸吸收入血的程度。Hara 等^[4]在比较大鼠小肠对游离氨基酸和寡肽结合氨基酸吸收的差异时曾经引用这 2 个指标,用血浆中某氨基酸浓度的初始(灌注后 5 min)增长速率来计算。本研究是利用灌注后 20 min 的增长速率来计算,可能会受到循环氨基酸的影响,但各处理组间仍具可比性。

本试验表明各寡肽灌注组氨基酸吸收效率的差异是由灌注底物中不同寡肽含量(PAA/ TAA)引起的,即灌注底物中 PAA/ TAA 越大,肠道氨基酸吸收入血的速率越大;同时吸收的各种氨基酸也更好的保持了底物氨基酸的比例,即底物氨基酸的吸收程度更高。

4 结论

肠道底物寡肽含量(PAA/ TAA)与氨基酸吸收效率呈显著正相关。鱼粉、豆粕等优质饲料由于在动物胃肠道中产生较多寡肽,提高了氨基酸在肠道的

吸收效率,因而具有较高的饲料氨基酸利用率。

参 考 文 献

- [1] Kim Y S, Birtwhistle W, Kim Y W. Peptide hydrolyses in the brush border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man [J]. *J Clin Invest*, 1972, 51: 1419
- [2] Matthews D M. Intestinal absorption of peptides [J]. *Physiol Rev*, 1975b, 55: 527
- [3] Burston D J, Addison M, Mathreus D M. Uptake of depeptide containing basic and acidic amino acids by rat small intestine *in vitro* [J]. *Clin Sci*, 1972, 43:823
- [4] Hara H, Funabli R, Iwata M, et al. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions [J]. *J Nutri*, 1984, 114:1122
- [5] Webb K E. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: A review [J]. *J Anim Sci*, 1990, 68:3011 ~ 3022
- [6] Webb K E, Matthews Jr J C, DiRienzo D B. Peptide absorption—a review of current concepts and future perspectives [J]. *J Anim Sci*, 1992, 70:3248
- [7] Daniel H, Boll M, Wenzel U. Physiological importance and characteristics of peptide transport in intestinal epithelial cells [A]. In: Souffrant W B, Hagemester H, eds. 6th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs [C]. Dummerstorf Pub, 1994, 1:1 ~ 7
- [8] Matthews D M. Rate of peptide uptake by small intestine [A]. In: Elion K, O'Connor M, eds. CIBA Symposium: Peptide Transport in Bacteria and Mammalian Gut [C]. Associated Scientific Publishers, 1972. 71 ~ 88
- [9] Silk D B A, Grimble G K, Rees R G. Protein digestion and amino acid and peptide absorption [J]. *Proc Nutr Sci*, 1980, 44:63
- [10] Rerat A, et al. Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in anaesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymatic hydrolysate or of free amino acids [J]. *Brit J Nutr*, 1988, 60:121 ~ 136
- [11] 乐国伟,施用晖,谢君,等. 灌注寡肽与游离氨基酸对来航公鸡氨基酸吸收及循环中肽的影响 [J]. *动物营养学报*, 1997, 9(4): 14 ~ 23
- [12] 冯秀燕,计成,蒋辉. 饲料蛋白质在鸡消化道食糜中肽氨基酸含量与氨基酸消化率的关系 [J]. *中国农业大学学报*, 2002, 7(1): 107 ~ 113
- [13] Meister H, Hagemester H. Postprandial proteolysis of caseins and soya protein [J]. *Milchwissenschaft*, 1987, 42: 153 ~ 158