

小分子大豆多肽对小鼠胃黏膜保护作用的研究

戚颖欣¹, 孟 军², 曹柏营¹

(1. 吉林工程技术师范学院食品工程学院, 吉林 长春 130052; 2. 吉林省通化市食品药品检验所, 吉林 通化 134000)

摘 要: 采用束缚-水浸法和无水乙醇诱导法复制小鼠胃黏膜损伤模型, 实验动物各分为 6 组: 正常组、模型组、阳性药物组(雷尼替丁+VE), 大豆多肽高、中、低剂量组(分别为 7.5、5.0、2.5 g/(kg·d)), 连续给药 10d 后, 处死实验动物, 观察溃疡指数, 同时测定肝组织 MDA 含量、血清 ALT 活性、胃黏膜组织 SOD 和 MDA 水平。结果表明: 成功建立小鼠胃黏膜损伤模型, 与模型组比较, 大豆多肽高、中剂量组能明显降低应激性和乙醇诱导胃黏膜损伤小鼠的溃疡指数, 以高剂量效果最佳, 呈明显的剂量依赖性; 同时大豆多肽高、中剂量组可明显降低应激性胃黏膜损伤小鼠肝组织 MDA 和血清中 ALT 水平; 增强乙醇诱导胃黏膜损伤小鼠胃黏膜组织中 SOD 活力, 降低 MDA 水平。小分子大豆多肽对小鼠胃黏膜损伤有一定的保护作用。

关键词: 大豆多肽; 应激性胃溃疡; 胃黏膜; 溃疡指数

Protective Effects of Low-Molecule-Weight Soybean Polypeptides on Gastric Mucosa in Mice

QI Ying-xin¹, MENG Jun², CAO Bai-ying¹

(1. College of Food Engineering, Jilin Teachers' Institute of Engineering and Technology, Changchun 130052, China;

2. Tonghua Food and Drug Administration of Jilin, Tonghua 134000, China)

Abstract: In this study, we examined the protective effects of low-molecular-weight soybean polypeptides (LMWSPs) against gastric mucosal injury in mice induced by water-immersion restraint stress (WIRS) and anhydrous alcohol, respectively. A total of 60 clean male IRC mice were randomly assigned into 6 groups: normal group, model control group, positive drug control group (ranitidine + VE), and high-, medium- and low-dosage LMWSP groups (administered at the dosages of 7.5, 5.0 g/(kg·d) and 2.5 g/(kg·d) once daily for 10 consecutive days, respectively). After the last administration, all the mice were killed to observe ulcer index and assay malondialdehyde (MDA) content in the liver, alanine transaminase (ALT) in the serum, and the levels of MDA and SOD in the gastric mucosa. The results showed that WIRS-induced and anhydrous alcohol-induced gastric mucosal injury models were set up in mice successfully. UI was significantly decreased in the high- and medium-dosage LMWSP and positive drug control groups compared with the model control groups ($P < 0.01$) and the UI-reducing effect of LMWSPs was better at the high dosage and consequently followed a dose-dependent pattern. Meanwhile, both dosages of LMWSPs markedly decreased ALT activity in the liver and serum of mice with WIRS-induced gastric mucosal injury, and increased SOD activity and reduced MDA level in mouse gastric mucosa with anhydrous alcohol-induced injury. Based on these findings, we conclude that LMWSPs can function to protect against gastric mucosal injury in mice.

Key words: soybean polypeptide; stress-induced stomach ulcer; gastric mucosa; ulcer index

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0289-04

大豆多肽是以大豆蛋白质经过水解、分离、精制等工艺过程制备的由 3~6 个氨基酸组成, 分子质量小于 1000D 的小分子肽类混合物^[1]。大豆多肽营养丰富, 含有 20 多种氨基酸, 且各种氨基酸的组成均衡^[2]。大豆多肽具有多种功能, 如调节血压、降低胆固醇、预防骨质疏松症、保护肝脏等^[3-7]。有研究表明, 大豆

多肽特别是小分子肽对脂质体系、非脂质体系、体外实验均有显著的抗氧化作用^[8-9], 体内脂质过氧化损伤是胃黏膜损伤的主要病理机制, 推测其对胃黏膜损伤可能有一定的保护作用^[10-12]。目前, 国内外关于大豆多肽对胃黏膜保护作用的研究报道较少。因此本实验采用电裂解装置制备小分子大豆多肽, 通过小鼠胃黏膜损伤模型

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: 吉林省科技厅资助项目(20080131); 吉林省教育厅资助项目(吉教科合字 2008 第 387 号)

作者简介: 戚颖欣(1976—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为保健食品开发。E-mail: qyxclhb@163.com

来探讨小分子大豆多肽对小鼠胃黏膜的保护作用。以期为大豆小分子肽在保健食品及医药领域中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

大豆 市售。

丙氨酸氨基转移酶(ALT)、丙二醛(MDA)、考马斯亮蓝蛋白定量、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒 南京建成生物工程中心; VE 胶丸(批号 100201) 上海东海制药有限公司东海制药厂; 雷尼替丁胶囊(批号 100708) 天津太平洋制药有限公司; 大豆调和油、甲醛(分析纯)、乙醇(分析纯)均为市售。

ECA-2000B 半自动生化分析仪 吉林省维尔医疗器械有限公司; LDZ5-2 型自动平衡离心机 北京医用离心机厂; 电磁裂解装置 课题组专利产品; Sdzf-6021 真空干燥箱 上海苏达实验仪器有限公司

1.2 实验动物

ICR 清洁级雄性小鼠, 体质量 18~22g, 由吉林大学基础医学院实验动物中心提供; 置于温度 18~25℃, 相对湿度 55%~60% 的条件下饲养。

1.3 大豆多肽的制备

大豆经脱脂、粉碎、碱溶、酸沉淀、中和、干燥得到的大豆分离蛋白进入电磁裂解装置的裂解仓, 在高频交变电磁场的作用下, 物料升温, 物料中分子在交变电磁场影响下, 不断扭转、拉伸, 使其分子断裂, 形成小分子的大豆多肽, 再经过真空干燥制备小分子大豆多肽粉。小分子大豆多肽粉经江南大学分析测试中心检测(检验报告编号: LC1010201)其分子质量分布为 2000~1000D, 占总分子质量(下同)2.88%; 1000~500D, 占 25.95%; 500~180D, 占 63.69%; 180D 以下, 占 7.4%。

1.4 方法

1.4.1 试剂的配制

大豆多肽高、中、低剂量质量浓度分别为 30、20、10g/100mL。VE 油剂: 将 VE 胶囊(100mg/粒)壳剪开, 以大豆调和油冲洗、溶解其内容物, 振荡, 配成 4.0mg/mL VE。雷尼替丁混悬液: 取雷尼替丁胶囊内容物, 用蒸馏水溶解, 配成 4.0mg/mL 雷尼替丁混悬液。用时振荡摇匀。

1.4.2 小鼠束缚-水浸法应激性胃黏膜损伤模型的建立^[10]

ICR 雄性小鼠 60 只, 按体质量随机分为 6 组, 每组 10 只: 正常组, 模型组, 大豆多肽高、中、低剂量组, 阳性药物组。正常组、模型组灌胃蒸馏水 25mL/(kg·d); 大豆多肽高、中、低剂量组分别灌胃高、中、低质量浓度的大豆多肽液, 皆为 25mL/(kg·d); 阳性药物组:

同时灌胃 VE 及雷尼替丁的混悬液各 10mL/(kg·d), 连续给药 10d, 每日 1 次。末次给药后禁食 12h, 不禁水。小鼠装入特制鼠笼, 浸入(18±1)℃的水, 液面保持在小鼠胸骨剑突处, 水浸应激 20h 后, 取出吹干。摘眼球取血; 颈椎脱臼处死小鼠, 剖腹, 留取肝脏; 结扎幽门部, 灌胃 0.4g/100mL 福尔马林溶液 1.5mL, 结扎贲门部, 游离胃, 固定 30min 后, 沿胃大弯剪开, 0.9g/100mL 氯化钠溶液冲去胃内容物, 展平。镜检小鼠胃黏膜损伤作为溃疡指标。

1.4.3 乙醇诱导的小鼠胃黏膜损伤模型的建立^[11]

ICR 雄性小鼠 60 只, 分组及给药同 1.4.2 节, 末次给药后 1h, 灌服无水乙醇 0.2mL/只。3h 后颈椎脱臼处死所有动物, 打开腹腔摘取全胃, 沿胃大弯剪开, 用生理盐水冲洗, 镜检小鼠胃黏膜损伤作为溃疡指标。同时剥取溃疡处胃黏膜组织备用。

1.5 检测指标

1.5.1 溃疡指数测定

按 Guth 标准计算各组小鼠溃疡指数和溃疡抑制率, 按溃疡或糜烂面积计分^[12]。点状出血: 每 3 个点状溃疡(黏膜缺损小于 1mm 或出血性糜烂小点, 称点状溃疡)计 1 分。条状出血: 以游标卡尺测量溃疡面的最大长径和垂直于最大长径的最大宽径, 二者的乘积即为溃疡指数。1mm 宽者每毫米长为 1 分; 2mm 宽者每毫米长为 2 分; 3mm 宽者每毫米长为 3 分。

$$A/\% = \frac{I_1 - I_2}{I_1} \times 100$$

式中: A 为溃疡抑制率/%; I_1 为模型对照组平均溃疡指数; I_2 为用药组平均溃疡指数。

1.5.2 肝组织 MDA 含量及血清 ALT 活力测定

用 0.86g/100mL 氯化钠(4℃预冷)将肝冲洗干净, 以滤纸吸干水分, 称其质量, 液氮中冻存, 以 1:9(m/V)制备肝组织匀浆, 离心取上清。对上清液中的蛋白定量并按试剂盒说明书测定 MDA 含量。血清 ALT 活力按试剂盒说明书测定。

1.5.3 胃黏膜组织 MDA 含量和 SOD 活力

剥取溃疡处胃黏膜组织 200mg, 称量按胃黏膜组织与双蒸水 1:20 比例配成 5g/100mL 的组织匀浆-20℃保存备用, 按试剂盒说明书检测 MDA 含量和 SOD 活力。

1.6 数据处理

所有实验数据经统计学处理后以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 组间差异比较采用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 大豆多肽对小鼠应激性胃黏膜损伤的影响

表1 大豆多肽对小鼠应激性胃黏膜损伤的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 1 Effect of LMWSPs on WIRS-induced gastric mucosal injury in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	溃疡指数	溃疡抑制率/%
正常组	0.18 \pm 0.12	
模型组	28.34 \pm 3.16 $\Delta\Delta$	
阳性药物组	10.21 \pm 2.58**	63.97
大豆多肽高剂量组	13.65 \pm 3.02**	51.83
大豆多肽中剂量组	19.47 \pm 2.42*** $\Delta\Delta$	31.30 $\Delta\Delta$
大豆多肽低剂量组	24.73 \pm 3.38 $\Delta\Delta$	12.74 $\Delta\Delta$

注: $\Delta\Delta$.与正常组比较, 差异极显著($P < 0.01$); *.与模型组比较, 差异显著($P < 0.05$); **.与模型组比较, 差异极显著($P < 0.01$); #.与大豆多肽高剂量组比较, 差异极显著($P < 0.05$); ##.与大豆多肽高剂量组比较, 差异极显著($P < 0.01$); $\Delta\Delta$.与阳性药物组比较, 差异极显著($P < 0.01$)。下同。

从表1可见, 与正常组比较, 模型组溃疡指数极显著增高($P < 0.01$); 与模型组比较, 大豆多肽高、中剂量组和阳性药物组溃疡指数明显降低($P < 0.01$)。大豆多肽高剂量组的溃疡指数和溃疡抑制率分别与阳性药物组比较差异无显著性意义, 但大豆多肽中、低剂量组的作用弱于阳性药物对照组($P < 0.01$)。大豆多肽降低应激性胃黏膜损伤小鼠的溃疡指数和提高溃疡抑制率并呈一定的量效关系。

2.2 大豆多肽对应激性胃黏膜损伤小鼠肝组织MDA含量和血清中ALT活力的影响

表2 大豆多肽对应激性胃黏膜损伤小鼠肝组织MDA含量和血清中ALT活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of LMWSPs on liver MDA content and serum ALT activity in mice with WIRS-induced gastric mucosal injury($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	MDA含量/(nmol/mg pro)	ALT活力/(IU/L)
正常组	33.28 \pm 5.36	10.25 \pm 2.17
模型组	79.25 \pm 4.43 $\Delta\Delta$	33.62 \pm 5.31 $\Delta\Delta$
阳性药物组	41.63 \pm 3.16**	12.73 \pm 2.34**
大豆多肽高剂量组	42.37 \pm 4.26**	14.68 \pm 3.23**
大豆多肽中剂量组	58.74 \pm 3.42*** $\Delta\Delta$	21.27 \pm 4.15*** $\Delta\Delta$
大豆多肽低剂量组	68.58 \pm 4.13*** $\Delta\Delta$	29.84 \pm 4.61 $\Delta\Delta$

从表2可见, 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织MDA含量和血清中ALT活力极显著增高($P < 0.01$); 与模型组比较, 大豆多肽高、中剂量组和阳性药物组小鼠肝组织MDA和血清中ALT水平极显著降低($P < 0.01$)。大豆多肽高剂量组小鼠肝组织MDA和血清中ALT水平分别与阳性药物组小鼠比较差异无显著性意义。说明大豆多肽降低应激性胃黏膜损伤小鼠肝组织MDA和血清中ALT水平, 并呈一定的量效关系。

2.3 大豆多肽对乙醇致胃黏膜损伤小鼠溃疡指数的影响

表3 大豆多肽对乙醇胃黏膜损伤小鼠溃疡指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 3 Effect of LMWSPs on anhydrous alcohol-induced gastric mucosal injury in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	溃疡指数	溃疡抑制率/%
正常组	0.32 \pm 0.21	
模型组	40.21 \pm 5.26 $\Delta\Delta$	
阳性药物组	22.54 \pm 3.12**	43.94
大豆多肽高剂量组	24.13 \pm 3.65**	40.01
大豆多肽中剂量组	31.48 \pm 4.16*** $\Delta\Delta$	21.71 $\Delta\Delta$
大豆多肽低剂量组	37.26 \pm 4.23 $\Delta\Delta$	7.34 $\Delta\Delta$

从表3可见, 与正常组比较, 模型组溃疡指数显著增高($P < 0.01$); 与模型组比较, 大豆多肽高、中剂量组和阳性药物组溃疡指数明显降低($P < 0.01$)。大豆多肽高剂量组的溃疡指数和溃疡抑制率分别与阳性药物组比较差异无显著性意义, 但大豆多肽中、低剂量组的作用弱于阳性药物对照组($P < 0.01$)。大豆多肽降低乙醇致胃黏膜损伤小鼠的溃疡指数和提高溃疡抑制率并呈一定的量效关系。

2.4 大豆多肽对乙醇致胃黏膜损伤小鼠胃黏膜组织SOD活力和MDA含量的影响

表4 大豆多肽对乙醇致胃黏膜损伤小鼠胃黏膜组织SOD活力和MDA含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of LMWSPs on SOD activity and MDA content in mouse gastric mucosa with anhydrous alcohol-induced injury

($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	MDA含量/(nmol/mg pro)	SOD活力/(U/mg pro)
正常组	35.31 \pm 4.26	20.35 \pm 3.24
模型组	94.64 \pm 5.65 $\Delta\Delta$	8.16 \pm 0.85 $\Delta\Delta$
阳性药物组	50.53 \pm 6.17**	18.97 \pm 2.75**
大豆多肽高剂量组	56.34 \pm 5.46**	15.38 \pm 2.35**
大豆多肽中剂量组	68.52 \pm 5.11*** $\Delta\Delta$	10.52 \pm 1.27*** $\Delta\Delta$
大豆多肽低剂量组	86.35 \pm 5.48*** $\Delta\Delta$	9.63 \pm 1.14 $\Delta\Delta$

从表4可见, 与正常组比较, 模型组小鼠胃黏膜组织中SOD活力显著降低($P < 0.01$), MDA含量显著增高($P < 0.01$); 与模型组比较, 大豆多肽高、中剂量组和阳性药物组小鼠胃黏膜组织中SOD活力显著升高($P < 0.01$), MDA含量显著降低($P < 0.01$)。大豆多肽高剂量组小鼠胃黏膜组织中SOD和MDA水平分别与阳性药物组小鼠比较差异无显著性意义。大豆多肽降低乙醇致胃黏膜损伤小鼠胃黏膜组织MDA含量, 增加SOD活力, 并呈一定的量效关系。

3 结论

本研究采用束缚-水浸法和无水乙醇诱导引起小鼠胃黏膜损伤, 溃疡指数结果表明造模成功, 并发现应

激性胃黏膜损伤同时引起小鼠的肝损伤,与正常组比较,模型组小鼠肝组织MDA和血中ALT水平显著增高,说明应激状况会加重小鼠体内脂质过氧化程度从而引起小鼠的胃黏膜损伤及肝损伤,与模型组比较,大豆多肽高、中剂量组和阳性药物组小鼠肝组织MDA和血中ALT水平显著降低($P < 0.01$),说明大豆多肽能够减缓小鼠体内脂质过氧化进程并防止小鼠的肝脏损伤。

乙醇的氧化毒害作用使细胞中脂质过氧化分解产物MDA增加造成细胞膜损伤,并产生大量氧自由基,而胃黏膜中富含SOD等自由基清除剂,因此,SOD活力高低反映机体清除自由基的能力,MDA含量的高低又反映机体受自由基攻击的严重程度。无水乙醇致小鼠胃黏膜损伤模型组与正常组比较,胃黏膜组织中的SOD活力显著降低($P < 0.01$),MDA含量显著增高($P < 0.01$),说明无水乙醇造成小鼠胃黏膜损伤,同时与模型组比较,大豆多肽高、中剂量组和阳性药物组小鼠胃黏膜组织中SOD活力显著升高($P < 0.01$),MDA含量显著降低($P < 0.01$),说明大豆多肽能提高胃黏膜中的自由基清除酶水平,减缓脂质过氧化进程。

本研究结果表明大豆多肽高、中剂量组可以减少胃黏膜损伤小鼠的溃疡指数,作用存在量效关系;同时大豆多肽高、中剂量组可以减缓体内脂质过氧化进程,即降低胃黏膜损伤小鼠血和胃黏膜组织中的MDA含量,并增加小鼠胃黏膜组织中SOD活力,增强小鼠胃黏膜的

自由基清除能力。因此小分子大豆多肽对胃黏膜损伤有一定的保护作用。

参考文献:

- [1] 薛凤照,莫文贵,王学辉,等.大豆多肽抗疲劳实验研究[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2007,14(2):121-122.
- [2] 孙显慧,蒋文强.大豆多肽功能特性及其开发应用[J].粮食与油脂,2004(5):7-10.
- [3] 高春霞.大豆多肽生理活性、应用与前景分析[J].大豆通报,2006(4):18-22.
- [4] 陶红丽,朱志伟,江津津.大豆多肽生理活性研究进展[J].食品与机械,2007,23(6):133-136.
- [5] 张莉莉,严群芳,王恬.大豆生物活性肽的分离及其抗氧化活性研究[J].食品科学,2007,28(5):208-211.
- [6] 宋俊梅,曲静然,徐少萍,等.大豆肽的研究进展[J].山东轻工业学院学报,2002,16(3):1-3;53.
- [7] 戚颖欣,孟军,曹柏营,等.大豆多肽对小鼠急性肝损伤保护作用的研究[J].食品科学,2009,30(21):377-379.
- [8] 邓成萍,薛文通,孙晓琳,等.不同分子量段大豆多肽功能特性研究[J].食品科学,2006,27(5):109-112.
- [9] AMAROWICZ R, SHAHIDI F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 1997, 58(4): 355-359.
- [10] 刘红艳,张莉华,方步武,等.柴郁汤对小鼠应激性胃溃疡的预防作用[J].中国中西医结合外科杂志,2010,16(2):206-208.
- [11] 卫自,沈业寿,史新强.天麻糖蛋白对小鼠实验性胃溃疡的保护作用[J].中药药理与临床,2007,23(6):34-35.
- [12] 张玉玉,祝文兴,孙一耕,等.大鼠束缚-浸水应激模型体温降低与应激性胃溃疡的关系[J].生物医学工程研究,2007,26(3):282-283.