

谷朊粉水解物对 MTX 诱导大鼠小肠炎症的修复作用

Effect of wheat gluten hydrolysate on the recovery of intestinal mucositis in methotrexate treated rats

严斌 刘丽娅 王延州 周闲容 周素梅

YAN Bin LIU Li-ya WANG Yan-zhou ZHOU Xian-rong ZHOU Su-mei

(中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193)

(Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

摘要:通过 MTX(氨甲蝶呤)诱导的大鼠小肠炎症模型,探讨富含谷氨酰胺的谷朊粉胰蛋白酶水解物对小肠粘膜损伤的修复作用。结果表明:水解物能显著提高小肠炎大鼠的小肠粘膜重量、绒毛高度、隐窝深度以及小肠粘膜的蛋白和 DNA 含量,同时降低血浆中二胺氧化酶水平和提高小肠粘膜谷胱甘肽含量。表明谷朊粉胰蛋白酶水解物可以有效地缓解大鼠小肠炎的肠粘膜损伤症状。

关键词:谷氨酰胺;谷朊粉水解物;氨甲蝶呤;小肠炎;大鼠

Abstract: To investigate the effect of wheat gluten hydrolysate (WGH) rich in glutamine prepared through the enzymatic hydrolysis by trypsin on small intestinal mucosa by methotrexate induced mucositis model in rats. The results showed that the WGH can significantly increase intestinal mucosa weight, villus height, crypt depth, protein and DNA content, decrease diamine oxidase level in plasma and increase glutathione content of small intestine mucosa. The WGH can efficiently alleviate the intestinal mucosal injury in rats.

Keywords: Glutamine; wheat gluten hydrolysate; methotrexate; intestinal mucositis; rats

谷氨酰胺 (glutamine, Gln), 一种“条件性必需氨基酸”, 在应激状态下作为肠上皮细胞的主要代谢前体主要在胃肠道进行消耗^[1]。Gln 对接受全肠外营养的手术患者防止肠粘膜萎缩、调节肠道炎症和抗氧化反应有积极的效果^[2]。然而,游离态 Gln 具有有限的溶解度,在水溶液中不稳定,在高温下易分解为焦谷氨酸^[3]。

富含 Gln 的肽类化合物稳定,易于溶解,且只有 N 末端的 Gln 才能转变成焦谷氨酸^[4],因此 Gln 肽可作为游离态 Gln 的理想替代品。已有研究^[5]证实 Gln 肽对预防大鼠肝肠器官损伤有积极作用。此外,一些研究也报道了 KGF^[6]、IGF-I^[7]、乳清衍生长因子^[8]和 ω -3 脂肪酸^[9] 等对肠粘膜改善的潜在作用。然而,这些化合物(包括化学合成肽)由于成本较高,在实际应用中受到限制^[10]。

谷朊粉是小麦淀粉加工的副产品。近年来,随着小麦淀粉加工产业的发展,全世界谷朊粉年产量已达 100 万 t^[11]。虽然谷朊粉在欧洲和北美被报道为一种常见的食物过敏原,但在大多数亚洲国家由于其低患病率仍被广泛用作食品原料^[12]。天然的谷朊粉表现出独特的粘弹性,在过去主要用于面包行业面粉的品质改良。酶解可有效地提高谷朊粉的生物利用率和功能特性^[13-15]。由于其低成本以及高 Gln 含量(约 400 mg/g·蛋白),可用来生产肠内营养肽来作为 Gln 的理想替代品^[13]。目前为止,谷朊粉水解物的多种生理功能已被报道^[16]。

已有研究^[17]表明,采用 molsin 酶和 actinase 酶水解谷朊粉得到的小麦低聚肽能有效抵抗化疗诱发的大鼠小肠炎症。碱性蛋白酶和复合蛋白酶水解谷朊粉得到的小麦肽对小鼠小肠炎症有明显的修复作用^[18]。本实验室前期研究^[19]指出,由胰蛋白酶一步酶解法所制备的谷朊粉水解产物中 Gln 含量高达 21.4%,具有调节溃疡性结肠炎的作用。然而,该水解物对小肠炎症是否具有类似的功效还未见报道。

氨甲蝶呤 (MTX) 是治疗癌症的化疗药物之一,常见副作用是粘膜损伤。最近研究^[20]表明,MTX 会使小肠隐窝细胞的增殖受到抑制,由化疗导致的大鼠小肠上皮损伤能通过绒毛和隐窝的高度以及绒毛状态来鉴定。有报道^[21]指出, Gln 对 MTX 诱导的小肠粘膜损伤有一定修复作用。本试验拟采用富含 Gln 的谷朊粉胰蛋白酶水解物 (WGH),通过 MTX 诱导的 Wistar 大鼠小肠炎模型,探讨 WGH 对大鼠小肠炎的调节作用,旨在挖掘谷朊粉的潜在利用价值,为小麦

基金项目:农业部“引进国际先进农业科学技术”项目(编号:2016-X31);农业部公益性行业(农业)科研专项(编号:201303071);国家自然科学基金项目(编号:31571768)

作者简介:严斌,男,中国农业科学院农产品加工研究所读硕士研究生。

通信作者:周素梅(1971-),女,中国农业科学院农产品加工研究所研究员,博士。E-mail:zhousumei@caas.cn

收稿日期:2016-10-24

肽产品的开发应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

谷胱甘肽(GSH)水合物:实验室自制(蛋白含量86.83%,Gln含量21.4%),酶解反应条件参照文献[19];

胰蛋白酶:酶活250 U/g,北京鸿润宝顺科技有限公司;

雄性Wistar大鼠:SPF级,(200±20)g,北京维通利华实验动物技术有限公司;

标准鼠粮:含谷氨酸及谷氨酰胺约3%,含玉米淀粉40%,酪蛋白20%,大豆油7%,纤维素5%等,北京华阜康生物科技股份有限公司;

谷胱甘肽(GSH)试剂盒:南京建成生物工程研究所;

大鼠二胺氧化酶(DAO)ELISA检测试剂盒:美国R&D公司;

组织基因组DNA提取试剂盒:北京天根生化科技有限公司;

分析天平:T-214型,北京市赛多利斯仪器系统有限公司;

凯氏定氮仪:Kieltec Analysister型,丹麦Foss公司;

紫外可见分光光度计:TU-1900型,北京普析通用仪器有限公司;

全自动酶标仪:BIO-RAD 680型,美国BIO-RAD公司;

高效液相色谱仪:1200型,美国安捷伦公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 将大鼠饲养于12 h灯照/黑暗交替,温度(22±2)℃,湿度(55±5)%的环境下,标准鼠粮和水充足。在适应环境4 d后,称重并随机分为3组:正常组(CONTR组)、模型组(MTX组)、样品组(MTX-WGH组),每组10只。给MTX组和MTX-WGH组大鼠连续4 d腹腔注射MTX药物(3.5 mg/kg体重),造成小肠炎,同时给CONTR组大鼠每天注射2.5 mL生理盐水,另外MTX-WGH组大鼠每天灌胃WGH(4.35 g/kg体重)。第5天处死大鼠,进行相关指标测定。

1.2.2 小肠粘膜含量的测定 处死大鼠后取出小肠,从盲肠往上1 cm处剪取小肠1 cm,用于常规石蜡包埋切片,然后再向上剪取8 cm,经冰盐水漂洗滤干后,用玻片刮取粘膜组织,称重,于-80℃下保存。

1.2.3 小肠粘膜组织形态的观察和绒毛高度、隐窝深度的测定 取小肠1 cm浸泡于10%甲醛溶液,石蜡包埋、切片,进行常规HE染色。利用光学显微镜观察小肠粘膜组织形态,采用医学图像处理系统分析软件对绒毛高度和隐窝深度进行测量。

1.2.4 小肠粘膜蛋白含量的测定 将小肠粘膜组织按1:9的质量比用生理盐水稀释成10%组织匀浆,采用Lorry法测定蛋白含量。

1.2.5 小肠粘膜DNA含量的测定 采用组织基因组DNA提取试剂盒测定小肠粘膜DNA含量。

1.2.6 小肠粘膜谷胱甘肽(GSH)含量的测定 取10%小肠

组织匀浆的上清液,采用南京建成GSH试剂盒测定小肠粘膜GSH含量。

1.2.7 血浆二胺氧化酶(DAO)含量的测定 采用大鼠二胺氧化酶ELISA检测试剂盒测定血浆DAO含量。

1.2.8 数据处理与分析 所得数据均以 $X \pm SD$ 表示,采用Microsoft Excel进行数据整理,用单因素方差分析进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 小肠粘膜组织形态

小肠粘膜组织形态见图1。CONTR组大鼠的小肠粘膜组织无明显的病理学变化,小肠绒毛结构清晰,排列整齐;MTX组大鼠的小肠粘膜损伤严重,小肠绒毛明显水肿,肠壁充血,结构破坏,表明MTX导致了大鼠小肠上皮的损伤;与MTX组大鼠相比,MTX-WGH组大鼠小肠粘膜损伤较轻,结构较清晰,排列较整齐。此结果与Gln修复MTX诱导的小肠粘膜损伤^[21]现象相似,由此说明WGH中的Gln肽对小肠炎大鼠粘膜结构损伤也有明显改善作用。

2.2 小肠粘膜的重量

小肠粘膜不仅在营养物质的消化吸收中扮演重要角色,同时是小肠抵御外界抗原和致病菌的有效屏障。由图2可知,与CONTR组相比,MTX组大鼠小肠粘膜重量显著减低($P < 0.05$),这是由于MTX导致小肠上皮结构破坏,部分粘

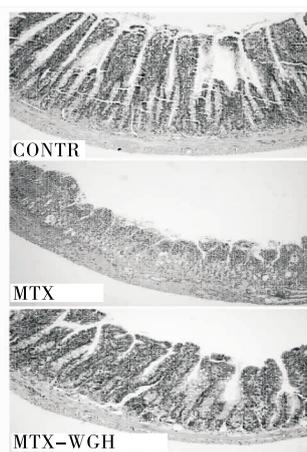


图1 小肠微观切片

Figure 1 Microscopic section of small intestinal (100×)

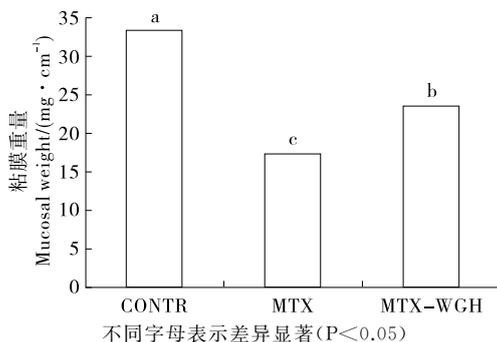


图2 小肠粘膜重量

Figure 2 Mucosal weight of small intestinal

膜脱落所致;而 MTX-WGH 组大鼠小肠粘膜重量显著高于 MTX 组($P<0.05$),说明 WGH 的摄入减轻了肠道炎症大鼠小肠粘膜的脱落,这与 Gln 肽改善其粘膜结构有关,小肠上皮损伤程度得到有效改善,机体抵抗外界抗原的能力得到提高。

2.3 小肠绒毛高度

小肠是机体吸收和转运营养物质的主要场所,小肠绒毛高度的缩短会使小肠吸收营养物质的能力下降^[22]。由图 3 可知,与 CONTR 组相比,MTX 组大鼠小肠绒毛高度明显缩短($P<0.05$),降低了小肠吸收营养物质的能力;而 MTX-WGH 组大鼠绒毛高度与 MTX 组相比有明显增加($P<0.05$),WGH 的摄入提高了小肠炎大鼠吸收营养物质的能力,改善了大鼠因 MTX 导致的小肠炎症状。

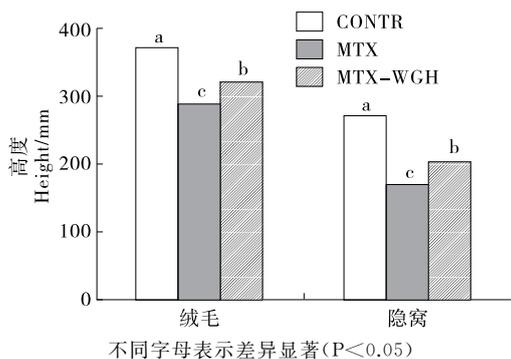


图 3 小肠绒毛和隐窝高度

Figure 3 Villus and crypt height of small intestinal

2.4 小肠隐窝深度

小肠隐窝细胞在粘膜修复机制和维持小肠粘膜完整性上起着关键性作用。小肠隐窝深度反映了肠上皮细胞的生成率,与小肠健康程度直接相关^[22]。由图 3 可知,MTX 组大鼠隐窝深度较 CONTR 组相比明显变浅($P<0.05$),肠上皮细胞的生成率明显降低;而 MTX-WGH 组大鼠隐窝深度明显高于 MTX 组($P<0.05$),WGH 的摄入缓解了 MTX 导致的小肠隐窝深度降低,提高了大鼠肠上皮细胞的生成率。

2.5 小肠粘膜的蛋白含量

小肠粘膜中的蛋白不仅维持着小肠粘膜的结构,还与粘膜组织的生理生化活动密切相关。由图 4 可知,MTX 组大

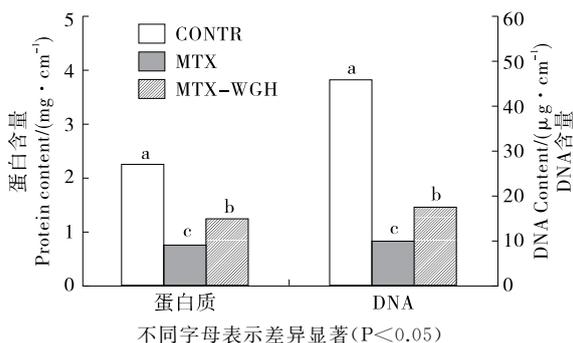


图 4 小肠粘膜蛋白和 DNA 含量

Figure 4 Protein and DNA content of small intestinal mucosa

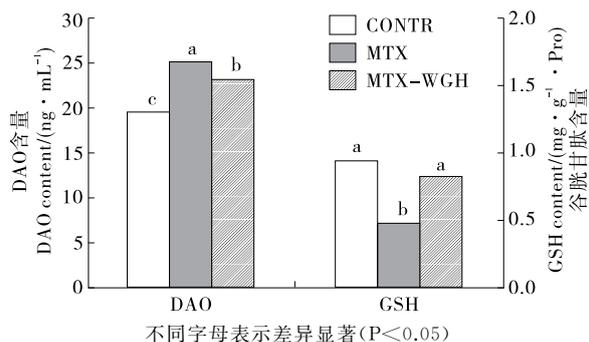
鼠小肠粘膜的蛋白含量显著低于 CONTR 组($P<0.05$);而 MTX-WGH 组大鼠小肠粘膜的蛋白含量与 MTX 组相比有显著提高($P<0.05$)。Gln 能为组织蛋白的合成提供氮源,WGH 的摄入尤其是其所含的 Gln 肽不仅缓解了小肠炎大鼠小肠粘膜结构的破坏,同时促进了其粘膜组织蛋白的合成。

2.6 小肠粘膜的 DNA 含量

Gln 是肠粘膜的主要能源物质及嘌呤合成的氮源供体,为 DNA 的合成提供了物质基础。Gln 由于提供了 DNA 复制的能量和核苷酸碱基而有助于肠道细胞结构和功能的维持^[23]。由图 4 可知,与 CONTR 组相比,MTX 组大鼠的小肠粘膜 DNA 含量显著降低($P<0.05$);而 MTX-WGH 组大鼠的小肠粘膜 DNA 含量与 MTX 组相比有明显提高($P<0.05$)。WGH 中的 Gln 肽促进了大鼠粘膜组织 DNA 的合成,缓解了大鼠因 MTX 导致粘膜 DNA 含量降低的现象。

2.7 小肠粘膜的 GSH 含量

GSH 是组织中主要的非蛋白类含硫基化合物,参与自由基和脂质过氧化物的清除^[24]。Gln 是谷胱甘肽合成的前体物质。研究^[25]表明,肠外营养补充 Gln 能够增加大鼠肠缺血再灌注模型的粘膜 GSH 水平。由图 5 可知,MTX 组大鼠的小肠粘膜 GSH 含量与 CONTR 组相比显著降低($P<0.05$);与 MTX 组相比,MTX-WGH 组大鼠小肠粘膜 GSH 含量有明显提高($P<0.05$),达到正常水平。Gln 肽促进了粘膜组织中 GSH 的合成,提高了小肠炎大鼠肠黏膜组织的抗氧化能力。



不同字母表示差异显著($P<0.05$)

图 5 血浆 DAO 含量和小肠粘膜 GSH 含量

Figure 5 DAO content in plasma and GSH content of small intestinal mucosa

2.8 血浆中 DAO 含量

DAO 是哺乳动物肠粘膜上皮细胞中具有高度活性的细胞内酶。据报道^[26],肠损伤会导致细胞中 DAO 的释放增加,然后促进其进入血液,增加血液中 DAO 含量。DAO 含量的变化与肠道粘膜屏障功能受损情况密切相关,能作为反映肠损伤的敏感指标^[27]。由图 5 可知,MTX 显著提高了大鼠血浆中 DAO 水平($P<0.05$),进一步表明 MTX 导致了大鼠肠粘膜屏障功能受到了严重损伤;而 MTX-WGH 组与 MTX 组相比大鼠血浆 DAO 水平显著降低($P<0.05$),表明 WGH 的摄入使大鼠肠粘膜屏障功能得到一定保护,使其受 MTX 的损伤得到有效缓解。

3 结论

本试验研究了谷朊粉胰蛋白酶水解物对 MTX 诱导的大鼠小肠炎的调节作用。结果表明,谷朊粉胰蛋白酶水解物对 MTX 诱导的小肠炎大鼠粘膜组织形态和生理生化指标具有明显的改善作用,能减轻粘膜损伤程度,促进粘膜炎症的恢复,该机制可能与水解物中的 Gln 肽促进粘膜细胞增殖以及提高小肠粘膜谷胱甘肽含量有关。谷朊粉经胰蛋白酶水解后可产生具有肠道活性的肽段,但其活性成分和作用机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] OWARI M, WASA M, OUE T, et al. Glutamine prevents intestinal mucosal injury induced by cyclophosphamide in rats [J]. *Pediatric Surgery International*, 2012, 28(3): 299-303.
- [2] COEFFIER M, DECHELOTTE P. The role of glutamine in intensive care unit patients: Mechanisms of action and clinical outcome [J]. *Nutrition Reviews*, 2005, 63(2): 65-69.
- [3] 马洪龙, 韩飞, 李爱科, 等. 谷氨酰胺及其结合肽的研究进展 [J]. *粮油食品科技*, 2014, 22(3): 76-81.
- [4] XIE Yan-li, LIANG Xin-hong, WEI Min, et al. Optimization of glutamine peptide production from soybean meal and analysis of molecular weight distribution of hydrolysates [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(6): 7 483-7 495.
- [5] JIA Chang-jun, DAI Chao-liu, ZHANG Xu, et al. Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(9): 1 373-1 378.
- [6] FARRELL C L, REX K L, CHEN Jian-ning, et al. The effects of keratinocyte growth factor in preclinical models of mucositis [J]. *Cell Proliferation*, 2002, 35(Suppl 1): 78-85.
- [7] HOWARTH G S, COOL J C, BOURNE A J, et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates regrowth of the damaged intestine in rats, when administered following, but not concurrent with, methotrexate [J]. *Growth Factors*, 1998, 15(4): 279-292.
- [8] TRAN C D, HOWARTH G S, COYLE P, et al. Dietary supplementation with zinc and a growth factor extract derived from bovine cheese whey improves methotrexate-damaged rat intestine [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, 77(5): 1 296-1 303.
- [9] SUN Ming-li, PANG Lei, JU Xue-peng, et al. Attenuating effects of omega-3 fatty acids (Omegaven) on irradiation-induced intestinal injury in mice [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 64(2): 275-280.
- [10] YAGASAKI M, HASHIMOTO S. Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(1): 13-22.
- [11] 顾国达, 尹靖华. 全球中长期粮食供需趋势分析 [J]. *华中农业大学学报: 社会科学版*, 2014(6): 6-16.
- [12] LEE A J, THALAYASINGAM M, LEE B W. Food allergy in Asia; how does it compare? [J]. *Asia Pacific Allergy*, 2013, 3(1): 3.
- [13] QIU Chao-ying, SUN Wei-zheng, CUI Chun, et al. Effect of citric acid deamidation on in vitro digestibility and antioxidant properties of wheat gluten [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2 772-2 778.
- [14] WANG Jin-shui, ZHAO Mou-ming, ZHAO Qiang-zhong, et al. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems [J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(4): 1 658-1 663.
- [15] CUI Chun, HU Qing-ling, REN Jiao-yan, et al. The effect of lactic acid bacteria fermentation on the antioxidant activity of wheat gluten pancreatin hydrolysates [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014, 49(4): 1 048-1 054.
- [16] KOIKAWA N, AOKI E, SUZUKI Y, et al. Wheat gluten hydrolysate affects race performance in the triathlon [J]. *Biomedical Reports*, 2013, 1(4): 646-650.
- [17] TANABE S, WATANABE M, ARAI S. Production of a high-glutamine oligopeptide fraction from gluten by enzymatic treatment and evaluation of its nutritional effect on the small intestine of rats [J]. *Journal of food biochemistry*, 1992, 16(4): 235-248.
- [18] 谢正飞, 王学东, 李彪, 等. 酵母水解物及小麦水解蛋白对小鼠小肠炎症修复作用的研究 [J]. *中国饲料*, 2015(23): 38-41.
- [19] 方颂平, 严斌, 朱本国, 等. 小麦面筋蛋白酶解物对小鼠溃疡性结肠炎的影响 [J]. *食品与机械*, 2016, 32(2): 124-127.
- [20] LEBLOND J, LE PESSOT F, HUBERT-BURON A, et al. Chemotherapy-induced mucositis is associated with changes in proteolytic pathways [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2008, 233(2): 219-228.
- [21] SUKHOTNIK I, MOGILNER J G, KARRY R, et al. Effect of oral glutamine on enterocyte turnover during methotrexate-induced mucositis in rats [J]. *Digestion*, 2009, 79(1): 5-13.
- [22] 刘秋东, 张中文, 刘风华, 等. 复方白头翁胶囊对腹泻犬小肠绒毛长度和隐窝深度的影响 [J]. *北京农学院学报*, 2011, 26(3): 38-40.
- [23] 谈定玉. 谷氨酰胺对危重患者肠道保护作用研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2005, 21(20): 2 345-2 347.
- [24] 李金敏, 贾海燕, 王俊杰, 等. 谷氨酰胺对溃疡性结肠炎小鼠结肠损伤的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2009, 25(2): 268-272.
- [25] TAZUKE Y, WASA M, SHIMIZU Y, et al. Alanyl-glutamine-supplemented parenteral nutrition prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Journal of Parenteral Nutrition*, 2003, 27(2): 110-115.
- [26] MORIYAMA K, KOUCHI Y, MORINAGA H, et al. Diamine oxidase, a plasma biomarker in rats to GI tract toxicity of oral fluorouracil anti-cancer drugs [J]. *Toxicology*, 2006, 217(2/3): 233-239.
- [27] 张妮, 朱保权, 张庆立, 等. 危重症患儿血浆 D-乳酸水平和二胺氧化酶活性与胃肠功能障碍关系研究 [J]. *临床儿科杂志*, 2006, 24(10): 794-796.