

蛋白质的消化吸收及其功能评述

庞广昌, 陈庆森, 胡志和, 解军波

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘要: 蛋白质及其肽类食品, 不仅是人体重要的营养物质, 而且具有重要的健康功能。大量研究表明, 单独食用蛋白质或氨基酸, 尽管其氨基酸组成是均衡的, 也不如食用酶解肽, 这说明蛋白质经过酶解不仅可以为机体提供氨基酸营养, 还可以产生多种功能肽, 对机体健康发挥重要功能。但是, 机体是一个自我调节、自我更新和自稳定系统, 它的免疫防御系统不允许异己分子的生物大分子进入机体, 特别是蛋白质或多肽, 因为它们有可能是入侵者。即使少量蛋白分子可以偶尔进入体内, 那主要是因为机体需要从肠道中采集样品, 以便认识周围的物质世界, 从而针对它们提前构成其获得性免疫防御系统。进入体内的蛋白质或多肽并不是为了让他们发挥功能, 而是很快被处理和酶解, 由抗原提呈细胞将其抗原决定簇提交给T细胞, 由微皱褶(M)细胞负责将完整蛋白传递给B细胞作为抗原表位, 激活B细胞, 从而构成机体的获得性免疫的基础。本文经过对相关研究成果的综合分析认为: 酶解肽主要是通过和胃肠系统中的微生物和受体相互作用发挥其生物功能。另外, 和氨基酸相比, 短肽, 特别是二、三肽更容易被其运载体(PepT1)吸收, 而且效率更高, 更有利于机体中不同组织和器官的利用, 从而构成氨基酸营养吸收和利用的基础, 同时对机体营养和吸收控制发挥重要的调节作用。通过对蛋白质的消化和吸收及其功能的评述试图为肽类功能性食品开发提供理论依据和参考。

关键词: 酶解肽; 肽的吸收; 肽类运载体(PepT1); 生物活性肽; 功能性食品; 专用食品

Bioactive Peptides: Absorption, Utilization and Functionality

PANG Guang-chang, CHEN Qing-sen, HU Zhi-he, XIE Jun-bo

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science,
Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Dietary proteins and their enzymolytic products exert a wide range of nutritional, functional and biological activities for human health. A large number of data showed that protein hydrolytic products are absorbed and transited more effectively than intact protein or free amino acids alone, supporting the notion that digestion is important for its uptake and circulation even if the amino acid compositions are exactly balanced. Furthermore, when the protein was administered orally as a hydrolysate instead of in an intact form or free amino acid, the healthy functions can be observed, suggesting that bioactive peptides can be liberated by proteolytic enzymes. However, the body is a self-regulatory, self-renew, and self-stabilization system, so the immune defense system never allows any dissident biomacromolecules, especially diet proteins and peptides to be taken in, for that maybe some invaders. Even if a small amount of intact proteins are occasionally taken up, which is due to the molecule structure recognition of substances around by sampling from intestinal tract. The major functions are to establish as the adaptive immunity defense system for specific antigens. After absorbed, these peptides will be rapidly hydrolyzed and processed by antigen presenting cells (APC) to present the antigenic determinants to Th cells. The membranous microfold (M) cells can bring intact protein to B cells as antigen epitopes for antibody class switching and secreting. Base on these investigations, diet proteins and corresponding enzymolytic peptides mainly offer their functions by the interaction with gastrointestinal mucosal systems and intestinal microorganisms. On the other hand, the accumulated data have demonstrated that transport of di- and tripeptides is a faster and effective route of uptake per unit of time than their free AA or intact protein by intestinal peptide transporter, PepT1. Furthermore, the di- and tripeptides are more efficiently than free AA or intact protein with the same respective AA compositions, and these peptides may be transported by circulation to different tissues or organs and used for different purpose more efficiently. This review will also provide a theoretical basis for the research and exploitation of bioactive peptides for special foods.

收稿日期: 2013-03-11

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD29B07); 天津市科技支撑计划项目(10ZCKFNC01800)

作者简介: 庞广昌(1956—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品生物技术和免疫信号通路研究。E-mail: pgc@tjcu.edu.cn

Key words: enzymolytic peptide; peptide absorption; peptide transporter (PepT1); bioactive peptides; functional food; special food

中图分类号: R151.41

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)09-0375-17

doi:10.7506/spkx1002-6630-201309074

生物活性肽是功能性食品研究的焦点领域,这主要是因为大多数生物功能都是由蛋白质或者多肽行使。而且,现代文明病(现代代谢综合征,或现代生活方式症)的发展和蔓延,使人们谈糖色变、谈脂肪色变,唯独蛋白质,似乎它们从来就是正确生物功能的执行者,从来没有人怀疑它会有什么副作用,这可能就是生物活性肽受到现代人和科学工作者追捧的主要原因。诚然,蛋白质属于大营养,其酶解和消化终产物-氨基酸是机体合成自身所需蛋白质的原料,特别是必需(和半必需)氨基酸,缺少就会患营养缺陷型疾病。但是正因为蛋白质是主要生物功能的执行者,生物必须自主合成蛋白质和多肽,而不能接受其他与自己不同的蛋白质和多肽,以保证自身的稳定性和独立性。而且,包括病毒在内的所有生物,都是由不同的蛋白质构成,允许异源蛋白质进入体内就意味着失去了独立性,默认其他生物对自己的入侵。所以,科学家一直把食物蛋白质作为营养看待,认为食入后都要经过胃肠道消化成氨基酸才能被吸收。如果从这个角度来认识食物蛋白质,只要其氨基酸构成合理(平衡),所有蛋白质的食用价值都应该是一样的,只要我们给机体提供复合、平衡的氨基酸,机体就应该能够很好地生存。但是,大量事实告诉我们,即使有充足、平衡的氨基酸,生物仍然不能很好地生存!这似乎又告诉我们:食物蛋白没有只提供平衡的营养膳食那么简单,换言之,食物蛋白质不仅仅是为机体提供基本的氨基酸营养,应该还有重要功能。于是产生了一个最基本的问题:食物蛋白质发挥什么功能?如何发挥功能?

早在20世纪70年代, Gardner等^[1]就证明了,肠道把短肽吸收进血液循环中是普遍存在的,不仅如此,其吸收速度甚至超过游离氨基酸。这无疑为我们解释短肽可以通过被机体选择性吸收发挥功能提供了重要依据。但是,后来的大量实验又证明:负责吸收和转运这些二肽和三肽的蛋白质是一个PepT家族,其中只有PepT1分布在肠道和肾部;PepT2分布在肾、肺、脑、乳腺和支气管上皮;hPTR3分布在肺、脾、胸腺、脑、肝、肾上腺和心脏;PTR4则分布在脑、视网膜和胎盘。它们显然主要是以二肽和三肽的形式运送氨基酸营养,这些短肽的命运是被体内或细胞内的酶系统降解为氨基酸作为营养^[2],就象葡萄糖被吸收到体内,再通过血液循环运送到各个器官和组织一样。事实上,PepT1可以传递所有400种二肽和8000种三肽^[3],说明其不存在选择性和特异性,从而间接证明其主要功能是氨基酸营养的吸收和控制,而不

是功能性短肽发挥功能。问题转了一圈似乎又回到了原点:食物蛋白质和肽类即使被消化成二肽或三肽吸收和转运,并不能证明其发挥功能,那么到底是通过什么途径发挥功能的呢?另一个观点是:尽管多数蛋白质食物都被酶解为氨基酸或短肽吸收,但是仍然会有小部分蛋白质或多肽被完整吸收,也许正是由于它们发挥了重要生物功能。

已经有大量研究表明,通过哺乳,母亲可以将自己的获得性免疫能力,如免疫球蛋白(IgG)传递给婴、幼儿,口服疫苗也正是因为口服抗原的吸收才可能产生对该抗原的特异性免疫。现在日益引起全世界,特别是发达国家重视的食物过敏问题本身也说明了食物蛋白可能被完整地吸收到体内。事实上,研究证明机体也许正是通过饮食认识了周围的物质世界,从而获得足够多的对周围物质世界的免疫和识别能力。但是,研究同时证明这些蛋白质或多肽的吸收是通过一种微皱褶细胞(M-cell)的吞噬和处理作用来实现的,它是肠道免疫识别异物抗原表位的基础,也是食物过敏、黏膜免疫防御和食源性病原菌感染与致病的基础。可见它很难成为食物蛋白或者多肽发挥生物功能的主要依据。但是,研究结果一再证明,食物蛋白或多肽的确不只为机体提供氨基酸或短肽营养,而是发挥重要的生物功能,例如蜂王之所以是蜂王完全是因为她是吃蜂王浆长大的,是因为蜂王浆中的一种57kD的蛋白质(royalactin, RoI或E-royalactin, ERoI)的作用改变了蜂王的信号通路,并通过这些信号改变了她的染色体,改变了表观遗传性状^[4]。这也正是本文要重点讨论的问题。

1 体内或体外酶解蛋白质可以获得多种生物活性肽

笔者曾经发表文章提出^[5]:营养和贮藏蛋白作为食物蛋白的主要来源,可能蕴含着多种功能序列,所以适当的酶切或消化可以把它释放出来。其主要理论依据是:营养和贮藏蛋白可能起源于功能蛋白结构域的不同组合,因为在生物进化的历程中,越原始的生物越需要功能蛋白(肽)的简约化,使其有限的编码能力尽量编码生存和繁殖所必需的功能蛋白(酶)。随着生物从简单到复杂的进化,特别是高等动、植物,它们需要为后代提供充足的营养以保证繁衍生息,所以才进化出营养和贮藏蛋白。而这些蛋白质并不是凭空制造出来的,它应该来自功能蛋白或结构域的组合。从生物进化和适应的角度来

推断, 这些营养蛋白如果能在为后代提供良好的营养需求之外, 也能够提供一些其适应环境所必需的功能多肽当然更具有生存优势。根据这些原理我们不难推测, 构成营养和贮藏蛋白的结构域应该具有如下功能: 抗微生物、抗氧化等防御功能; 各种微量元素、矿物质的结合与传递功能; 后代的发育、分化和信号传递功能等。

1.1 乳源生物活性肽

近年来, 已经有大量研究集中在酶解营养和贮藏蛋白释放多种功能的生物活性肽方面。其中最多的研究则聚焦在乳源生物活性肽的研究与开发上。乳品是特殊食品, 它是满足婴幼儿营养、发育、分化、提高免疫力等所必需的。这方面已经有大量研究结果和综述性文章发表^[6-7], 在此不再作详细综述。但是需要强调: 既然乳是哺乳动物为其婴、幼儿提供的专用食品, 是否也能作为成年人群的最佳功能性食品是值得我们深入研究的一个重要课题, 因为所有的哺乳动物都不可能一生靠哺乳生存, 更不能因为其对婴、幼儿成长和发育有益, 而推断其对成年人也具有健康功能。需要对其功能成分, 特别是多肽, 包括酪蛋白酶解肽的健康功能进行系统研究, 特别是体内研究才能科学运用和开发其功能性食品。很显然, 乳的功能主要是和婴幼儿发育有关, 其中的乳铁蛋白及其酶解产物-乳铁素、免疫球蛋白、先天免疫成分、各种细胞因子等主要用于婴、幼儿发育、分化和免疫防御功能。乳的特异性成分-酪蛋白, 曾经被认为只是全营养(高营养价)蛋白, 但是近年的研究表明, 通过适当酶解可以释放出多种生物活性肽, 而且其功能非常广泛, 特别是刺激婴幼儿的发育、分化和免疫预防功能。例如, 酶解酪蛋白可以释放出多种免疫调节肽、抗微生物肽等, 可以提高机体的免疫与防御能力; 释放出阿片肽类, 可以抗疲劳、改善睡眠、给婴幼儿安慰感, 同时可以调节免疫, 不产生依赖性; 释放出矿物质载体肽(例如: 酪蛋白磷酸肽, 亦即CPPs)可以促进钙、铁、镁、锌等重要矿物质的吸收, 对婴、幼儿骨骼发育具有重要作用; 释放出抗血压升高肽, 用来抑制血压的过渡升高; 释放出酪蛋白糖巨肽发挥抗感冒、控制体质量、调节免疫等多种功能。

1.2 卵源生物活性肽

和乳相似, 卵也是重要的生物活性肽资源, 其原因是卵必须为受精卵细胞发育和分化准备好所有的营养、分化和发育条件。在卵生动物孵化过程中, 不仅需要足够的全营养, 而且随着其代谢过程, 应该能够通过酶解其乳白蛋白、乳球蛋白、卵黄等为其发育和分化提供必要的营养和生物活性成分, 特别是生物活性肽。除此之外, 在卵生动物发育早期, 免疫系统尚未健全, 所以其先天免疫和获得性免疫的发育、分化和调节是至关重要的。已经有大量卵源生物活性肽开发出来, 特别是通过

酶解卵蛋白释放生物活性肽方面已经取得了大量研究结果, 并有不少相关的综述性文章发表。

1.3 其他动物源生物活性肽

其他动物, 特别是水生生物蛋白, 经过适当的酶解也能释放出多种生物活性肽, 例如抗微生物肽、抗肿瘤肽、抗血压升高肽、抗氧化肽等。由于水生生物特殊的生态环境, 不同的生物个体共同处在一个水域中, 互相之间的生存竞争发生在水溶液中, 其相互作用也需要在水中进行。这种特殊的相互关系可能进化出很多生物活性成分, 特别是食物活性肽。其中最典型的是抗微生物肽, 这是几乎所有生物所必需的, 特别是水生生物和生活在复杂、肮脏的环境中的动物生存和繁殖所必需的。除此之外, 具有毒性作用的成分, 肽类也是生存竞争的必要条件。近年来, 已经有大量的, 各种功能的生物活性肽通过酶解释放出来, 其中抗微生物肽、毒素、神经活性肽、氧化还原调节和风味肽最具代表性。

1.4 植物源生物活性肽

植物的种子是重要的种质资源, 是植物抗逆、过冬和繁衍生息的基础。和动物的卵相似, 为了保证其胚胎的生存、生长和发育, 必需为其子代贮存足够多的营养和活性成分。已经有不少酶解种子及其贮藏蛋白释放生物活性肽的报道。比较集中的研究成果在大豆蛋白酶解肽方面。大豆的特殊性并不仅仅在于其作为重要的植物蛋白资源, 还在于其特殊的生理代谢。豆科植物本身就是一个和根瘤菌形成彼此互惠的共生体系, 不仅如此, 固氮菌固氮所需要的厌氧环境和大豆本身所需要的好氧环境能够实现很好的结合也是豆科植物的最大特性。这个特性需要解决一系列代谢问题。推测恰恰是这些特殊的功能要求导致了大豆蛋白及其酶解肽具有重要的生物功能。近年来, 已经报道了很多来自大豆蛋白的生物活性肽, 这些不仅使大豆蛋白本身成为人类重要的植物类食品蛋白资源, 而且作为功能肽的重要来源。从大豆蛋白酶解释放的生物活性肽以抗肿瘤肽和抗血压升高肽最具特色, 与此同时, 大豆蛋白已经成为当今最受青睐的具保健功能的蛋白食品之一。

2 食源性生物活性肽的主要功能

已经报道了多种生物活性肽, 其功能可能涉及几乎所有生理功能, 其分类也多种多样, 很不统一, 互相交叉甚至矛盾, 急需学术界通过讨论进行规范。有根据其生理活性进行分类的, 如抗微生物肽、阿片肽、抗氧化肽等; 也有根据人类的感受进行分类的, 如鲜味肽、咸味肽、甜味肽或者呈味肽等; 还有根据其健康功能(多数是推测)进行分类的, 如: 抗血压升高肽、抗肿瘤肽、抗血栓形成肽等^[6]。这里仅对有代表性的食源性生物活性肽及与健康的关系进行简单的评述^[8]。

2.1 抗血压升高肽(antihypertensive peptides)

抗血压升高肽也有人称为降压肽,但是笔者认为按照英文翻译比较准确,因为这类肽只有在血压升高时才会通过抑制血管紧张素转化酶的作用抗血压升高,而不是直接降血压。血压的生理调节(physiological regulation of blood pressure)是通过肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)和激肽-一氧化氮(the kinin NO)系统,一个重要的神经内分泌系统。RAS包括血管紧张素原(angiotensinogen)通过高血压蛋白酶原的蛋白酶水解激活转化为血管紧张素-I(angiotensin, AT-I)。该反应是RAS途径的第一个关键性调节步骤。AT-I接着在羧端组氨酸残基处由血管紧张素-I转化酶(angiotensin I-converting enzyme, ACE)切割成为活化状态的AT-II。AT-II是一个血管收缩因子通过结合到相应的受体上发挥作用。这种受体分布在机体的所有组织,从而引起生理上的级联放大作用,导致血管收缩,血压升高。但是过高的AT-II水平可能会产生严重的血管收缩,从而使血管的收缩和舒张压升高到非正常水平。此外,激肽-NO系统则涉及到血管舒缓激肽(bradykinin)合成与激活,它可以通过细胞内钙离子浓度的提高导致一氧化氮合成酶(nitric oxide synthases, NOS)的激活,产生NO,促进血管舒张,从而具有抗血压升高的作用。ACE可以降解缓激肽,所以增加ACE可以导致双重作用:防止血管舒张,激活血管收缩。可见通过ACE的抑作用可以实现抗血压升高药物或食品的初步筛选^[9]。另外,直接抑制高血压蛋白酶(renin),防止AT-I的合成并转化为AT-II可能具有比ACE抑制剂更直接的抗血压升高的作用。称此途径为ACE-非依赖性补救糜酶-催化途径(ACE-independent alternative chymase-catalyzed pathway)^[10]。需要强调的是:这些方法的特点是可以实现抗血压升高肽的高通量的初步筛选,但这仅仅是体外实验,和体内实验是两回事。因为机体血压升高的过程非常复杂,原因更加复杂,有关高血压的病因学问题仍然不断困惑着我们。

2.1.1 ACE-抑制食物蛋白酶解肽

通过ACE抑制活性筛选RAS调节肽的创建性工作是在蛇(*Bothrops jararaca*)毒中作出的^[11],之后,很快得到了广泛关注,迅速用来进行食源性抗血压升高肽的筛选研究。已经先后在植物、动物、微生物等非常广泛的食物资源中筛选出多种此类生物活性肽。当然研究最多的还是集中在乳、鱼、蛋、大豆蛋白。与此同时,对其分离方法^[12]、氨基酸序列和活性的关系、半抑制浓度、构效关系等也有大量报道^[13]。

2.1.2 高血压蛋白酶-抑制食源性酶解肽

最近的研究已经证明在ACE抑制的基础上进一步通过高血压蛋白酶的抑制活性可以筛选到系列食源性抗血压升高肽,而且证明其治疗高血压的潜力明显好于仅

仅通过ACE抑制所筛选的肽。最初的报道是通过蛋白酶水解亚麻仁蛋白后,进行超滤获得低分子质量组分,然后再进行高血压原酶活性抑制筛选,获得了一个组分,其 IC_{50} 达到 $1.22\sim 2.81\text{mg/mL}$ ^[14]。该组分再经过ACE抑制筛选也表现出较低的半抑制质量浓度。这种具有双重抑制活性的组分可以潜在地增加抗血压升高作用。之后,其他相似的研究,如酶解豌豆和火麻仁种子蛋白所进行的抗血压升高肽的双重筛选研究^[15]获得高血压蛋白酶半抑制质量浓度(IC_{50})达到 0.81mg/mL , ACE的 IC_{50} 达到 0.67mg/mL 。此外, Li等^[16]从豌豆蛋白酶解肽中分离到3种二肽: Ile-Arg, Lys-Phe和Glu-Phe,它们分别具有较弱的半抑制活性(IC_{50} : 9.2、17.8、22.6mmol/L),但是其组合在一起的活性则很高,证明它们具有增效作用。与此同时,科学家也进行了大量构效关系、序列与活性关系的研究^[17]。

2.1.3 食源性抗血压升高肽的体内研究

只有通过食用才是真正意义上的食品。所以笔者认为体外实验的参考价值十分有限,对于药物或者纯粹的基础理论研究只是不得已而为之,但是对于食品科学研究,只有体内实验才具有科学意义。体外的RAS酶抑制剂筛选方法为我们提供了一个高通量的离体筛选系统,但是只有经过体内实验研究才有一定的参考价值。近年来, ACE-和高血压蛋白酶抑制剂-大麻籽蛋白水解物诱导的对血压升高的抑制作用分别通过自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)实验得到了证明^[15]。早在1995年^[18],来自乳蛋白酶解的三肽: Ile-Pro-Pro和Val-Pro-Pro的实际降压作用也得到了动物实验验证。此外, 70个高血压的高加索人每天服用 7.5mg 的Ile-Pro-Pro,连续4周,其血压得到了明显控制^[19]。这些抗血压升高肽的作用可能与服用形式、剂量和时间长短以及遗传背景,特别是高血压的病因有复杂的关系。例如,也有研究表明,本来具有降压作用的乳源三肽在高血压前期患者服用后24h跟踪器血压变化并没有显著性改善^[20]。显然,跟踪检测血压变化所得到的结果可以为我们提供更可靠的材料。可见,食源性生物活性肽的抗血压升高作用可能通过多条途径,不仅仅是RAS酶活性。而且高血压的产生原因也异常复杂,包括饮食、体质、情绪和生理状态等因素都会影响血压,而现在的抗血压升高药物或食物筛选的体内实验也仅仅是通过高血压动物模型做出的,人为的高血压实验动物模型只能代表一种病因,对这种高血压有作用并不能表明对所有其他病因所引起的高血压都有作用。

2.2 食源性抗氧化肽

饮食中的抗氧化物可以为机体内源性酶和非酶抗氧化系统抵御氧化应激提供补充。虽然合成的抗氧化制剂已经被广泛用于食品工业中的食品保藏和贮运,但是食

源肽类可能为我们提供天然的抗氧化添加剂。其实蛋白酶解物早就被广泛用于食品和实验系统的保护作用,例如浓度越高的蛋白质稳定性也就越好,牛血清白蛋白常用作蛋白质,特别是抗体的封闭和保护剂。从生物化学角度,这些保护作用可能正是由于其抗氧化和众数作用。但是,对食源性抗氧化肽的系统研究则只有近年来才引起了学术界的关注。

植物和动物蛋白来源的抗氧化肽包括:豌豆、大豆、鱼类、亚麻籽、奶酪、乳清和蛋类。抗氧化肽的特性包括:清除反应性氧(reactive oxygen species, ROS)/自由基和抑制ROS诱导的生物大分子,如脂肪、蛋白质和DNA的氧化和损伤作用。食源性抗氧化肽对自由基的淬灭作用主要是通过参与单电子传递反应^[21],因此,丰富的可以传递电子的氨基酸侧链对于在生理条件下清除自由基,对于抗氧化肽的抗氧化能力有重要贡献。其他抗氧化机制可能包括:过渡金属螯合物的活性和铁的还原作用。事实上,氨基酸侧链中真正能发挥氧化还原作用的并不多,能够转移电子或金属离子的侧链也有限,所以包括蛋白质及其酶解肽对大分子的保护作用应该还有其他机制,如蛋白质及其酶解肽之间的相互作用所造成的空间位阻、由于其亲水作用所产生的水化层、疏水作用或亲脂作用所产生的膜样结构以及氢键、离子键、范德华力等物理化学性质可能都在其抗氧化和保护中发挥作用。

氨基酸侧链的组氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸和芳香族氨基酸都对食源性肽的抗氧化活性有贡献。疏水性氨基酸往往对抗氧化起重要的增强作用,因为它们可以增加抗氧化肽对细胞靶分子的亲和力,例如生物膜上的多不饱和脂肪链^[22]。但是,还不清楚这些抗氧化的氨基酸残基对食物酶解肽复合物的具体贡献,也不清楚这些酶解肽带正或负电荷的具体作用。含巯基的半胱氨酸也可以作为合成谷胱甘肽的前体,谷胱甘肽是一个普遍存在的细胞抗氧化三肽,具有保持系统的氧化还原状态,蛋白质的结构和功能维护等重要生物活性,因此在体内、外发挥重要的生理抗氧化防御作用^[23]。另外,食源性肽也可以通过诱导基因表达,通过细胞组分的变化来抵御氧化应激所产生的损伤作用。在内皮细胞中,一种从沙丁鱼肌肉蛋白制备的二肽Met-Tyr可以刺激血红蛋白加氧酶-1(heme oxygenase-1)和铁蛋白的表达,从而保护细胞免受氧化应激损伤^[24]。最近的研究表明,干酪素不同蛋白酶的水解物表现出不同的抗氧化活性,不依赖于其水解度,在人类T淋巴细胞中它可以增加细胞过氧化氢酶活性和还原型谷胱甘肽的量,但是对超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性没有作用^[25]。虽然干酪素水解物显示出人类T淋巴细胞的剂量依赖性减少,但是,低剂量仍然表现出适度的抗氧化作用。在D-半乳

糖-诱导的老化ICR小鼠中,口服水母胶原蛋白水解物可以诱导SOD的增加和谷胱甘肽过氧化物酶合成,并伴随血清和肝脏丙二醛(一种氧化应激标志物)的减少^[26]。虽然上述研究已经取得了一定的研究进展,但是除在食品保藏与加工过程中的应用外,作为保健食品的研究与应用还有很多问题需要解决,特别是体内实验和人体实验。在其作用机制方面也还是需要进行深入研究。

2.3 食源性钙调蛋白肽(food protein-derived calmodulin, CaM)

Ca-结合肽,亦即CaM,是一种遍在的带负电荷148个氨基酸残基(16.6kD)组成的Ca²⁺-结合蛋白,具有可以增加细胞内Ca²⁺的浓度等一系列重要特性^[27]。一些临床上十分重要的酶都需要Ca²⁺/CaM激活作用,包括:内皮和神经元细胞的一氧化氮合成酶(NOS)、环化核苷酸磷酸二酯酶-1(cyclic nucleotide phosphodiesterase-1, CaMPDE)、三磷酸腺苷酶(adenosine triphosphatase)、磷脂酶(phospholipase A2)、腺苷酸环化酶和蛋白激酶-II(protein kinase II)^[28]。很多天然的CaM结合蛋白和肽的氨基酸序列揭示出在钙结合位点存在着重复的带正电荷和疏水氨基酸^[29]。带正电荷侧链使得阳离子肽靠电荷作用结合钙,称为CaM结合因子^[30]。食源性阳离子肽也可以结合CaM,从而抑制CaM-依赖性酶活性。早期的工作是从酪蛋白酶解分离到的一种CaM结合肽^[31],对应 α_{s2} -酪蛋白的f164~179, f183~206, f183~207和f90~109片段,可以抑制CaMPDE活性,IC₅₀分别为38、6.9、1.1、1.0 μ mol/L,对未结合钙的PDE没有作用。在此基础上, α_{s2} -酪蛋白水解肽以及来源于其他蛋白质酶解的富含正电荷的CaM结合肽也得到了相关研究。Li等^[32]报道了酶解豌豆蛋白所获得的阳离子肽,并证明可以抑制CaM-依赖性蛋白激酶-II活性,为竞争性抑制。从碱性蛋白酶水解亚麻籽蛋白获得的2种阳离子肽也可以结合CaM,并可以抑制内皮和神经元细胞的NOS^[33],分别属于混合型和非竞争性抑制。此外,近来的研究还显示,来自蛋清溶菌酶的阳离子肽既可以抑制CaMPDE也可以抗氧化^[34]。

2.4 降血脂和降胆固醇肽

食物蛋白质酶解也可以释放具有降低胆固醇和血脂作用的肽。食源性降血脂和降胆固醇肽,这些蛋白质包括大豆蛋白^[35]、乳蛋白^[36]、荞麦蛋白^[37]、卵白蛋白^[38]和鱼类蛋白^[39]。然而,酶水解也可能导致抗降血脂肽的产生^[40]。大多数这方面的研究工作集中在大豆蛋白水解肽或水解液。

大豆蛋白水解肽的降胆固醇和降血脂作用的动物和人体实验室分别由Aoyama^[41]和Hori^[42]等用7S大豆球蛋白(β -conglycinin, β -伴大豆球蛋白)做出的。该蛋白的一个亚基可以强烈上调低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)受体表达,从而提高低密度脂蛋白的吸收和降解^[43]。

该肽负责激活作用的结构域已经鉴定来自 α -亚基, 并进行了序列测定^[44]。这是一种24个氨基酸残基构成的肽, 对应于 α -亚基的127~150序列, 对体外培养的Hep G2细胞可以通过增加LDL受体介导的LDL吸收调节胆固醇代谢平衡。此外, Cho等^[35]也从大豆蛋白酶解液中分离到一种八肽(FVVNATSN), 对离体培养的HepT9A4人肝细胞的LDL受体具有极强的激活作用。这可能也是大豆蛋白酶解所释放的小肽具有保肝、护肝作用的原因之一。这些作用也在研究中得到证实, 该项研究工作用细菌蛋白酶水解无大豆异黄酮的7S β -伴大豆球蛋白获得一种生物活性肽, 命名为ApoB-100, 具有极低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)及其降解并减少其合成的作用。这些研究结果支持先前有关大豆 β -伴大豆球蛋白有益于人体血浆三酰甘油控制^[45]的研究结果。

除改变基因表达之外, 大豆蛋白酶解液和肽组分还表现出降胆固醇活性, 这种活性是通过在肠道中结合胆酸和中性固醇类, 从而通过增加排泄和清除作用来实现^[46]。大豆蛋白水解液可以依赖其疏水性结合到胆酸上生成不溶性大分子^[47], 最早观察到的是荞麦蛋白的胰蛋白酶酶解肽所形成的高分子质量组分^[48]。这说明, 即使生物活性肽不能大量跨过肠道上皮进入血液循环, 也可以发挥其降血脂作用。因为它可以通过和胆酸以及外在的胆固醇结合依赖其疏水作用清除它们。有两种大豆来源的抗癌多肽-Lunasin (Lunasin XP-R和LunaSoyTM)已经进行了商业化生产, 主要用于降胆固醇食品添加剂。Lunasin是一种43个氨基酸残基的多肽, 分子质量5.4kD, 存在于大豆、大麦、黑麦和小麦中^[49]。Lunasin通过阻断组蛋白H3的Lys4残基的乙酰化作用从而降低3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶(HMG-CoA reductase)生成, 从而减少胆固醇的生物合成发挥其降胆固醇活性。Lunasin还可以增加细胞LDL受体的合成, 从而促进血浆LDL胆固醇的去除。进一步的研究应该集中在其作为食品口服后对高胆固醇血症群体的实际治疗和预防作用。

2.5 食源性抗肿瘤肽

具有抗癌作用的肽被称为抗癌肽, 或抗肿瘤肽, 来自食物蛋白酶解的此类肽也经常报道。大量有关抗癌肽的研究来自大豆抗癌肽-Lunasin。Lunasin的抗癌作用主要表现在对化学和病毒癌基因所引起的癌症, 其作用机制是通过抑制组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyl transferase, HAT)对组蛋白进行的特异性乙酰化和脱乙酰化途径的调节作用。H3和H4的乙酰化抑制作用可以抑制细胞周期进程, 使之停留在G₁/S期, 从而诱导癌细胞凋亡。虽然Lunasin在细胞培养中显示出非常好的抗癌潜力, 但是其分子质量对于其口服后的吸收和活性以及实际的抗癌作用仍然存在很多问题。据Dia等^[50]报道, 在口服含Lunasin的大豆蛋白的人体实验中, Lunasin吸

收率为4.5%。他们还在血浆中测定到其他的Lunasin衍生肽的序列, 认为这些肽可能是在胃肠道和血浆中被蛋白酶降解所产生的。另一项研究报道, 来自黑麦的Lunasin可以有效地吸收进血液并到达肝、肾, 而且保留了母体分子的抗癌HAT抑制活性^[51]。有人认为, 在富含Lunasin的食品中存在的蛋白酶抑制因子可能起到保护Lunasin免遭胃肠道消化作用。进一步的研究需要弄清楚Lunasin的作用机制、吸收到血液循环的动力学、代谢动力学、作用的靶细胞以及作为抗癌食品的实际治疗和预防效果。除Lunasin之外, 其他大豆来源的生物活性肽也有显示出抗癌作用。据Wang等^[52]报道, 不同种类的大豆蛋白酶解肽也具有抑制离体培养的白血病细胞(L1210)生存的能力, 其IC₅₀为3.5mg/mL到6.2mg/mL, 显著低于Lunasin (其IC₅₀为0.078mg/mL)。此外, 富含Lunasin的苋属植物(*Amaranthus hypochondriacus*)谷蛋白的胰蛋白酶酶解组分可以诱导HeLa细胞凋亡, 1 μ g/mL和5 μ g/mL剂量处理的凋亡率分别达到30%和38%^[53]。一个相似的研究还证明, 大豆蛋白酶解肽的一个组分对离体培养的巨噬细胞样小鼠肿瘤细胞系(P388D1)具有抑制细胞分裂的作用(使靶细胞停留在G₂/M期), 其IC₅₀达到0.16mg/mL^[54]。最近, Hsu等^[55]从金枪鱼肉的木瓜蛋白酶和蛋白酶XXII酶解物中分离到2种多肽, 其序列分别为: Leu-Pro-His-Val-Leu-Thr-Pro-Glu-Ala-Gly-Ala-Thr和Pro-Thr-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Tyr-Met-Val-Thr, 这两种肽表现出剂量依赖性抑制离体培养的乳腺癌细胞(MCF-7)增殖的作用, 其IC₅₀分别为: 8.1 μ mol/L和8.8 μ mol/L。由此可见, 酶解食物蛋白的确可以释放具有抗癌功能的生物活性肽。*Amaranthus mantegazzianus*蛋白经过酶解之后的抗癌作用比未酶解蛋白提高了两倍以上^[56]。来自一种太平洋牡蛎蛋白酶解短肽对BALB/c小鼠移植恶性肉瘤具有剂量依赖性抑制作用, 并证明其作用机制可能是通过增加免疫。不过, 目前最关键的问题是体内实验和体外实验有根本的区别, 而且动物实验和人体实验也有很多不同。随着有关抗癌药物和医学研究的不断深入, 科学家越来越清醒地认识到, 癌症发生过程是一个极端复杂的过程。但是尽管如此, 通过饮食和功能性食品来预防和治疗癌症仍然具有非常广阔的前景。

2.6 食源性免疫调节和抗炎症肽

免疫调节涉及到人类免疫功能的抑制和刺激作用。笔者曾经多次提到提高免疫力可以治百病的错误言论。免疫是一把双刃剑, 太弱了会造成体弱多病和反复感染; 而太强了则会引起自身免疫性和相关性疾病。特别是目前困扰着生命科学、食品科学、营养学和医学领域的现代文明病(代谢综合征, 或称为现代生活方式症), 往往是由于营养过多和免疫过强所造成的。食源性免疫调节肽是通过上调或下调免疫系统, 包括细胞因子的表达、抗体的产生和ROS-诱导的免疫功能调节来实现^[57]。

例如,大米蛋白的胰蛋白酶消化液具有促进吞噬作用、增强人多形核白细胞释放过氧化物的作用^[58]。此外,卵源肽也被证明具有免疫刺激活性,在癌症的免疫治疗中发挥增强免疫的功能^[59]。一项最近的研究证明,口服豌豆蛋白酶解液可以使小鼠通过激活巨噬细胞降低NO的产生,同时减少炎症细胞因子的分泌,肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)-6分别降低到35%和80%^[60]。志愿者口服小麦蛋白酶解物(3g/d)6d,其自然杀伤细胞活性显著增加^[61]。此外,另一项研究表明,乳清蛋白来源的肽可以增强细胞免疫功能^[62]。

食源肽的抗炎作用大多数报道集中在改良巨噬细胞炎症反应所引起的内毒素损伤作用。例如, Lunasin以及Lunasin样肽所表现出来的通过降低ROS所产生的抗炎作用。另外抗炎作用还表现在对炎症和抗炎细胞因子的作用,如: TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、核因子- κ B(NF- κ B)等炎症细胞因子或信号途径的活性和表达水平,以及下调NO/PGE2合成、诱导并激活巨噬细胞表达NOS/COX-2^[63]。Lunasin正是由于抑制巨噬细胞RAW264.7的NF- κ B的p65/p50亚基向核中转位,从而抑制炎症细胞因子IL-6的表达,和NOS、COX-2的产生实现抗炎作用^[64]。此外,据报道酪蛋白酶解物可以增加伴刀豆蛋白A (ConA)-刺激的人类辅助性T细胞(Th)-1产生IL-2,但是不能促进Th-2产生IL-10,表明这些肽可以激活T细胞介导的免疫应答,而对于体液免疫或抗体介导的免疫应答不起作用^[65]。此外,食源性肽也可以保护生物避免辐射所引起的免疫抑制。最近的一项研究报道,一种来自大马哈鱼胶原酶解肽可以保护 γ 射线所引起的免疫抑制,增强脾脏产生IL-12,诱导产生I κ B,减少游离的NF- κ B,从而抑制脾细胞凋亡^[66]。正如抗癌和CaM-结合肽一样,大多数此类实验都是在离体的条件下做出的,而且免疫调节和炎症、抗炎调节是非常复杂的调解网络,简单的实验很难说明问题,甚至不同的研究结果之间互相矛盾,所以进一步的工作应该集中在体内实验,特别是口服实验研究方面,应针对目前普遍存在的胃肠道疾病、营养和免疫过度所引起的食物过敏、现代文明病等具体情况进行系统研究。近年来,笔者所在的实验室也开展了一些食源性多肽对机体免疫调节作用及其信号通路的研究,创造了细胞通讯网络方法,提出了机体中存在的细胞无线通讯模型,从而为整体研究食品或食源肽的免疫调节功能提供了一条新的思路和方法^[67]。

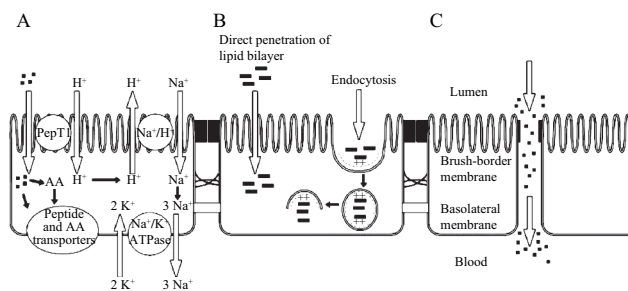
3 氨基酸和肽类的吸收问题

食源性酶解肽具有极其重要的功能是毋庸置疑的,但是生物化学研究结果告诉我们:作为营养,机体只能以氨基酸的形式吸收,因为如果大量的蛋白质或多肽链

都能直接吸收,就会造成自身稳定性的严重破坏,免疫学明白地告诉我们,机体正是通过蛋白质或多肽来识别异己,并将其拒之体外的。如果机体不能识别所有这些异己的蛋白质、多肽类大分子并排斥或清除在外,他自身就会变成了细菌或病毒的“培养基”。

虽然已有研究证明,少量生物大分子,特别是蛋白质也可以进入机体,但是那些都是通过分布在肠道中的M细胞、树突状(DC)细胞的吞噬作用进入体内的,其主要目的是机体通过其吞噬、加工和处理以后提呈给免疫细胞,特别是T、B淋巴细胞,从而机体可以通过在肠道中不断采集食物样品,通过免疫系统认识周围的物质世界。当然,这个过程也充满风险,因为这也给有些细菌或病毒,例如人类免疫缺陷病毒(HIV)创造了可乘之机!此外,胃肠道,特别是肠道黏膜系统的完整性和功能对于防止过多的异己生物大分子进入机体也是极端重要的,对于胃肠系统病人和婴幼儿可能正是由于肠黏膜系统的完整性不够健全才会导致诸多疾病发生。也许正是如此,才有了哺乳的重要性。可见食源性蛋白质或多肽除营养功能外,其生物功能机制和途径始终是一个关键性问题,也是蛋白和肽类功能性食品研究必需回答的问题。

半个世纪以来,肠道中肽和氨基酸的转运得到了迅速发展^[2],早在1994年^[68],肠道中短肽转运蛋白, PepT1就得到了系统描述和研究。作为短肽的载体,它介导短肽的跨肠上皮细胞刷状缘膜的吸收。虽然肽的转运证据早在20世纪50年代已经被观察到^[69],但是直到90年代,多数人还仍然认为跨肠道转运和吸收主要是氨基酸,而不是短肽。此外,除通过PepT1转运之外,肽也可以通过其他途径吸收,如:细胞的取样作用(内吞)和细胞穿越肽(cell-penetrating peptides, CPP), CPP可以像运送货物一样在黏膜外装载穿过细胞质膜以后再卸载,见图1。



A.二肽和三肽吸收途径是通过和H⁺协同转运途径,其运载体为PepT1。
B.细胞穿越肽(CPP)可以运载肽类穿越细胞膜进入细胞内。C.增加紧密连接的肠上皮细胞的通透性,从而吸收肽类的转运途径^[2]。

图1 肽类跨肠道细胞的吸收途径

Fig.1 Potential routes of peptide uptake in enterocytes

肠黏膜细胞以氨基酸为能量,以维护蛋白质合成、核苷酸、多胺类和肠黏膜免疫状态(例如:谷胱甘肽和黏膜素合成等)^[70]。因此,虽然食物蛋白的某些氨基酸以二

肽或三肽的形式进入肠道细胞,也是作为定量的营养吸收进行的。在狗^[71]和家兔^[72]的实验中,几乎测定不到完整的蛋白或多肽。在大鼠^[73]、泌乳期赫斯坦奶牛^[74]等多数动物中,高达85%的氨基酸是以小肽的形式吸收的。

在血液中可以测定到饮食来源二肽和三肽,其浓度受饮食的影响,这表明它们作为重要的营养原料供应肝和各种组织。有人定量测定了体内游离氨基酸和肽跨肠系黏膜的结果表明:1) 肠系流量,即从空肠、回肠、盲肠、结肠和胰腺流入肠系静脉的游离氨基酸和肽是相似的;2) 非肠系流,即流向内脏,从反刍动物的胃、十二指肠和脾脏大量的都是肽状态的氨基酸。这些研究证明,短肽作为氨基酸营养的贡献是主要的,这一结论在多种动物中得到了进一步的证实^[74]。

3.1 血浆中肽的命运

循环系统中的肽可能并不是在血浆中水解的,即使红细胞有所消耗也非常有限^[75]。肽似乎主要是被转运到组织或器官细胞中,然后水解为游离的氨基酸,接着再利用这些游离氨基酸合成自身的蛋白质^[76]。细胞中肽的利用受营养状态的控制,这表明,饮食的确影响循环系统中的肽的含量和肝外组织对肽的水解和利用效率^[77]。短肽的迁移和清除具有组织特异性,表明其吸收和利用也具有组织特异性。疏水肽也可能与饮食蛋白来源有关,对其吸收和其后的组织利用起作用。疏水肽可以抗黏膜的酶解作用,往往比亲水肽被更快地利用和吸收,亲水肽则容易被水解^[78]。含甲硫氨酸的二肽在不同细胞中的利用率不同,同时也具有转运的细胞特异性。这说明氨基酸以二或三肽的形式循环可能对不同组织具有不同供应形式和运用机制^[79]。Tagari等^[80]的研究表明,肽状态的氨基酸代表了最重要的总氨基酸的流通方式。上述研究证明,循环二、三肽的存在对于氨基酸营养的吸收和利用发挥主要作用。同时也证明二、三肽的吸收并不是为了发挥这些外来小肽的功能,而是机体自身氨基酸营养吸收和利用的控制手段和过程。

3.2 肠道细胞转运小肽的证据

多个研究团队独立鉴定和分离了表达在肠道细胞基底外侧膜上的小肽运载体,并发现它负责将肠道内腔的二、三肽跨肠上皮细胞转运到门静脉循环。曾经在没有证据的情况下提出肠上皮细胞含有丰富的肽酶,可以水解肽类变为游离的氨基酸,进入循环系统,所以机体只能以游离氨基酸的形式吸收到体内。Kim等^[81]曾经测定了肠道上皮细胞对氨基酸与13种二肽和5种三肽的转运情况,结果表明,肽的运转达到80%~90%。二、三肽运载体在肠细胞基底外侧膜上的发现^[82]和相对抗酶解肽的转运研究至少证明了氨基酸以肽的形式跨肠黏膜运输到循环系统是最重要的吸收机制。

3.3 PepT1的克隆和鉴定

肽类运载体是一种质子偶联性寡肽运载体超家族,

也称为肽运载体家族^[83]。1994年,第一个运载体-PepT1 mRNA从家兔中克隆^[68]。虽然结果显示了它有吸收肽并转运到肠道细胞内的功能,但是直到90年代才得到确切证明。肽类传递体已被发现广泛存在于细菌、酵母菌、植物和无脊椎动物中^[83]。最近,一个原核细胞H⁺-依赖性肽运载体YdgR被鉴定,发现其特性和功能与哺乳动物的PepT1十分相似^[84],说明肽运载体是生物从环境中吸收氨基酸营养的基本机制。

3.4 PepT1的底物特异性

推算的所有400种二肽和8000种三肽都可以由PepT1转运。水可能在转运过程中发挥重要作用,例如在底物和PepT1结合结构域中保护氨基酸侧链的电荷,允许带电荷以及不带电荷的肽结合到相同的结构域等^[83]。金属离子如Zn²⁺、Mn²⁺和Cu²⁺也可以通过和该运载体相互作用增强肽的吸收^[85]。有趣的是,PepT1也可以接受与二、三肽结构相似的药物化合物,并参与其转运,具有重要的治疗价值^[86]。此外,PepT1和PepT2还可以转运头孢菌素、青霉素以及氨肽酶抑制剂-苯丁抑制素等^[87]。这些研究结果表明,PepT1主要是肽类营养的吸收途径,与肽类营养以外的生物活性肽功能似乎关系不大。

肽类运载体具有质子依赖性,对于中性和阳离子肽类底物PepT1的质子底物比为1,而阴离子底物则为2^[88]。肽和H⁺被PepT1吸收后,质子再由刷状缘膜上的Na⁺/H⁺交换泵泵到细胞外侧。这个过程和基底外侧膜上的Na⁺/K⁺ ATPase泵耦联再把Na⁺和K⁺交换,恢复其电化学梯度。显然这和其他营养,如葡萄糖的吸收非常相似,都和质子泵或/和Na⁺/K⁺泵偶联,一方面驱动其主动运输过程,另一方面对所吸收的营养进行精确计数。笔者认为,这一精确的计数功能非常重要,它不仅可以和中枢神经系统进行快速的信号交流,而且对于营养吸收的神经(食欲)控制发挥至关重要的作用。特别是随着过度营养和不平衡营养膳食造成的疾病的不断发展和蔓延,应该深入进行营养吸收计数及其控制机制的研究,这对于功能性食品发挥作用及其机制的研究也具有重要意义。

3.5 PepT1的分布

PepT1 mRNA及其蛋白质主要表达在肠道和肾上皮细胞^[89]。肾脏还有一种肽运载体PepT2,和PepT1相对照,PepT2在肾小管上表达水平最高,但是在肺、乳腺、脉络丛和神经系统的神经胶质细胞上都有少量表达,但是并不表达在肠道^[83]。肠道特异性PepT1的表达受核转录因子CDX2的控制,该转录因子在肠道上皮细胞增殖、分化和成熟中起重要作用^[89]。该转录因子和Sp1转录因子非常相似,可以识别PepT1启动子控制位点,从而控制其表达活性^[90]。

3.6 PepT1对饮食的调控

一般来讲,肽运载体表达和活性随饮食蛋白和肽的水平而增加。Shiraga等^[91]用20%的酪蛋白饮食喂养大鼠

一周,然后A组转变为无蛋白饮食,其他组则分别切换到50%、20%或5%的酪蛋白饮食,喂养3d。结果显示,高水平的饮食蛋白与高水平的PepT1 mRNA和蛋白相对应,高蛋白饮食导致了二肽吸收的明显增加(72%比18%)。在大鼠中,短期饥饿表现出PepT1 mRNA和蛋白表达的增加^[92]。例如,饥饿4d的大鼠,其PepT1 mRNA和蛋白表达增加179%。肽运载体的表达也和昼夜节律有关^[93]。在大鼠中,PepT1在晚上增加表达,与喂养行为也有关系。有趣的是,禁食,或加强白天的饮食次数,或者废除白天喂食,PepT1的表达节律也会随之改变^[93]。这提示我们肽运载体表达的可塑性大而且迅速,以适应环境的变化。Shimakura等^[94]提出:PepT1的感应是由过氧化物酶体激活受体 α (peroxisome-proliferator-activated receptor α , PPAR α)介导的,PPAR α 是一个和受体家族,受脂肪酸配基的激活,因此在对饥饿应答中发挥重要作用。在PPAR α 缺陷型小鼠中,禁食不再诱导PepT1表达,而野生型小鼠则表现出PPAR α 和PepT1在进食48h后表达的明显增加。有趣的是,大量研究证明PPAR α 和机体的能量控制、寿命、衰老和多种疾病有密切关系,这充分说明了PepT1实质上是氨基酸营养吸收控制的重要一环,能够在很大程度上说明蛋白酶解肽与非酶解的蛋白和游离氨基酸相比其功能和作用明显不同。

3.7 PepT1的发育和激素调控

发育、代谢和激素水平都可能影响小肠中肽的转运。已经证明可以调节肽吸收和转运的激素有:胰岛素^[95]、瘦素^[96]、表皮生长因子^[97]和甲状腺激素T3^[98]。胰岛素并不定位于肠道内腔,但是正常生理条件下,循环系统的胰岛素可以结合到肠道细胞基底外侧膜的受体上,从而控制机体营养吸收和胰岛素分泌及其抗性^[99]。十二指肠PepT1的表达一般随年龄而降低,空肠和回肠PepT1则随年龄而增加。

3.8 PepT1的调控与疾病

已经发现PepT1在结肠比小肠表达相对很少^[100],但是短肠综合症患者的结肠则明显上调表达^[101]。推测这是对氨基酸营养的一个补救性“措施”。相同的调控模式也表现在溃疡性结肠炎和Crohn's病患者。然而,内毒素处理大鼠则可以下调PepT1 mRNA及其蛋白表达,其表达调控可能是通过炎症细胞因子,如IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α ^[102],推测这是由于机体检测到细菌或者病毒入侵时所做出的安全防范“措施”。

3.9 肽吸收的选择性补救机制

除PepT1之外,科学家也注意到一种细胞穿透肽(cell-penetrating peptides, CPP)可能作为氨基酸营养以肽的形式吸收的一个补救途径。当然大家的兴趣还在于它有可能发展为一条口服给药途径。细胞穿透肽是一类具有跨质膜转位能力,同时还可以将胞外装载的“货物”释放

到细胞内^[103],转运的分子包括:寡核苷酸^[104]、肽、核苷酸^[105]和蛋白质^[106]。有研究证明4种不同的CPP具有转运标记的五肽进入人类黑色素瘤的能力。

3.10 饮食肽及其功能

已知所有动物都可以以二、三肽的形式吸收氨基酸营养,而且小肽的吸收似乎比氨基酸更有效。因此,我们有理由相信小肽或酶解蛋白作为氨基酸营养对于动物的生长、发育具有明显的优势。此外,二、三肽的吸收更快、更有效^[107]、更有利于体内在组织或器官之间的循环、供应和调控。

据报道,用酶解蛋白物喂鱼,可以增加其小肠PepT1的表达^[108]。用酶解蛋白喂食海鲈鱼和未酶解相比其增重和生存能力提高20%~40%^[107]。Kotzamanis等^[109]观察到10%酶解短肽喂养海鲈鱼幼仔表现出最好的生长、生存率和小肠刷状缘膜酶活力,通过弧菌感染证明,这一组的免疫状态也得到了显著改善。肽类转运基因的调控已经得到了集中研究,证明PepT1受饮食、发育时期、激素和健康状况的影响和控制。虽然其控制机制仍然不完全清楚,但是很可能涉及到该基因家族的转录控制、mRNA的稳定性及其蛋白质的穿核定位与激活。

总之,大量研究表明,氨基酸营养的吸收与控制并不仅仅依赖于游离氨基酸的吸收,二、三肽不仅可以通其运载体吸收,而且构成氨基酸营养吸收的主体。由于小肽在机体氨基酸代谢和组织、器官循环、运输中具有重要地位,而且整个吸收和循环过程中受机体激素、生理、代谢、免疫和营养状态的严格和有效控制,所以肽类饮食显然具有和游离氨基酸以及未经酶解的蛋白质明显不同的健康功能。事实上,机体在不缺少营养的条件下,其营养组成、是否平衡已经不重要了,因为没有哪一种生物只能在各种营养既不能不足也不能超过的情况下才能生存。显而易见,营养的吸收与控制才是机体健康和生理活动的基础,现代文明病的发病原因可能正是由于其营养吸收与控制失调所造成的。正如食用葡萄糖不会造成胰岛素抗性,而注射或输液会造成胰岛素抗性一样,生物活性肽发挥生理功能的重要途径可能就是因为其吸收和转运控制及其反馈作用。

4 生物活性肽发挥功能的途径

生物活性肽的分离、鉴定和筛选过程一般都是通过体外实验,但是体外实验不可能代表体内实验结果,更不能代表其真实功能。另一个不可忽视的问题是:对功能性成分的功能性研究往往沿用了药物研究的实验方法,但是药物主要用来治病,而食品,即使保健食品也不能标记为可以治疗某种疾病。所以从理论上讲,目前所沿用的建立致病动物模型的方法在医药开发上可能是

临床实验之前的必经之路,而在功能性食品或生物活性肽的功能实验中却是难以站得住脚的。另外,生物活性肽的功能实验所面临的难题还在于:1)生物活性肽一般不能完整进入体内。除二、三肽有专门的吸收和转运途径之外,有些小肽还有例如CPP作为补救途径,另外就是由肠道中专门用来取样的DC细胞,它们对生物大分子通过吞噬和处理并加以甄别,将有特色的抗原决定簇提呈给T、B淋巴细胞,实现机体对其摄入物的识别与记忆,从而获得特异性免疫能力。还有就是M-细胞,它也是肠腔中大分子进入体内的重要通道,但是其目的是为B细胞提供抗原表位,从而使B细胞激活并成熟为可以分泌抗体的浆细胞以及记忆细胞。2)即使个别生物活性肽可以进入体内,也会很快被多种机制清除掉,这是机体免疫系统的主要功能和职责。事实上,肠黏膜的主要功能正是将基本营养以外的异己分子,特别是生物大分子阻隔在肠腔内,所以笔者强烈反对人为增加肠道对异己分子,特别是大分子通透性的研究和探索,因为这可能为病毒或细菌的感染和入侵提供可乘之机。3)同一种食品对不同人群可能有不同的功能,取决于各自不同的生理状况、吸收能力和遗传背景,甚至精神状态也会有明显作用。何况人和动物间,甚至与体内和体外实验之间的差异更是不可忽视。体外实验有功能的生物活性肽是否在体内有作用显然取决于吸收、肠道利用及其对胃、肠消化系统的敏感性^[110]。研究表明,乳源性生物活性肽MAP1和MAP2在体外显示出明显的ACE抑制活性,但是高血压志愿者口服实验表明,只有MAP1具有抗血压升高作用^[9]。

有人提出:体内、外实验结果不同的原因可能主要是因为其活性肽的命运不同,只有那些能够吸收到体内的生物活性肽才能发挥功能^[13]。至少笔者不同意这一观点,尽管持这种观点的人很多。如上所述,虽然并非所有的蛋白质和多肽都不能吸收,但是除二、三肽可以进入循环系统外,绝大多数都会被皮下或血液、淋巴液中的免疫细胞吞噬处理,这不仅是免疫识别、监视和自稳定作用的基础,同时也是食物过敏的基础,但不能构成其发挥生物功能的基础。已经有人提出,二肽或三肽可以通过运载体吸收,所以我们应该调查这些肽是否可以发挥重要的生物功能^[111]。有人将乳源三肽(Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro)和酸奶一起服用,结果的确在血液中测定到毫微摩尔水平的Ile-Pro-Pro^[112],并声称这是第一个测定到未被消化进入循环系统的生物活性肽。但是其生物功能就在于如此低浓度的生物活性肽?笔者推测就是如此微量的活性肽也会很快被转化利用或者排出体外。尽管不排除二、三肽发挥生物活性的可能性,但是笔者认为如果有,那也不会是什么好事情,因为机体是一个自我调节和自稳定系统,并由自身的激素、细胞因子和趋化因子形成一个密度很高的无线通讯网络,不应该随便让异

己的肽类物质干涉自己的“内政”。而且,食品,包括功能性食品不一定只有进入机体才起作用,它们在胃、肠道中照样可以发挥生物活性,例如:胆固醇结合肽、食欲控制肽、可食性纤维素、变性淀粉等^[113]。事实上,饮食中的生物活性肽起作用的途径很多,主要的并不是通过吸收到体内,而是通过信号系统发挥生物功能,在其信号传递方面已经得到了非常系统和深入的研究。

4.1 肽类食品的味觉和嗅觉受体途径

人体对营养的传感主要有两个方面:味觉和嗅觉,并用来区分有害食品还是营养食品。4种基本味觉:甜、苦、鲜、香与特异性的G蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptors, GPCRs)相联系,也就是味觉受体(taste receptors),最初发现它们分布在舌头的味蕾和鼻咽部。有800多种味觉受体,有趣的是,这些受体不仅分布在舌和鼻咽部,整个消化道系统都有分布。事实上,这些受体可以为机体提供对食品的营养评价,从而控制我们的饮食、营养与健康,例如食欲控制、营养吸收、分配和处理^[114]。

4.1.1 蛋白质(肽类)传感受体

富含蛋白质的膳食和蛋白质消化产物在体内、体外的实验均已证明可以刺激肠内分泌激素的释放。和其他营养一样,GPCR-依赖性和非依赖性途径都涉及到氨基酸和多肽的传感作用。有些氨基酸,如谷氨酸盐,已经显示出可以去极化肠内分泌细胞,从而作为它们通过钠离子偶联受体产生电荷吸收,从而导致钙离子依赖性分泌刺激。二和三肽可以刺激STC-1细胞伴随PEPT1的转运,表明传递体介导的吸收可能与膜电势偶联,从而对小肽刺激分泌肠内分泌激素有贡献。

已知一系列GPCRs直接对氨基酸和选择性二肽、三肽作出响应。氨基酸敏感性GPCRs通常具有一个细胞外的Venus捕蝇草结构域,负责配基结合,并包括钙敏感性受体(CaSR)、GPCR6A、异质二聚体鲜味味觉受体T1R1/T1R3、以及代谢型谷氨酸受体。证据显示,这些受体作为GI,氨基酸传感器是多变的。

在这些GPCRs中,肠内分泌细胞的氨基酸传感器就是CaSR。该受体最初是在甲状旁腺中作为Ca²⁺传感器鉴定出来的,但是后来发现其普遍存在于食道的一系列细胞类型中,它们与多种生理响应密切相关,包括:胃肠动力、NaCl和水的转运、Ca²⁺的吸收以及结肠细胞的分化^[115]。在胃泌素分泌G细胞、生长激素抑制素分泌D细胞和CCK分泌I细胞中,CaSR表达非常强,从而介导氨基酸引发的激素分泌。可见CaSR的确在肽类传感中发挥重要作用。

T1R1/T1R3异聚体受体作为鲜味受体分布在味蕾上。一个最近的研究观察到了mGluR家族在内分泌细胞中一系列成员的表达,他们提出:这些受体可能有助于

通过mGluR-依赖性抑制生长激素抑制素抑制氨基酸诱发的胃酸释放。GPR92/93并不是Venus-捕蝇草家族,但是它可以被蛋白酪激活。GPR92主要是和Gaq、Ga12/13相偶联,有研究证明它可以调节一系列下游效应因子:Ca²⁺、cAMP、PKA和ERK^[116]。可见,肽类食品不仅可以通过这些受体告知机体氨基酸营养的供给情况,而且可以通过多条信号途径调节机体免疫内分泌系统并作出响应。

4.1.2 苦味肽感受受体

大约有25种苦味受体家族(T2R)属于A组GPCR超家族。已经证明苦味受体所介导的调节主要用来限制毒素的消化和吸收,但是也有少量研究显示苦味物质可以刺激释放胃饥饿素、CCK和GLP-1。更特异性的营养相关传感作用,亦即T2R1已经证明对苦味二肽和三肽传感,但是,正在探讨是否该受体在肠道中表达,亦即是否具有对肠道内腔消化的蛋白质(肽)传递信号的能力。苦味肽信号传递的生理意义有待深入研究,但是推测可能与机体对营养的安全检测和吸收有关。

4.1.3 神经降压肽受体(neurotensin receptor)

神经降压肽(素)(NTS)是一种13个氨基酸残基构成的肽,具有通过其受体(the neurotensin receptor, NTSR1),即一种GPCR,发挥神经递质和激素活性的小肽^[117]。NTS具有多种生理功能,特别是在帕金森氏症、精神分裂症、调节多巴胺神经传递、降低体温、抗情绪伤害和促进脑瘤生长等方面发挥重要作用。在大脑中,NTS促进多巴胺系统的活性,阿片非依赖性镇痛以及食欲抑制作用。在肠道中,NTS则控制一系列消化过程。White等^[118]最近发现NTS的肽类或非肽类拮抗剂也可以结合在GPCR上,阻断NTS的信号传递,从而为治疗神经紊乱、癌症和肥胖提供一条新的途径。

4.1.4 阿片肽感受受体

有些食物会产生明显的精神上的快乐感受,从而用于一般的消除痛苦和娱乐。但是鸦片类药物也会导致依赖性和滥用。事实上,这类食品或药品也被用来进行安全止痛。相关的受体属于G蛋白偶联受体,不同类型的分布明显不同,除分布在中枢神经系统外,若干阿片受体(GPCRs)分布在外周组织,如胃、肠道系统,其主要功能是传感损伤和止痛。这些受体和“经典”阿片受体 μ 、 δ 、 κ (μ -OR, δ -OR和 κ -OR)不同,是痛敏肽和孤啡肽受体(NOP, 或ORL-1)。这些受体是最近根据孤儿GPCR1类受体的特点克隆到的。在2012年485期Nature上,发表了系列文章,报道了这方面的研究结果,特别是其受体结构与配体或拮抗剂的相互识别和作用^[119]。这些研究为寻找没有依赖性和副作用的阿片类食品或药物提供了重要信息。阿片类受体也属于G蛋白偶联受体超家族,其作用途径是通过受体和配体结合激活相关的G蛋白,通过G蛋白进一步引发一系列生理应答^[120]。

4.1.5 肠道中的蛋白受体及其吸收与转运

蛋白质被降解为氨基酸、二肽或三肽混合物后才可以被吸收和转运。肽类、氨基酸类营养的运转可能对于基因表达和代谢具有重要作用。研究表明,对信号传递途径,例如涉及到雷帕霉素复合物-1(rapamycin TOR complex 1)或非阻遏激酶2(non-derepressing kinase 2, GCN2)等都有控制作用^[121]。蛋白质水解产物具有刺激EEC分泌的作用^[122]。从其机制来看,肠道中的蛋白质传感器可能应用3种和糖传感器相同的机制。已经有人提出GPR93的表达可以进一步激活肠促胰酶肽(promote cholecystokinin, CCK)的分泌,CCK至少在EEC细胞系中分泌^[116]。其次,氨基酸和二肽运载体可能在EEs中发挥离子传递受体的功能。这些受体、肽运载体和内分泌信号途径的相互作用充分证明,食物蛋白或酶解肽或生物活性肽不仅可以通过质子泵、Na⁺/K⁺ATP酶泵向机体传递氨基酸营养的定量化信息,从而控制机体相关的生理活动,而且可以通过复杂的胃肠黏膜信号途径发挥多种生理和免疫调节功能。

4.2 免疫调节与细胞通讯网络

因为食品是机体营养供应的基础,所以不论营养缺陷或者营养过度都会影响机体的免疫系统,大量研究证明:GPCRs不仅是营养传感器,更是重要的免疫信号传递系统。笔者大胆推测,所有的食品都具有免疫调节作用,不是上调就是下调。对于营养不足的人来说,往往会产生免疫低下,但是对不缺少营养的人,一般不应该产生免疫低下^[123],因为免疫是机体的防御系统,是机体首先要保证的,就像一个国家的国防系统必需得到保障一样。免疫学告诉我们:免疫是一把双刃剑,低下意味着反复感染、疾病缠身;而免疫过强则会产生自身免疫性疾病。就像到处蔓延的富营养化环境污染一样,富营养化同时也污染着人的胃、肠道,严重影响着大众健康。富营养化导致了机体的过渡免疫:糖尿病、生殖能力下降、高血压、高血脂、心脑血管疾病、过敏、慢性肠炎等,甚至大多数癌症都与免疫过强,而不是免疫低下有关。早在2006年,笔者提出:功能性食品,特别是多肽,主要是通过刺激机体的胃肠道系统分泌或改变其细胞因子表达向机体传递信号,发挥调节功能^[124-125]。接着我们研究了一些有代表性的功能成分,证明它们的确是改变细胞因子,并通过循环系统传递到机体相应的组织或器官发挥功能^[126-127]。综合国内外和本实验室的研究结果,笔者提出:在机体中存在一个无线通讯网络:其信号分子就是细胞因子和趋化因子,细胞之间正是通过释放和接受(受体)这些信号分子传递无线信号。其传播途径是通过循环系统^[67,128]。食品和营养,特别是功能性食品正是通过胃肠道,特别是肠道系统的受体和“取样细胞”-DC细胞和微皱折(M)细胞,对胃肠道中的

食品、营养和安全情况通过各种信号通路和细胞(趋化)因子分泌,再通过循环系统和机体中相应的细胞、组织和器官进行通讯。为了能够定量描述该通讯网络,笔者进一步建立了细胞通讯网络模型,并以酪蛋白酶解肽对机体细胞通讯网络的作用进行了实验和分析。目前笔者所在的实验室已经对多种功能性食品和中国人根据数千年经验所总结出来的“温、凉、寒、热、平”不同属性进行了系统研究,证明它们对机体细胞通讯网络的作用和传统经验基本吻合^[129]。这一方面证明了功能性食品的确是通过改变细胞通讯网络发挥生物功能,另一方面也为传统的中医和食品保健功能的分子细胞生物学机制研究奠定了理论基础。

4.3 功能多肽对肠道微生物的作用

功能多肽对肠道微生物的作用已经积累了大量的研究。1998年,Salminen等^[130]对此作了非常系统的综述。消化道里的细菌和宿主的消化酶将饮食中的蛋白质转化为肽,其中也有我们所说的生物活性肽。当然,有些生物活性肽可能是在餐前的发酵过程中产生的,但是所有这些肽都必需经过肠道微生物的作用。这些营养肽和生物活性肽对宿主的作用既涉及到局部作用,例如:黏液素的产生,也涉及系统作用,如诱导降血压作用^[131]。肠道中布满可以和不同的肽包括生物活性肽相互识别的受体,其中不少已经鉴定出来。但是还有很多并没有鉴定出来。有趣的是,有人试图分离饮食蛋白经肠道中乳酸菌发酵产生的肽类,发现所有分离到的三肽组分都对宿主发挥同样的生物活性^[132]。笔者认为:这三肽很可能是通过PepT1的运转和计数发挥机体对肽类营养的控制所用。

已经有大量通过胃肠道微生物作用所形成的生物活性肽的报道。 β -酪啡肽-7就是奶在肠道中消化产生的,它可以使黏液素明显增加^[133]。这些生物活性肽直接作用于肠上皮杯状细胞的基底外侧 μ -阿片肽受体^[134]。这种相互作用似乎可以改善肠道的保护作用,从而改善肠道健康。已经有体内实验研究报道,例如,口服乳酸发酵的酸奶的确可以促进杯状细胞、潘氏细胞的增殖^[135]。乳酸菌的发酵产物也可以抑制前列腺素介导的急性和慢性炎症细胞因子-IL-1 β 的释放,并证明这个过程是通过一种阿片受体介导的肠上皮细胞应答^[136]。

研究表明,乳酸菌是由于所产生的代谢产物和肠上皮上的组胺激活受体(histaminergic receptor)发挥抗血压升高作用^[137]。肠道微生物产生的组胺样分子可以由乳酸菌所产生的组胺激活受体拮抗剂消除。有研究发现,鱼蛋白消化也可以产生生物活性肽^[138]。从奶或鱼的发酵所产生的生物活性肽也可以增加肠上皮固有层中IgA(+)B细胞的增殖^[139]。鱼蛋白消化可以改变炎症或抗炎症细胞因子IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 和TNF- α 的合成与分泌。

4.4 肠道和其他器官的通讯联系

近些年来的大量研究表明,胃肠道及其微生态系统和其他器官和组织存在着极其密切的联系,这些联系不仅包含神经系统、循环系统、免疫系统和生殖系统上的联系,也包含营养和代谢上的联系^[140]。最近,Science上刊登了系列综述,全面总结了胃、肠道微生态系统和健康的关系^[141]。Nicholson等^[142]综述了食物、宿主和肠道微生物之间在代谢上的复杂关系,特别是这些相互作用对机体健康和疾病的影响及信号传递途径。

4.4.1 肠道和肝之间的信号交换(the gut/liver axis)

肝肠循环(enterohepatic circulation)主要功能是维护肝脏中胆酸和胆固醇的代谢与肠道之间的协调关系。其信号传递主要是由核受体信号途径所控制。核受体FXR在肝和肠道中高表达,主要功能就是维护胆固醇/胆酸的体内代谢平衡和各种代谢酶的调控与传递^[143]。

4.4.2 肠/大脑信息交换枢纽(the gut/brain axis)

肽类激素及其类似物可以从胃肠道系统分泌,也可能来源于肠道内的酶解肽(饮食中的激素活性肽),它们可以通过和相应的受体识别或互作将肠道内的能量和营养平衡情况传递给大脑。通过大脑做出判断,从而控制食欲和能量消费。涉及这一控制过程的是脑干和下丘脑,通过迷走神经进行快速响应。Sam等^[144]对此进行了系统综述。笔者认为:该系统可能和营养感受受体(GPCRs)及其相应的计数系统(钙通道和钠钾泵)相偶联实现能量和营养的定量控制。

4.4.3 大麻碱信号传递通过肠/脑/肝/神经(intestine/brain/liver/neural axis)枢纽控制炎症平衡

在机体处于发炎状态,即发烧时,明显伴随食欲不振,这充分说明在免疫状态、营养吸收和能量控制之间有密切的联系。能量吸收和调节主要受大脑控制。大脑则接受胃、肠道、肝、胰腺、脂肪组织和骨骼肌的信号控制,这些信号就是它们之间负责传递信息的信号分子^[145],例如细胞因子和趋化因子,因为这些炎症或抗炎症的细胞因子或趋化因子的确控制着机体的体温、食欲和免疫状态。

4.4.4 CCR6作为肺和肠道之间免疫调节和传递系统

趋化因子组成和结构相关的一个细胞因子家族。趋化因子通过浓度梯度和各自的趋化因子受体控制着白细胞的迁移和活性。已经发现通过CCR6在肠道和肺之间构成密切的相互协调关系^[146]。最近的研究发现^[147],肠道上皮或皮下的树突状(DC)细胞可以通过分泌趋化因子指导白细胞在血管或淋巴管中的迁移。迁移的靶位点和路线正是通过相应的趋化因子的浓度梯度。这一结果完全符合我们的判断^[67]。现在看来越来越明确:胃肠道中的营养和食品成分,特别是蛋白质或肽类,通过树突状细胞或M细胞的吞噬处理作用将抗原决定簇传递给T、B细胞,建立起对这些抗原的识别作用,也就是获得性免疫

作用；同时通过分泌细胞因子调节白细胞活性；通过趋化因子控制白细胞迁移；通过M细胞为B细胞分化为浆细胞提供抗原表位。从饮食中所获得的这些先天和获得性免疫识别作用，通过肠道和肺之间的交流，为呼吸道提供免疫防御和识别作用。这可能正是构成饮食太单一或环境太清洁的人一旦处在比较复杂或者污染比较严重的环境中往往会出现呼吸道疾病甚至发烧的重要原因。笔者判断这正是由于他没有建立起对这些抗原的免疫能力，因而当这些抗原被吸入呼吸系统后，由于事前没有建立起针对这些抗原的清除系统(获得性免疫)，往往会诱发炎症。

4.4.5 饥饿素的激活和生殖信号控制枢纽(the reproductive axis)

饥饿素(ghrelin)是一种从胃中分泌进入循环系统的肽类激素，但是实验证明，在其他一系列组织中也有分泌。该激素具有内分泌和旁分泌作用。有趣的是，它在各种生殖组织中都有表达活性，这表明饥饿素可能调节生殖生理或病理过程^[148]，大量研究证明，肥胖往往伴随生殖能力下降，推断与肠胃道和生殖系统的信息交流枢纽有关。笔者判断：因为怀孕过程所面对的主要难题就是母体对受精卵以及其后的胎儿的免疫耐受问题，所以母体营养太过造成免疫过强，从而影响生殖能力。

5 食源性生物活性肽的加工和生产问题

由于现代文明病的蔓延，已经对富含糖类和脂肪类食品敲起了警钟，这同时也激起了商家对富含蛋白质和肽类食品的重视。综合到目前为止的研究结果，笔者认为蛋白或肽类食品开发与生产应该着重做好如下几个方面的研究：1)由于蛋白质资源上的限制，提高蛋白质的消化和吸收率应该成为食品和功能食品开发研究的重要方向。提高蛋白吸收率的加工方法很多，包括发酵、酶解和各种物理加工方法，如：蒸、煮、超微破碎、高压、高温等。因为变性的蛋白更有利于消化，所以这些加工方法都可以提高机体对蛋白质的利用率。2)生物转化加工。由于自然界中的蛋白质往往并不能保证其氨基酸平衡，例如谷物蛋白往往缺少赖氨酸，玉米醇溶蛋白等往往氨基酸含量单一或不平衡；动物血中的蛋白往往利用和消化率很低。这些问题往往不能仅仅通过食品加工提高其营养价值，研究证明通过科学发酵或酶的转化作用可以将其转化为更易吸收和利用的蛋白食品。3)生物活性肽的研究与开发。大多数食品都是来源于营养和贮藏蛋白，由于这些蛋白可能起源于功能蛋白的不同结构域，所以通过适当的酶解或发酵能够释放出多种生物活性肽。虽然这些生物活性肽有可能开发为药物，但是食源性肽类药物研究和开发面临很多问题，其中最大的问题就是吸收问题。一方面生物的防御机制不允许异己

肽类进入，另一方面即使偶尔进入循环系统也会很快被降解、利用或清除。如果其识别受体就在胃肠道中，那么我们是否需要把它们分离、纯化出来？笔者认为，食源性生物活性肽的研究与开发应该针对要开发的生物活性肽酶解、转化或加工条件的研究，以及其体内作用机制的研究，通过优化其工艺参数获得含有该生物活性肽的功能性食品，而不是将其纯化和分离出来。4)尽管可能有很多食源性生物活性肽，但是肽类的诸多功能还是由于短肽更容易吸收和体内的循环与转运。所以经过消化的肽类食品本身就是一种很好的功能性食品。事实上，对于消化弱势群体，例如老人、婴幼儿或病人，他们往往特别需要补充足够多的短肽类营养(而不是蛋白质或氨基酸)，因为他们依赖自身的消化能力往往难以把食物中蛋白质消化成短肽，所以把蛋白质消化为短肽就可以成为这些人的功能性食品。5)专用食品的研发。笔者一直对功能性食品这一定义持怀疑态度。认为应该用“专用食品(special food)”来代替功能性食品(functional food)。因为功能性食品往往不能确切表明其适合人群，再加上商业宣传上往往夸其食品功能，从而误导消费者。例如：增强免疫的食品，往往被打扮成包治百病的功能性食品加以宣传：“人之所以得病，包括癌症，是因为免疫低下”，所以只要大力宣传：“可以促进免疫的功能性食品”就可以达到“包治百病”的宣传目的。而我们知道，免疫是一把双刃剑，尤其值得重视的是：大量研究结果证明：目前的大多数疾病都是由于过高的营养造成过高的免疫应答。所以如果上述提高免疫的宣传是假的也许还好，如果是真的，对于免疫过高的食用者无疑会起到相反的作用。而专用食品则可以明确其适合食用的人群，例如专门用于消化弱势群体的肽类食品；专门用于免疫低下人群的促进免疫的食品；专门用于免疫过度人群的食品；专门用于苯丙酮酸尿症患者的食品等。

6 结 语

大量研究结果证明，高热量食品的过度食用，不仅会导致肥胖、糖尿病、高血脂和心脑血管疾病，而且会加速老化进程。所以高蛋白质食品获得了更多消费者的青睐。但是，蛋白质食品的营养和健康作用是不一样的，而且经验和研究都证明，不同的蛋白质食品其功能也是不一样的。所以科学食用蛋白质，特别是研究和开发蛋白质类功能性食品具有非常重要的科学意义和应用前景。从上述研究结果我们不难得出如下结论：1)机体对蛋白质的吸收需要消化为短肽或氨基酸，即使偶尔有完整蛋白被吸收，那也是因为机体通过“采集食物样品”来认识周围的物质世界，而且很快就会被机体清除

掉。2)机体吸收短肽,特别是二、三肽的能力比氨基酸还要高得多,而且短肽更有利于机体通过循环系统满足不同组织、器官和生理功能。3)短肽和氨基酸的吸收通过 Na^+/K^+ 泵和钙离子通道进行严格计数,并通过神经向大脑传递信号,通过胃肠激素传递生理信号,这是机体对营养、饮食和食欲控制的需要,也是机体本身合成与分解代谢调控的需要。4)食物中的蛋白质经过体外或体内消化,特别是胃肠道系统中的酶、微生物消化会产生多种生物活性肽,这些肽除具有营养作用外,还可能具有多种生理功能,例如抗血压升高作用、免疫调节作用、诱发炎症或抗炎作用、改变肠道内的微生物区系或微生态作用、降胆固醇作用等。5)生物活性肽或蛋白质发挥生理作用的机制并非通过吸收进入体内,至少绝大多数不能被吸收,即使少量吸收也会被作为抗原处理掉,或者作为异物清除掉。因此,它们发挥生理作用主要是通过和肠道内复杂的受体系统、微生物系统、代谢系统相互作用,通过改变自己的信号系统对机体发挥各种生理功能。已知这些信号分子主要是细胞因子、趋化因子和激素,通过循环系统和机体中相应的组织、器官或细胞构成无线通讯网络,使机体通过和胃肠道之间的信息交流实现和谐与动态平衡。

依据上述总结,笔者认为以后的研究工作应该集中在:1)通过体外消化、生物转化获得具有不同生理功能的,适应于不同人群的专用蛋白或多肽类食品;2)加强对蛋白或肽类食品在胃肠道内发挥功能作用机制的研究;3)加强各类生物活性肽发挥生物学功能的体内实验研究;4)加强胃肠黏膜系统有关受体及其信号传递功能的研究,以阐明生物活性肽发挥生物功能的信号途径和机制。5)加强蛋白质类食品加工工艺和食品消化吸收率及其与功能调节之间关系的研究,为适应不同人群的生理需求开发出专用食品或辅助治疗性食品。6)加强针对现代文明病具有辅助治疗和预防作用的食品的研究,特别是肽类食品的研究与开发,预期此类食品将具有巨大的市场潜力。

参考文献:

- GARDNER M L. Amino acid and peptide absorption from partial digests of proteins in isolated rat small intestine[J]. *J Physiol*, 1978, 284: 83-104.
- GILBERT E R, WONG E A, WEBB K E, Jr. Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health[J]. *J Anim Sci*, 2008, 86: 2135-2155.
- DANIEL H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport[J]. *Annu Rev Physiol*, 2004, 66: 361-384.
- KAMAKURA M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees[J]. *Nature*, 2011, 473: 478-483.
- 庞广昌, 王秋楹, 陈庆森. 生物活性肽的研究进展理论基础与展望[J]. *食品科学*, 2001, 22(2): 80-84.
- SHARMA S, SINGH R, RANA S. Bioactive peptides: a review[J]. *INT J Bioautomation*, 2011, 15(4): 223-250.
- KORHONEN H, PIHLANTO A. Bioactive peptides: production and functionality[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16: 945-960.
- UDENIGWE C C, ALUKO R E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits[J]. *Journal of Food Science*, 2012, 71(1): R11-R24.
- IBRAHIM M M. RAS inhibition in hypertension[J]. *J Hum Hypertens*, 2006, 20: 101-108.
- SEGALL L, COVIC A, GOLDSMITH D J A. Direct renin inhibitors: the dawn of a new era, or just a variation on a theme?[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2007, 22: 2435-2439.
- FERREIRA S H, BARTELT D C, GREENE L J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* Venom[J]. *Biochemistry*, 1970, 9: 2583-2593.
- ALUKO R E. Technology for the production and utilization of food protein-derived antihypertensive peptides: a review[J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2007, 1: 260-267.
- FITZGERALD R J, MURRAY B A, WALSH D J. Hypotensive peptides from milk proteins[J]. *J Nutr*, 2004, 134: 980S-988S.
- UDENIGWE C C, LIN Y S, HOU W C, et al. Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions[J]. *J Funct Foods*, 2009, 1: 199-207.
- GIRGIH A T, UDENIGWE C C, LI H, et al. Kinetics of enzyme inhibition and antihypertensive effects of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates[J]. *J Am Oil Chem Assoc*, 2011, 88(3): 381-389.
- LI H, ALUKO R E. Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 11471-11476.
- UDENIGWE C C, LI H, ALUKO R E. Quantitative structure-activity relationship modelling of renin-inhibiting dipeptides[J]. *Amino Acids*, 2012, 42(4): 1379-1386.
- NAKAMURA Y, YAMAMOTO N, SAKAI K, et al. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from a sour milk[J]. *J Dairy Sci*, 1995, 78: 777-783.
- BOELSMA E, KLOEK J. IPP-rich milk protein hydrolysate lowers blood pressure in subjects with stage 1 hypertension, a randomized controlled trial[J]. *Nutr J*, 2010, 9: 52-59. DOI: 10.1186/1475-2891-9-52.
- USINGER L, JENSEN L T, FLAMBARD B, et al. The antihypertensive effect of fermented milk in individuals with prehypertension or borderline hypertension[J]. *J Hum Hypertens*, 2010, 24: 678-683.
- HUANG D, OU B, PRIOR R L. The chemistry behind antioxidant capacity assays[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 1841-1856.
- CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidant properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 49-53.
- MEISEL H. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins[J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12: 1905-1919.
- ERDMANN K, GROSSER N, SCHIPPOREIT K, et al. The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin[J]. *J Nutr*, 2006, 136: 2148-2152.
- LAHART N, O'CALLAGHAN Y, AHERNE S A, et al. Extent of hydrolysis effects on casein hydrolysate bioactivity: evaluation using the human Jurkat T cell line[J]. *Int Dairy J*, 2011, 21: 777-782.
- DING J F, LI Y Y, XU J J, et al. Study on effect of jellyfish collagen

- hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation[J]. Food Hydrocoll, 2011, 25: 1350-1353.
- [27] HOOKS S S, MEANS A R. Ca^{2+} /CaM-dependent kinases: from activation to function[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001, 41: 471-505.
- [28] ITANO T, ITANO R, PENNISTON J T. Interactions of basic polypeptides and proteins with calmodulin[J]. Biochem J, 1980, 189: 455-459.
- [29] O'NEIL K T, DEGRADO W F. How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic α -helices[J]. Trends Biochem Sci, 1990, 15: 59-64.
- [30] BARNETT R D, WEISS B. Inhibition of calmodulin activity by insect venom peptides[J]. Biochem Pharmacol, 1983, 32: 2929-2933.
- [31] KIZAWA K. Calmodulin binding peptide comprising α -casein exorphin sequence[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 1579-1581.
- [32] LI H, ALUKO R E. Kinetics of the inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by pea protein-derived peptides[J]. J Nutr Biochem, 2005, 16: 656-662.
- [33] OMONI A O, ALUKO R E. Effect of cationic flaxseed protein hydrolysate fractions on the *in vitro* structure and activity of calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase[J]. Mol Nutr Food Res, 2006, 50: 958-966.
- [34] YOU S J, UDENIGWE C C, ALUKO R E, et al. Multifunctional peptides from egg white lysozyme[J]. Food Res Int, 2010, 43: 848-855.
- [35] CHO S J, JULLERAT M A, LEE C H. Identification of LDL-receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 4372-4376.
- [36] KIRANA C, ROGERS P F, BENNETT L E, et al. Naturally derived micelles for rapid *in vitro* screening of potential cholesterol-lowering bioactives[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 4623-4627.
- [37] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M, et al. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility[J]. J Nutr, 1997, 127: 1395-1400.
- [38] MANSO M A, MIGUEL M, EVEN J, et al. Effects of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chem, 2008, 109: 361-367.
- [39] WERGEDAHL H, LIASET B, GUDBRANDSEN O A, et al. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats[J]. J Nutr, 2004, 134: 1320-1327.
- [40] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M, et al. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility[J]. J Nutr, 1997, 127: 1395-1400.
- [41] AOYAMA T, FUKUI K, TAKAMATSU K, et al. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK) [J]. Nutrition, 2000, 16: 349-354.
- [42] HORI G, WANG M F, CHAN Y C, et al. Soy protein hydrolyzate with bound phospholipids reduces serum cholesterol levels in hypercholesterolemic adult male volunteers[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65: 72-78.
- [43] LOVATI M R, MANZONI C, GIANAZZA E, et al. Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors. Identification of active β -conglycinin subunits[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 2474-2480.
- [44] LOVATI M R, MANZONI C, GIANAZZA E, et al. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in HepG2 cells[J]. J Nutr, 2000, 130: 2543-2549.
- [45] KOHNO M, HIROTSUKA M, KITO M, et al. Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean beta-conglycinin[J]. J Atheroscler Thromb, 2006, 13: 247-255.
- [46] CHO S, JULLERAT M A, LEE C. Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 10599-10604.
- [47] HIGAKI N, SATO K, SUDA H, et al. Evidence for the existence of a soybean resistant protein that captures bile acid and stimulates its fecal excretion[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70: 2844-2852.
- [48] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M, et al. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility[J]. J Nutr, 1997, 127: 1395-1400.
- [49] HERNANDEZ-LEDESMA B, HSIEH C C, de LUMEN B O. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention[J]. Peptides, 2009, 30: 426-430.
- [50] DIA V P, TORRES S, de LUMEN B O, et al. Presence of lunasin in plasma of men after soy protein consumption[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57: 1260-1266.
- [51] JEONG H J, LEE J R, JEONG J B, et al. The cancer preventive seed peptide lunasin from rye is bioavailable and bioactive[J]. Nutr Cancer, 2009, 61: 680-686.
- [52] WANG W, BRINGE N A, BERHOW M A, et al. β -Conglycinins among sources of bioactives in hydrolysates of different soybean varieties that inhibit leukemia cells *in vitro*[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 4012-4020.
- [53] SILVA-SANCHEZ C, BARBA de la ROSA A P, LEON-GALVAN M F, et al. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 1233-1240.
- [54] KIM S E, KIM H H, KIM J Y, et al. Anticancer activity of hydrophobic peptides from soy proteins[J]. Bio Factors, 2000, 12: 151-155.
- [55] HSU K, LI-CHAN E C Y, JAO C. Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7[J]. Food Chem, 2011, 126: 617-622.
- [56] BARRIO D A, ANON M C. Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*[J]. Eur J Nutr, 2010, 49: 73-82.
- [57] HARTMANN R, MEISEL H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications[J]. Curr Opin Biotechnol, 2007, 18: 163-169.
- [58] TAKAHASHI M, MORIGUCHI S, YOSHIKAWA M, et al. Isolation and characterization of oryzatensin: a novel bioactive peptide with ileum-contracting and immunomodulating activities derived from rice albumin[J]. Biochem Mol Biol Int, 1994, 33: 1151-1158.
- [59] MINE Y, KOVACS-NOLAN J. New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen's egg[J]. Worlds Poult Sci J, 2006, 62: 87-95.
- [60] NDIAYE F, VUONG T. Antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds[J]. Eur J Nutr, 2012, 51(1): 29-37.
- [61] HORIGUCHI N, HORIGUCHI H, SUZUKI Y. Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69: 2445-2449.
- [62] GAUTHIER S, POULIOT Y, SAINT-SAUVEUR D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of

- whey proteins[J]. Int Dairy J, 2006, 16: 1315-1323.
- [63] DIA V P, TORRES S, de LUMEN B O, et al. Presence of lunasin in plasma of men after soy protein consumption[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57: 1260-1266.
- [64] GONZALEZ de MEJIA E, DIA V P. Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF- κ B pathway in the macrophage[J]. Peptides, 2009, 30: 2388-2398.
- [65] PHELAN M, AHERNE-BRUCE S A, O'SULLIVAN D, et al. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells[J]. Int Dairy J, 2009, 19: 279-285.
- [66] YANG R, PEI X, WANG J, et al. Protective effect of a marine oligopeptide preparation from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) on radiation-induced immune suppression in mice[J]. J Sci Food Agric, 2010, 90: 2241-2248.
- [67] 庞广昌, 陈庆森, 胡志和, 等. 食品与机体中的移动通讯网络[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 1-9.
- [68] FEI Y J, KANAI Y, NUSSBERGER S, et al. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter[J]. Nature, 1994, 368: 563-566.
- [69] NEWEY H, SMYTH D H. The intestinal absorption of some dipeptides[J]. J Physiol, 1959, 145: 48-56.
- [70] REEDS P J, BURRIN D G, STOLL B, et al. Role of the gut in the amino-acid economy of the host. In peptides and amino acids in enteral nutrition[J]. Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme, 2000, 3: 25-40.
- [71] LEVENSON S M, ROSEN H, UPJOHN H L, et al. Nature and appearance of protein digestion products in upper mesenteric blood[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1959, 101: 178-180.
- [72] WIGGANS D S, JOHNSTON J M. The absorption of peptides[J]. Biochim Biophys Acta, 1959, 32: 69-73.
- [73] GARDNER M L G. Absorption of amino acids and peptides from a complex mixture in the isolated small intestine of the rat[J]. J Physiol, 1975, 253: 233-256.
- [74] TAGARI H, WEBB K E, Jr, THEURER B, et al. Mammary uptake, portal-drained visceral flux, and hepatic metabolism of free and peptide-bound amino acids in cows fed steam-flaked or dry-rolled sorghum grain diets[J]. J Dairy Sci, 2008, 91: 679-697.
- [75] LOCHS H, MORSE E L, ADIBI S A. Uptake and metabolism of dipeptides by human red blood cells[J]. Biochem J, 1990, 271: 133-137.
- [76] KRZYSIK B A, ADIBI S A. Comparison of metabolism of glycine injected intravenously in free and dipeptide forms[J]. Metabolism, 1979, 28: 1211-1217.
- [77] WEBB K E, Jr, DIRIENZO D B, MATTHEWS J C. Recent developments in gastrointestinal absorption and tissue utilization of peptides: a review[J]. J Dairy Sci, 1993, 76: 351-361.
- [78] PAN Y L, BENDE P K, AKERS R R M, et al. Methionine-containing peptides can be used as methionine sources for protein accretion in cultured C2C12 and MAC-T cells[J]. J Nutr, 1996, 126: 232-241.
- [79] MABJEESH S J, COHEN M, GAL-GARBER O, et al. Aminopeptidase N gene expression and abundance in caprine mammary gland is influenced by circulating plasma peptide[J]. J Dairy Sci, 2005, 88: 2055-2064.
- [80] TAGARI H, WEBB K E, Jr, THEURER B, et al. Portal drained visceral flux, hepatic metabolism, and mammary uptake of free and peptide-bound amino acids and milk amino acid output in dairy cows fed diets containing corn grain steam flaked at 360 or steam rolled at 490 g/L[J]. J Dairy Sci, 2004, 87: 413-430.
- [81] KIM Y S, BIRTWISTLE W, KIM Y W. Peptide hydrolases in the brush border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man[J]. J Clin Invest, 1972, 51: 1419-1430.
- [82] TERADA T, SAWADA K, SAITO H, et al. Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 1999, 276: 1435-1441.
- [83] DANIEL H, KOTTRA G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology[J]. Pflugers Arch, 2004, 447: 610-618.
- [84] WEITZ D, HARDER D, CASAGRANDE F, et al. Functional and structural characterization of a prokaryotic peptide transporter with features similar to mammalian PEPT1[J]. J Biol Chem, 2007, 282: 2832-2839.
- [85] LEIBACH F H, GANAPATHY V. Peptide transporters in the intestine and kidney[J]. Annu Rev Nutr, 1996, 16: 99-119.
- [86] BRANDSCH M, KNUTTER I, LEIBACH F. The intestinal H⁺/peptide symporter pepT1: structure-affinity relationships[J]. Eur J Pharm Sci, 2004, 21: 53-60.
- [87] STEFFANSEN B, NIELSEN C, BRODIN B, et al. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption[J]. Eur J Pharm Sci, 2004, 21: 3-16.
- [88] STEEL A, NUSSBERGER S, ROMERO M, et al. Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PepT1[J]. J Physiol, 1997, 498: 563-569.
- [89] SHIMAKURA J, TERADA T, SHIMADA Y, et al. The transcription factor Cdx2 regulates the intestinespecific expression of human peptide transporter 1 through functional interaction with Sp1[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 71: 1581-1588.
- [90] SHIMAKURA J, TERADA T, KATSURA T, et al. Characterization of the human peptide transporter PEPT1 promoter: Sp1 functions as a basal transcriptional regulator of human PEPT1[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289: G471-G477.
- [91] SHIRAGA T, MIYAMOTO K, TANAKA H, et al. Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/peptide transporter PepT1[J]. Gastroenterology, 1999, 116: 354-362.
- [92] IHARA T, TSUJIKAWA T, FUJIYAMA Y, et al. Regulation of PepT1 peptide transporter expression in the rat small intestine under malnourished conditions[J]. Digestion, 2000, 61: 59-67.
- [93] PAN X, TERADA T, OKUDA M, et al. The diurnal rhythm of the intestinal transporters SGLT1 and PEPT1 is regulated by the feeding conditions in the rat[J]. J Nutr, 2004, 134: 2211-2215.
- [94] SHIMAKURA J, TERADA T, SAITO H, et al. Induction of intestinal peptide transporter 1 expression during fasting is mediated via peroxisome proliferator-activated receptor α [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291: G851-G856.
- [95] THAMOTHARAN M, BAWANI S, ZHOU X, et al. Hormonal regulation of oligopeptide transporter PepT-1 in a human intestinal cell line[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 1999, 276: C821-C826.
- [96] BUYSE M, BERLIOZ F, GUILMEAU S, et al. PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine[J]. J Clin Invest, 2001, 108: 1483-1494.
- [97] NIELSEN C, AMSTRUP J, NIELSEN R, et al. Epidermal growth factor and insulin short-term increase hPepT1-mediated glycylsarcosine uptake in Caco-2 cells[J]. Acta Physiol Scand, 2003, 178: 139-148.
- [98] ASHIDA K, KATSURA T, MOTOHASHI H, et al. Thyroid hormone regulates the activity and expression of the peptide transporter PepT1 in Caco-2 cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282: G617-G623.
- [99] ADIBI S A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (PepT-1) in health and disease[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 285: G779-G788.
- [100] FORD D, HOWARD A, HIRST B. Expression of the peptide

- transporter hPepT1 in human colon: a potential route for colonic protein nitrogen and drug absorption[J]. *Histochem Cell Biol*, 2003, 119: 37-43.
- [101] ZIEGLER T, FERNANDEZ C, GU L, et al. Distribution of the H⁺/peptide transporter PepT1 in human intestine: up-regulated expression in the colonic mucosa of patients with short-bowel syndrome[J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 75: 922-930.
- [102] SEIKAWA S, KAWAI Y, FUJIWARA A, et al. Alterations in hexose, AA and peptide transporter expression in intestinal epithelial cells during *Nippostrongylus brasiliensis* infection in the rat[J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33: 1419-1426.
- [103] PALM C, JAYAMANNE M, KJELLANDER M, et al. Peptide degradation is a critical determinant for cell-penetrating peptide uptake[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768: 1769-1776.
- [104] MORRIS M C, VIDAL P, CHALOIN L, et al. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 2730-2736.
- [105] ERIKSSON M, NIELSON P E, GOOD L. Cell permeabilization and uptake of antisense peptide-peptide nucleic acid (PNA) into *Escherichia coli*[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 7144-7147.
- [106] SAALIK P, ELMQUIST A, HANSEN M, et al. Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. A comparative study[J]. *Bioconjug Chem*, 2004, 15: 1246-1253.
- [107] ZAMBONINO INFANTE J L, CAHU C L, PERES A. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development[J]. *J Nutr*, 1997, 127: 608-614.
- [108] RONNESTAD I, GAVAIA P J, VIEGAS C S, et al. Oligopeptide transporter PepT1 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): cloning, tissue expression and comparative aspects[J]. *J Exp Biol*, 2007, 210: 3883-3896.
- [109] KOTZAMANIS Y P, GISBERT E, GATESOUE F J, et al. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007, 147: 205-214.
- [110] VERMEIRSEN V, van CAMP J, VERSTRAETE W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides[J]. *Brit J Nutr*, 2004, 92: 357-366.
- [111] DAREWICZ M, DZIUBA B, MINKIEWICZ P, et al. The preventive potential of milk and colostrum proteins and protein fragments[J]. *Food Rev Int*, 2011, 27: 357-388.
- [112] FOLTZ M, MEYNEN E E, BIANCO V, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation[J]. *J Nutr*, 2007, 137: 953-958.
- [113] WANG W, GONZALEZ de MEJIA E. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases[J]. *Compr Rev Food Sci Food Safety*, 2005, 4: 63-78.
- [114] 庞广昌, 陈庆森, 胡志和, 等. 五味调与营养平衡及其信号传导[J]. *食品科学*, 2012, 33(13): 1-20.
- [115] GEIBEL J P, HEBERT S C. The functions and roles of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor along the gastrointestinal tract[J]. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71: 205-217.
- [116] CHOI S, LEE M, SHIU A L, et al. GPR93 activation by protein hydrolysate induces CCK transcription and secretion in STC-1 cells[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292: G1366-G1375.
- [117] BISSETTE G, NEMEROFF C B, LOOSEN P T, et al. Hypothermia and intolerance to cold induced by intracisternal administration of the hypothalamic peptide neurotensin[J]. *Nature*, 1976, 262: 607-609.
- [118] WHITE J F, NOINAJ N, SHIBATA Y, et al. Structure of the agonist-bound neurotensin receptor[J]. *Nature*, 2012, 490: 508-513.
- [119] FILIZOLA M, DEVI L A. Structural biology: how opioid drugs bind to receptors[J]. *Nature*, 2012, 485: 314-317.
- [120] THOMPSON A A, LIU Wei, CHUN E, et al. Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic[J]. *Nature*, 2012, 485: 395-399.
- [121] KIM J, GUAN K L. Amino acid signaling in TOR activation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 1001-1032.
- [122] TOLHURST G, REIMANN F, GRIBBLE F M. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion[J]. *J Physiol*, 2009, 587: 27-32.
- [123] RELMAN D A. Undernutrition-looking within for answers[J]. *Science*, 2013, 339: 530-532.
- [124] 庞广昌, 陈庆森, 胡志和. 食品是如何通过细胞因子网络控制人类健康的(I)[J]. *食品科学*, 2006, 27(5): 258-264.
- [125] 庞广昌, 陈庆森, 胡志和. 食品是如何通过细胞因子网络控制人类健康的(II)[J]. *食品科学*, 2006, 27(6): 260-270.
- [126] 黄栩林, 庞广昌, 杨静静. Trpi免疫调节功能的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(4): 381-385.
- [127] 李扬, 庞广昌, 于立芹. 牛初乳中的IgG对肠黏膜免疫系统调节的初步研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(17): 297-301.
- [128] 滑艳君, 庞广昌, 郭丽. 口服酪蛋白复合肽对细胞通讯网络的作用[J]. *食品科学*, 2010, 31(17): 310-317.
- [129] 庞广昌, 于立芹, 马田野. 食品-家兔体温-免疫调节的因果关系研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(10): 568-574.
- [130] SALMINEN S, BOULEY C, BOUTRON-ROUAULT M C, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function[J]. *British Journal of Nutrition*, 1998, 80(Suppl 1): 147-171.
- [131] WILLING B P, van KESSEL A G. Host pathways for recognition: establishing gastrointestinal microbiota as relevant in animal health and nutrition[J]. *Livestock Science*, 2010, 133: 82-91.
- [132] LEBLANC J G, MATAR C, VALDEZ J C, et al. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*[J]. *J Dair Sci*, 2002, 85: 2733-2742.
- [133] TROMPETTE A, CLAUSTRE J, CAILLON F, et al. Milk bioactive peptides and beta-casomorphins induce mucus release in rat jejunum[J]. *J Nutr*, 2003, 133: 3499-3503.
- [134] ZOGHBI S, TROMPETTE A, CLAUSTRE J, et al. Beta-casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a mu-opioid pathway[J]. *Am J Physiol-Gastrointest*. *Liver Physiol*, 2006, 290: G1105-G1113.
- [135] THOREUX K, BALAS D, BOULEY C, et al. Diet supplemented with yoghurt or milk fermented by *Lactobacillus casei* dn-114 001 stimulates growth and brush-border enzyme activities in mouse small intestine[J]. *Digest*, 1998, 59: 349-359.
- [136] FIANDER A, BRADLEY S, JOHNSON-GREEN P C, et al. Effects of lactic acid bacteria and fermented milks on eicosanoid production by intestinal epithelial cells[J]. *J Food Sci*, 2005, 70: M81-M86.
- [137] TANIDA M, YAMANO T, MAEDA K, et al. Effects of intraduodenal injection of *Lactobacillus johnsonii* la1 on renal sympathetic nerve activity and blood pressure in urethane-anesthetized rats[J]. *Neurosci Lett*, 2005, 389: 109-114.
- [138] DUARTE J, VINDEROLA G, RITZ B, et al. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation[J]. *Immunobiol*, 2006, 211: 341-350.
- [139] PERDIGON G, VINTINI E, ALVAREZ S, et al. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria[J]. *J Dair Sci*, 1999, 82: 1108-1114.
- [140] PANG Guangchang, XIE Junbo, CHEN Qingsen, et al. How functional foods play critical roles in human health[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2012, 1: 26-60.
- [141] MUELLER K, ASH C, PENNISI E, et al. The gut microbiota. Introduction[J]. *Science*, 2012, 336: 1245.
- [142] NICHOLSON J K, HOLMES E, KINROSS J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions[J]. *Science*, 2012, 336: 1262-1267.
- [143] MATSUBARA T, LI Fei, GONZALEZ F J, et al. FXR signaling in the enterohepatic system[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.05.004>.
- [144] SAM A H, TROKE R C, TAN T M, et al. The role of the gut/brain axis in modulating food intake[J]. *Neuropharmacology*, 2012, 63: 46-56.
- [145] CLUNY N L, REIMER R A, SHARKEY K A. Cannabinoid signalling regulates inflammation and energy balance: the importance of the brain-gut axis[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2012, 26: 691-698.
- [146] YOSHIE O, IMAI T, NOMIYAMA H. Chemokines in immunity[J]. *Adv Immunol*, 2001, 78: 57-110.
- [147] MICHELE W, HAUSCHILD R, SCHWARZ J, et al. Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients[J]. *Science*, 2013, 339: 328-332.
- [148] LORENZI T, MELI R, MARZIONI D, et al. Ghrelin: a metabolic signal affecting the reproductive system[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009, 20: 137-152.