

水牛唾液中生物活性物质的研究

胥清富, 田河山, 陈杰

(南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 从 7 头公水牛口腔中收集混合唾液, 用 RIA 法测定了 5 种激素样免疫反应物质 (immunoreactive substances), 并检测了唾液的胃蛋白酶解产物的总阿片样生物活性。结果显示, 水牛唾液中含有表皮生长因子 (EGF)、胰岛素样生长因子 1 (IGF-I)、促胃液素、胰岛素、胰高血糖素等激素样免疫反应物质。唾液经胃蛋白酶水解后, 产物使 NG108-15 细胞 cAMP 含量下降了 26.03% ($P < 0.01$), 这种作用可被特异性阿片受体阻断剂纳洛酮阻断。提示, 唾液在消化道中经胃蛋白酶水解产生阿片样生物活性物质。

关键词: 水牛; 唾液; 生物活性物质; 阿片样生物活性

中图分类号: S823.83 文献标识码: A 文章编号: 0578-1752(2001)05-0578-03

Studies on Immunoreactive Substances in Buffalo Saliva and General Opioid Peptide-like Activity in Protein Hydrolysates of Saliva

XU Qing-fu, TIAN He-shan, CHEN Jie

(Laboratory of Animal Physiology & Biochemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: This study detected immunoreactive substances in saliva of male buffalo and general opioid peptide-like activity in protein hydrolysates of the saliva was detected with RIA method. The result showed that there were epidermal growth factor (EGF), insulin like growth factor (IGF-I), gastrin, insulin and glucagon in buffalo saliva. The hydrolysates of saliva by protainase in atomach could decrease cAMP level of NG108-15 cells by 26.03% ($P < 0.01$), and this action could be inhibited reversed by naloxone, a specific inhibitor of opioid receptor. This suggested that saliva protein could release opioid-like active substance in gastrointestinal lumen by pepsin hydrolyzed.

Key words: Buffalo; Saliva; Immunoreactive substances; Opioid peptide-like activity

近年来, 有关唾液源性生物活性物质的研究受到人们普遍关注。在人、鼠、猫等动物的唾液中相继发现了 EGF、IGF-I、NGF、GIP 等多种生物活性肽, 并参与生长、消化及免疫机能的调节^[1], 但在反刍动物报道不多。此外, 唾液中含有丰富的蛋白质, 有学者推测, 唾液中的蛋白质可能在消化道中释放出某些生物活性肽^[2,3], 但无资料支持这一假说。本试验旨在检测唾液中激素样免疫反应物质, 并探讨唾液蛋白经胃蛋白酶水解产生阿片样生物活性肽的可能性, 为深入研究反刍动物唾液的生理意义提供资料。

1 材料与方法

1.1 唾液样品收集

健康公水牛 7 头, 体重 500 ± 50 kg, 上午 8:00 饲喂青干草, 1h 后清洗口腔并收集混合唾液, -20°C 保存待测。

1.2 主要试剂

PRM II 640 培养液, 美国 GIBCO 产品; 纳洛酮 (naloxone), Sigma 公司产品; NG108-15 细胞, 购自中国科学院上海细胞研究所; 猪胃蛋白酶, 中国科学院上海生化研究所产品; ^{125}I -cAMP 试剂盒, 购自上

收稿日期: 2000-05-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970552)

作者简介: 胥清富 (1966-), 男, 博士, 讲师, 主要从事动物消化代谢和营养生理方面研究工作, 现在四川畜牧兽医学院动物医学系工作。陈杰为本文通讯联系人。Tel: 025-4396413; Fax: 025-4442173; E-mail: Lapid@publicl.ptt.js.cn

海中医药大学同位素室; ^{125}I 胰岛素试剂盒, 购自卫生部上海生物制品研究所; ^{125}I -胰高血糖素试剂盒和 ^{125}I -EGF 试剂盒, 购自北京北方免疫试剂研究所; ^{125}I -促胃液素试剂盒, 购自北京海科锐生物技术中心。

1.3 唾液中几种激素样免疫反应物质的放免测定

用 RIA 双抗法测定 IGF-I、EGF、促胃液素、胰岛素、胰高血糖素。IGF-I 操作过程参照刘根桃 (1999)^[4] 方法进行, 其余的按试剂盒说明书进行。

1.4 唾液蛋白的胃蛋白酶水解产物中总阿片样生物活性测定

1.4.1 试验设计 分试验组、对照组 1 和对照组 2, 试验组唾液经胃蛋白酶酶解后处理 NG108-15 细胞, 对照组 1 和对照组 2 则分别用未经酶解的唾液和蒸馏水处理细胞, 收集细胞并测定其蛋白质和 cAMP。各组分别作加纳洛酮和不加纳洛酮两种处理。

NG108-15 细胞 (小鼠神经母细胞瘤×大鼠神经胶质细胞瘤) 内腺苷酸环化酶活性很高, 细胞表面有丰富的阿片受体。阿片受体激活后, 抑制细胞内腺苷酸环化酶的活性, 致使 cAMP 减少。而这种效应可被特异性阿片受体阻断剂纳洛酮所阻断。因而, 可根据 cAMP 含量的改变和纳洛酮能否阻断这种效应判定样品中是否有阿片样生物活性物质^[5]。

1.4.2 酶解液制备^[3] 样品 50ml, 用 HCl 调 pH 至 1.4, 根据唾液蛋白质含量, 按酶和蛋白质 1: 10 比例加入胃蛋白酶, 置 37℃ 孵育 2h。试验组孵育后置于 70℃ 40min 将酶灭活, 对照组 1 加胃蛋白酶后立即灭活后再孵育, 对照组 2 用蒸馏水代替试验组中的唾液, 与试验组同样处理。用 NaOH 调 pH 至 7.2, 而后 8500G 4℃ 离心 30min, 上清液-20℃ 保存

待用。

1.4.3 细胞培养和 cAMP 提取和测定^[3] 用含 10% 胎牛血清的 PRM II 640 培养液, 37℃ 培养 NG108-15 细胞。选细胞数基本一致的细胞瓶, 弃去培养液, 加入 37℃ 培养液 (浓度是 1640 培养液的 2 倍, 不含血清,) 和酶解液各 5ml。每组用 2 瓶细胞, 其中一瓶加纳洛酮 (终浓度 $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), 另一瓶不加。37℃ 孵育 15min 后, 加三氯乙酸终止反应。测定细胞 cAMP 和蛋白含量。结果用每毫克蛋白质对应的 cAMP pmol 数 (Mean ± SE) 表示, Student' T 检验差异显著性。

2 结果与分析

2.1 唾液中激素样免疫反应物质

表 1 显示, 水牛唾液中存在 IGF-I、EGF、促胃液素、胰岛素和胰高血糖素等激素样免疫反应物质, 但从数值上个体差异较大, 这可能与动物所处的生理状态有关。

2.2 唾液蛋白的胃蛋白酶水解产物中总阿片样生物活性

由表 2 可知, 对照组 1 和对照组 2 中, 加纳洛酮与不加纳洛酮比较, 细胞 cAMP 含量无显著变化 ($P > 0.05$), 表明纳洛酮对细胞 cAMP 含量无明显影响。加纳洛酮和不加纳洛酮两种情况下, 对照组 1 和对照组 2 比较, 未经酶解的唾液对细胞 cAMP 均无明显影响 ($P > 0.05$)。表明在本试验条件下, 未经酶解的唾液中未检测到阿片样活性。

试验组与对照组 1 比较, 不加纳洛酮时, 试验组细胞 cAMP 含量比对照组 1 低 26.03% ($P < 0.01$), 而加纳洛酮时, 二者差异不明显 ($P > 0.05$)。试验组

表 1 水牛唾液中几种激素样免疫反应物质测定结果

Table 1 Immunoreactive substances in saliva of buffalo

	IGF-I (n= 5) (ng/ml)	EGF (n= 5) (pg/ml)	胰岛素 Insulin (n= 6) (mIU/ml)	胰高血糖素 Glucagon (n= 6) (pg/ml)	促胃液素 Gastrin (n= 7) (pg/ml)
测定值	40.755	157.014	13.776	482.819	32.686
Values	± 10.400	± 73.413	± 6.231	± 188.177	± 15.554

表 2 唾液的胃蛋白酶解液对 NG108-15 细胞内腺苷酸环化酶活性的影响¹⁾ (pmol/mg, n= 7)

Table 2 Effect of saliva protein hydrolastes on the adenylate cyclase activity of NG108-15 cell

	试验组 TEST	对照组 1 CON-1	对照组 2 CON-2
No NAL	20.103 ± 2.473a	27.178 ± 2.782b	27.341 ± 2.337b
NAL	25.850 ± 2.468b	27.336 ± 2.542b	27.102 ± 2.412b

¹⁾ 相同字母表示 $P > 0.05$, 不同字母表示 $P < 0.01$

Values with the same and different letters mean $P > 0.05$ and $P < 0.01$ respectively

中,加纳洛酮时细胞 cAMP 含量比不加纳洛酮高 22.23% ($P < 0.01$)。表明唾液经胃蛋白酶水解后,能抑制细胞腺苷酸环化酶活性,这种效应能被纳洛酮阻断。提示,产物中有阿片样生物活性物质。

3 讨 论

3.1 反刍动物唾液中生物活性物质来源

唾液中生物活性物质主要来自两个方面,一是直接来源于血液,或从血液摄取原料,在唾液腺泡细胞合成后随唾液分泌进入消化道。研究表明,水牛唾液中含有 IGF-I、EGF、促胃液素、胰岛素和胰高血糖素等激素样免疫反应物质。这几种物质血液中都存在,因而可能来源于血液。二是唾液中某些蛋白质,经消化酶作用释放出某些活性肽。Jansman 等发现,小鼠的唾液中含有脯氨酸富集片段的蛋白质^[2]。这种与外啡肽(exorphine)的特性相似。有关研究表明,食物或饲料中的某些蛋白含有生物活性片段(bioactive peptide, BAP),它们经消化酶作用释放出来^[3]。研究最多的是外源性阿片活性肽-外啡肽,尤其是乳源性酪蛋白、饲料中谷蛋白等经消化酶作用产生的酪啡肽(β CMs),其对动物摄食、消化、内分泌等有重要作用^[2]。

3.2 反刍动物唾液中生物活性物质的生物学意义

反刍动物唾液分泌量大,随着唾液分泌,有相当数量的生物活性物质进入瘤胃。瘤胃中有大量的细菌、真菌和纤毛虫与宿主共生。资料表明,细菌、真菌能分泌某些类似哺乳动物多肽类激素、类固醇激素和神经递质的物质,被称为微生物激素^[6]。如甲烷菌和 *Neurospora crass* 真菌能产生胰岛素样免疫反应物质^[7],酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 可产生与哺乳动物 GnRH 的前 9 个氨基酸有高度同源性的 α 因子(Loumaye E, 1982)。同时,在微生物细胞上存在某些生物活性物质的受体^[5]。如 *Neurospora crass* 真菌细胞膜上有与哺乳动物胰岛素高度亲和力的膜蛋白,胰岛素与之结合后,能调节微生物的代谢(Fawell S E, 1988)。因此,唾液中生物活性物质,可能直接作用于瘤胃微生物,调节瘤胃消化代谢。

消化道的生物活性肽在调节消化液分泌、上皮

增生和保护粘膜中发挥重要作用^[1]。资料表明,小肠粘膜有 NGF、EGF 等活性肽的受体(Thompson J F, 1988),小肠灌注 EGF 能促进半乳糖和甘氨酸的吸收(Schwartz M Z, 1988)。由于网瓣口周期性开放和唾液的连续分泌,有一部分唾液可直接经网瓣口进入真胃^[2,3]。因此,唾液中的生物活性物质可能作用于皱胃和小肠粘膜上相应受体或吸收入血,参与消化活动及整体代谢的调节^[1]。

唾液分泌与动物机体的机能状况有关,动物处于发情期、怀孕期和泌乳期,唾液中孕酮、皮质醇、雌激素等发生明显变化,并与血中浓度改变是平行的。动物机能状况与神经系统之间存在必然联系,唾液分泌受神经内分泌调节。神经系统释放的神经递质及下丘脑释放的激素通过交感神经干-下颌腺轴调节唾液腺分泌^[8]。因此,我们推测,唾液可看成是一种信息传递者,通过“神经系统-唾液腺-生物活性物质-消化道”途径,将机体内环境变化的信息传递给消化道及瘤胃微生物,使消化代谢与整体代谢保持一致。

References:

- [1] Rao R K. Biologically Active peptides in the gastrointestinal lumen[J]. Life Science, 1991, 48(18): 1685- 1704.
- [2] Foretschel M A. Bioactive peptides in digesta that regulate gastrointestinal function and intake[J]. J. Anim. Sci 1996, 74: 2500- 2508.
- [3] Foretschel M A. Effect of abomasal infusion of saliva on reticular motility and ruminal liquid contents of steers[J]. J. Dairy Sci 1995, 78: 2395- 2401.
- [4] Liu G T, Chen W H, Zheng Y L, et al. Development of a radioimmunoassay for insulin-like growth factor I [J]. Nanjing Agricultural University, 1999, 22(2): 63- 66. (in Chinese)
刘根桃,陈伟华,郑元林,等.胰岛素样生长因子-1 的放射免疫测定方法的建立[J].南京农业大学学报,1999,22(2): 63- 66.
- [5] Shama S K, Nirenberg M, Klee W A. Morphine receptor as regulator of adenylate cyclase activity[J]. Proc. Nat. Acad. Sci USA. 1975, 72(2): 590- 594.
- [6] Lyte M. The role of microbial endocrinology in infectious disease[J]. J. Endocrinol. 1993, 137(3), 343- 345.
- [7] Lenard J. Mammalian hormones in microbial cells[J]. Trends Biochem Sci 1992, 17(4): 147- 150.
- [8] Mathison R J, et al. Neuroendocrine regulation of inflammation and tissue repair by submandibular gland factors[J]. Immunol. Today, 1994, 15(11): 527- 532.