

研究简报

鲢、鳙胰蛋白酶的研究

STUDIES ON TRYPSIN IN SILVER CARP AND BIGHEAD CARP

黄峰 严安生 汪小东

(华中农业大学, 武汉 430070)

Huang Feng, Yan Ansheng and Wang Xiaodong

(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

关键词 鲢, 鳙, 胰蛋白酶

KEYWORDS silver carp, bighead carp, trypsin

鱼类消化酶的研究是鱼类消化生理的重要研究内容, 也为配合饲料的研制提供理论依据。鱼类消化酶的种类很多, 在这方面的研究工作, 国外开展得比国内要多, 但关于鱼类胰蛋白酶的研究, 则相对较少。Jany [1976]报道了鲫的一些组织器官中的胰蛋白酶。Yoshinaka等[1984]研究了日本鳊的胰蛋白酶活性的分布。Uys和Hecht[1987]分析了胡子鲶的胰蛋白酶。Segner等[1989]用酶组织化学方法观察了白鲢消化道胰蛋白酶的分布。Bitterlich[1985]研究了鲢和鳙十等分肠段内容物的胰蛋白酶活性。本文研究了这两种鱼的消化器组织中的胰蛋白酶活性分布。

1 材料与方方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源

实验用的鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 和鳙 (*Aristichthys nobilis*) 均取自华中农业大学水产试验站同一鱼池, 所取得的鲢、鳙在半小时内运至实验室, 使鱼保持正常活动状态。鲢体重 430 ~ 660g, 体长 34 ~ 40cm; 鳙体重 365 ~ 760g, 体长 31 ~ 42cm。

1.1.2 样品制备

解剖活鱼, 取出内脏, 置于碎冰中(保持在 0 ~ 4℃ 状态下), 从肝胰脏、脾脏组织中随机取出一部分组织块, 称重; 取出胆囊, 将胆囊表面的脂肪及其他组织剔除干净, 用蒸馏水冲洗囊外壁数次, 再用脱脂棉球轻轻拭干, 刺破囊壁, 取得胆汁, 称重; 将肠分为五等分, 取出各肠段内容物, 用蒸馏水冲洗干净肠内壁, 再用脱脂棉球小心拭干, 刮下各段肠粘膜, 分别称重; 将所有取得的样品加蒸馏水, 在 0 ~ 4℃ 下匀浆(胆汁除外)、抽提 20 ~ 28 小时, 尔后, 离心 20 分钟(12000g, 4℃), 取上清液, 即为酶粗提液。

1.2 方法

1.2.1 胰蛋白酶活性测定

测定方法根据张龙翔等[1981],以Na α -对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯酸盐(TAME)作底物,29.0mg TAME溶于100ml 0.05M-pH 8.0的Tris-盐酸缓冲液(含CaCl $_2$)。在25 $^{\circ}$ C条件下,使酶粗提液与之反应(无酶同浓度底物作空白),使用UV-265FW紫外可见分光光度计(日本),于247nm波长测其吸光值(A),每隔30秒读一次数,共计3分钟。胰蛋白酶活性大小以在25 $^{\circ}$ C、pH 8.0的条件下,1g新鲜样品在1分钟内所产生的吸光值的变化量(ΔA 增量)来表示($\Delta A/g \cdot \text{min}$)。

1.2.2 肝胰脏、脾脏组织学

鲢和鳙的肝胰脏组织样本随机地取材于靠近胆囊的部位,大小约0.4cm \times 1cm \times 1cm,脾脏样本则取材于整个脾脏,用Bouin's液固定,石蜡包埋、切片,H.E.染色,显微镜观察、拍照。

2 结果

2.1 胰蛋白酶活性的分布

从表1中可以看出,鲢和鳙的胰蛋白酶活性的变化规律很相似。在所检测的组织器官中,均以肝胰脏中的胰蛋白酶活性为最大($P < 0.05$),脾脏中也具有较高的该酶活性,而胆汁中未检测出胰蛋白酶活性。在五等分长度的肠道中,两种鱼的胰蛋白酶活性以第II段肠粘膜中的为最高,高于第I段肠粘膜($P > 0.05$,无显著性差异),并从第II段向肠后呈递减趋势,但是,第V段肠粘膜中的胰蛋白酶活性又稍高于前一段的。

表1 胰蛋白酶活性的分布

Table 1 Distribution of the trypsin activity

分布部位	第I段 肠粘膜	第II段 肠粘膜	第III段 肠粘膜	第IV段 肠粘膜	第V段 肠粘膜	肝胰脏	脾脏	胆汁
n	9	9	9	9	8	10	4	4
鲢 X[$\Delta A/g \cdot \text{min}$]	4.98 (2.73)	5.73 (2.38)	0.45 (0.41)	0.13 (0.12)	0.41 (0.25)	8.00 (3.92)	4.13 (1.15)	0.00 (0.00)
n	8	8	6	7	7	10	4	4
鳙 X[$\Delta A/g \cdot \text{min}$]	5.33 (2.14)	6.23 (1.95)	0.21 (0.11)	0.10 (0.06)	0.35 (0.24)	8.27 (1.84)	6.29 (1.12)	0.00 (0.00)

说明:n-样本数;X-胰蛋白酶活性的平均值;括号-标准差。

在这两种鱼的相同组织器官中,胰蛋白酶活性除在脾脏中的有显著性差异($P < 0.05$)外,其它组织器官中均无显著性差异($P > 0.05$)。这两种鱼的第I段肠粘膜与第II段肠粘膜之间的胰蛋白酶活性不存在显著差异($P > 0.05$),而第I、II段比第III、IV和V段肠粘膜的胰蛋白酶活性明显要高($P < 0.05$)。

2.2 pH值对胰蛋白酶活性的影响

在TAME浓度相同的条件下,仅改变缓冲液的pH值,检测了pH对鲢、鳙第II段肠粘膜中的胰蛋白酶活性的影响,结果表明,在pH为6.5~8.5的范围内,该酶活性在pH 8.0~8.5时很稳定;低于pH 7.5时,其活性急剧下降;当pH为6.5时,其活性几乎丧失(图1)。

2.3 鲢、鳙鱼的胰腺组织分布

在显微镜下,经H.E.染色的胰脏组织呈蓝紫色,细胞排列成管泡状结构,胰腺组织细胞呈锥体形或低柱状,胞核圆形,胞质呈不均匀蓝色或蓝色颗粒状,而肝脏组织中可见肝细胞索及其分枝,并互相连接形成网状结构,肝细胞呈多角状,核圆形呈蓝色,胞质呈不均匀的红色或浅红色,并可见脂泡,所以在显微镜下,从染色

和结构上都很容易把胰脏组织和肝脏组织区分开来。分布于脾脏组织中的胰脏组织,其染色和结构与分布于肝脏组织中的一样,也可以很容易地加以区别。

鲢、鳙肝胰脏和脾脏组织学观察表明,这两种鱼的胰腺组织在肝脏和脾脏中均有分布,且分布情况很相似,即分布于肝脏和脾脏的表面,或伸入其内部,胰脏组织虽与肝脏或脾脏组织混合在一起,但彼此之间有结缔组织使两两之间相对分开(图1)。

3 讨论

3.1 肝胰脏中的胰蛋白酶活性

鱼类的食性是其与消化器官组织的结构和消化机能相适应的,消化器官的不同部位,因所承担的消化机能不同,消化酶活性也会呈明显差异。六十多年前,Chesley [1934]曾调查了具有密致型、弥漫型胰腺的多种鱼类,认为淀粉酶等消化酶的中心生成器官是胰脏。Fish [1960]发现河鲈 (*Perca fluviatilis*) 和莫桑比克罗非鱼 (*Tilapia mossambica*) 的碱性蛋白酶活性以胰脏组织中的最大,草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肝胰蛋白酶活性高于肠道的 [黄耀桐和刘永坚,1988]。本实验结果表明,鲢、鳙的肝胰脏蛋白酶活性明显大于其它组织器官 ($p < 0.05$);胰腺组织虽与肝脏混在一起,但彼此是分开的,同时胆汁中无胰蛋白酶活性,这就说明散布于鲢、鳙肝脏内的胰脏组织仍是产生胰蛋白酶的主要场所。

3.2 脾脏中的胰蛋白酶活性

脾脏并非消化腺,通常被认为是造血、过滤血液循环和破坏衰老红细胞的中心场所 [孟庆闻,1989],但我们检测到这两种鱼的脾脏中具有较强的胰蛋白酶活性。在现有资料中,我们尚未发现这种情况。通常认为胰蛋白酶是来源于胰腺组织或其它一些与消化有关的器官组织。进一步通过组织学观察,我们发现脾脏的表面和内部均有胰腺组织的存在,这就说明了脾脏中的胰蛋白酶实际上来源于脾脏的胰腺组织,并非脾脏本身的产物。

3.3 胆汁中的胰蛋白酶活性

有关鱼类胆汁是否有消化酶的研究报道很少。早期的一些研究曾表明某些鱼类胆汁中有消化酶,如鳊鱼胆汁内有蛋白酶等活性,并有激活胰液的作用;鲤胆汁里有淀粉酶 [尾崎久雄,1983年中译本]。但若将底鲃 (*Fundulus heteroclitus*) 胆囊在波恩氏液里固定1分钟,以使其周围胰腺组织固定后再采集胆汁,发现胆汁里并无蛋白酶等活性 [尾崎久雄,1983年中译本]。笔者对鲢、鳙胆汁作过多次酶活性检测,均未发现有胰蛋白酶的存在,据此推测,尽管鲢、鳙的胰腺组织分布于肝脏的表面或其内部;但两者之间有结缔组织使之分隔,因而胰脏分泌物的排出可能另有解剖学上的途径。

3.4 肠粘膜的胰蛋白酶

Кирилленко [1983]发现摄食不同浓度蓝藻的鲢,其三等分肠段粘膜和食糜中的蛋白酶等消化酶的活性是从前端向后显著递减 (张幼敏译,1985年)。Jonas 等 [1983]也测得鲤和鲢五分肠壁的蛋白酶活力由前向后呈现下降趋势。酶组织学显示白鲢 (*Coregonus lavaretus*) 的胰蛋白酶由前端向后端呈下降趋势 [Segner, 1989]。

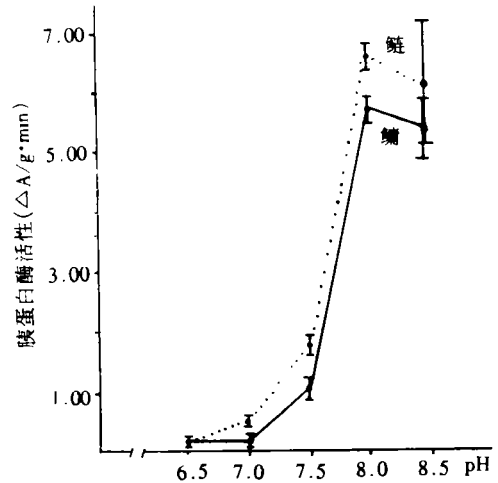


图1 pH对鲢、鳙胰蛋白酶活性的影响

Fig. 1 Effect of pH value on the trypsin of *H. molitrix* and *A. nobilis*

(1)张幼敏译,1985。白鲢摄食蓝藻时消化酶的活性。淡水渔业译丛,(4):51~54。

罗非鱼前端肠粘膜碱性蛋白酶等酶活性比后端的要强[Fish, 1960]。虹鳟前肠胰蛋白酶活性明显高于后肠的[Onishi 等, 1976]。鲢、鳙和其它一些鱼类肠粘膜胰蛋白酶活性由前向后逐渐减弱的一致性,表明无论是胃鱼类还是无胃鱼类,其肠前部是消化食物的主要场所,这是消化酶活性分布与消化机能相适应的一个例证。

值得提及的是,鲢、鳙肠粘膜最后端的胰蛋白酶活性稍高于前一段,这可能在肠的后端存在着胰蛋白酶重吸收的机制,使胰蛋白酶得以重新利用[Bitterlich, 1985]。

3.5 胰腺组织的分布

早在 1873 年,Legouis 就曾发现硬骨鱼类的胰脏有密致型、弥漫型和散在型三种类型,而且大多数硬骨鱼胰脏是弥漫型的,分散在肝脏、幽门垂、脾脏和肠等处;鲤科鱼类不但有弥漫型还有散在型[尾崎久雄, 1983 年中译本]。孟庆闻和苏锦祥[1960]认为沿输胆管两侧散布着的一些粉红色小圆形颗粒即是鲢的胰脏和胰岛细胞。而有关于鲢、鳙胰腺组织的分布至今未见报道,虽然本文的重点是研究这两种鱼的胰蛋白酶,但对这两种鱼的肝脏和脾脏组织学观察表明,这两种脏器的表面和内部均有胰脏组织的分布,而且在鲢、鳙是一致的。这与秉志[1983]对“鲤胰脏分布在肝脏之外或在其内,亦有一部分透入脾脏的,其体颇分散”的描述相似。鲢、鳙肝脏、脾脏的胰蛋白酶检测结果也从机能上证实了胰腺组织存在于这两种脏器之中。根据已有的研究结果,可以推测鲢、鳙的胰腺不属于密致型,但究竟是属于弥漫型或散在型或是它们的中间类型尚有待于今后的研究。

参 考 文 献

- [1] 尾崎久雄(吴尚忠译), 1983. 鱼类消化生理(上、下册), 296~328. 上海科学技术出版社。
- [2] 张龙翔等主编, 1981. 生化实验方法和技术, 171~175. 人民教育出版社(京)。
- [3] 秉志著, 1983. 鲤鱼组织, 20~21. 科学出版社(京)。
- [4] 孟庆闻, 1989. 鱼类学, 108. 上海科学技术出版社。
- [5] 孟庆闻、苏锦祥著, 1960. 白鲢的系统解剖, 81~82. 科学出版社(京)。
- [6] 黄耀桐、刘永坚, 1988. 草鱼肠道肝脏蛋白酶活性初步研究. 水生生物学报, 12(4): 328~322.
- [7] Bitterlich, G., 1985. Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeders, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp, *Aristichthys Nobilis* Rich. *J. Fish Biol.*, 27:103~112.
- [8] Chesley, L. L., 1984. The concentration of protease, amylase, and lipase in certain marine fishes. *Biol. Bull.*, 66:133~144.
- [9] Fish, G. R., 1960. The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of *Tilapia* and *Perch*. *Hydrobiologia*. 15(1~2):161~177.
- [10] Jany, K. D., 1976. Studies on the digestive enzymes of the stomachless bonefish *Carassius auratus gibelio* (Bloch): endopeptidases. *Comp. Biochem. Physiol.*, 53:31~38.
- [11] Jonas, E. et al., 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio* L.) fishes. *Aquac.*, 30:145~154.
- [12] Onishi, T. et al., 1976. Changes in digestive enzymes levels in Carp after feeding - III. response of protease and amylase to twice - a - day feeding. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 42(8):921~929.
- [13] Segner, H. et al., 1989. Digestive enzymes in larval *Corgonus larvaretus* L. *J. Fish Biol.*, 35:249~263.
- [14] Uys, W. & T. Hecht, 1987. Assays on the digestive enzymes of sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces claridae). *Aquac.*, 63:301~313.
- [15] Yoshinaka, R. et al., 1984. Distribution of trypsin and chymotrypsin, and their zymogens in digestive organs of the eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 788(3):569~573.