

野生棘胸蛙消化器官蛋白酶的分布及酶活力

谢展望 颜志刚 胡一中* 郑荣泉

浙江师范大学化学与生命科学学院生态研究所 金华 321004

摘要: 本研究在不同pH和温度条件下以离体方式对野生棘胸蛙 (*Quasipaa spinosa*) 不同消化器官的蛋白酶活力进行了分析。结果表明, 食道、胃、胰的蛋白酶活力受到酶体系pH的显著影响 ($P < 0.05$), 且随pH升高呈现典型的单峰型活力曲线。食道和胃的蛋白酶活力在pH为1.5时达到峰值, 胰的酶活力在pH为9.6时达到峰值, 而肠道酶活力在pH为7.4时达到峰值。各消化器官蛋白酶活力具有明显的温度依赖性 ($P < 0.05$), 酶活力随温度升高也均呈典型的单峰型活力曲线, 不同消化器官的最大酶活力温度分别为, 食道50°C、胃50°C、胰45°C、前肠45°C、后肠45°C、直肠45°C。在最大酶活力的pH和30°C条件下, 各消化器官蛋白酶活力由高到低依次为胰、食道、胃、直肠、前肠、后肠。由此可见, 蛋白酶在棘胸蛙消化系统的分布具有明确的规律性, 且不同来源的蛋白酶需要在特定pH和温度下才能表现出最大的反应活性。

关键词: 棘胸蛙; 消化系统; 蛋白酶; 酸碱度; 温度

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 05-765-08

Distribution and Activity of Protease in Digestive Organs of Wild Giant Spiny Frog, *Quasipaa spinosa*

XIE Zhan-Wang XIE Zhi-Gang HU Yi-Zhong* ZHENG Rong-Quan

Institute of Ecology, College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract: This study investigated protease activities in different digestive organs of wild giant spiny frog (*Quasipaa spinosa*) in the range of pH 0.5 to 10.0 at 30°C and reaction temperature 15 to 60°C at optimum pH *in vitro*. The protease activity was measured using the Folin-phenol method. The data were statistically analyzed by One-way ANOVA and LSD. The results showed that pH could affect protease activities of esophagus, stomach and pancreas significantly ($P < 0.05$), and their dynamic curves of protease activities were typically unimodal with increasing pH (Fig. 1). The protease activities of esophagus, stomach, pancreas and intestine were maximal at pH 1.5, 1.5, 9.6 and 7.4, respectively. The protease activities of digestive organs showed an obvious temperature dependence ($P < 0.05$), and the curves were also typically unimodal (Fig. 2). The protease activities of esophagus, stomach, pancreas, foregut, hindgut and rectum attained

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31270457);

* 通讯作者, E-mail: huyizhong@zjnu.cn;

第一作者介绍 谢展望, 男, 硕士研究生; 研究方向: 动物生理生态学; E-mail: 404690966@qq.com。

收稿日期: 2014-11-06, 修回日期: 2015-03-26 DOI: 10.13859/j.cjz.201505013

maximum value at temperature 50°C, 50°C, 45°C, 45°C, 45°C and 45°C, respectively. Under the conditions of 30°C and optimal pH mentioned above, digestive organs were arranged in order of descending protease activities: pancreas, esophagus, stomach, rectum, foregut and hindgut. In conclusion, there obviously exists a regular protease distribution in digestive system of this species, and the enzymes from different organs can show maximal activities at specific pH values and temperatures.

Key words: *Quasipaa spinosa*; Digestive system; Protease; pH value; Temperature

消化酶活力是反映动物消化生理机能的一项重要指标, 其高低决定机体对营养物质消化吸收的能力, 从而影响机体的生长发育。动物的食性或食物的营养组成与其消化酶组成密切相关 (Sabat et al. 2005), 而且动物消化系统不同部位消化酶的类型和活力也存在差异 (Naya et al. 2005)。两栖类属于典型的肉食性动物, 主要摄食高蛋白食物, 因此消化系统蛋白酶活力的高低直接影响其对食物的利用能力。另外, 两栖类属于典型的变温动物, 如季节性的温度变化可能会通过影响消化酶活力来干扰两栖类的消化能力 (Hofer 1979), 从而影响其适合度。

棘胸蛙 (*Quasipaa spinosa*) 隶属于蛙科棘胸蛙属, 俗称石蛙, 是一种分布在我国南方山区溪流生态系统的大型无尾两栖类 (Yu et al. 2014)。由于棘胸蛙具有较高的营养价值和药用价值, 已经成为一种新兴的具有较高经济价值的水产养殖品种, 但因该物种对生境的要求极为苛刻 (Zheng et al. 2010) 且只摄食活饵, 在驯养条件下环境温度和食物种类的改变易导致消化不良和代谢障碍等问题。目前, 关于此蛙消化生理方面的研究非常缺乏, 本文较详细地报道了野生棘胸蛙消化系统各部位蛋白酶的分布情况以及在不同反应温度和pH条件下的酶活力。了解该物种的消化生理特征, 不仅可为养殖实践提供专业知识, 还可为两栖类进化适应机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

棘胸蛙于2013年5月采自浙江武义牛头山,

选取6只健康成体 (体重90~110 g, ♀/♂为1:1) 用于研究。经双毁髓法处死后解剖, 迅速取出完整消化道。剪开消化道后用4°C蒸馏水快速洗净, 用吸水纸拭干, 按食道、胃、前肠、后肠、直肠和胰剪取组织样品并称量, 立刻用于粗酶提取。

1.2 粗酶液的制备

每克组织样品加入20 ml 4°C蒸馏水, 在冰浴条件下用电动匀浆机充分匀浆, 然后在4°C下以4 000 r/min离心20 min, 取上清, 即为粗酶提取液。于4°C保存, 在8 h内完成酶活力测定。

1.3 蛋白酶活力的测定

蛋白酶活力采用福林-酚试剂法。操作步骤: 取浓度为1%的酪蛋白溶液0.5 ml, 分别加入不同pH的缓冲液2 ml, 混匀, 在(30 ± 1) °C下预温5~10 min。经预实验发现各部位蛋白酶活力相差很大, 为保证各部位的酶有充分的底物, 按食道、胃、前肠、后肠、直肠和胰分别加入0.25 ml、0.25 ml、0.50 ml、0.50 ml、0.50 ml和0.10 ml预温的粗酶液。在(30 ± 1) °C下反应15 min后加10%三氯乙酸1.5 ml终止反应, 静置15 min, 经过滤后取滤液1 ml, 加0.55 mol/L的Na₂CO₃溶液5 ml, 酚试剂1 ml, 摇匀。在(30 ± 1) °C下显色15 min, 用全波长酶标仪 (Multiskan GO, Thermo) 在680 nm波长条件下测吸光度。酶活力单位: 在(30 ± 1) °C下, 1 g组织在1 min内水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸作为一个酶活力单位[μg/(g min)]。根据标准曲线方程 $y = 91.586x$ (x 为吸光度, y 为酪氨酸含量) ($r^2 = 0.9961$), 求出各个吸光度对应的酪氨酸含量, 根据公式计算酶活力, 酶活力 = $A \times V / (N \times t)$, 式中, A 为对照标准曲线得出

的酪氨酸释放量 (μg), V 为加入粗酶液的体积 (ml), N 为组织匀浆时稀释倍数20, t 为反应时间 (min), 取5次测量的平均值。

1.3.1 酶反应体系pH的设置 酶反应体系不同pH缓冲液的配置: KCl-HCl配制pH 0.5 ~ 1.5的缓冲液; Na_2HPO_4 -柠檬酸配制pH 2.2 ~ 8.0的缓冲液; 巴比妥钠-HCl配制pH 8.0 ~ 9.6的缓冲液; 甘氨酸-NaOH配制pH 10.0 ~ 10.6的缓冲液。共设15个pH梯度 (0.5、1.0、1.5、2.2、3.4、4.2、5.0、6.2、7.0、7.4、7.8、8.2、9.0、9.6、10.0)。

1.3.2 酶反应温度的设置 根据消化系统各部位蛋白酶的最大酶活力的pH, 选择对应的缓冲液测定不同温度下的蛋白酶活力。温度范围为15 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$, 以5 $^{\circ}\text{C}$ 为间隔, 共设10个温度梯度。

1.4 统计与分析

实验数据均以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示, 采用统计软件 SPSS17.0 对数据进行分析, 用 One-Way ANOVA 检验比较不同条件下的酶活力差异, 当检测到符合方差齐性后, 进行 LSD 多重比较, 显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 pH对蛋白酶活力的影响

在不同 pH 条件下野生棘胸蛙消化系统各部分蛋白酶活力变化情况见图 1。食道、胃、胰蛋白酶活力与 pH 关系曲线均呈较典型的单峰型, 而肠道酶活力虽然也基本呈现单峰型, 但在不同 pH 间无显著差异 ($P > 0.05$)。食道和胃蛋白酶活力表现出相同的变化趋势, 食道蛋白酶活力总体大于胃, 在 pH 1.5 ~ 2.0 范围内表现出较强的活性, 当 pH 为 1.5 时食道和胃的酶活力达到峰值, 分别为 $(324.19 \pm 7.11) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 和 $(225.73 \pm 3.15) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$, 当 pH 大于 2.0 时活力下降较快。胰的酶活力在 pH 8.0 ~ 10.0 范围内较强, 当 pH 为 9.6 时达到峰值 $(682.78 \pm 10.70) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$, 当 pH 低于 7.5 时活力下降较快。前肠、后肠、直肠蛋白酶活力均在 pH 为 7.4 时达到峰值, 分别为 $(41.10 \pm 1.45) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 、 (39.68 ± 16.91)

$\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 、 $(48.11 \pm 20.81) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。

2.2 反应温度对蛋白酶活力的影响

温度对各消化部位蛋白酶活力影响显著 ($P < 0.05$), 且蛋白酶活力与温度的关系曲线均呈较典型的单峰型 (图 2)。食道、胃、胰、前肠、后肠、直肠蛋白酶的最大酶活力温度分别为 50 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 消化系统不同部位蛋白酶活力的分布

在最大酶活力 pH 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 胰的酶活力为 $(682.78 \pm 10.70) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$, 显著高于消化系统其他器官 ($P < 0.05$); 食道蛋白酶活力为 $(324.19 \pm 7.11) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$, 显著高于胃蛋白酶 [$(225.73 \pm 3.15) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$] ($P < 0.05$); 肠道各段酶活力, 前肠为 $(41.10 \pm 1.45) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$, 后肠为 $(39.68 \pm 16.91) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$, 直肠为 $(48.11 \pm 20.81) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$, 但各段间无统计差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

动物体内蛋白酶水解底物的能力直接受到内环境酸碱度的影响。如本研究结果显示, 野生棘胸蛙不同消化器官来源的蛋白酶需要在特定酸碱度条件下才能表现出最大的反应活性。又如胃蛋白酶由胃腺的主细胞合成, 以酶原颗粒形式分泌, 在胃液酸性环境中酶原发生去折叠, 使得其能够以自催化的方式对自身进行剪切, 从而生成具活性的胃蛋白酶 (Das et al. 1991)。此外, 棘胸蛙食道最大酶活力的pH为 1.5, 与胃蛋白酶相同, 这与对野生黑斑蛙 (*Rana nigromaculata*) (张盛周等 2004) 和野生虎纹蛙 (*R. rugulosa*) (张盛周等 2005) 的研究结果相一致。这验证了组织学研究的结论, 即蛙类食道壁腺体中有分泌蛋白酶原的细胞, 且与胃蛋白酶原细胞同源 (Reeder 1964)。这说明蛙类在食道内就开始对食物进行消化, 并将更多的蛋白酶带入胃中以利于进一步消化。棘胸蛙肠道各段蛋白酶最大酶活力的pH偏弱碱性 (7.4), 而胰最大酶活力的pH偏强碱性 (9.6), 这与对黑斑蛙 (张盛周等 2004)、虎纹蛙 (张

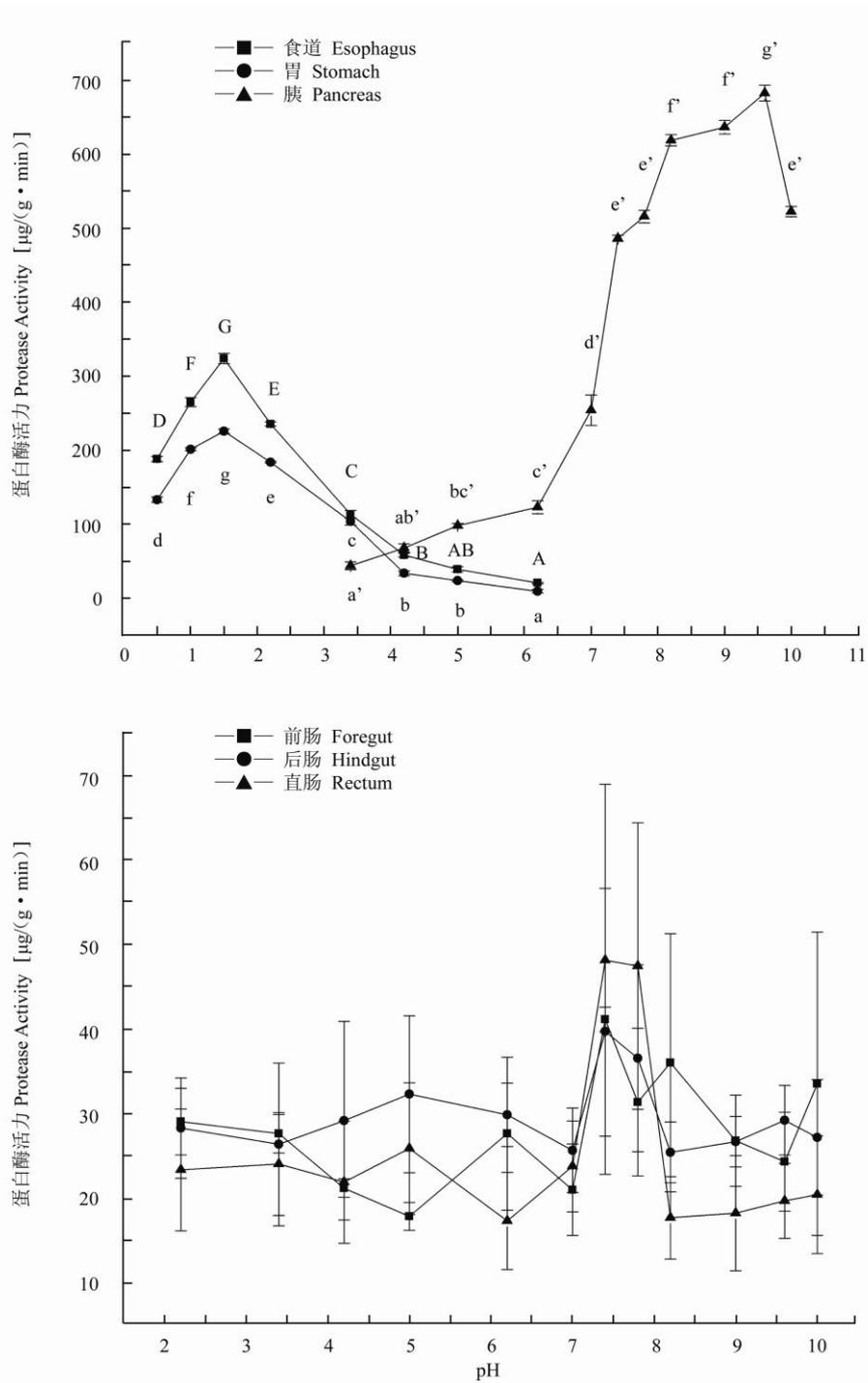


图1 pH对野生棘胸蛙消化系统蛋白酶活力的影响

Fig. 1 The effect of pH on protease activity in digestive system of wild giant spiny frog

同一折线上各点不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different letters along with the points in the same polygonal line mean significant difference ($P < 0.05$).

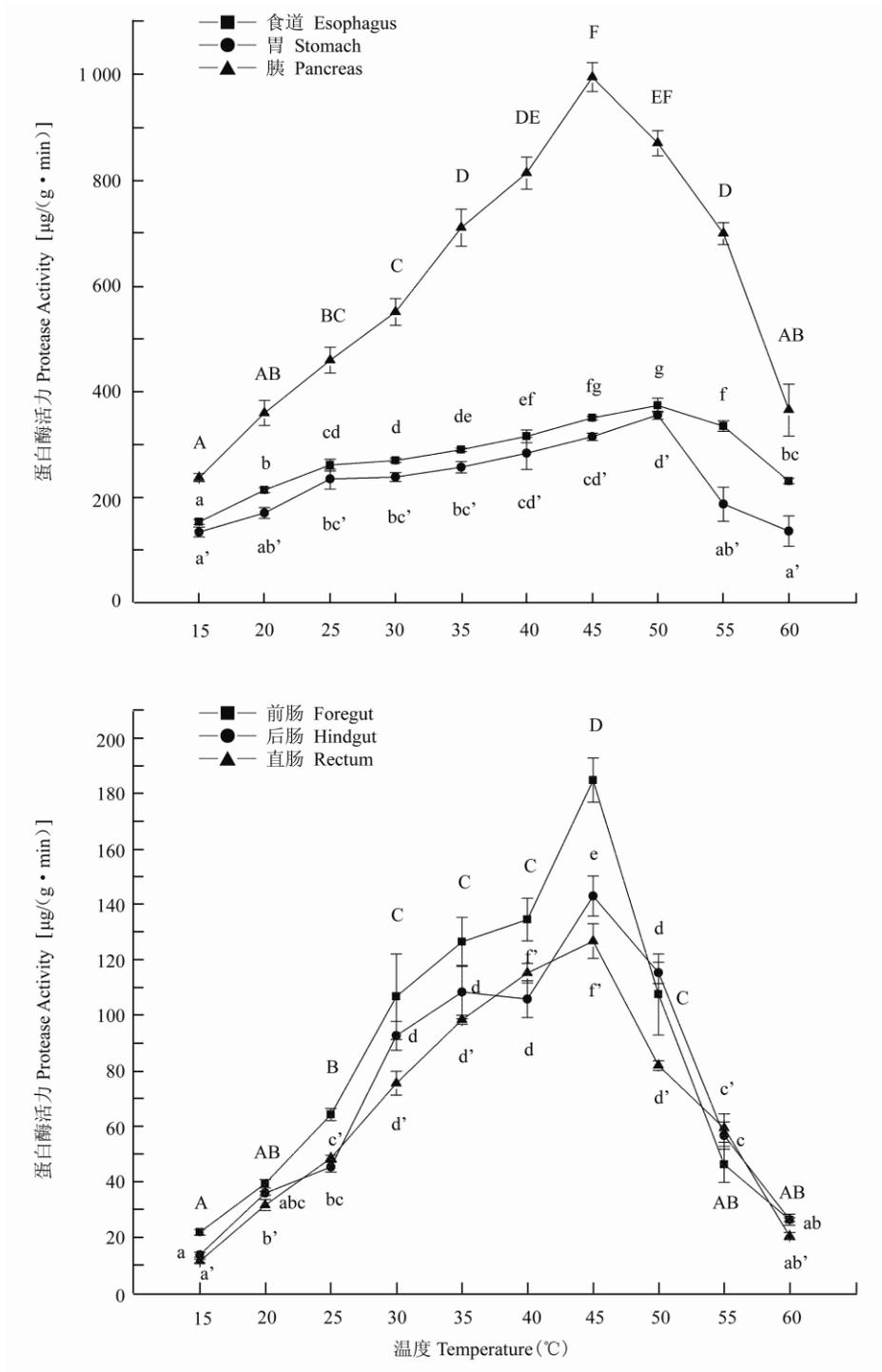


图2 温度对野生棘胸蛙消化系统蛋白酶活力的影响

Fig. 2 The effect of temperature on protease activity in digestive system of wild giant spiny frog

同一折线上各点不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different letters along with the points in the same polygonal line mean significant difference ($P < 0.05$).

盛周等 2005)、牛蛙 (*R. catesbeiana*) (朱联九等 2008) 的研究一致。另外, 棘胸蛙食道、胃胰蛋白酶活力随pH升高的酶活力曲线均呈明显的单峰型, 而肠道各段的蛋白酶活力则未出现明显的单峰型。推测原因, 可能是肠道内包括肠腺本身分泌的肠蛋白酶, 还包括来自其他消化器官的蛋白酶, 如胰分泌产生的碱性蛋白酶 (包括胰蛋白酶和糜蛋白酶) 可通过胰总管随胰液进入肠道, 且胰蛋白酶原的活化会受到肠激酶或胰蛋白酶本身的限制分解作用的影响, 因此肠道蛋白酶活力实际上是残留在肠道黏膜上多种蛋白酶混合物的总酶活力, 所以酶活力曲线很难呈现出典型的单峰型, 但食道、胃中胰蛋白酶的种类相对比较单一, 酶活力曲线可呈明显的单峰型。

基于酶类本身的蛋白质属性以及变温动物生理机能的温度依赖性, 温度对蛙类消化系统蛋白酶活力的影响非常明显。棘胸蛙消化系统各部位蛋白酶活力从15℃至最大酶活力温度上升了5~10倍。棘胸蛙食道和胃蛋白酶最大酶活力温度为50℃, 与野生虎纹蛙一致 (张盛周等

2005), 但低于野生黑斑蛙的55℃ (张盛周等 2004); 胰蛋白酶最大酶活力温度为45℃, 低于虎纹蛙和黑斑蛙 (均为50℃) (张盛周等 2004, 2005); 而肠道是对食物进行消化与吸收最主要的器官, 其蛋白酶最大酶活力温度为45℃, 也低于这两种蛙 (均为50℃) (张盛周等 2004, 2005)。棘胸蛙属于高山溪流生态型的物种, 栖息环境的温度相对较低, 其消化器官内蛋白酶的最大酶活力温度也低于这两个物种, 这在某种程度上可以认为是该物种适应环境的表现。

大多数无尾两栖类不同消化器官蛋白酶最大酶活力pH的规律是: 食道和胃最大酶活力pH为强酸性, 肠道为弱碱性, 胰为强碱性 (表1)。然而, 较为原始的有尾两栖类贵州疣螈 (*Tylotriton kweichowensis*) 胰蛋白酶最大酶活力的酸碱度却为强酸性 (pH 2.2) (白建梅等 2007), 而较高等的爬行类中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 胰蛋白酶的最大酶活力酸碱度为弱碱性 (pH 7.4) 且十二指肠为弱酸性 (pH 6.2) (龙良启等 1997)。在最大酶活力pH和30℃下, 大多数无尾两栖类各消化器官蛋白酶活力

表1 两栖爬行类物种间消化系统蛋白酶最大酶活力pH的比较

Table 1 The comparison of digestive system protease activities at the pH of maximal activities among amphibian and reptile species

物种 Species	食道 Esophagus	胃 Stomach	前肠 Foregut	后肠 Hindgut	直肠 Rectum	胰 Pancreas	文献 Reference
贵州疣螈 <i>Tylotriton kweichowensis</i>		2.2	8.2	7.4	7.8	2.2	白建梅等 2007*
黑斑蛙 <i>Rana nigromaculata</i>	1.5	1.5	7.4	7.4	7.4	9.6	张盛周等 2004
虎纹蛙 <i>R. rugulosa</i>	1.5	1.5	7.4	7.4	7.4	9.6	张盛周等 2005
棘胸蛙 <i>Quasipaa spinosa</i>	1.5	1.5	7.4	7.4	7.4	9.6	本文
牛蛙 <i>R. catesbeiana</i>		2.2		7.4		9.6	朱联九等 2008*
黑框蟾蜍 <i>Bufo melanostictus</i>		2.2				7.2	Teo et al. 1990
海蟾蜍 <i>B. marinus</i>		1.6					Taylor et al. 1986
中华鳖幼鳖 <i>Trionyx sinensis</i>		2.2	6.2			7.4	龙良启等 1997*

* 不同时期文献对肠道各部分的命名有所不同 (前肠、后肠、直肠分别相当于这些文献中的十二指肠、中肠、后肠)。

* Means that there were some discrepancies about the names of different parts of intestinal tract in the literatures published at different times (Foregut, hindgut and rectum is equal to duodenum, midgut and hindgut, respectively).

表2 两栖爬行类物种间消化系统蛋白酶在最大酶活力pH和30℃下酶活力的比较

Table 2 The comparison of digestive systems protease activities at the pH of maximal activities and 30°C among amphibian and reptile species

物种 Species	食道 Esophagus	胃 Stomach	前肠 Foregut	后肠 Hindgut	直肠 Rectum	胰 Pancreas	文献 Reference
贵州疣螈 <i>Tylototriton kweichowensis</i>		3 470.37	1 958.42	202.72	208.75	434.40	白建梅等 2007**
黑斑蛙 <i>Rana nigromaculata</i> *	980	540	34	34	20	6 200	张盛周等 2004
虎纹蛙 <i>R. rugulosa</i> *	500	640	200	160	140	4 400	张盛周等 2005
棘胸蛙 <i>Quasipaa spinosa</i>	324.19	225.73	41.10	39.68	48.11	682.78	本文
牛蛙 <i>R. catesbeiana</i>	14.50	116.60	7.98	24.70	3.63	118.60	朱联九等 2008**
黑框蟾蜍 <i>Bufo melanostictus</i> #		4.8				8.2	Teo et al. 1990
中华鳖幼鳖 <i>Trionyx sinensis</i> *		230	95			1 400	龙良启等 1997**

* 数值为根据文献图表估计值; #代表数值为相对活性; ** 代表不同时期文献对肠道各部分的命名有所不同(前肠、后肠、直肠分别相当于这些文献中的十二指肠、中肠、后肠)。

* Means estimated value according to the figure of the references; # Means relative activity value; ** Means that there were some discrepancies about the names of different parts of intestinal tract in the literatures published at different times (Foregut, hindgut and rectum is equal to duodenum, midgut and hindgut, respectively).

大小的规律是: 胰的酶活力最大, 食道和胃的酶活力显著大于肠道(表2)。这与对中华鳖的研究结果一致(龙良启等 1997), 但贵州疣螈胃蛋白酶活力最大, 胰的酶活力却远小于胃和前肠(白建梅等 2007)。与对尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)(倪寿文等 1993)、长吻鲢(*Leiocassis longirostris*)(叶元土等 1998)、暗纹东方鲀(*Fugu obscurus*)(殷宁等 2001)等鱼类的研究结果非常类似, 说明其在进化地位上的原始性。但是, 这些现象是否可被视作两栖类消化系统由低级向高级进化的普遍规律, 尚缺乏足够证据, 需要深入研究。此外, 养殖牛蛙的胰蛋白酶与胃蛋白酶活力相当, 且胃蛋白酶活力明显大于食道的酶活力(朱联九等 2008), 这与其他几种蛙类存在明显差异(表2), 原因可能是物种差异, 但更可能是摄食易于消化的人工饲料会影响其消化系统内蛋白酶的分泌量及活性。因此, 在棘胸蛙驯养过程中除了考虑环境温度外, 还需注意因食物种类的单一化可能导致的消化酶分泌异常和消化能力减弱等潜在问题。

参 考 文 献

- Das K M, Tripathi S D. 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquaculture*, 92: 21–32.
- Hofer R. 1979. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus* and rudd *Scardinius erythrophthalmus*: Proteases. *Journal of Fish Biology*, 15(4): 373–379.
- Naya D E, Farfán G, Sabat P, et al. 2005. Digestive morphology and enzyme activity in the Andean toad *Bufo spinulosus*: hard-wired or flexible physiology? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140(2): 165–170.
- Reeder W G. 1964. *Physiology of the Amphibia*. New York: Academic Press, 99–149.
- Sabat P, Riveros J M, López-Pinto C. 2005. Phenotypic flexibility in the intestinal enzymes of the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140(1): 135–139.
- Taylor P M, Tyler M J. 1986. Pepsin in the toad *Bufo marinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 84(4): 669–672.
- Teo L H, Chen T W, Tan L L. 1990. The proteases of the common Malayan toad *Bufo melanostictus* Schneider. *Comparative*

- Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 96(4): 715–720.
- Yu X Y, Zheng R Q, Zhang J Y, et al. 2014. Genetic polymorphism of major histocompatibility complex class IIB alleles and pathogen resistance in the giant spiny frog *Quasipaa spinosa*. *Infection, Genetics and Evolution*, 28: 175–182.
- Zheng R Q, Liu C T. 2010. Giant spiny-frog (*Paa spinosa*) from different populations differ in thermal preference but not in thermal tolerance. *Aquatic Ecology*, 44(4): 723–729.
- 白建梅, 肖玲远, 胡思玉. 2007. pH值对贵州疣螈消化系统蛋白酶活性的影响. *江西农业学报*, 19(3): 80–81.
- 龙良启, 白东清, 梁拥军, 等. 1997. 幼鳖胃肠组织主要消化酶活性分布. *动物学杂志*, 32(6): 23–26.
- 倪寿文, 桂远明, 刘涣亮. 1993. 草鱼、鲤、鲢、鳙和尼罗罗非鱼肝胰脏和肠道蛋白酶活性的初步探讨. *动物学报*, 39(2): 160–167.
- 叶元土, 林仕梅, 罗莉, 等. 1998. 温度、pH 值对南方大口鲶、长吻鮠蛋白酶和淀粉酶活力的影响. *大连水产学院学报*, 13(2): 16–23.
- 殷宁, 赵强, 李朝晖, 等. 2001. 暗纹东方鲀蛋白酶活性的研究. *南京师大学报: 自然科学版*, 24(1): 101–104.
- 张盛周, 朱升学, 刘明, 等. 2004. 黑斑蛙消化系统蛋白酶的活力. *动物学杂志*, 39(1): 25–28.
- 张盛周, 朱升学, 佟媛, 等. 2005. pH值和温度对虎纹蛙消化系统蛋白酶活力的影响. *安徽师范大学学报: 自然科学版*, 28(2): 200–202.
- 朱联九, 朱升学, 程文娟, 等. 2008. 牛蛙主要消化酶的分布及pH和温度对消化酶活力的影响. *激光生物学报*, 17(4): 496–501.