

生物活性肽对罗非鱼嗅囊 EOG 反应的影响^{*}

梁春梅, 潘 庆, 毕英佐

(华南农业大学动物科学学院水产养殖系, 广东 广州 510642)

摘 要: 通过记录奥尼罗非鱼嗅上皮产生的嗅电图 (electroolfactogram, EOG) 反应, 研究了几种小肽 (包括 GSH 丙谷二肽、肌肽、双甘氨酸、阿斯巴甜) 以及几种蛋白酶解物 (包括鱼粉酶解物、两种大豆酶解物) 对罗非鱼嗅觉反应的影响。结果表明: 罗非鱼嗅电图是一个单相负电位。EOG 幅值随着刺激浓度的升高而增大。在小肽组中, 罗非鱼嗅囊在受到 GSH 刺激的时候产生的 EOG 反应最强烈, 在刺激浓度为 2 mmol/L 时, 反应幅值显著大于其它 4 种小肽 ($P < 0.05$); 在浓度为 5、10 mmol/L 时差异极显著 ($P < 0.01$)。在 3 种酶解物中, 在同一刺激浓度下, 鱼粉酶解物引起的 EOG 幅值比其它两种大豆酶解物的要大, 在刺激浓度为 50、200 mg/L 时差异显著 ($P < 0.05$)。结果揭示生物活性肽对罗非鱼有嗅觉刺激作用, 与其它小肽相比, 罗非鱼嗅囊对 GSH 的刺激反应更强烈。在 3 种蛋白酶解物中, 鱼粉酶解物对罗非鱼嗅囊 EOG 反应的刺激较为强烈。

关键词: 生物活性肽; 奥尼罗非鱼; EOG

中图分类号: S63 7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) S2-0253-05

鱼类嗅觉与摄食等多种行为关系密切, 嗅觉器官主要是嗅囊。嗅电图 (electroolfactogram, 简称 EOG) 是研究嗅觉反应的一个重要指标, 是在嗅上皮上记录到的一种慢的电位变化, 它代表着嗅感觉细胞集体产生的感受器电位的总和^[1-2]。了解鱼类的嗅觉器官对水溶物的反应有助于鱼类诱食剂的研究开发。近年来的有不少关于氨基酸对鱼类 EOG 反应的影响研究^[3-4], 而关于生物活性肽对鱼类嗅觉的影响尚未见相关报道。

有研究发现 GSH 能显著提高罗非鱼的摄食率, 显著促进罗非鱼的生长^[5]。阿斯巴甜二肽 (Aspartame, α -L-天门冬氨酸-β-L-苯丙氨酸甲酯) 是一种新型甜味剂, 具有增强食品风味的效能^[6]。肌肽具有抗氧化、抗衰老、促进细胞能量代谢等多种生物学功能。丙谷二肽可促进大鼠小肠上皮细胞的分裂增殖^[7]。

蛋白质原料经过蛋白酶处理后, 产生多种小肽和小分子物质, 可能具有类似氨基酸的诱食作用^[8]。

本实验以奥尼罗非鱼为试验动物, 研究几种小肽和几种蛋白酶解物对罗非鱼的 EOG 反应的影响, 旨在通过研究罗非鱼的嗅觉反应来探讨生物活性肽对鱼类促生长作用的机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物

奥尼罗非鱼购自华南农业大学农贸市场, 平均体质量 591.5 g, 暂养 3 d 待鱼的生理状态稳定后进行实验。实验鱼分成两组, 分别是小肽组与蛋白酶解物组, 每组 5 个重复, 每个重复一尾鱼。

1.2 试剂的配制

小肽包括 GSH (Amresco 公司, 纯度 > 98%)、丙谷二肽 (天津天成制药有限公司, 纯度为 99.4%); 肌肽 (Sigma, 纯度 > 98%)、双甘氨酸 (Amresco 公司, 纯度 > 99%)、阿斯巴甜 (NutraSweet 公司, 纯度为 99.3%)。刺激液质量浓度梯度为 0.01、0.5、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 mmol/L。标准刺激物为 2 mmol/L 的 L-Glu 溶液。

酶解物包括大豆酶解物 A (华南理工大学化工厂, 含 w=10% 小肽)、B (乐能生物工程股份有限公司, 含 w=40% 小肽); 鱼粉酶解物 (广东海大集团, w (CP) = 53.5%)。刺激液质量浓度梯度为 20、50、100、200、500、1 000、2 000 mg/L。标准刺激物为 200 mg/L 的 L-Glu 溶液。

所有溶液用蒸馏水配置, 置于 4 °C 冰箱保存, 一周内用完。

* 收稿日期: 2007-09-20

作者简介: 梁春梅 (1979年生), 女, 硕士; 通讯联系人: 潘庆; Email: maysaljiang@sohu.com

1.3 测定方法

罗非鱼 EOG 的测定方法参考 Frade 等^[9] 所述, 并有所改动。实验装置见图 1。

流向嗅囊的水流速为 75 mL/min。刺激物被流水稀释后达到嗅囊的有效刺激质量分数为 29%。第一组中, 以 2 mmol/L 的 L-Glu 刺激引起 EOG 幅值为 100%, 求其它各种刺激物相对刺激效应; 第二组中, 以 200 mg/L L-Glu 刺激引起 EOG 幅值为 100%, 求其它各种刺激物相对刺激效应。

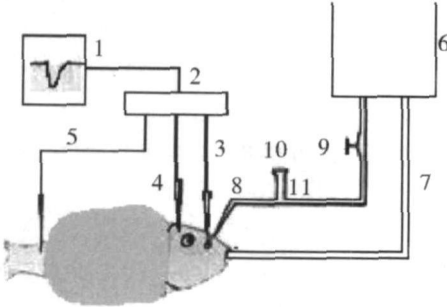


图 1 罗非鱼嗅电图测定装置示意图
Fig. 1 Sketch map of EOG measurement devices

1: 计算机; 2 MS4000 生物信息分析系统 (广州市龙飞达科技有限公司); 3 测定甘汞电极 (232 型, 上海罗素); 4 参考甘汞电极 (232 型, 上海罗素); 5 鱼体接地线; 6 供水箱; 7 往鳃供水管; 8 往嗅囊供水管; 9 水速调节钮; 10 加液管; 11 三通管

1.4 数据的统计分析

利用 SPSS 10.0 软件对数据进行统计, 试验结果采用平均数 ± 标准误差表示, P 值设为 0.05。在 P 小于 0.05 时, 再把 P 设为 0.01 进行统计。

2 结果

2.1 几种小肽诱发的罗非鱼 EOG

记录得到的 EOG 是一个单相负电位: 当刺激液刚刚接触到嗅囊时, 电位快速上升, 然后随着刺激的结束, 电位很快恢复至波幅的 50% 左右, 最后缓慢地回到基线位置 (见图 2 注: 纵向 0.51 mV/格, 横向 5 s/格)。

各种小肽不同浓度对罗非鱼嗅囊刺激产生的 EOG 相对 2 mmol/L L-Glu 的反应幅值及同一浓度下各种刺激物之间 EOG 相对反应幅值的显著性比较结果见表 1。

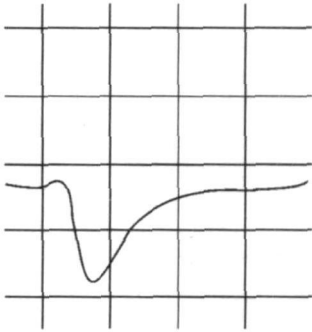


图 2 小肽刺激罗非鱼嗅囊产生的 EOG
Fig. 2 Tilapia's EOG response to short peptides

L-Glu 以及 5 种小肽刺激产生的 EOG 幅值都随着刺激物浓度的升高而上升, 呈剂量依赖效应。刺激浓度 X (mmol/L) 与 EOG 幅值 Y (mV) 的相关方程与相关系数见表 2。为了计算刺激阈浓度, 求出刺激浓度为 0.1 ~ 1 mmol/L 的刺激浓度 X (mmol/L) 与 EOG 幅值 Y (mV) 的相关方程。根据相关方程推算出反应阈浓度分别为: L-Glu 0.11 mmol/L, GSH 0.006 mmol/L, 丙谷二肽、肌肽、双甘二肽、阿斯巴甜: 0.01 ~ 0.06 mmol/L。

表 1 各种小肽对罗非鱼嗅囊刺激产生的 EOG 相对反应幅值 ($M \pm SE$, $n=5$)
Tab. 1 The relative amplitudes of tilapia's EOG responses to short peptides

浓度 / (mmol·L ⁻¹)	GLU	GSH	丙谷二肽	肌肽	双甘氨酸	阿斯巴甜	P
0.1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.14 ± 0.14	0 ± 0	0 ± 0	> 0.05
0.2	3.31	4.00 ± 1.50	0 ± 0	6.61 ± 5.85	9.67 ± 6.05	2.49 ± 1.91	0.05
0.5	7.97 ± 2.28	7.42 ± 3.42	8.70 ± 5.41	6.99 ± 3.22	10.56 ± 5.47	4.93 ± 3.79	> 0.05
1	34.83 ± 11.35	13.97 ± 2.89	38.73 ± 17.42	13.98 ± 4.33	17.48 ± 5.83	19.56 ± 7.35	> 0.05
2	100 ± 0 ^b	97.07 ± 18.43 ^b	44.46 ± 3.78 ^{ab}	23.50 ± 6.46 ^a	16.43 ± 7.47 ^a	26.39 ± 8.94 ^a	< 0.05
5	289.06 ± 57.92 ^b	385.78 ± 38.99 ^b	55.65 ± 22.21 ^a	21.72 ± 8.23 ^a	29.83 ± 14.57 ^a	33.17 ± 11.18 ^a	< 0.01
10	387.43 ± 17.59 ^b	485.62 ± 41.31 ^c	78.1 ± 21.35 ^a	40.28 ± 22.45 ^a	47.82 ± 21.59 ^a	46.11 ± 17.57 ^a	< 0.05
10	387.43 ± 17.59 ^b	485.62 ± 41.31 ^b	78.1 ± 21.35 ^a	40.28 ± 22.45 ^a	47.82 ± 21.59 ^a	46.11 ± 17.57 ^a	< 0.01

注: 同一行数据右上角有相同字母 (a, b, c) 的表示差异不显著

表 2 小肽刺激浓度 $X(\text{mmol/L})$ 与 EOG幅值 $Y(\text{mV})$ 的相关关系 及刺激阈浓度
Tab. 2 Correlativity between concentrations of short peptides and EOG amplitudes of tilapia and the threshold concentrations of each peptide

刺激物	相关方程 1(0~10 mmol/L)	R	相关方程 2(0.1~1 mmol/L)	R	阈浓度 (mmol/L)
Glut	$Y=0.5378X-0.0579$	0.99	$Y=0.5378X-0.0579$	0.99	0.11
GSH	$Y=0.674X-0.0041$	0.95	$Y=0.674X-0.0041$	0.95	0.006
丙谷二肽	$Y=0.0284X+0.0247$	0.97	$Y=0.0663X-0.0033$	1	0.05
肌肽	$Y=0.0237\ln(X)+0.066$	0.96	$Y=0.0237\ln(X)+0.066$	0.96	0.06
双甘氨酸	$Y=0.0385X+0.0204$	0.99	$Y=0.18X-0.01$	1	0.06
阿斯巴甜	$Y=0.0437X+0.0461$	0.97	$Y=0.1094X-0.0012$	1	0.01

2.2 几种酶解物对罗非鱼嗅电图的影响

几种蛋白酶解物刺激嗅囊测得的 EOG图像形状与小肽组相同。各种刺激物引起的 EOG相对幅值结果以及同一浓度下各种刺激物之间 EOG相对反应幅值显著性比较结果见表 3。

3种酶解物刺激所产生的 EOG幅值都呈明显的剂量依赖性。刺激浓度 $X(\text{mg/L})$ 与罗非鱼 EOG相对反应幅值 $Y(\text{mV})$ 的相关方程与相关系数见表 4。

表 3 罗非鱼 对不同蛋白酶解物刺激产生的 EOG相对反应幅值
Tab. 3 The relative amplitudes of tilapia's EOG responses to protein hydrolysates ($M\pm SE$, $n=5$)

质量浓度 / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	GLU	大豆酶解物 A	鱼粉酶解物	大豆酶解物 B	P
20	16.61 ± 7.10	12.74 ± 11.06	1.15 ± 1.15	7.14 ± 2.47	>0.05
50	15.62 ± 7.74^a	23.46 ± 12.53^a	67.90 ± 10.03^b	22.15 ± 12.94^a	<0.05
100	44.80 ± 6.33	36.02 ± 6.75	89.27 ± 15.01	42.35 ± 27.11	>0.05
200	100 ± 0^b	37.97 ± 10.59^a	98.00 ± 19.85^b	45.68 ± 24.76^{ab}	<0.05
500	364.82 ± 114.96^b	77.39 ± 9.81^a	118.31 ± 41.78^a	70.82 ± 33.18^a	<0.05
1000	694.93 ± 187.48^b	109.45 ± 16.41^a	155.66 ± 35.98^a	97.35 ± 29.49^a	<0.01
2000	962.93 ± 201.96^b	198.38 ± 40.10^a	188.16 ± 40.38^a	176.39 ± 38.23^a	<0.01

注：同一行数据右上角有相同字母 (a、b、c) 的表示数据之间差异不显著 ($P>0.05$)。

表 4 酶解物刺激质量浓度 $X(\text{mg/L})$ 与罗非鱼 EOG幅值 $Y(\text{mV})$ 的相关关系与刺激阈浓度
Tab. 4 Correlativity between concentrations of protein hydrolysates and EOG amplitudes of tilapia and the threshold concentrations of each hydrolysate

刺激物	相关方程	R	刺激阈值 (mg/L)
大豆酶解物 A	$Y=0.0007X-0.0088$	0.95	12.6
鱼粉酶解物	$Y=0.0918\ln(X)-0.2307$	0.98	12.3
大豆酶解物 B	$Y=0.0805\ln(X)-0.2066$	0.99	13

3 讨 论

3.1 几种小肽对罗非鱼 EOG的影响

Frad等^[9]的研究发现, 莫桑比克罗非鱼的嗅

囊对很多氨基酸都很敏感, 包括 L-Ser、L-Arg、Cys, 记录得到的 EOG图像是鱼类经典的嗅电图: 刺激开始时电位快速上升, 然后较快的恢复到 50%的反应幅值, 随着刺激的结束, 电位慢慢恢复到基线; 而且反应幅值呈剂量依赖效应。在本实验中, 以几种小肽以及蛋白酶解物刺激所记录得到的 EOG图像与以上报道相似。

本实验中测定 GSH刺激所产生的 EOG幅值最高达到 18 mV, 而 L-GLU是 17.72 mV, 其它的 3 种小肽均在 1 mV以下。证明罗非鱼嗅觉对 GSH高度敏感。焦彩虹^[5]研究发现, 在饲料中添 100~400 mg/kg的 GSH对罗非鱼摄食率有显著的促进作用。结合本试验的结果, 可以推测 GSH可能是通过刺激鱼类的嗅觉反应而促进其摄食行为。

3.2 酶解物对罗非鱼嗅觉的影响

蛋白质原料经过酶解,产生大量的小肽与氨基酸,其所具有的生物学功能应该与小肽有类似之处。试验证明,经过胰酶、肠肽酶水解后鱼粉酶解物中主要含有由 3~9 个氨基酸组成的短肽,肽含量达 80.75%^[10]。大豆经过木瓜蛋白酶水解后,由于水解产生疏水性短肽而形成苦味,而原有的豆腥味减弱^[8]。经浓缩干燥的龙头鱼酶解提取物具有浓郁的海鲜香味^[11]。草鱼日粮中添加一定比例的鱼粉酶解物可以显著提高鱼的特定生长率、饲料表观消化率,增加鱼体血液中生物活性肽的含量^[10]。饲料中添加多肽产品喂大快可以明显提高欧鳗的摄食率,表明适量饲喂这种多肽产品对欧鳗具有诱食作用,可能喂大快中某种构型的小肽对欧鳗具诱食作用^[12]。

本实验中,两种大豆酶解物和一种鱼粉酶解物对罗非鱼的嗅囊都有很明显的刺激作用,并且刺激效应都呈剂量依赖性。其中在同一浓度下鱼粉酶解物的刺激效果显著高于其它两种酶解物。证明鱼类嗅觉对鱼粉酶解物中的小肽或者氨基酸更敏感。

3.3 鱼类对刺激物的 EOG反应的敏感性

鲇鱼嗅感觉细胞膜上存在酸性、碱性和中性氨基酸等 3 种以上的受体位点,它们分别与一种或多种氨基酸结合^[13-14]。Reri 等^[4]也报道了罗非鱼嗅囊内分别具有对氨基酸和胆酸的专门受体。异育银鲫对牛磺酸、乳酸、复合氨基酸的 EOG 反应阈浓度在 0.001~1 mmol/L 之间^[15]。L-丝氨酸、L-精氨酸、L-半胱氨酸、L-酪氨酸对罗非鱼 EOG 反应刺激阈浓度分别为 10⁻⁹ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10^{-8.0} mol/L、10⁻⁶~10⁻⁵ mol/L^[9]。由此可知,鱼类嗅上皮对氨基酸的敏感性较高。在本实验中,罗非鱼对 L-Glu 及 GSH 等 5 种小肽的 EOG 反应阈浓度在 0.006~0.11 mmol/L 之间,其中 GSH 的阈浓度最低,可见罗非鱼嗅囊对 GSH 的刺激是最敏感的。在酶解物当中,鱼粉酶解物的刺激阈浓度低于两种大豆酶解物,可见在罗非鱼嗅囊对鱼粉酶解物较为敏感。

4 结 论

综上所述,罗非鱼的嗅觉对生物活性肽,尤其是 GSH 优良蛋白酶解物是比较敏感的,由此可

以推测,具有多种生物学功能的小肽可能可以通过刺激鱼类的嗅觉反应而产生诱食作用,从而促进鱼类生长。

参考文献:

[1] 王伯扬. 神经生理学[M] 北京: 高等教育出版社, 1989 285—287.

[2] 奥托森. 神经系统生理学[M] 北京: 人民卫生出版社, 1987 330—334.

[3] 柴敏娟, 曾建平, 于森. 罗非鱼嗅觉对 15 种常见氨基酸的 RSE 探讨[J]. 台湾海峡, 2001 20(4): 63—68.

[4] DAND RERIQ MICHEL W Ç DERBIDGE D Ş Evidence of distinct amino acid and bile salt receptors in the olfactory system of the zebrafish[J]. Brain Research 1997, 764: 179—187.

[5] 焦彩虹. 谷胱甘肽对罗非鱼生长的影响及其机理研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2004.

[6] 王电. 阿斯巴甜在酸奶生产中的应用[J]. 中国奶牛, 1999(3): 54—55.

[7] 赵元珍, 高春芳. 谷氨酰胺二肽胃肠外营养对短肠大鼠小肠上皮细胞的增殖作用[J]. 实用医药杂志, 2003 20(7): 520—522.

[8] 肖凯军, 高孔荣, 曾庆孝. 酶解大豆分离蛋白的特性研究[J]. 广州食品工业科技, 1995 11(2): 5—11.

[9] FRADE P, HUBBARD P Ç BARATA EN et al. Olfactory sensitivity of the Mozambique tilapia to conspecific odour[J]. Journal of Fish Biology 2002 61: 1239—1254.

[10] 冯键. 鱼粉酶解物中小肽对幼龄草鱼生长性能的影响[J]. 水产学报, 2005 29(2): 222—226.

[11] 余杰, 陈美珍. 酶法制取龙头鱼水解蛋白及海鲜风味料的研究[J]. 食品与发酵工业, 2000 26(3): 39—43.

[12] 王碧莲, 徐加锐, 钱雪桥. 小肽制品对欧鳗生长特征的影响[J]. 淡水渔业, 2001 31(2): 42—43.

[13] SVENSSON T, HARA T J. Multiple olfactory receptors for amino acids in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) evidenced by cross-adaptation experiments[J]. Comp Biochem and Physiol 1990 97A: 289—293.

[14] CAPRIO J, BYRD R P. Electrophysiological evidence for acidic, basic and neutral amino acid olfactory receptor sites in the catfish[J]. J Gen Physiol 1984 84 403—422.

[15] 赵月红, 曹海宁, 薛敏, 等. 不同浓度刺激物对异育银鲫 EOG 反应的影响[J] // 第五届世界华人鱼虾营养学术研讨会, 2004.

Effect of Biopeptide on Electroolfactogram Response of Tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*

LIANG Chunmei, PAN Qing, BI Yingzuo

(Aquiculture Department College of Animal Science, South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, China)

Abstract The electroolfactogram (EOG) of tilapia was recorded to study the effects of several short peptides (GSH, L-Alanyl-L-glutamine, L-Carnosine, Glycylglycine and Aspartame) and several protein hydrolysates (soybean hydrolysate and fish meal hydrolysate) on olfactory responses of tilapia and to illuminate the mechanism of the improvement function of biologic active peptides on growth performance. The result showed that the EOG of tilapia showed an initial sharp negative deflection at the onset of stimulus arrival at the olfactory epithelium, and the EOG returned to baseline soon after the stimulus was stopped. The normalized EOG amplitude of responses to the stimulus showed a clear concentration dependence with no evidence of reaching a plateau at the highest concentration tested. The amplitudes of EOG responses to GSH were significantly greater than those of other kinds of peptides in the concentration of 2 mmol/L ($P < 0.05$), 5 mmol/L ($P < 0.01$) and 10 mmol/L ($P < 0.01$). There were no significant differences among the EOG amplitudes of responses among the other four peptides ($P > 0.05$). EOG amplitudes of responses to fish meal hydrolysate were significantly greater than those of the other two kinds of hydrolysate. It suggests that tilapia were insensitive to short peptides and protein hydrolysates, while GSH in peptides and fish meal hydrolysate in hydrolysates tested can arouse greater EOG response in tilapia.

Key words biologic active peptides; tilapia; EOG