

孕酮调节瘤胃微生物氮代谢的研究

王金洛  
 (北京市农林科学院, 北京 100081)

陈 杰 陈伟华 韩正康  
 (南京农业大学, 南京 210095)

摘 要 采用 5头装有瘤胃瘘管、十二指肠瘘管的土著种成年空怀母山羊, 按自身对照设计, 试验期山羊皮下注射孕酮 1.25mg/d 以研究孕酮对瘤胃微生物氮代谢的调节及其作用机理。结果表明, 皮下注射孕酮可进入瘤胃, 并影响微生物的代谢活动, 使十二指肠食糜微生物氮(MCP-N), 尿素氮(UN), 氨氮(NH<sub>3</sub>-N)量极显著增加(P< 0.01), 但食糜总氮, 过瘤胃蛋白氮(BPN)或非氮氮(NAN)无显著变化(P> 0.05)。用放射免疫受体测定法对瘤胃细菌进行测定, 发现山羊瘤胃细菌孕酮受体(BPR)与孕酮的最大结合容量和 K<sub>d</sub>值分别为 105.0±15.32mol/mg(蛋白)和 9.54±0.44×10<sup>-8</sup>mol/L(n= 3)。非标记孕酮对 BPR 的竞争抑制作用明显。上述结果显示, 进入瘤胃的孕酮可与微生物受体结合, 继发一系列生理生化反应, 使瘤胃微生物对内源氮的利用增加, 在提高 MCP 合成量的同时, 不见减少 BPN。因此, 孕酮对瘤胃微生物氮代谢具有双向调节作用。

关键词 孕酮 瘤胃氮代谢 细菌孕酮受体

瘤胃是反刍家畜特殊的消化器官。瘤胃消化代谢的调控是动物营养学研究领域长期关注的问题。实际上, 瘤胃消化代谢的调控过程就是施控因子对瘤胃微生物代谢活动的作用过程。近几年来, 陆续发现许多微生物体内存在激素样物质, 人体内激素对病原微生物有抑制其扩增的作用<sup>[1]</sup>。且早在 70年代就在链丝菌和假单胞菌中发现或分离到孕酮受体<sup>[2,3]</sup>。作者曾证实孕酮对瘤胃消化代谢有影响<sup>[4]</sup>, 也曾发现水牛瘤胃微生物存在孕酮受体<sup>[5]</sup>。本研究在这些工作的基础上, 进一步探讨了孕酮对瘤胃微生物氮代谢的作用及其机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5头装有瘤胃瘘管, 十二指肠近端双筒“T”形瘘管的土种空怀母山羊, 平均体重 20.3±0.44kg。每天于 8:00和 20:00分别饲喂混合精料 150g(豆饼粉 30%, 玉米粉 50%, 麸皮 20%), 干青草不限量, 自由饮水。

1.2 实验设计

实验按自身对照设计, 每期各重复 5d。试验期每天 8:00按 1.25mg/kg 体重在颈部皮下

注射油剂孕酮;对照期则注射等量溶剂 数据采用成对法 t 检验。

### 1 3 样品收集和测试

每天 12∶ 00采集瘤胃液样用作受体测定 十二指肠食糜 6h采一次混合样,直接计量食糜流量 分别测定瘤胃液孕酮,十二指肠食糜总氮,  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{UN}$ ,  $\text{MCP}$ ,  $\text{BPN}$  以及  $\text{NAN}$ 。

### 1 4 瘤胃细菌受体 (BPR)测定

孕酮 葡聚糖及活性炭均用血浆孕酮放免测定药盒,由上海内分泌研究所提供。DCC 缓冲液为含 1.5% 活性炭, 0.2% 葡聚糖的溶液 闪烁液为 0.5% PPO 和 0.02% POPOP 二甲苯溶液。放射性测量用 Beckman LS9800型液闪计数仪。

参照 Hino 方法<sup>[6]</sup>制得瘤胃细菌液后,用 16-850型超声波细胞破碎仪破碎和经聚四氟乙烯 玻璃细胞匀浆器匀浆各 30min 再经 20 000× g 离心 30min 上清液即为细菌受体测定液 蛋白质浓度测定用 Bradford法<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2 1 瘤胃液孕酮浓度

试验期瘤胃液孕酮平均浓度为  $2.76\pm 0.87\text{ng/ml}$  对照期仅为  $2.05\pm 0.34\text{ng/ml}$  ( $P<0.05$ ),一般于注射孕酮后 5h 出现峰值 (图 1)。提示皮下孕酮经一定途径进入瘤胃。

### 2 2 采食量及十二指肠食糜流量

试验期羊摄入干青草较对照期显著增多 ( $P<0.05$ ),摄入混合精料量则显著减少 ( $P<0.05$ ),采食总量仍以试验期显著增多 ( $P<0.05$ ),但摄入饲料蛋白总量两期无显著差异 ( $P>0.05$ ) (表 1)。试验期全天十二指肠食糜流量比对照期提高 10.65% ( $P<0.01$ ) 两期食糜排空

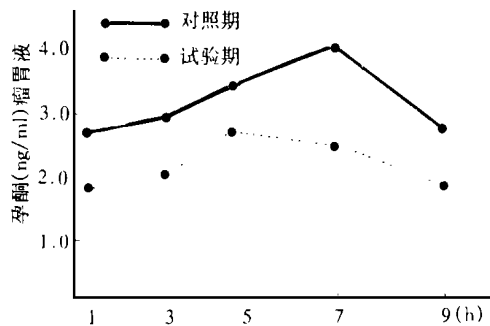


图 1 皮下注射孕酮后山羊瘤胃液孕酮浓度的变化

表 1 孕酮对山羊采食的影响

采食 (g/d)	对照期 ( $\bar{X}\pm\text{SD}$ )	试验期 ( $\bar{X}\pm\text{SD}$ )
干青草	374.6 $\pm$ 41.9	434.7 $\pm$ 44.3 <sup>*</sup>
混合精料	233.4 $\pm$ 75.4	195.8 $\pm$ 82.8 <sup>*</sup>
采食总量	605.8 $\pm$ 61.9	630.5 $\pm$ 57.9 <sup>*</sup>
粗蛋白总量	96.9 $\pm$ 16.8	95.8 $\pm$ 15.6

注: \* 差异显著 ( $P<0.05$ ); \*\* 差异极显著 ( $P<0.01$ )。

的周期性变化相似,即白天早、晚两次排空峰值,夜晚排空较均衡 (图 2)。

### 2 3 十二指肠食糜氮的组成

如表 2所示,试验期每天通过十二指肠的  $\text{MCP-N}$ ,  $\text{UN}$ ,  $\text{NH}_3\text{-N}$  和  $\text{NAN}$  都明显增多,但  $\text{BPN}$  增加不显著,总氮含量两期相比无显著差异。

### 2 4 BPR测定

用 DCC法测定 BPR,发现 BPR 与孕酮的结合是一个饱和过程 (图 3),其 Scatchard 曲线 (图 4)与水牛瘤胃细菌孕酮受体的相似。BPR 与孕酮的结合容量及  $K_d$  值分别为  $105.0\pm 15.3\text{mol/mg}$  (蛋白) 和  $9.54\pm 0.44\times 10^{-8}\text{mol/L}$ 。非标记孕酮对 BPR 的竞争抑制作用明显。

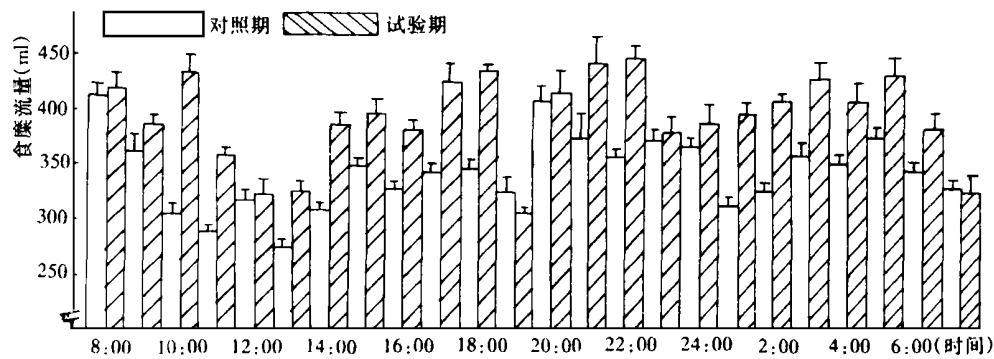


图 2 山羊十二指肠食糜昼夜流量变化

表 2 孕酮对十二指肠食糜组成的影响

组 成	对照期 ( $\bar{X} \pm SD$ )	试验期 ( $\bar{X} \pm SD$ )
食糜总氮	9.7 ± 0.84	10.45 ± 0.99
MCP-N	2.89 ± 0.33	3.29 ± 0.30*
UN	0.16 ± 0.03	0.23 ± 0.04*
NH <sub>3</sub> -N	0.69 ± 0.11	0.88 ± 0.08*
BPN	5.97 ± 0.41	6.05 ± 0.63
NAN	8.85 ± 0.73	9.3 ± 0.90

注: \* \* 差异极显著 ( $P < 0.01$ )

3 讨论

3.1 孕酮进入瘤胃及与微生物作用机理

本研究证实,孕酮可经血液途径进入瘤胃,这与以往关于类固醇激素存在于瘤胃的报道<sup>[8]</sup>一致。途径之一可能随唾液分泌进入,因有报道唾液中检测出孕酮<sup>[9]</sup>;另一条途径可能经瘤胃壁透入,据报道反刍动物消化道是

孕酮的排泄器官<sup>[10]</sup>。从瘤胃微生物对孕酮表现出的生物学效应及其结合位点与孕酮的高亲和力,专一性和  $K_d$  值提示山羊瘤胃细菌存在 BPR。但与水牛瘤胃细菌孕酮受体比较,山羊瘤胃 BPR 有较低的最大结合容量和更大的  $K_d$  值<sup>[5]</sup>,表明后者与孕酮的亲和力较小。孕酮进入瘤胃后,正是与 BPR 结合,孕酮-BPR 复合物再激活菌体内一系列生理生化过程,进而表现出孕酮对瘤胃微生物的生物学效应。

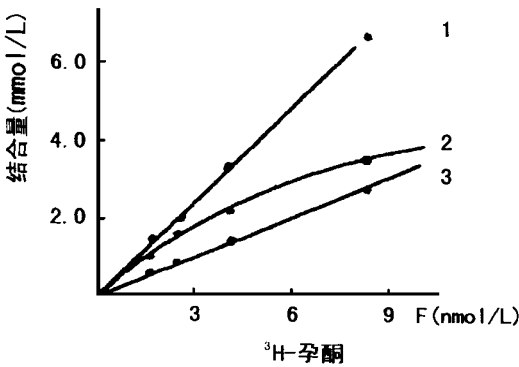


图 3 山羊瘤胃 BPR 的饱和曲线  
1 总结合 2 特异结合 3 非特异结合

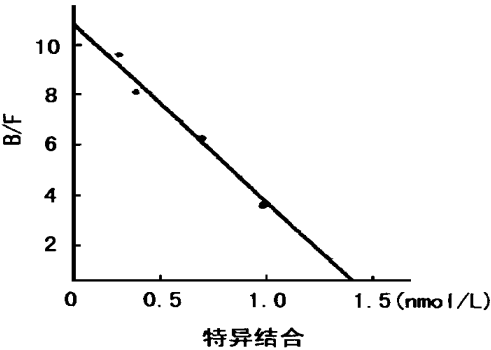


图 4 山羊瘤胃 BPR 的 Scatchard 图

### 3.2 孕酮对瘤胃微生物氮代谢的作用

尽管试验期羊采食粗蛋白较少,十二指肠食糜流量显著增多,但摄入粗蛋白以及进入十二指肠食糜中的 BPN 和 NAN 与对照期相比,均无显著差异,表明 MCP-N 的增加不是受饲料蛋白影响的结果,而主要是微生物受到孕酮的作用,增加了对内源氮的利用。正是由于内源氮增多,十二指肠食糜总氮量两期比较无显著差异,提示食糜含氮量不明显受饲料及其它因素干扰而保持相对恒定。此与陈杰等观察到羊皱胃食糜氨基酸组成相对稳定的结果相似<sup>[11]</sup>。

有意义的是试验期山羊摄入粗蛋白量较少,而瘤胃合成 MCP 较多。这一结果提示在低蛋白日粮饲喂下,内源或外源孕酮可通过增加 MCP 合成来提高畜体内内源氮的利用率,使进入十二指肠中食糜蛋白质量能满足机体的营养需要。这种消化道内源含氮物质的加速周转,是否是动物机体蛋白质代谢的自我调控,以实现其代谢稳态<sup>[12]</sup>的方式,值得进一步研究。本研究结果提示,内源激素可能参与这一过程,而瘤胃 MCP 合成则是维持机体蛋白摄入量与其需要量间平衡的关键因素。因此,加大瘤胃 MCP 的合成和周转速度,是实现反刍动物最大生产力和最好经济效益的一个重要手段。

### 参 考 文 献

- 1 Lyte M. The role of microbial endocrinology in infectious disease. *Journal of Endocrinology*, 1993, 137: 343~345
- 2 特雷格, L(邹继超译). 类固醇激素生物合成代谢作用. 北京: 科学出版社, 1980: 276
- 3 Watanabe M, Watanabe H. Periplasmic steroid-binding proteins and steroid transforming enzymes of pseudomonas testosteronei. *Journal of Steroid Biochemistry*, 1974, 5: 439
- 4 王金洛, 韩正康, 陈杰. 孕酮调节瘤胃消化代谢的研究. *南京农业大学学报*, 1990, 14(2): 74~78
- 5 王金洛, 陈伟华, 韩正康. 水牛瘤胃细菌及纤毛虫孕酮受体分析. *中国兽医科技*, 1992, 22(12): 18~21
- 6 Hino T, Russell JB. Relationship contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 1987, 64: 261~270
- 7 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254
- 8 蔡天权, 韩正康, 陈伟华, 等. 注射 1 $\beta$ -雌二醇对瘤胃消化代谢的影响. 见: 中国畜牧兽医学会主编. 动物生理生化研究会成立大会学术论文摘要汇编, 1987, 31
- 9 郑树衡. 唾液孕酮、雌二醇放射免疫测定在避孕及抗早孕药物研究中的应用. *生殖与避孕*, 1981, 7(1): 35~38
- 10 Wheeler AG, et al. Peripheral progesterone concentration in the luteal phase and effects of  $\alpha\beta$ -adrenergic receptor antagonist and  $\alpha$ -adrenergic agonists. *The Journal of Endocrinology*, 1988, 116: 137~142
- 11 陈杰, 锥秋江, 韩正康. 不同日粮条件下绵羊皱胃食糜氨基酸的研究. *南京农业大学学报*, 1986, 4: 88~92
- 12 卢德勋. 动物机体自我营养调控功能及其实践意义. *内蒙畜牧科学*, 1995, 1: 1~10

# A Study of Regulating Nitrogen Metabolism of Goat Ruminal Microorganisms with Progesterone

Wang Jinluo

(Beijing Municipal Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100081)

Chen Jie    Chen Weihua    Han Zhengkang

(Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract** In this experiment five native female goats fitted with chronic rumen fistulas, T-shaped duodenal cannulas were used to study the regulation of the ruminal nitrogen metabolism by injecting progesterone subcutaneously (1.25 mg/kg body weight), and to assay the ruminal bacteria progesterone receptor. The study showed that compared with the control period the progesterone entered the rumen through blood and reached its peak 8 hours after the injection. Goat intake, duodenal chyme flow, as well as the microbe-nitrogen (MCP-N), UN and  $\text{NH}_3\text{-N}$  in duodenal chyme except for the total nitrogen, BPN and NAN, increased considerably ( $P < 0.01$ ). The radio-receptor assay was used to analyse the progesterone receptor of goat rumen bacteria (BPR). The results showed that the maximal association content and  $K_d$  of BPR were  $105.01 \pm 15.32 \text{ fmol/mg protein}$  and  $9.54 \pm 0.44 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ , respectively. It suggested that a certain specific progesterone receptor should exist in the ruminal bacteria. The results cited above showed that a series of bio-effects could be stimulated by binding progesterone with BPR to obtain an increase both in the internal nitrogen and in MCP without affecting BPN.

**Key words** Progesterone; Nitrogen metabolism of ruminal microorganisms; Bacteria progesterone receptor