

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00883

• 研究快报 •

酸刺激前后唾液淀粉酶活性、流率和 pH 值的性别差异

杨泽民^{1*}, 林 静¹, 陈龙辉², 张 敏³, 陈蔚文², 杨小蓉⁴

1. 广东药学院基础学院生物化学与分子生物学系, 广州 510006
2. 广州中医药大学脾胃研究所, 广州 510405
3. 广州市海珠区妇幼保健院中医科, 广州 510240
4. 广东药学院附属第一医院检验科, 广州 510080

[摘要] **目的** 探讨唾液淀粉酶(sAA)活性、流率和 pH 值以及 sAA 活性与流率相关性的性别差异。**方法** 采集 105 名健康志愿者酸刺激前后的唾液标本, 测定其 sAA 活性、流率和 pH 值, 分析 sAA 活性和流率的相关性, 比较唾液测定指标之间的性别差异。**结果** 柠檬酸刺激能增加 sAA 活性、流率和 pH 值, 其中以流率增加最大($P < 0.01$); sAA 活性、流率和 pH 值在酸刺激前后以及对刺激的反应(前后的差值)都不存在性别差异; 女性在酸刺激前后 sAA 活性和流率之间以及 sAA 活性差值和流率差值之间都存在正相关($P < 0.05$), 并且相关系数相对稳定; 男性只在酸刺激后的 sAA 活性和流率之间表现正相关($P < 0.01$)。**结论** sAA 活性、流率和 pH 值在基础和应激状态下都没有性别差异, 但是 sAA 活性和流率之间的相关性存在一定的性别差异。

[关键词] 唾液; α 淀粉酶; 流率; pH 值; 柠檬酸; 性别

[中图分类号] R 345.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)08-0883-05

Sex differences of salivary α -amylase activity, flow rate and pH value before and after acid stimulation

YANG Ze-min^{1*}, LIN Jing¹, CHEN Long-hui², ZHANG Min³, CHEN Wei-wen², YANG Xiao-rong⁴

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China
2. Pi-Wei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China
3. Department of Traditional Chinese Medicine, Maternal and Child Health Hospital of Haizhu District, Guangzhou 510240, Guangdong, China
4. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To explore sex differences of salivary α -amylase activity (sAA), flow rate, pH value and correlation between sAA activity and flow rate. **Methods** Saliva samples were collected from 105 healthy volunteers before and after citric acid stimulation. Salivary sAA activity, flow rate and pH value were determined for each samples, and the correlation between sAA activity and flow rate was analyzed. The sex differences of the indices mentioned above were analyzed. **Results** Citric acid stimulation significantly increased salivary sAA activity, flow rate and pH value, with flow rate undergoing the greatest increase ($P < 0.01$). No significant sex differences in sAA activity, flow rate or pH value were found at baseline, stimulation or acute responses (delta value) to citric acid stimulation. For female subjects, significant positive correlations were found between sAA activity and flow rate in unstimulated and stimulated saliva, between sAA activity delta value and flow rate delta value ($P < 0.05$), and their coefficients kept relatively stable. For male subjects, significantly positive correlation was only found between stimulated sAA activity and flow rate ($P < 0.01$). **Conclusion** Our study indicates that no sex difference in the

[收稿日期] 2015-01-10 **[接受日期]** 2015-03-24

[基金项目] 国家自然科学基金(81102703), 广东省科技计划项目(2013A032500005), 广东省中医药管理局项目(20123001), 广东药学院基础学院教改项目。Supported by National Natural Science Foundation of China (81102703), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2013A032500005), Program of Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province (20123001), and Teaching Reform Project of School of Basic Courses of Guangdong Pharmaceutical University.

[作者简介] 杨泽民, 博士, 高级实验师。

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 020-39352192, E-mail: yzm3102001@gmail.com

sAA activity, flow rate or pH value at basal and acute responses to citric acid stimulation. However, certain sex difference is indicated in correlation between sAA activity and flow rate.

[Key words] salivary; α -amylase; flow rate; pH value; citric acid; sex

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(8): 883-887]

唾液不仅在保持口腔健康、起始淀粉的消化等方面具有重要作用,而且对临床唾液分泌功能的检测和腮腺炎、中医脾虚证等疾病的诊断具有重要的意义^[1-2]。唾液的分泌主要受交感神经和副交感神经的调控,唾液淀粉酶(salivary α -amylase, sAA)、唾液流率和唾液 pH 值是反映唾液分泌的常用指标。sAA 是唾液蛋白的重要成分,占唾液总蛋白的 40%~50%,是反映唾液蛋白分泌的主要指标,并且 sAA 作为一种消化酶和交感神经活跃状态的标记物已经被广泛用于营养代谢和心理生理方面的研究^[3-5]。唾液流率是反映唾液总量,尤其是唾液液体部分分泌的指标,已经被用于口腔健康方面的研究^[6]。唾液 pH 会影响唾液中蛋白酶的活性,也可一定程度地反映唾液中离子分泌的情况,因此, pH 值也是唾液分泌研究的常用观测指标。唾液包括基础和刺激唾液,由于基础和应激状态下唾液分泌方式有所不同,因此两种唾液的成分也存在差异。研究显示,生理或心理压力刺激能增加 sAA 活性和流率^[4,7]。此外,研究发现影响唾液分泌的下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)和交感神经系统(SNS)都存在明显的性别差异^[8]。因此,基础和刺激唾液可能存在性别差异。目前国外大量心理压力刺激的结果显示,基础或刺激的 sAA 活性不存在性别差异^[4,9-10]。然而,味觉刺激下的 sAA、流率和 pH 的性别差异,尤其是对刺激的急性反应(刺激前后的差值或比值)的性别差异还未见报道。并且目前已报道的样本量偏小,且受试者年龄层单一,以成年人为主。为此,本研究收集了包括儿童和成年人在内的 105 名健康志愿者酸刺激前后的唾液标本,对其 sAA 活性、流率和 pH 值以及 sAA 活性和流率的相关性在不同状态下的性别差异进行了分析,以期对唾液分泌和唾液指标的研究和临床应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 受试对象 本研究由广东药学院和广州市海珠区妇幼保健院伦理委员会授权。105 名健康志愿者(男 52 名,女 53 名)分别来自于广东药学院和广州市海珠区妇幼保健院,年龄范围为 6~25 岁,平均为(16±2)岁。受试者纳入标准:(1)无明显的疾病,

尤其是口腔、唾液腺及精神性疾病;(2)1 个月内没有服用任何形式的药物,尤其是可能影响唾液分泌的药物,如抗哮喘药、安眠药、镇痛药、避孕药等^[11];(3)无抽烟、喝酒或喝咖啡等习惯^[4];(4)所有参与者包括儿童监护人都签署知情同意书。

1.2 唾液标本的采集和处理 唾液采集按照课题组之前建立的方法^[12]进行,具体如下。(1)唾液采集时间为上午 10:00~11:00;(2)唾液采集前禁食 1 h 以上(除水之外);(3)酸刺激前(unstimulated)唾液采集:静坐 10 min 后,通过吞咽的方法将口腔唾液排净,然后将口腔内 3 min 分泌的唾液自然流出到 1 个 5 mL 的 EP 管,记录唾液量(mL);(4)酸刺激后(stimulated)唾液采集:用 0.4 mol/L 1 cm×1 cm 的柠檬酸试纸刺激舌尖 1 min,将刺激后唾液自然流出到另 1 个 5 mL 的 EP 管,记录唾液量(mL)。酸刺激舌尖时,注意将舌尖上翘,避免影响唾液 pH 值。采集的唾液标本-20℃保存过夜,次日 4℃解冻,11 000×g 离心 10 min,上清用于 sAA 活性测定。

1.3 sAA 活性测定 sAA 活性测定采用 IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)推荐的 EPS-G7 速率法^[4],由广东药学院附属第一医院检验科在日立 7180 全自动生化分析仪上进行。简单介绍如下:唾液标本 200 倍稀释后,以 α 淀粉酶测定试剂盒(广州科方生物技术有限公司)中的对硝基苯麦芽庚糖苷(亚乙基-G7-pNP)作为底物,葡萄糖苷酶作为指示酶进行反应。底物被 sAA 和糖苷酶水解后产生对硝基苯酚(pNP)。通过测定单位时间内 pNP 在 405 nm 处的光密度值的差值计算标本中 sAA 的活性(U/mL)。

1.4 唾液流率和 pH 测定 根据一定时间内(酸刺激前 3 min,酸刺激后 1 min)分泌的唾液量(mL),计算酸刺激前后的唾液流率(flow rate, mL/min)。唾液 pH 值利用 pH 6.0~8.0 和 1.0~14.0 精密试纸进行测定。

1.5 统计学处理 统计分析前, Kolmogorov-Smirnov 检验结果显示部分 sAA 活性和流率不符合正态分布。因此,对 sAA 活性和流率进行对数转换,转换后数据都符合正态分布。酸刺激前后 sAA

活性和流率的比较采用配对 *t* 检验, 全部参与者、男性和女性参与者之间的比较采用非配对 *t* 检验。酸刺激前后 sAA 活性和流率之间的相关性采用 Pearson 相关系数分析。检验水准(α)为 0.05。统计分析和作图分别利用 SPSS 19.0 (IBM software, USA) 和 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., USA) 完成。

2 结果

2.1 酸刺激前后 sAA 活性、流率和 pH 值的性别差异 基础状态下, sAA 活性(图 1A)、流率(图 1B)和 pH 值(图 1C)都不存在性别差异; 柠檬酸刺激

后, 男性和女性参与者的 sAA 活性($P < 0.01$)、流率($P < 0.01$)和 pH 值($P < 0.01$)都增加, 但是刺激后的 sAA 活性、流率和 pH 值都不存在性别差异(图 1A~1C)。此外, 酸刺激前后唾液流率的差值和 sAA 活性的差值不存在性别差异(图 1D)。

2.2 酸刺激前后 sAA 活性和流率相关性分析 结果如表 1, 对于女性, 酸刺激前后 sAA 活性与流率之间以及 sAA 活性差值与流率差值之间都存在正相关($P < 0.05$), 并且相关系数没有明显的变化。对于男性, 酸刺激后的 sAA 活性和流率之间存在正相关($P = 0.007$), 而酸刺激前的 sAA 活性和流率之间以及两者酸刺激前后的差值之间都没有相关性。

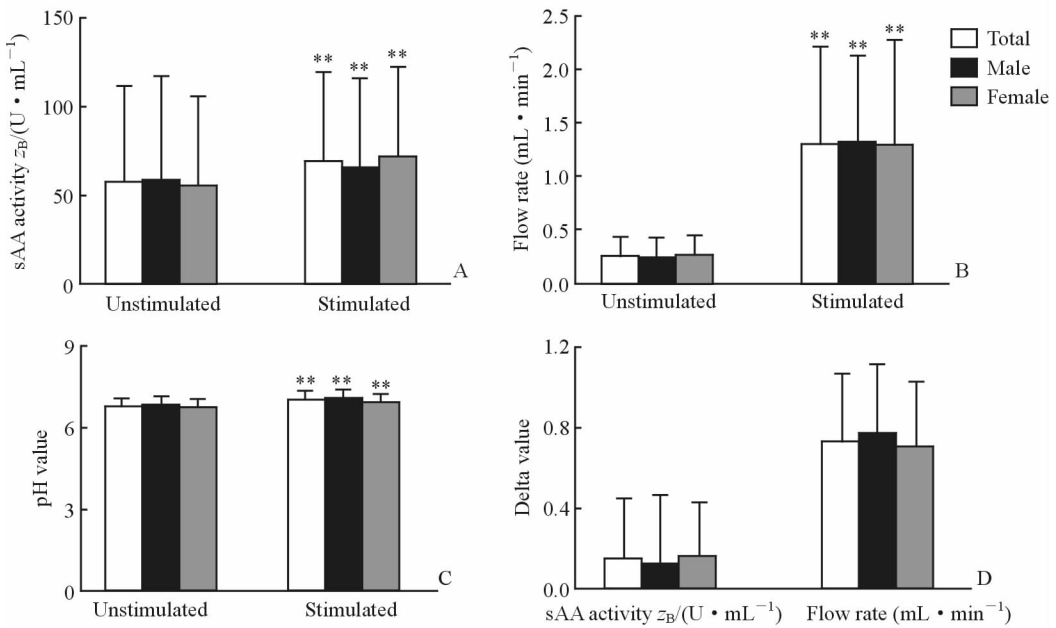


图 1 柠檬酸刺激前后 sAA 活性、流率、pH 值及其差值比较

Fig 1 Comparison of sAA activity, flow rate, pH value and their delta value before and after citric acid stimulation

sAA: Salivary α -amylase. A: sAA activity; B: Salivary flow rate; C: pH value; D: Delta value of sAA activity and that of flow rate. ** $P < 0.01$ vs unstimulated saliva

表 1 酸刺激前后 sAA 活性与流率之间的相关性

Tab 1 Correlation between sAA activity and flow rate before and after citric acid stimulation

| | Unstimulated | | | Stimulated | | | Delta value | | |
|-------------------------|--------------|-------|--------|------------|-------|--------|-------------|-------|--------|
| | Total | Male | Female | Total | Male | Female | Total | Male | Female |
| Correlation coefficient | 0.276 | 0.251 | 0.296 | 0.312 | 0.384 | 0.273 | 0.013 | 0.206 | 0.313 |
| P value | 0.005 | 0.085 | 0.031 | 0.002 | 0.007 | 0.048 | 0.901 | 0.159 | 0.022 |

Total numbers of subjects were 105, with 52 males and 53 females. sAA: Salivary α -amylase

3 讨论

sAA 作为交感神经活跃状态的生物标记物, 在心理压力测试的研究已经有大量的报道^[4-5], 但是味觉刺激的研究较少。柠檬酸刺激对 sAA 活性、流

率、pH 值的研究在中医脾虚证的研究中虽然有一定的报道^[2], 但是有关 sAA 活性、流率和 pH 值以及 sAA 活性和流率之间相关性的性别差异尚未见报道。本研究通过性别分析, 发现 sAA 活性、流率和 pH 值在酸刺激前和刺激后以及对刺激的急性反应

(前后差值)都不存在性别差异,但是 sAA 活性和流率的相关性在不同的状态下存在一定的性别差异。

唾液的分泌主要受自主神经系统支配,其中交感神经通过去甲肾上腺素与腺泡细胞膜上的 α 和 β 受体(α -AR、 β -AR)结合,适量增加唾液中液体分泌,并促进大量唾液蛋白的分泌;副交感神经通过乙酰胆碱与腺泡细胞膜上的胆碱受体 M3(mAChRs)结合,引起大量电解质、水分和少量唾液蛋白的分泌。因此,唾液蛋白主要是由交感神经调控,而唾液流率主要是受到副交感神经的调控^[13-14]。此外,唾液主要由腮腺、颌下腺和舌下腺 3 个唾液腺分泌,但是这 3 个腺体对唾液成分和唾液量的贡献存在明显差异,其中腮腺分泌 80% 的 sAA,并且在刺激状态下其分泌的唾液量占总唾液量的比例由 20% 增加到 50% 以上^[4]。因此,在各种外界刺激的情况下,机体 sAA 会随腮腺分泌增强而增加^[4,12]。本研究发现,柠檬酸刺激后 sAA 活性和流率增加,并且唾液流率比 sAA 活性增加更为明显。该结果揭示,柠檬酸刺激主要是通过促进副交感神经活性来调控唾液的分泌。

人类对压力和刺激物的反应主要由 HPA 轴和交感神经系统调控。研究显示,HPA 轴和交感神经系统存在显著的性别差异。Kirschbaum 等^[15]发现男性 HPA 轴对心理压力的反应性比女性更强。Gustafson 等^[16]也发现,在等长运动中男性血浆去甲肾上腺素的含量比女性更高,提示男性对压力或运动的反应比女性更大。本研究结果显示,男性酸刺激前后的唾液流率差值与女性相比呈现增加的趋势(图 1D)。该结果提示男性对作用于副交感神经的柠檬酸刺激的反应同样比女性大。此外,sAA 作为反映交感神经活性的生物标记物,已被广泛用于心理压力的研究^[4-5]。由于交感神经活性的性别差异,通常认为 sAA 活性也存在性别差异。然而大量的心理压力测试结果显示,测试前后的 sAA 活性及其对压力的反应都不存在性别差异^[4,9-10]。本研究以柠檬酸作为味觉刺激物探讨其对唾液分泌的性别差异,结果显示酸刺激前后的 sAA 活性和流率以及它们对酸刺激的急性反应(前后的差值)都不存在显著的性别差异。由此可见,分别作用于副交感神经和交感神经的味觉刺激和心理压力测试虽然在获得的唾液量和唾液组成上可能存在差异,但是两者都不存在性别差异,即男性和女性在味觉和心理刺激下的唾液流率和 sAA 活性没有差异。

唾液流率和 sAA 活性分别由副交感和交感神经调控,两者的相关性分析不仅能直接反映酸刺激前后唾液流率和 sAA 活性的关系,而且还能一定程度地反映交感神经和副交感神经的相互作用关系。交感神经和副交感神经对唾液分泌的调控是此长彼消的协调交互影响模式。本研究结果显示,女性在酸刺激前后的 sAA 活性和流率之间以及 sAA 活性差值和流率差值之间都存在正相关性,并且相关系数相对稳定。然而男性在酸刺激前后 sAA 活性和流率之间的相关性变化较大,即在酸刺激前和对刺激的急性反应上(前后差值)两者都没有相关性,只在酸刺激后的唾液中两者呈正相关。该结果揭示,男性和女性基础状态的唾液分泌主要受副交感神经的调控,但男性基础状态的唾液分泌受情绪等心理因素影响较大,然而柠檬酸刺激后两者副交感神经活性都增加。Ng 等^[17]研究发现,静息状态下,男性交感神经活性比女性更高,并且交感神经活性与血浆去甲肾上腺素的含量呈正相关。此外,Gerlo 等^[18]发现,男性 24 h 尿液中去甲肾上腺素的排泄量比女性更高。这些结果提示男性基础状态下交感神经的活性比女性更高。sAA 作为反映交感神经活性的标记物,易受情绪等心理因素的影响^[4-5]。本研究也显示基础状态下男性 sAA 活性的平均值和标准差都比女性大 [(57.98 ± 59.17) U/mL vs (55.29 ± 50.35) U/mL]。因此,男性基础状态下唾液流率和 sAA 活性没有显著的相关性 ($P=0.085$) 可能与此有关。然而,柠檬酸刺激后,男性和女性副交感神经对唾液分泌的调控进一步加强,因此两者 sAA 活性和流率都表现为显著的正相关。同时,由于女性酸刺激前后的唾液分泌受交感神经影响较少,因此其 sAA 活性差值和流率差值之间也呈现正相关。相反,男性由于基础状态的唾液分泌受交感神经的影响,其 sAA 活性差值和流率差值之间没有相关性。

另外,柠檬酸刺激在促进唾液液体和蛋白部分分泌的同时,还会促进氯离子、钠离子、钾离子、碳酸氢根离子等分泌,这些离子不仅会改变唾液 pH 值,而且还会激活或抑制唾液中如 sAA 等蛋白酶的活性^[19]。正常人唾液 pH 值为 6.8~7.1,受刺激后唾液 pH 可升高 2 个单位。本研究发现所有健康志愿者在柠檬酸刺激后,唾液 pH 值都显著增加,但是酸刺激前后的唾液 pH 值不存在性别差异。这也进一步证实了唾液的分泌方式不存在性别差异。

综上所述,柠檬酸刺激能增加 sAA 活性、流率和 pH 值,其中以流率增加最大。然而 sAA 活性、流率和 pH 值在酸刺激前、刺激后以及对刺激的急性反应(前后差值)都没有性别差异。但是男性和女性参与者 sAA 活性和流率的相关性在不同的状态下存在一定的差异。这一结果提示男性和女性在激素水平和对刺激的激素反应上可能存在一定的差异,这种差异对 sAA 活性和流率的相关性有一定的影响,对 sAA 活性、流率和 pH 值的影响则不大。

[参考文献]

- [1] 张小飘,董明驹. 血清淀粉酶同工酶在流行性腮腺炎诊断中的意义[J]. 重庆医学,2010,39:1129-1130.
- [2] 杨泽民,陈龙辉,林静,张敏,杨小蓉,陈蔚文. 柠檬酸刺激对脾虚患儿唾液淀粉酶、总蛋白、唾液流率及 pH 值的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2015,35:188-192.
- [3] Mandel A L, Peyrot des Gachons C, Plank K L, Alarcon S, Breslin P A. Individual differences in AMY1 gene copy number, salivary α -amylase levels, and the perception of oral starch [J]. PLoS One, 2010, 5: e13352.
- [4] Rohleder N, Nater U M. Determinants of salivary alpha-amylase in humans and methodological considerations [J]. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34: 469-485.
- [5] Schumacher S, Kirschbaum C, Fydrieh T, Ströhle A. Is salivary alpha-amylase an indicator of autonomic nervous system dysregulations in mental disorders? — a review of preliminary findings and the interactions with cortisol [J]. Psychoneuroendocrinology, 2013, 38: 729-743.
- [6] Shaila M, Pai G P, Shetty P. Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: a comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis [J]. J Indian Soc Periodontol, 2013, 17: 42-46.
- [7] Arhakis A, Karagiannis V, Kalfas S. Salivary alpha-amylase activity and salivary flow rate in young adults [J]. Open Dent J, 2013, 7:7-15.
- [8] Kirschbaum C, Kudielka B M, Gaab J, Schommer N C, Hellhammer D H. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis[J]. Psychosom Med, 1999, 61:154-162.
- [9] Nater U M, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase [J]. Psychoneuroendocrinology, 2007, 32:392-401.
- [10] Kivlighan K T, Granger D A. Salivary alpha-amylase response to competition: relation to gender, previous experience, and attitudes [J]. Psychoneuroendocrinology, 2006, 31: 703-714.
- [11] Strahler J, Mueller A, Rosenloecher F, Kirschbaum C, Rohleder N. Salivary alpha-amylase stress reactivity across different age groups [J]. Psychophysiology, 2010, 47: 587-595.
- [12] 陈龙辉,杨泽民,李茹柳,林传权,张杰,陈蔚文. 柠檬酸滤纸面积及浓度对刺激健康人唾液分泌和唾液淀粉酶活性改变的影响[J]. 广州中医药大学学报,2013, 30:186-190.
- [13] Proctor G B, Carpenter G H. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves [J]. Auton Neurosci, 2007, 133:3-18.
- [14] Ishikawa Y, Cho G, Yuan Z, Skowronski M T, Pan Y, Ishida H. Water channels and zymogen granules in salivary glands[J]. J Pharmacol Sci, 2006, 100:495-512.
- [15] Kirschbaum C, Kudielka B M, Gaab J, Schommer N C, Hellhammer D H. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis [J]. Psychosom Med, 1999, 61:154-162.
- [16] Gustafson A B, Kalkhoff R K. Influence of sex and obesity on plasma catecholamine response to isometric exercise [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1982, 55: 703-708.
- [17] Ng A V, Callister R, Johnson D G, Seals D R. Age and gender influence muscle sympathetic nerve activity at rest in healthy humans [J]. Hypertension,1993, 21: 498-503.
- [18] Gerlo E A, Schoors D F, Dupont A G. Age- and sex-related differences for the urinary excretion of norepinephrine, epinephrine, and dopamine in adults [J]. Clin Chem, 1991, 37:875-878.
- [19] Catalán M A, Nakamoto T, Melvin J E. The salivary gland fluid secretion mechanism [J]. J Med Invest, 2009, 56 (Suppl): 192-196.