

鱼类低温适应机制的研究

Ⅱ. 驯化温度对草鱼和鲢鱼肌肉线粒体膜 脂肪酸组成和胆固醇含量的影响

曹永长* 王祖熊

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

摘要 采用气相色谱法和气相色谱/质谱联用法对不同温度驯养的草鱼和鲢鱼肌肉线粒体膜脂肪酸组成进行了分析。10℃适应的草鱼和25℃适应的草鱼相比, 肌肉线粒体膜脂肪酸中不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸(U/S)值明显升高, 脂酰链平均长度也从25℃时的19.08个碳原子增加到10℃时的20.46个碳原子。而鲢鱼的脂肪酸组成在不同适应温度下的变化不明显。此外, 还测出了不同驯养温度下草鱼和鲢鱼肌肉线粒体中胆固醇含量的变化, 发现两种鱼的胆固醇含量在低温下都显著下降。作者认为, 低温适应下的草鱼由于肌肉线粒体的脂肪酸组成和胆固醇含量都发生变化, 因而其肌肉线粒体膜的流动性明显增加; 而鲢鱼肌肉组织线粒体中胆固醇含量虽也减少, 但脂肪酸组成变化甚微, 因此, 鲢鱼肌肉组织线粒体膜流动性增加很有限。这可能就是鲢鱼耐寒能力差的重要原因之一。

关键词 草鱼; 鲢鱼; 脂肪酸; 胆固醇; 膜脂流动性; 温度适应

经过长期特定环境的影响以及进化过程中的分化, 不同的鱼类适应环境温度的能力有了明显的差异。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是一种广温性鱼类, 可以在广泛的温度范围内生存。鲢鱼(*Cirrhinus molitorella*)属喜温性鱼类, 对低温的耐受性差, 当环境温度低于7℃时便开始死亡。造成鱼类温度适应能力差的原因, 在于鱼类本身生理生化性能的差异, 除神经系统和新陈代谢系统等生理适应性调节能力以外, 膜结构的生理适应能力也是一个很重要的方面。为了进一步弄清鲢鱼不耐低温的机理, 并为彻底改善鲢鱼抗寒育种实践提供理论依据, 我们对不同驯养温度下鲢鱼肌肉组织线粒体膜的脂肪酸组成和胆固醇含量变化进行了比较研究, 并用草鱼作对照, 比较二者在膜结构和组成上变化的差异, 从另外一个方面说明鲢鱼不耐寒的原因。

1 材料与方 法

材料来源: 草鱼为长江野生草鱼种, 每尾重约50 g。鲢鱼系从广州购回的当年鱼苗, 在本所鱼塘养至11月份, 每尾重10—15 g。将两种鱼各分成两组, 在10℃和25℃的室内鱼池中进行驯养, 持续时间4周以上。

线粒体及线粒体膜脂的制备: 将鱼断头后取背部白肌, 采用Wodtke (1978) 法^[16]制备

* 现在华南农业大学畜牧系工作。

1990-04-01 收稿

线粒体。用 Folin—酚法^[13]测定线粒体蛋白质浓度(用每毫升中所含蛋白质的毫克数表示)。将 Folch 等(1957)的方法^[10]略加改进后制备线粒体膜脂。

胆固醇含量的测定采用铁矾显色法^[4]。

采用快速酯交换法^[1]进行脂肪酸甲酯化。将甲酯化脂肪酸用气相色谱/质谱联用法(GC/MS)对脂肪酸组成进行定性分析,并用气相色谱法(GC)对脂肪酸各组分进行定量。

气相色谱条件:日本岛津 GC-9A 型气相色谱仪的色谱柱为岛津 Dexsil-300GC 弹性石英毛细管,柱长 50 m,内径 0.24 mm;程序升温,初始温度为 140℃,保持 2 min,然后按 4℃/min 升至 280℃,保持到分析结束;采用氢火焰检测器(FID),气化室和检测器温度均为 300℃;用 N₂ 作载气,CR-3A 数据处理机进行结果分析,根据各峰面积计算各组分百分比含量。

色谱/质谱联用条件:色/质联用仪为英国 VG-7070E-HE 型质谱仪与美国 HP-5790A 型气相色谱仪联用。色谱柱与色谱条件同上;连接器温度 220℃,选用 EI 电离方式,离子源温度 200℃,电子电离能量为 70 eV,加速电压 6 kV,分辨率为 10³,载气为 He。

2 结果

2.1 胆固醇含量的变化

低温驯养使草鱼和鲢鱼肌肉线粒体膜中胆固醇含量都发生了变化,测得的结果如表 1 所示。在 2 种鱼中,与 25℃驯养的鱼比较,10℃驯养鱼的肌肉线粒体膜胆固醇含量均明显下降,其中草鱼下降 32.84%,鲢鱼下降 25.06%。

表 1 不同温度驯化的鱼类中肌肉线粒体膜胆固醇含量(μg 胆固醇/mg 线粒体蛋白质)

		25℃	10℃
草	鱼	7.338	5.075
鲢	鱼	12.196	7.329

2.2 脂肪酸组成的变化

表 2 列出了草鱼和鲢鱼在不同驯养温度下的脂肪酸组成变化。从表中可以看出,草鱼和鲢鱼肌肉线粒体膜脂肪酸的主要成分为 16C 到 22C 的饱和脂肪酸和各种不饱和脂肪酸。另有两个未知峰,根据其在色谱图上的位置和峰的形状,可以确定为 22C 的不饱和脂肪酸,但在质谱上未能检测出它们具体代表哪种脂肪酸。

不同温度适应的草鱼,其肌肉线粒体脂肪酸的组成明显不同,10℃驯养的草鱼和 25℃的草鱼比较,不饱和脂肪酸比例增加,饱和脂肪酸含量相对下降,两者的比值(U/S)升高;长链多不饱和脂肪酸含量增加,脂酰链平均长度增加。而鲢鱼肌肉线粒体脂肪酸组成的变化受驯养温度的影响较小,不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸之比及脂酰链平均长度在两种驯化温度下的差异不明显。

3 讨论

当环境温度发生变化时,鱼类和其它变温动物一样,其生理生化性质在许多方面都要发生变化,其中,膜脂的适应性变化是一个非常重要的方面。随着环境温度的下降,膜的流动性降低,因而使酶活力下降^[12]。鱼类针对环境温度的下降,增加膜的流动性,以补偿它对酶活力的影响。影响膜流动性的因素很多,如磷脂组成的变化,脂肪酸组成的变化以及胆固醇含量的变化等因素都直接影响到膜流动性^[5]。

表 2 不同温度驯养的鱼类肌肉线粒体膜脂肪酸组成

脂 肪 酸	百 分 含 量	草 鱼		鲢 鱼	
		25℃	10℃	25℃	10℃
16:1	十六碳一烯酸甲酯	1.413 5	1.380 9	1.668 9	2.119 7
16:0	十六碳烷酸甲酯	14.818 0	4.021 2	12.638 6	9.123 1
17:0	十七碳烷酸甲酯	1.225 9	2.679 0	5.280 4	7.055 7
18:3	十八碳三烯酸甲酯				
18:2	十八碳二烯酸甲酯	23.639 9	11.444 8	26.308 2	24.159 4
18:1	十八碳一烯酸甲酯				
18:0	十八碳烷酸甲酯	9.537 5	3.261 8	8.797 2	7.322 8
20:4	二十碳四烯酸甲酯				
20:3	二十碳三烯酸甲酯	22.004 7	15.298 5	10.203 7	9.347 6
20:2	二十碳二烯酸甲酯				
20:1	二十碳一烯酸甲酯	4.515 3	3.178 1	4.276 6	5.867 5
20:0	二十碳烷酸甲酯	1.235 8	6.229 1	1.042 4	5.541 4
22:6	二十二碳六烯酸甲酯	12.196 5	24.002 1	8.808 6	8.849 9
未知峰 1		3.277 7	23.238 2	10.433 6	10.1081
未知峰 2		6.134 3	5.266 1	10.541 6	10.504 8
不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸 (U/S)		2.72	5.18	2.60	2.44
脂酰链平均长度*		19.08 C	20.46 C	19.16 C	19.30 C

$$* \text{脂酰链平均长度 } L = \sum (\text{脂肪酸碳原子数} \times \text{百分含量} \%) / 100$$

胆固醇是线粒体内膜的一个重要结构成分。Davis 等 (1980)^[7]用核磁共振法研究温度和胆固醇对 *Acholeplasma laidlawii* 膜活性的影响,发现在 20~42℃ 的范围内,胆固醇的存在能使膜脂分子的有序性增加。Demel 等 (1976)^[9]认为胆固醇含量的变化影响到膜温度的适应性,如膜的渗透性和膜结合酶的活力都会受到影响。但是,如果仅仅只有胆固醇含量的变化,而膜的其它结构成分(如磷脂的组成和脂肪酸的组成)不发生变化,那么,膜的流动性的改变是很有限的^[14]。实验表明,不同温度驯养的草鱼和鲢鱼的肌肉线粒体胆固醇含量都发生了变化,10℃ 适应的鱼和 25℃ 适应的鱼相比,胆固醇含量均明显降低。这说明在低温适应的鲢鱼和草鱼中,线粒体膜脂流动性也可能会有所增加,但增加的程度有多大,则要依赖于膜脂的其它结构成分的变化情况。

脂肪酸组成的变化是影响膜脂流动性的一个非常重要的因素。当环境温度下降时,广温性鱼类膜脂脂肪酸组成发生变化,饱和脂肪酸比例下降,不饱和脂肪酸比例增加,长链多不饱和脂肪酸的含量也增加。这些变化直接影响到膜脂的结构状态,因为不饱和脂肪酸具有较低的熔点,在单层膜结构中占据的位置比其饱和的同源脂肪酸大,所以脂肪酸中不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸比例的增加,增加了膜双层组织的无序性,因而使膜的流动性

增加^[5]。低温适应的草鱼,其脂肪酸中不饱和脂肪酸比例上升,平均脂酰链长度增加,说明草鱼在低温下其膜脂的流动性增加了。而鲢鱼脂肪酸组成的变化甚小,说明鲢鱼肌肉组织线粒体膜脂流动性的改变也是很有限的。

综上所述,低温适应的草鱼肌肉组织线粒体,由于膜脂中多不饱和脂肪酸含量的增加,以及胆固醇含量降低,因而膜脂的流动性增加。鲢鱼肌肉线粒体膜脂脂肪酸组成在不同温度下变化不大。虽然胆固醇含量下降了,但由于胆固醇对膜脂流动性的影响是有限的,所以鲢鱼线粒体膜脂流动性变化幅度也不大。这一结论与从鱼类线粒体 ATPase 的 Arrhenius 图折点温度所得出的结论是一致的^[3]。在鲤鱼中也发现了和我们在草鱼中所发现的情况相同的结果^[16~17]。

膜脂流动性的变化,直接影响到酶的催化能力。Kimmelberg (1972) 认为^[12],在金鱼的温度适应过程中,细胞色素氧化酶^[4]和琥珀酸脱氢酶^[11]活力的变化是适应性“趋粘”效应,受膜脂流动性的影响。Cossins 等 (1987)^[6]指出,ATPase 的动力学特性对膜有序性的改变是敏感的。当环境温度降低时,鱼类通过各种不同的机制增加膜的流动性,以补偿温度下降对酶活力的影响。膜结构调节机制对于有机体的低温适应是很重要的。他们研究了几种动物的膜流动性和 Na-K ATPase 的性质之后得出结论说,从鱼类、鸟类到哺乳类的 ATPase 性质的差异是由膜有序性的适应性调节引起的,而很可能与蛋白质的一、二级结构的差异无关。草鱼等广温性鱼类在低温环境中具有调节膜脂组成的能力,通过膜脂组成的变化来改变膜的结构,以保证大部分酶在低温下行使正常的功能。而鲢鱼的这一调节机制还不完善,当环境温度下降时,膜的流动性降低,使酶的催化能力受到压抑,从而影响到整个有机体的新陈代谢能力。当温度下降到一定程度时 (7℃ 以下),就会导致机体的损伤和死亡。鲢鱼脑乙酰胆碱酯酶随着水温的下降而酶活力降低^[2]可能也与其膜脂流动性的下降有关。因此,我们认为,鲢鱼膜结构调节功能的缺陷是鲢鱼不能耐受低温的一个很重要的因素。

参 考 文 献

- 1 王光华等. 食用油中脂肪酸含量的分析. 分析化学, 1987, 15 (10): 936~938
- 2 冯祖强等. 鲢鱼冷休克及其死亡的某些生化因素. 水生生物学集刊, 1984, 8 (3): 289~297
- 3 汪亚平. 几种鱼类线粒体 ATP 酶活性及核内小分子 RNA 电泳组成的比较研究. 中国科学院水生生物研究所硕士论文. 1988
- 4 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1981.
- 5 曹永长. 温度变化对鱼类膜脂组成和结构的影响. 生命的化学, 1989, 9 (6): 22~24
- 6 Cossins AR, et al. Lipid-protein interactions in the adaptive regulation of membrane function. Biochem Soc Trans, 1987, 15 (1): 77~81
- 7 Davis J H, et al. The temperature dependence of molecular order and the influence of cholesterol *Acholeplasma laidlawii* membranes. Biochim Biophys Acta, 1980, 597: 477~491
- 8 Dean J M. Metabolism of tissues of thermally acclimated trout. Comp Biochem Physiol, 1969, 29: 185~196
- 9 Demel R A and De Kruyff B. The function of sterols in membranes. Biochim Biophys Acta, 1976, 457 (2): 109~132
- 10 Folch J, et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem, 1957, 226: 497~509

- 11 Hazel J R. The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the epaxial muscle of the common goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp Biochem Physiol*, 1972, 43B: 863~882
- 12 Kimmelberg H K, et al. Phospholipid requirements for Na-K ATPase activity: Head-group specificity and fatty acid fluidity. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 282: 277~292
- 13 Lowry O H, et al. Protein measurement with the folinphenol reagent. *Biol Chem*, 1951, 193: 265~273
- 14 Nigg E A and Cherry R J. Influence of temperature and cholesterol on the rotational diffusion of band 3 in the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 1979, 18: 3457~3465
- 15 Wodtke E. Discontinuities in the arrhenius plots of mitochondrial membranebound enzyme systems from a poikilotherm: Acclimation temperature of carp affects transition temperatures. *J Comp Physiol*, 1976, 110: 145~157
- 16 Wodtke E. Lipid adaptation in liver mitochondrial membranes of carp acclimated to different environmental temperature. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 529: 280~291
- 17 Wodtke E. The effects of acclimation temperature on unsaturation of the main neutral and charged phospholipids in mitochondrial membranes of carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim Biophys Acta*, 1981, 640: 698~709

STUDY ON THE MECHANISM OF LOW TEMPERATURE ADAPTATION IN FISH.

II. EFFECTS OF ACCLIMATION TEMPERATURE ON FATTY ACID COMPOSITION AND CHOLESTEROL CONTENT IN MITOCHONDRIAL MEMBRANES OF MUSCLE TISSUE OF THE GRASS CARP AND MUD CARP

Cao Yongchang Wang Zuxiong

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract The GC/MS and GC techniques were applied to analyse the composition of fatty acids from mitochondria in muscle tissue of grass carps and mud carps acclimated to different temperatures. Significant changes in fatty acid composition were observed in muscular mitochondrial membrane of grass carps acclimated to 25°C and 10°C respectively, but little changes occurred in mud carp mitochondrial membrane. The cholesterol content in muscular mitochondrial membrane of warm-and cold-acclimated fish were also determined, and the cholesterol content in all of them decreased after cold-acclimation. The fluidity of mitochondrial membranes in muscle tissue of cold-acclimated grass carps increased as a result of the changes in fatty acids and the decrease in cholesterol content. In the muscle tissues of cold-acclimated mud carps, increase in fluidity of the mitochondrial membranes was limited because the changes in fatty acid composition were little. It is believed that the difference in fluidity changes of the membrane between the grass carp and mud carp is partly responsible for the difference of cold tolerance capacity between these two fish species.

Key Words Grass carp; Mud carp; Fatty acid; Cholesterol; Fluidity of membranes; Acclimation temperature