

综 述

# 鱼类对环境温度适应问题

## THE ACCLIMATION OF FISHES TO ENVIRONMENTAL TEMPERATURE

冯祖强 王祖熊

(中国科学院水生生物研究所)

Feng Zuqiang and Wang Zuxiong

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica)

### 提 要

本文从鱼脑乙酰胆碱酯酶系统、抗冻蛋白基因调控系统、同工酶开关合成系统以及代谢系统等四个方面综述了近年来鱼类对环境温度适应的研究概况,并分析讨论这些研究结果,同时提出遗传改良某些亚热带鱼类优良品种抗寒能力差的可能性。

生物对环境温度适应问题的研究,一方面,在理论上对阐明生物进化、自然选择等原理具有重要的意义;另一方面,在实践上对进行遗传改良物种和定向培育物种也具有同等重要的意义。因此,受到生态学家、遗传育种学家和分类学家的普遍重视。近年来,生物对环境温度适应问题的研究已经成为生物学学科中一个活跃的领域。它涉及的面越来越广,从低等生物细菌到高等动植物,已有许多生物学工作者从各方面去探讨生物对环境温度适应的机理。在高温细菌中,已发现有耐热的蛋白质存在,并对其生物学功能进行了研究<sup>(1)</sup>;在鱼类中,也已有学者初步研究了抗冻蛋白基因的特性<sup>(17,18)</sup>;在植物中,人们开始研究植物酶系统的多型性和对异常温度的抗性等问题<sup>(2)</sup>。下面仅就近年来鱼类对环境温度适应的研究概况作一评述。

### 鱼脑乙酰胆碱酯酶系统

现在已经知道,乙酰胆碱(Ach)是重要的神经递质。它的释放与解除引起膜电位差的改变,从而维持着神经系统兴奋与抑制两个过程。Ach的释放为神经传导所必需,但是它必须迅速地被除去,否则连续的刺激会引起过度兴奋,最终导致传导阻断而死亡。Ach的解除是由乙酰胆碱酯酶(AchE)将其水解为乙酸和胆碱,从而使其失活。因此,AchE的作用是十分重要的。为了阐明神经系统与环境温度之间的关系,以及在适应环境温度的过程中神经系统的作用等问题。1964年,Baslow和Nigrelli比较热

(1) 盛祖嘉,1977。高温细菌。生物科学动态,1977(1):1-7。

(2) 季莫夫,1978。植物酶系统的多型性和异常温度(低温)的抗性。生物科学动态,1981(5):69-72。

带生物和喜冷生物的某些特异性酶对温度变化的不稳定性程度,发现热带鱼的脑 AchE 比喜冷鱼的脑 AchE 对热具有较大的稳定性和对冷的不稳定性<sup>[3]</sup>。Baldwin 和 Hochachka(1970)研究硬头鱈(*Salmo gairdnerii*)脑 AchE 在对温度适应期间的动力学时注意到:该酶可以两种截然不同的形式存在。长时期适应于 17°C 水温的鱼中,出现这种酶的“温暖”变体;而适应于 2°C 水温之后则出现这种酶的“寒冷”变体。在较适温度区内(12°C),两种形式可同时存在。实验证明,该鱼的脑 AchE 变异体的  $K_m$  值是由环境温度决定的。作者们认为,尽管温度升高时,希望酶的反应速度加快,但这种影响被酶与底物亲和性(Affinity)的降低所抵消。因此,全部反应速率仍维持着不以温度为转移的相对独立性<sup>[2]</sup>。在广温性鱼类鲮鱼(*Mugil cephalus* L.)中, AchE 也是以改变其  $K_m$  值来适应温度变化的。这类酶蛋白分子的构型在不同温度条件下是可变的。因此,它是在广泛温度区内都能适用的广泛性酶,它与底物结合的能力在这种鱼广泛分布的温度区域内都是适应的<sup>[1]</sup>。又例如,花鲢(*Aristichthys nobilis*)的脑 AchE 在不同的温度条件下,酶的活力维持不变<sup>[4]</sup>。

然而,对于喜冷定温性鱼类南极鱼(*Trematomus borchgrevinkii*)来说, AchE 与底物结合的能力就只限于低温区内(0°C左右),当温度高于 0°C 以上时,该酶的活力下降,在 7°C 左右时即失活而导致死亡。由于它是决定这种鱼存活的水温上限条件,所以人们已经把 AchE 称为临界脑酶<sup>[1]</sup>。但是,对于“喜暖”定温性鱼类鲢鱼(*Cirrhinus molitorella*)来说,脑 AchE 的活力特性恰好相反。随着水温的下降,酶的活力相应地下降,到了临界温度(7°C)时,酶的活力丧失,鱼出现冷休克,最后导致死亡。显然,温度降低,机体死亡是与鱼脑 AchE 活力显著下降有关的<sup>[4]</sup>。

此外,Johnston 和 Roots(1964)研究过鲫鱼(*Carassius auratus*)的脑脂肪酸对温度变化的反应,发现总的脑脂随着温度的下降而增加(适应的水温为 5°C、15°C、25°C、30°C;脑脂的百分含量为 9.32、8.98、8.59、8.30)。特别是不饱和脂肪酸最明显。这些作者相信,酯类不饱和程度的主要功能是在神经细胞膜中维持酯—水的平衡。这样,离子的流动,例如 Ach 的释放,使神经功能适当地平衡<sup>[4]</sup>。

从以上三类鱼(广温性鱼类、喜冷性鱼类和喜暖性鱼类)脑 AchE 对环境温度适应所表现的特征,我们认为:在广温性鱼类中,脑 AchE 在周年的季节性温度变化范围内都能行使正常的生理功能,而狭温性鱼类在对热带或寒带温度进行演化性适应过程中,脑 AchE 的正常生理功能只限于狭温性鱼类各自所栖息的地区,超出了该酶所允许的温度范围时,酶的活力就丧失。由此可见,鱼脑 AchE 系统对温度的改变是十分敏感的。同时,这种由环境温度的刺激所引起的鱼脑 AchE 系统的反应也是符合自然选择的客观规律的。

## 抗冻蛋白基因系统

1970年,Stanley 在比较冷适应的南极鱼和其它鱼类血液蛋白质组成时发现:南极鱼的血清缺乏白蛋白,但含有较多的脂蛋白和能降低冰点的抗冻糖蛋白(AFGP),这类 AFGP 在一般鱼类的血清中不存在<sup>[25]</sup>。尔后,Hew(1981)报导在大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)的血浆中也含有类似的物质并进行了多肽链的氨基酸序列分析<sup>[10]</sup>。实验证明,这一类糖蛋白降低溶液冰点的效力比相同克分子浓度的氯化钠要高出 200—500 倍。因此,使生活在极区高寒水域的鱼类能顺利越冬而不被冻死。在这期间同时发现许多海洋性鱼类的血液中存在抗冻多肽类物质。例如,美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*)的冬季血液中抗冻多肽类物质的浓度可以高达每毫升 25 毫克的抗冻肽类<sup>[1,8]</sup>。因此,该鱼冬季血液的冰点可以降到 -0.5—-0.8°C 以下,完全能够在该鱼分布区内安全越冬。目前,对上述的 AFGP 或多

(1) 王祖熊等,1982。鲮鱼遗传改良的研究 I. 杂交育种和遗传性状分析。水生生物学集刊(待发表)。

(2) 冯祖强、王祖熊,1982。鲮鱼冷休克及其死亡的某些生化因素。水生生物学集刊(待发表)。

肽类防止血液冰晶体生长的分子机理已提出了几种设想<sup>[7,9]</sup>。由于这类抗冻肽的生物合成是与温度及光周期相关的,并与前人发现美洲拟鲈血液中抗冻肽的含量是有季节变化的以及在同一季节中比较美洲拟鲈的北方与南方种群血液中抗冻肽含量的结果完全相符,这就提供了一个研究基因结构和基因调控与环境温度关系的良好课题。因此,引起了不少学者的注意。1980年, Lin, Y. 等人从美洲拟鲈冬季肝脏中提取并纯化了抗冻多肽的信息核糖核酸(mRNA),它可以在麦胚无细胞蛋白质合成系统中翻译出有抗冻能力的多肽类。他们还将这种 mRNA 在鸡胚成纤维细胞的逆转录酶作用下转录出它的互补脱氧核糖核酸(cDNA),并把这种 cDNA 和美洲拟鲈肝脏中提取的核酸进行杂交动力学分析,结果表明美洲拟鲈肝脏中大约有 1% 的总核酸是抗冻肽的 mRNA,然而从夏季美洲拟鲈肝中提取的 mRNA 与 cDNA 杂交时没有发现明显的杂交作用<sup>[17]</sup>。可见,控制抗冻肽生物合成的因素至少有一部分取决于抗冻肽 mRNA 的存在与否以及存在量的多少。1981年,他们又将抗冻肽 mRNA 的 cDNA 插入 PBR322 质粒后在大肠杆菌中进行克隆化扩增,然后,切下 cDNA 进行核苷酸序列分析,证明它所编码的多肽与从美洲拟鲈血液中提取的抗冻肽结构基本相同,并研究了这类多肽的二级结构<sup>[18]</sup>。抗冻肽类的发现可以说从理论上为“冰点学说”找到了证据。但是,我们目前对鱼类抗冻基因本身的遗传结构与调控机理还不甚了解。

## 同工酶的开关合成系统

自 1959 年 Markert 发现并命名“同工酶”以来,许多学者猜想,酶分子的多种形式可能与生物对环境温度的适应有关。因此,以研究动植物特别是鱼类在适应环境温度过程中同工酶表达为目的的论文日趋增多。例如,在硬头鲈肝脏的丙酮酸激酶<sup>[24]</sup>、柠檬酸合成酶<sup>[14]</sup>以及异柠檬酸脱氢酶中<sup>[20]</sup>;在溪鲈肠道的碱性磷酸酯酶<sup>[28]</sup>和肝脏的异柠檬酸脱氢酶中<sup>[19]</sup>;在鳊鱼组织的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶<sup>[15]</sup>中等都报导存在着由温度所诱导的特殊性同工酶产生。1965年, Hochachka 根据 6-磷酸葡萄糖脱氢酶存在着两种不同的分子形式的现象(电泳分离),通过克隆系的研究,证明这两种蛋白质编码在不同的位点上。他认为两种同工酶可能是循环控制的,一种类型在一种代谢系统中是适合的(比如说冷补偿);另一种类型则在另一代谢系统中是适合的。这种调控循环,说明特异性同工酶类型表达的特征是自然选择的结果。并提出从专一的或占优势的一种同工酶转换成其它的同工酶能够被激素诱导,甚至可能直接受环境因子例如温度的激活<sup>[12]</sup>。

另一类研究结果表明,鱼类种群中蛋白质多态性的表达可能是鱼类低温适应的遗传基础。例如, Place, A. R. 等(1978, 1979)和 Beneden, R. J. 等作者(1981)对大西洋北美洲沿岸底鲈(*Fundulus heteroclitus*)种群的八种多态性酶类基因频率的空间变异性(Spatial variation)研究以及对底鲈中纯化的乳酸脱氢酶-B(LDH-B)等位基因同工酶类的相对活性的比较研究结果说明这九种酶基因频率的空间(指纬度)变异性是显著的,并支持这类遗传变异性是由温度选择所决定的学说<sup>[4,6,23,23]</sup>。

此外,通过研究酶动力学发现,酶与底物的亲和性随着温度的变化而改变,并一般都在其栖息地点长期所适应的温度下接近最大值(即 Km 值最小)。Hochachka 认为:生物在对环境温度的进化适应中,酶与底物的亲和性是对自然选择比较敏感的一种生物学特性<sup>[13]</sup>。

上述研究结果完全证实了 Moon (1975)在其“同工酶功能和异质性的维持与温度适应关系”的综述中所阐明的观点:在面对温度条件变动的情况下,在变温动物机体内维持酶的异质性。他并提出了同工酶对温度适应的两种基本方式,一是单一同工酶的一些不同类型的“开关”合成方式,二是在一个复杂同工酶系统中一些专一性同工酶成员之间的相互改变<sup>[21]</sup>。我们也认为:在变温低等脊椎动物鱼类中出现在植物界已被证实的那种“温度变异是使同工酶系统复杂化的主要原因”的一般规律性是合理的。同时,还认为二倍体鱼类(包括那些古老的四倍体鱼而目前已基本二倍体化了种类,例如鲤、鲫鱼等)在对不同栖息温度进行进化性适应过程中以应用酶动力学的广谱性的适应方式为主也是符合自然选择的

客观要求的<sup>(1)</sup>。

## 代 谢 系 统

由上述研究证明,鱼类对环境温度的适应与机体内酶系统的功能活动有关。那么,根据“代谢反应一般为酶促反应”的原理,可以设想,相应的代谢系统也会受到影响。1960年,Brown在研究葡萄糖代谢时发现,在鲤鱼中,同时开放着两条代谢途径,他认为,适应性可能包含着葡萄糖降解代谢途径的转换<sup>(1)</sup>。Hochachka(1962)进一步证实,硬头鲮在冷适应期间,明显地增加了磷酸己糖支路的利用和较高速率的脂肪合成<sup>(11)</sup>。由此可以看到在更复杂的水平上有机体对于环境温度的适应性。

## 总 结

综上所述,鱼类对于环境温度的适应反应是非常复杂的。从神经系统的AchE活力变化到同工酶的多型性:从抗冻蛋白类的适时转录和翻译到代谢途径的转换等都发生着深刻的变化,而且广温性鱼类和定温性鱼类也各有所异。现在知道,生物对环境温度的反应具有以下特点,即温度提高或降低会加强一系列生物学过程的水平。在这种温度范围内便能开动有机体的基本生物学机能,显然,在这个范围内温度的起伏不能引起基因功能的改造。看来,只有随后适当加强因素的剂量,才能够诱导依赖温度的基因功能的改造,也就是关闭一个基因位点和打开另一个基因位点,或者在最大的温度允许范围内激活基因的最大量。由于发生或加强一种酶(同工酶)的合成和完全或局部停止另一种酶合成的缘故,在代谢中便发生有规律的转化。那么,它们将引起生物对温度反应的变化(导致生物对温度变化适应能力的提高)。因此,有人提出在植物中锻炼能保证对异常温度的最大抗性<sup>(12)</sup>。据理,我们认为采用低温(临界温度)适应的连续选育的途径,遗传改良某些亚热带鱼类优良品种抗寒能力差的性状是有可能的。在这里必须着重指出:在损伤性的低温条件下,显然毫无遗传改良的可能性。因为有机体的生化反应由可逆变化转变为不可逆变化会引起个别细胞、组织和整个机体的结构和功能完整性的丧失。

总之,近年来,经过众多研究者的共同奋斗,鱼类对环境温度适应的有关研究已经取得了相当多的成就。同时,在探讨鱼类适应环境温度的机理方面也取得了若干新进展。我们相信,对于这类问题,例如对某些热带或亚热带鱼类不耐寒的生化遗传学机理等的进一步阐明,将为鱼类的遗传改良与定向选育提供坚实的理论基础和有效的技术措施。

## 参 考 文 献

- [1] Ananthanarayanan, V. S. et al., 1977. Structural studies on the freezing-point-depressing protein of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 74(2): 685—689.
- [2] Baldwin, J. and Hochachka, P. W., 1970. Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatization—Acetylcholinesterase from Trout brain. *Bioch. J.*, 116: 883—887.
- [3] Baslow, M. H. and Nigrelli, R. F., 1964. The effect of thermal acclimation on brain cholinesterase activity of the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Zoologica* 49: 41—51.
- [4] Beneden, R. J. et al., 1981. Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus* III. Inheritance of isocitrate dehydrogenase (Idh-A and Idh-B), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6 Pgdh-A), and serum esterase (Est-S) polymorphisms. *Biochem. Genet.*, 19: 701—714.

(1) 同82页脚注(1)

(2) 同81页脚注(2)

- [ 5 ] Brown, W. D., 1960. Glucose metabolism in Carp. *J. Cellular Comp. Physiol.*, **55**: 81—85.
- [ 6 ] Cashon, R. E. et al., 1981. Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus* IV. Spatial variation in gene frequencies of Idh-A, Idh-B, 6-Pgdh-A, and Est-S. *Biochem. Genet.*, **19**: 715—728.
- [ 7 ] Devries, A. L., 1980. Biological antifreezes and survival in freezing environments. In: *animals and environmental fitness I*: 583—607. (Edited by R. Gilles). Pergamon Press Toronto.
- [ 8 ] Duman, J. G. et al., 1974. Freezing resistance in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Nature*, **247**(5438): 237—238.
- [ 9 ] Feeney, R. E. et al., 1978. Antifreeze proteins from fish bloods. *Adv. Protein Chem.*, **32**: 191—282.
- [ 10 ] Hew, C. L. et al., 1981. Antifreeze glycoproteins in the plasma of Newfoundland Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Zool.*, **59**(1): 2186—2192.
- [ 11 ] Hochachka, P. W. et al., 1962. The effect of temperature acclimation on pathways of glucose metabolism in the Trout. *Can. J. Zool.*, **40**: 261—270.
- [ 12 ] Hochachka, P. W., 1965. Organization of metabolism during temperature compensation. In: *Molecular mechanisms of temperature adaptation*, 177—203. (Edited by C. Ladd Prosser).
- [ 13 ] Hochachka, P. W., 1968. The adaptation of enzymes to temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, **27**: 659—668.
- [ 14 ] Hochachka, P. W. et al., 1970. Enzyme variants in thermal acclimation—Trout liver citrate synthases. *J. Biol. Chem.*, **245**: 6567—6573.
- [ 15 ] Hochachka, P. W. et al., 1973. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and thermal acclimation in the Mullet fish. *Marine Biol.*, **18**, 251—259.
- [ 16 ] Johnston, P. V. et al., 1964. Brain lipid fatty acids and temperature acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.*, **11**: 303—309.
- [ 17 ] Lin, Y. et al., 1980. Purification and characterization of winter flounder antifreeze peptide messenger ribonucleic acid. *Biochem.*, **19**(6): 1111—1116.
- [ 18 ] Lin, Y. et al., 1981. Molecular cloning and characterization of winter flounder antifreeze cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (USA) **78**(5): 2825—2829.
- [ 19 ] Moon, T. W. et al., 1971. Effect of thermal acclimation on multiple forms of the liver soluble NADP-linked isocitrate dehydrogenases in the family Salmonidae. *Comp. Biochem. Physiol.*, **40B**: 207—213.
- [ 20 ] Moon, T. W. et al., 1972. Temperature and enzyme activity in poikilotherms: Isocitrate dehydrogenases in Rainbow trout liver. *Biochem. J.*, **123**: 695—705.
- [ 21 ] Moon, T. W., 1975. Temperature adaptation: Isozymic function and the maintenance of heterogeneity. In: *isozyme II*, *Physiol. Funct.*, 207—220 (Edited by C. L. Markert Academic Press, New York)
- [ 22 ] Place, A. R. et al., 1978. Genetic bases for protein polymorphism in *Fundulus heteroclitus* I. Lactate dehydrogenase (Ldh-B), malate dehydrogenase (Mdh-A), glucosephosphate isomerase (Gpi-B), and phosphoglucumutase (Pgm-A). *Biochem. Genet.*, **16**: 577.
- [ 23 ] Place, A. R. et al., 1979. Genetic variation and relative catalytic efficiencies: Lactate dehydrogenase Allozymes of *Fundulus heteroclitus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **76**: 2354.
- [ 24 ] Somero, G. N. et al., 1968. The effect of temperature on the catalytic and regulatory functions of pyruvate kinases of the Rainbow trout and the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Biochem. J.*, **110**: 395—401.
- [ 25 ] Stanley, K. et al., 1970. Blood plasma proteins of cold adapted Antarctic fishes *Comp. Biochem. Physiol.*, **32**: 519—527.
- [ 26 ] Whitmore, D. H. et al., 1972. Trout intestinal alkaline phosphatases II. The effect of temperature upon enzymatic activity *in vitro* and *in vivo*. *J. Exptl. Zool.*, **182**: 59—68.