

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00262

南方鲇不同组织间线粒体代谢的比较研究

闫玉莲 谢小军

(西南大学生命科学学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 采用人工繁殖的同批南方鲇(*Silurus meridionalis* Chen)幼鱼为研究对象, 分别在 7.5、10、12.5、17.5、22.5、27.5、32.5、35 和 37.5℃条件下测定其心脏、肾脏、肝脏、脑和白肌的线粒体呼吸率、细胞色素 c 氧化酶(CCO)的活性, 以检测不同组织线粒体的含量及代谢特征的差异性。在 27.5℃下, 南方鲇心脏、肾脏、肝脏、脑和白肌线粒体状态 3 呼吸率分别为 69.94、30.98、32.36、18.89 和 7.34 nmol O₂/min·mg; CCO 活性分别为 676.54、327.46、294.34、153.23 和 65.73 nmol O₂/min·mg。统计检验表明, 状态 3 呼吸率和 CCO 活性均表现为: 心脏显著高于其他 4 种组织($P < 0.05$), 白肌则要显著低于其他 4 种组织($P < 0.05$), 肾脏和肝脏之间差异不显著, 但均显著高于脑($P < 0.05$)。试验测定了以上 5 种组织的柠檬酸合酶(CS)活性来表征组织中线粒体含量。在 27.5℃条件下 CS 的活性则分别是 17.93、7.20、8.42、6.12 和 1.35 U/mg, 心脏显著高于其他 4 种组织($P < 0.05$), 肝脏、肾脏和脑之间差异不显著, 但都显著高于白肌($P < 0.05$)。在 7.5℃—32.5℃范围内, 南方鲇的心脏、肝脏、肾脏、脑和白肌 5 种组织的线粒体状态 3 呼吸率和 CCO 活性均随着温度的升高而增加, 但在高温端, 心脏中这两种代谢指标开始出现随温度上升而下降的趋势。在低温端(7.5℃—10℃)和高温端(35℃—37.5℃), 各组织线粒体呼吸率 RCR 值多数小于 4, 在 37.5℃下的心脏和 7.5℃下的白肌的 RCR 值分别低至 1.76 和 1.85。研究结果提示, 南方鲇不同组织间线粒体含量可以由 CS 活性作为间接指标进行比较, 而各组织间线粒体含量及其代谢能力存在较大的差异。心脏表现出高含量、高代谢能力和低的耐受高温能力; 白肌为低含量、低代谢能力和低的耐受低温能力; 肝脏、肾脏和脑表现为中等含量、中等活性和较高的耐受极端温度能力。

关键词: 线粒体呼吸率; 线粒体含量; 细胞色素 c 氧化酶; 柠檬酸合酶; 南方鲇

中图分类号: Q591 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2011)02-0262-08

生物能量学是动物生理生态学研究的重要领域, 长期以来大量的研究工作主要以个体水平能量收支中各组间的定量关系为重点, 探讨能量分配模式在不同环境或生理条件下的变化及其适应意义^[1, 2]。近年来, 对产生这类适应的体内生理调节机制的实验研究逐渐成为探讨的热点^[3-6]。已有的研究表明, 细胞大部分的 ATP 需求是由线粒体中氧化磷酸化提供, 线粒体可及时调节氧化磷酸化的速率以适应机体对 ATP 需求的急性变化^[7]。除了急性调节氧化磷酸化, 当环境因子或生理状态发生持续性变化时, 机体还可以逐步改变组织的线粒体含量及线粒体自

身的组成, 对其代谢功能进行驯化调节, 以适应这类持续性的变化^[5, 7]。动物整体水平的代谢率是其体内各器官组织代谢耗能的整合效应^[8, 9]。由于体内不同器官组织具有其独特的功能, 在能量需求及代谢底物类型等方面存在差异, 当个体面临环境的变化或受到生理限制时, 各器官组织所承担的抗逆性压力不同, 因而其线粒体功能的适应性调节机制不同^[10, 11]。Rossignol, *et al.*发现, 当器官应对呼吸水平的适应性需求变化时, 在肌肉和心脏组织主要是通过线粒体中呼吸链的调控来实现, 而在肝、肾和脑组织中, 则主要是调控线粒体磷酸化系统^[12]。在

收稿日期: 2010-09-14; 修订日期: 2010-12-02

基金项目: 重庆市自然科学基金重点项目(编号: 2007BA7029)资助

作者简介: 闫玉莲(1983—), 女, 安徽砀山人; 博士研究生; 主要从事鱼类生理生态学研究。E-mail: yanyul@swu.edu.cn

通讯作者: 谢小军, E-mail: xjxie@swu.edu.cn

不同组织中, 线粒体不仅在细胞中的含量及分布不同, 其组分和结构亦存在差异^[3, 13], 线粒体中各类代谢酶的活性也可能不同, 这些差别是线粒体功能出现组织特异性的生理学基础^[6, 12, 14]。

南方鲇(*Silurus meridionalis* Chen)是中国特有的凶猛肉食性鱼类, 在水体生态系统中具最高营养水平的生态位和特殊的能量生态学对策^[2, 15, 16]。本研究测定了在不同温度下南方鲇心脏、肾脏、肝脏、脑和白肌等 5 种器官组织中线粒体的呼吸率以及线粒体代谢关键酶的活性, 比较研究了不同组织间线粒体代谢功能的差异及其对温度变化的适应性反应, 旨在为进一步探讨该种鱼生态适应过程中细胞水平的能量调控机理提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源与驯养

采用人工繁殖的同批南方鲇幼鱼[体重: (153.20 ± 1.66) g, 体长: (28.90 ± 2.71) cm], 实验前饲养于西南大学水产科学研究所的实验养殖系统内, 自然水温与光周期, 驯养期间, 以鲜活的泥鳅切成碎块作为饵料, 每两天投喂一次, 达饱足。实验开始前, 将实验鱼移入水族箱, 水温控制在 $(27.5 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$, 驯化 2 周。测定前实验鱼禁食 3d。

1.2 组织线粒体制备

肝脏、肾脏、脑和心脏线粒体的提取 将实验鱼处死后, 迅速摘取完整肝脏、肾脏、脑和心脏, 用滤纸浸干血液后称重。心脏和脑全取, 肝脏和肾脏取约 0.3 g, 剪碎, 加入 0.5 mL 提取液 A(250 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L TES, 1 mmol/L EDTA, 64 $\mu\text{mol/L}$ BSA, pH 7.4)匀浆, 转入 1.5 mL 离心管中, 用 1 mL 提取液 A 分 2 次冲洗入该离心管中; 13000 r/min 离心 10min, 弃上清液, 3700 r/min 离心 10min, 弃沉淀, 吸上清液于另一离心管, 11000 r/min 离心 10min, 弃上清液, 用 1.5 mL 提取液 B(250 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L TES, 1 mmol/L EGTA, 64 $\mu\text{mol/L}$ BSA, pH 7.4)悬浮, 再以 11000 r/min 离心 10min; 弃上清液, 按每克组织 1 mL 的比例用提取液 C(100 mmol/L KCl, 20 mmol/L TES, 1 mmol/L EGTA, pH 7.4)悬浮^[17]。以上操作均在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

白肌线粒体的提取 称取重约 1 g 肌肉组织放入 5 mL 离心管中, 加 2 mL 介质 A(100 mmol/L 蔗糖, 100 mmol/L KCl, 50 mmol/L Tris base,

5 mmol/L EGTA, 5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L ATP- Na_2 , 0.5% BSA, pH 7.4)洗涤, 洗涤后将样品放入另一个 5 mL 离心管中, 加入 5 mg 枯草杆菌蛋白酶, 剪碎, 用 2 mL 介质 A 悬浮, 冷浴消化 7min; 加入 500 μL 介质 A 匀浆 3 次, 每次匀浆 10 下, 倒入 5 mL 离心管中, 用 1.5 mL 介质 A 分 3 次冲洗(实际使用提取液 2 mL); 3800 r/min 离心 10min, 取上清, 12000 r/min 离心 10min, 取沉淀, 加 500 μL 介质 B(250 mmol/L 蔗糖, 20 mmol/L Tris base, 1 mmol/L EGTA, pH 7.4)悬浮, 转入 1.5 mL 离心管中, 再分别用 500 μL 介质 B 冲洗 2 次, 11000 r/min 离心 10min; 取沉淀, 用 150 μL 介质 B 悬浮待用^[18]。

1.3 组织线粒体呼吸率的测定

线粒体呼吸率(RCR)和呼吸控制率的测定均参照本实验室已采用的方法^[19]。测定温度为 7.5、10、12.5、17.5、22.5、27.5、32.5、35 和 37.5°C , 每个温度梯度的样本量为 10。

1.4 组织线粒体细胞色素 c 氧化酶(CCO)活性测定

采用液相氧电极(型号为 Oxytherm, 英国 Hansatech 公司生产)分别在 7.5、10、12.5、17.5、22.5、27.5、32.5、35 和 37.5°C 下测定。反应液总体积为 2 mL。先往反应室中加入 1.98 mL 缓冲液(7.5 mmol/L KH_2PO_4 , 3.75 mmol/L 抗坏血酸, 0.3 mmol/L 2HCl-四甲基对苯二胺, pH 7.4, 其中抗坏血酸为氧化底物), 待基线斜率稳定后, 用微量进样器将 10 μL 线粒体悬浮液和 10 μL 的 30 $\mu\text{mol/L}$ 细胞色素 c 加入反应室, 此后的耗氧率会明显上升, 测出稳定的最大耗氧率^[17]。

线粒体蛋白含量用福林酚法^[20]测定。采用单位线粒体蛋白重量的耗氧率($\text{nmol O}_2 / \text{min} \cdot \text{mg}$)表示线粒体呼吸率及 CCO 活性。

1.5 柠檬酸合酶(CS)活性的测定

处死实验鱼后, 迅速摘取完整肝脏、肾脏、脑和心脏, 用滤纸浸干血液后称重。以上 4 种组织和白肌分别各取约 0.2 g, 快速放在液氮中, 然后置于 -80°C 保存待测。

CS 活性采用试剂盒测定(上海杰美基因医药科技有限公司), 酶提取的具体方法和步骤参照试剂盒说明书。采用酶标(SPECTRA MAX190, Molecular devices), 在 27.5°C 测定 412 nm 波长下吸收峰值在 15min 内的变化, 来定量分析柠檬酸合成酶的活性。

CS 活性计算: $[(\text{样品读数} - \text{背景读数}) \times 25] / (\text{样品}$

稀释倍数) $\times 0.25(\text{mL, 体系容量})/[0.01(\text{样品容量, mL})\times 13.6(\text{毫摩尔吸光系数})\times 15(\text{反应时间, min})]/(\text{样品蛋白浓度, mg/mL}) = U/\text{mg}$; $U = \mu\text{L mol 柠檬酸}/\text{min}$ 。

1.6 数据处理方法

采用 Excel(2003)和 SPSS(11.5)软件进行数据的整理及统计分析, 以 $P < 0.05$ 作为数据均值差异达到显著性的标准。

2 结果

2.1 线粒体蛋白含量和 CS 活性

南方鲇心脏、肾脏、肝脏和脑的重量占体重的百分比(器官指数)分别为 0.07、0.42、0.88 和 0.37, 其线粒体蛋白含量分别为 2.50、4.93、9.2 和 9.13 mg/g, 白肌中的线粒体蛋白含量为 2.51 mg/g(表 1)。统计结果显示, 肝脏和脑的线粒体蛋白含量显著高于其他 3 种组织($P < 0.05$); 肾脏显著高于心脏和白肌($P < 0.05$); 肝脏和脑之间的差异不显著, 心脏和白肌之间的差异也不显著。

在 27.5°C 下测定心脏、肾脏、肝脏、脑和白肌 5 种组织中 CS 的活性分别是 17.93、7.20、8.42、6.12 和 $1.35 \text{ U}/\text{mg}$ (表 1), 心脏显著高于其他 4 种组织($P < 0.05$), 肝脏、肾脏和脑之间该值差异不显著, 但都显著高于白肌($P < 0.05$)。

2.2 不同组织中线粒体呼吸率

在 27.5°C 测定温度下, 南方鲇心脏、肾脏、肝脏、脑和白肌线粒体状态 3 呼吸率分别为 69.94、30.98、32.36、18.89 和 $7.34 \text{ nmol O}_2/\text{min} \cdot \text{mg}$ (表 1)。统计检验表明, 心脏显著高于其他 4 种组织($P < 0.05$), 白肌则要显著低于其他 4 种组织($P < 0.05$),

肾脏和肝脏之间状态 3 呼吸率差异不显著, 但均显著高于脑($P < 0.05$)。

在 27.5°C 下, 南方鲇心脏、肾脏、肝脏、脑和白肌线粒体状态 4 呼吸率分别为 14.32、5.27、5.42、2.76 和 $1.20 \text{ nmol O}_2/\text{min} \cdot \text{mg}$ (表 1)。统计结果显示, 心脏显著高于肝脏、肾脏、脑和白肌($P < 0.05$), 肝脏和肾脏差异不显著, 并且高于脑($P < 0.05$), 肌肉则显著低于其他 4 种组织($P < 0.05$)。在 27.5°C 下, 以上 5 种组织的呼吸控制率(RCR)分别为 4.93、5.94、6.57、6.99 和 6.15(表 1)。

2.3 不同组织中线粒体 CCO 活性

心脏、肾脏、肝脏、脑和白肌 5 种组织中线粒体 CCO 活性, 在 27.5°C 下测定的值分别为 676.54、327.46、294.34、153.23 和 $65.73 \text{ nmol O}_2/\text{min} \cdot \text{mg}$ (表 1)。心脏显著高于其他 4 种组织($P < 0.05$), 脑线粒体的 CCO 活性要低于肝脏和肾脏, 肝脏和肾脏差异不显著, 肌肉中 CCO 活性则显著低于其他 4 种组织($P < 0.05$)。

2.4 测定温度对不同组织线粒体呼吸率的影响

在实验设置温度范围内, 南方鲇的肝脏、肾脏、脑和白肌 4 种组织的线粒体状态 3 呼吸率均随着温度的升高而增加; 心脏线粒体状态 3 呼吸率在 32.5°C 时达到最高值, 在 35°C 时已略有下降, 在 37.5°C 时则明显下降, 其值已经低于 32.5°C 时的平均值(图 1)。5 种组织的状态 4 均随着温度的增加呈上升趋势(图 2)。

在 12.5°C — 32.5°C 温度范围内, 除了肌肉和心脏线粒体呼吸率 RCR 值在 12.5°C 条件下分别为 3.03 和 3.92, 低于 4, 位于该温度范围内的其他 RCR 值

表 1 南方鲇 5 种组织线粒体状态参数(平均值 $\pm$ 标准误, $n=10$)

Tab. 1 Performance parameters of mitochondria isolated from five tissues of *Silurus meridionalis* (Mean $\pm$ SE, $n=10$)

	心脏 Heart	肾脏 Kidney	肝脏 Liver	脑 Brain	白肌 White muscle
器官指数	0.07 $\pm$ 0.013	0.42 $\pm$ 0.010	0.88 $\pm$ 0.015	0.37 $\pm$ 0.026	—
Organ index (%)					
线粒体蛋白含量(mg / g)	2.5 $\pm$ 0.64 ^z	4.93 $\pm$ 0.87 ^y	9.2 $\pm$ 1.70 ^x	9.13 $\pm$ 2.86 ^x	2.51 $\pm$ 0.42 ^z
Mitochondrial protein content					
CS (U / mg)	17.93 $\pm$ 3.13 ^x	7.20 $\pm$ 0.97 ^y	8.42 $\pm$ 0.21 ^y	6.12 $\pm$ 0.47 ^y	1.35 $\pm$ 0.32 ^z
State 3(nmol O ₂ / min · mg)	69.94 $\pm$ 4.40 ^x	30.98 $\pm$ 2.84 ^y	32.36 $\pm$ 2.60 ^y	18.89 $\pm$ 1.31 ^z	7.34 $\pm$ 0.91 ^u
State 4(nmol O ₂ / min · mg)	14.32 $\pm$ 0.81 ^x	5.27 $\pm$ 0.45 ^y	5.42 $\pm$ 0.73 ^y	2.76 $\pm$ 0.22 ^z	1.20 $\pm$ 0.13 ^u
呼吸控制率(RCR)	4.93 $\pm$ 0.26	5.94 $\pm$ 0.30	6.57 $\pm$ 0.59	6.99 $\pm$ 0.33	6.15 $\pm$ 0.28
Respiration control ratio					
CCO(nmol O ₂ / min · mg)	676.54 $\pm$ 45.17 ^x	327.46 $\pm$ 19.98 ^y	294.34 $\pm$ 36.00 ^y	153.23 $\pm$ 11.60 ^z	65.73 $\pm$ 7.79 ^u
CCO					

注: x, y, z, u: 相同行中带不同上标字母的表示差异显著($P < 0.05$)

Note: x, y, z, u: different letter superscripts in each row indicate significant differences among temperature treatments ($P < 0.05$)

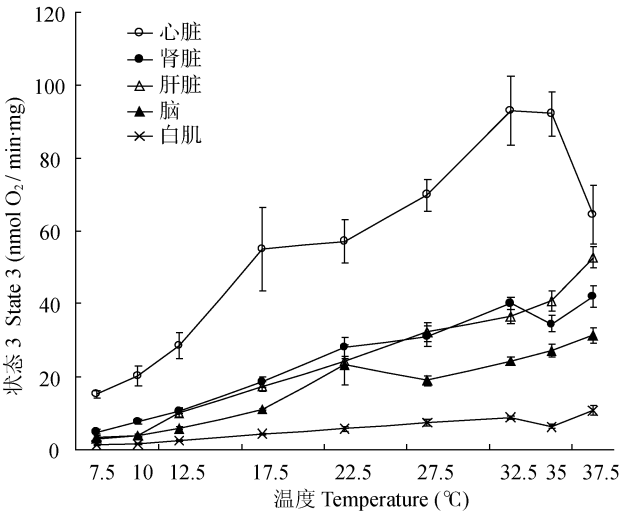


图 1 测定温度对南方鲇 5 种组织线粒体状态 3 呼吸率(nmol O₂ / min · mg)的影响
Fig. 1 Effects of assay temperature on state 3 respiration rates of mitochondria isolated from five tissues of *Silurus meridionalis*

均在 4 以上。但在低温端(7.5℃—10℃)和高温端(35℃—37.5℃), 各组织线粒体呼吸 RCR 值多数小于 4。在 37.5℃下的心脏和 7.5℃下的白肌, 其各自的 RCR 值仅分别为 1.76 和 1.85(表 2)。

2.5 测定温度对不同组织中线粒 CCO 的活性影响
在 7.5℃—32.5℃温度范围内, 肝脏、肾脏、脑、心脏和白肌线粒体的 CCO 活性均随温度的升高而呈增加的趋势, 但在 37.5℃条件下, 心脏、肾脏和脑线粒体的 CCO 活性要低于 35℃时的该值(图 3)。

3 讨论

3.1 不同组织中线粒体含量的差异

鱼类不同组织的线粒体含量在血液、脑、肝脏、肾脏、心脏、红肌和白肌等组织间变动可以超过 100

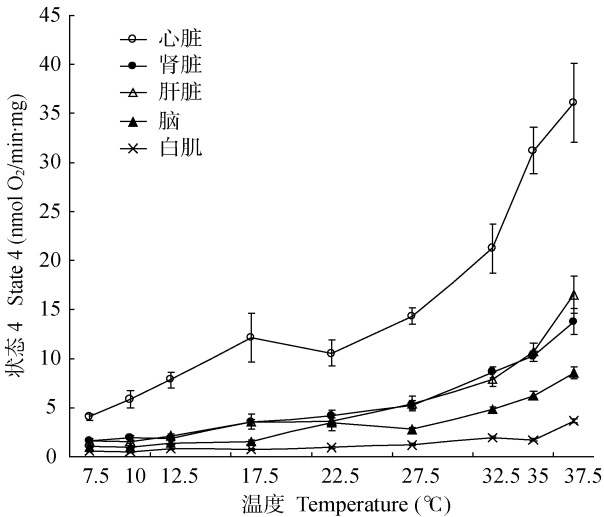


图 2 测定温度对南方鲇 5 种组织线粒体状态 4 呼吸率(nmol O₂ / min · mg)的影响
Fig. 2 Effects of assay temperature on state 4 respiration rates of mitochondria isolated from five tissues of *Silurus meridionalis*

倍^[7]。线粒体含量可采用生化方法测定各种线粒体酶活性(U / g)以及各种亚组分, 如细胞色素 a、b、c 或腺苷酸转移酶的含量, 也可采用亚显微观察方法测定的组织单位体积密度(cm² / cm³)或采用分子生物学方法测定的 mtDNA 拷贝数等多种指标来表征, 线粒体蛋白含量亦可用于表征组织的线粒体含量^[6, 21, 22]。

本研究测定了南方鲇 5 种组织的 CS 活性以及线粒体蛋白含量。在 27.5℃下测定的心脏、肝脏、肾脏、脑和白肌中 CS 活性值分别为 17.93、8.42、7.20、6.12、和 1.35 U / mg 蛋白(表 1), 心脏显著高于其他 4 种组织($P < 0.05$), 肝脏、肾脏和脑之间该值差异不显著, 但都显著高于白肌($P < 0.05$)。这 5 种组织中的线粒体蛋白含量分别为 2.5、4.93、9.2、9.13 和 2.51 mg / g 组织(表 1), 与不同组织间柠檬酸

表 2 测定温度对南方鲇各组织线粒体呼吸 RCR 值的影响(平均值±标准误, n=10)

Tab. 2 Effect of assay temperature on the value of RCR for mitochondrial respiration in different tissues of *Silurus meridionalis* (Mean ± SE, n=10)

温度 Temperature (°C)	肝脏 Liver	肾脏 Kidney	脑 Brain	心脏 Heart	白肌 White muscle
7.5	2.29±0.40	3.19±0.36	3.08±0.32	3.96±0.45	1.85±0.17
10	2.74±0.36	4.30±0.58	4.98±0.67	3.85±0.57	3.11±0.35
12.5	5.03±0.39	6.11±0.73	5.02±0.64	3.92±0.58	3.03±0.22
17.5	5.60±0.82	5.49±0.51	7.45±0.60	4.58±0.19	5.59±0.38
22.5	6.98±0.67	7.07±0.56	6.87±0.47	5.55±0.37	5.92±0.22
27.5	6.57±0.59	5.94±0.30	6.99±0.33	4.93±0.26	6.15±0.28
32.5	5.08±0.63	4.74±0.20	5.06±0.16	4.53±0.28	4.50±0.11
35	3.98±0.29	3.36±0.14	4.48±0.37	3.04±0.25	3.73±0.22
37.5	3.42±0.25	3.23±0.27	3.67±1.67	1.76±0.32	4.07±0.50

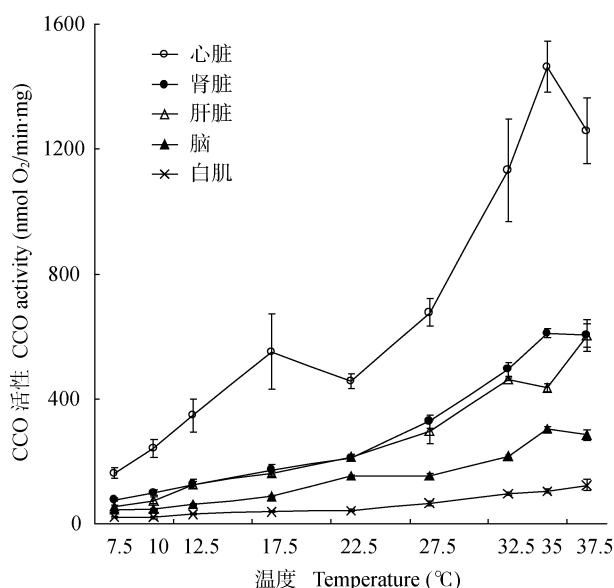


图3 测定温度对南方鲇5种组织中细胞色素c氧化酶(CCO)活性(nmol O₂/min·mg)的影响

Fig. 3 Effects of assay temperature on enzymatic activity of cytochrome c oxidase for five tissues from *Silurus meridionalis*

合酶的活性差异表现不一致的变化趋势。为此,我们分析了该种现象出现的可能原因,一方面,由于白肌组织线粒体采用了与其他4种组织不同的提取方法;另一方面,虽然其他4种组织采用了相同的提取方法,但对不同组织中的线粒体的提取效率亦会存在差异;而测定CS活性时,对5种组织的采样、处理及酶活力定量的方法均相同,所得的数据应当有较高的可比性。已有的研究也发现,柠檬酸合酶(CS)的活性与组织内线粒体含量之间有较高的相关性,在相关研究中通常被选作表征线粒体含量的指标^[6, 7, 21, 23]。因此在本研究中我们采用组织的CS活性而不是线粒体蛋白含量作为比较组织间线粒体含量差异的指标。Leary, *et al.*在25°C条件下测得虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的心脏、肾脏、脑、肝脏和白肌的CS活性分别为31.79、13.35、8.85、3.14和3.67 U/mg^[7],其中除脑的值相对稍低而白肌的值相对稍高外,与本实验结果反映的组织差异趋势一致。

3.2 不同组织中线粒体代谢能力差异

动物体内不同组织间线粒体的代谢水平差异很大,而表征线粒体代谢水平的主要指标通常有状态3呼吸率和CCO活性。状态3呼吸率为线粒体呼吸链综合功能的体现^[6],线粒体酶水平对氧化产生ATP能力具有重要的决定作用^[14],CCO为线粒体呼

吸链中最后一步耗氧过程的关键酶,常被用来作为细胞有氧能力的近似值^[24]。本研究结果显示,同样在27.5°C条件下,心脏线粒体状态3呼吸率显著高于其他4种组织($P < 0.05$),白肌线粒体状态3呼吸率则要显著低于其他4种组织($P < 0.05$),肝脏和肾脏线粒体的该指标差异不显著,但要显著高于脑($P < 0.05$)(表1)。而该种鱼线粒体CCO活性在各组织间的差异表现出与状态3相似的趋势,心脏显著高于肝脏、肾脏、脑和白肌($P < 0.05$),肝脏和肾脏差异不显著,并且高于脑,白肌则显著低于其他4种组织($P < 0.05$)(表1)。这表明南方鲇心脏线粒体在5种组织中代谢能力最强,其次为肾脏、肝脏和脑,白肌线粒体代谢能力最低。Fangue, *et al.*发现鳊鱼(*Fundulus heteroclitus macrolepidotus*)肝脏线粒体CCO活性约为白肌中该种酶活性的5—6倍^[25],与本研究结果相似。但Benard, *et al.*对大鼠的不同组织线粒体代谢率的研究结果显示,心脏线粒体的状态3呼吸率最高,其次为脑,肾脏和肝脏最低^[6],与本实验结果所反映的组织差异趋势并不完全一致。以上提示不同组织间线粒体代谢强度的差异可能存在种间特异性。

不同组织细胞中的线粒体代谢能力都与其细胞生理功能相适应^[3]。心脏是血液循环器官,心肌线粒体中的氧化磷酸化是其主要的能量来源^[23]。南方鲇心脏组织较高线粒体含量和较强线粒体功能使其对能量需求状态有快速高效的反馈机制,以满足其持续的高耗能运转。肝脏为生物合成组织,其线粒体主要是为合成代谢提供能量和碳-中间代谢物^[7];肾脏则除了主要承担动物体的泌尿功能外,在调节鱼体内渗透压,维持内环境的稳定方面也具有重要的作用^[26]。相对较高的线粒体含量和代谢能力使两种组织可持续地处在“做功”状态^[23]。脑是以有氧代谢为主,耗氧量大,代谢率高,但其氧和ATP贮备少^[27],南方鲇脑功能的正常运行亦需要相对较多的、活性较强的线粒体来维持。鱼类的骨骼肌可以分为白肌和红肌,南方鲇肌肉构成主要为白肌,其红肌很少并难于取材,因此本研究只测定了白肌的线粒体的代谢指标。白肌在静止或者运动恢复期才依赖于线粒体代谢^[28],白肌中每单位体积含有2%—4%的线粒体^[29],而红肌中的线粒体体积密度为白肌的10倍左右^[14, 21]。已有研究发现,鱼类红肌的体积密度与心脏相似,代谢能力相近^[4, 21],南方鲇心脏CS活

性、状态 3 和状态 4 呼吸率, 以及 CCO 活性均分别是其白肌相应指标的 10 倍左右, 与以往研究发现的规律相符^[4, 14, 21]。

3.3 温度对各组织线粒体代谢的影响

已有研究发现南极鱼(*Notothenia neglecta*)肝脏线粒体呼吸率随测定温度升高而增大, 呈明显的正相关趋势, 而温度对心肌与脑组织线粒体呼吸率的影响却呈现与此不一致的变化模式^[8]。在本研究中, 南方鲇 4 种组织的线粒体状态 3 呼吸率在实验设置温度范围内均随着温度的升高而增加(图 1), 只有心脏线粒体状态 3 呼吸率在 37.5℃ 下测得值要显著低于 32.5℃ 和 35℃, 该温度下的心脏 CCO 的活性也要低于 35℃ 时的值(图 3)。RCR 值是反映线粒体功能状态的一个灵敏指标, RCR 值的大小反映线粒体氧化磷酸化的偶联程度。当 RCR 值大于 4 时, 可以认为线粒体的结构相对完整而且功能正常^[30]。南方鲇在 37.5℃ 下的心脏线粒体呼吸 RCR 值仅为 1.76, 这提示, 37.5℃ 已经超出了南方鲇心脏线粒体代谢的耐受上限温度, 可能造成其偶联性丧失, 并进一步损害心脏的正常代谢功能。在 7.5℃ 下, 白肌线粒体呼吸 RCR 值为 1.85(表 2), 提示南方鲇白肌线粒体对低温耐受力低于其他组织。南方鲇经历的自然环境温度大约在 10℃—30℃ 之间, 在此温度范围内, 除了肌肉和心脏线粒体的呼吸 RCR 值在 12.5℃ 条件下低于 4 外, 其他 3 种组织的 RCR 值均在 4 以上。

综上所述, 本研究结果提示, 南方鲇不同组织间线粒体含量, 代谢能力存在较大的差异。心脏表现出高含量、高代谢能力和低的耐受高温能力; 白肌为低含量、低代谢能力和低的耐受低温能力; 肝脏、肾脏和脑表现为中等含量、中等活性和较高的耐受极端温度能力。

参考文献:

- [1] Jobling M A. Review of the physiological and nutritional energetics of cod, *Gadus morhua* L, with particular reference to growth under farmed conditions [J]. *Aquaculture*, 1988, **70**: 1—19
- [2] Xie X J, Sun R Y. The pattern of energy allocation in the southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) [J]. *Journal of Fish Biology*, 1993, **42**: 197—207
- [3] Mootha V K, Bunkenborg J, Olsen J V, et al. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria [J]. *Cell*, 2003, **115**: 629—640
- [4] Moyes C D, Hood D A. Origins and consequences of mitochondrial variation [J]. *Annual Review of Physiology*, 2003, **65**: 177—201
- [5] Guderley H. Metabolic responses to low temperature in fish muscle [J]. *Biological Reviews*, 2004, **79**: 409—427
- [6] Benard G B, Faustin E, Passerieux A, et al. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2006, **291**: C1172—C1182
- [7] Leary S C, Battersby B J, Moyes C D. Inter-tissue differences in mitochondrial enzyme activity, RNA and DNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1998, **201**: 3377—3384
- [8] Sugizaki M, Lucchiari P H, Malucelli M I C, et al. Respiration and oxidative phosphorylation of mitochondria from tissues and organs of Antarctic fish [J]. *Proceedings of the NIPR Symposium on Polar Biology*, 1997, **10**: 145—152
- [9] Barger J L, Brand M D, Barnes B M, et al. Tissue-specific depression of mitochondrial proton leak and substrate oxidation in hibernating arctic ground squirrels [J]. *American Journal of Physiology*, 2003, **284**: R1306—R1313
- [10] Leverve X M, Fontaine E. Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ [J]. *IUBMB Life*, 2001, **52**: 221—229
- [11] Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways [J]. *Science*, 2001, **292**: 504—507
- [12] Rossignol R, Malgat M, Mazat J P, et al. Threshold effect and tissue specificity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**: 33426—33432
- [13] Forner F, Foster L J, Campanaro S, et al. Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart and liver [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, **5**: 608—619
- [14] Battersby B J, Moyes C D. Influence of acclimation temperature on mitochondrial DNA, RNA, and enzymes in skeletal muscle [J]. *American Journal of Physiology*, 1998, **275**: R905—R912
- [15] Xie X J, Sun R Y. The daily total metabolism and specific dynamic action in the southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, **16**(3): 200—207 [谢小军, 孙儒泳. 南方鲇的日总代谢和特殊动力作用的能量消耗. 水生生物学报, 1992, **16**(3): 200—207]
- [16] Luo Y P, Xie X J. Effects of temperature on the specific dynamic action of the southern catfish, *Silurus meridionalis* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 2008, **149**: 150—156
- [17] Zhao Z J, Wang D H. Short photoperiod enhances thermogenic capacity in Brandt's voles [J]. *Physiology & Behavior*, 2005, **85**: 143—149
- [18] Cogswell A M, Stevens R J, Hood D A. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and in-

- termyofibrillar regions [J]. *American Journal Physiology-Cell Physiology*, 1993, **264**: C383—C389
- [19] Yan Y L, Xie X J, Yuan L Q. Effects of temperature on oxygen consumption rate in metabolism of mitochondria isolated from liver of the Southern Catfish, *Silurus meridionalis* Chen [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(2): 237—243 [闫玉莲, 谢小军, 袁伦强. 温度对南方鲇肝组织离体线粒体代谢耗氧率的影响. 水生生物学报, 2008, **32**(2): 237—243]
- [20] Lowry O H, Rosbrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagents [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, **193**: 265—275
- [21] Moyes C D, Battersby B J, Leary S C. Regulation of muscle mitochondrial design [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1998, **201**: 299—307
- [22] Hulbert A J, Turner N, Hinde J, *et al.* How might you compare mitochondria from different tissues and different species [J]? *Journal of Comparative Physiology-Part B*, 2006, **176**(2): 93—105
- [23] Moyes C D. Cardiac metabolism in high performance species [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 1995, **113**: 69—75
- [24] Kadenbach B, Hüttemann M, Arnold S, *et al.* Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, **29**: 211—221
- [25] Fangue N A, Richards J G, Schulte P M. Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance [J]? *Journal of Experimental Biology*, 2009, **212**: 514—522
- [26] Lin H R. Fish Physiology [M]. Guangzhou: Higher Education Press. 1999, 1—20 [林浩然. 鱼类生理学. 广州: 高等教育出版社. 1999, 1—20]
- [27] Mink J W, Blumenschine R J, Adams D B. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 1981, **241**: R203—R212
- [28] Moyes C D, West T G. Exercise metabolism of fish. In: P W Hochachka and T P Mommsen (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* [M]. New York: Elsevier Press. 1995, 367—392
- [29] Johnston I A, Calvo J, Guderley H, *et al.* Latitudinal variation in the abundance of oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1997, **201**: 1—12
- [30] Guderley H, St-Pierre J, Couture P, *et al.* Plasticity of the properties of mitochondria from rainbow trout red muscle with seasonal acclimatization [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, **16**: 531—541

COMPARATIVE STUDIES ON METABOLISM OF MITOCHONDRIA ISOLATED FROM VARIOUS TISSUES OF SOUTHERN CATFISH, *SILURUS MERIDIONALIS* CHEN

YAN Yu-Lian and XIE Xiao-Jun

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education), School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract: To investigate diversity of mitochondrial contents and metabolic features in various tissues, the respiration rates of mitochondria and activities of cytochrome *c* oxidase (CCO) in heart, kidney, liver, brain and white muscle of southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) were measured at temperatures of 7.5, 10, 12.5, 17.5, 22.5, 27.5, 32.5, 35, and 37.5°C, respectively. At 27.5°C, state 3 rates were 69.94 in heart, 30.98 in kidney, 32.36 in liver, 18.89 in brain, and 7.34 nmol O₂ / min · mg in white muscle, respectively. And activities of CCO were 676.54 nmol O₂ / min · mg in heart, compared with 327.46 in kidney, 294.34 in liver, 153.23 in brain, and 65.73 in white muscle. Statistical analysis indicated that either state 3 rates or activities of CCO showed the similar comparative trends among the five tissues. Either of the two values were significantly higher in heart than those in the other four tissues ($P < 0.05$), and significantly lower in white muscle than those in the others ($P < 0.05$). The two values in brain were significantly lower than those in kidney and liver, but there was no significant difference between kidney and liver. The global mitochondrial contents were evaluated by the activity of citrate synthase (CS) in various tissues in the present study. At 27.5°C, the values were 17.93 in heart, 7.20 in kidney, 8.42 in liver, 6.12 in brain, and 1.35 U / mg in white muscle, respectively. Heart presented the significantly highest value compared with the other four tissues, and white muscle presented the significantly lowest value ($P < 0.05$). There was no significant difference for activities of CS among kidney, liver and brain. From 7.5 to 32.5°C, either state 3 rates or activities of CCO increased respectively with increasing temperature in all of the five tissues. But both indexes in heart began to decline dramatically from 32.5°C to 37.5°C. Values of the respiratory control ratio (RCR) almost were less than 4 at low (7.5°C—10°C) and high (35°C—37.5°C) temperature rang. RCR for white muscle at 7.5°C and for heart at 37.5°C presented very low values of 1.85 and 1.86, respectively. Based on the present results, it could be suggested that activity of CS could be used as an indirect index to compare mitochondrial content among various tissues in the southern catfish. And the mitochondrial content and metabolic capacity were significantly variable among different tissues. Heart presents with the higher mitochondrial content, higher metabolic capacity, and lower tolerable capacity against the extremely high temperatures. White muscle showed the lower mitochondrial content, lower metabolic capacity, and lower tolerable capacity against the extremely low temperature. Kidney, liver and brain characterized by middle mitochondrial content, middle metabolic capacity of mitochondria and a higher tolerable capacity against the either extremely low or high temperatures.

Key words: Respiration rates of mitochondria; Mitochondrial content; Cytochrome *c* oxidase (CCO); Citrate synthase (CS); *Silurus meridionalis* Chen