

# 几种鱼类线粒体 ATP 酶活性的比较研究

汪亚平 王祖熊

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

## 提 要

本文比较了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)和鲢鱼(*Cirrhinus molitorella*)常在、低温驯养时, 肝细胞线粒体 ATP 酶活性, 并采用吐温 80 处理线粒体, 观察其对线粒体 ATP 酶活化能 Arrhenius 图折点温度的影响, 讨论了线粒体 ATP 酶活性与鱼类低温适应能力的相关性。认为鱼类线粒体 ATP 酶活化能折点温度在常、低温驯养时的差异程度和鱼的抗寒性能有关; 低温驯养时, 线粒体 ATP 酶活化能折点温度的高低和鱼的低温耐受能力有关。

**关键词** 线粒体 ATP 酶, 折点温度, 吐温 80, 活化能

鱼类对温度的适应性, 特别是对低温适应的系统研究是在 70 年代开始的。主要涉及神经系统的调节、调控蛋白类的温度适应调节, 膜流动性调节以及能量代谢调节等四方面<sup>[1]</sup>。由于能量代谢调节在鱼类温度适应机制中起着显著的作用<sup>[2]</sup>, 一些与能量代谢有关的酶受到重视。膜的流动性调节也有了深入的研究。线粒体作为细胞能量代谢中心, 结合在线粒体内膜上的 ATP 酶在细胞能量代谢中起着重要作用; 而且线粒体对环境因素的作用比较敏感, 很多环境因素的影响都能迅速引起线粒体发生变化<sup>[3]</sup>。以线粒体为材料, 研究鱼类的耐寒机制显然有其重要意义。本文对三种鱼的线粒体 ATP 酶活性进行比较研究, 在能量代谢和膜流动性协同调节机制方面作了一些尝试。

## 材料和方法

试验鱼为长江野生草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)(1 龄)、内蒙岱海瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)(3 龄)和广东省顺德水产良种二场提供的鲢鱼(*Cirrhinus molitorella*)(3 龄)。

草鱼和瓦氏雅罗鱼分别在 4—5℃ 和 20—22℃ 水温的室内水族箱中驯养两周; 鲢鱼在 8—10℃ 和 20—22℃ 水温的水族箱中亦驯养两周。

取每个试验组鱼的肝脏制备线粒体<sup>[4]</sup>。酶活力测定, 取线粒体制剂 0.5ml (含蛋白量为 0.09—0.24mg/ml), 反应液(125mmol/L 氯化钾、3.75mmol/L 氯化镁、125mmol/L 氯化钠、32.5mmol/L Tris, pH7.4)0.4ml, ATP 溶液 0.1ml。最终反应浓度为: 氯化钾 50mmol/L、氯化镁 1.5mmol/L、氯化钠 50mmol/L、Tris 33mmol/L、ATP 0.5mmol/L。反

应 30min, 用 0.2ml 冰冷的 20% 三氯醋酸终止反应。酶反应在 4—30℃ 范围内, 6 个恒温水浴中进行。酶活力用 ATP 酶降解 ATP 生成无机磷的速度来表示, 并绘制 Arrhenius 图。无机磷的测定用钼蓝法<sup>[5]</sup>, 酶蛋白用 Folin-Phenol 试剂测定<sup>[6]</sup>。

添加吐温的线粒体 ATP 酶活力测定是采用 10m mol/L 吐温的 SET 液悬浮线粒体, 测定方法同前。为进一步观察吐温是否与线粒体膜结合, 进行了去除悬浮液中吐温的试验, 将含 10m mol/L 吐温 80 的 SET 液悬浮线粒体, 于 10℃ 下保温 30min, 经  $15.000 \times g$  离心 10min, 弃上清液, 用 SET 液再洗涤离心一次, 取沉淀用 SET 液悬浮。ATP 酶活力测定如前述。

## 结 果

### 1. 三种鱼在不同温度驯养后线粒体 ATP 酶活力对温度的响应

在 4—30℃ 范围内, 三种鱼线粒体 ATP 酶活化能都出现一个折点。低温驯养的草鱼线粒体 ATP 酶活化能在 12.5℃ 处有一折点, 折点两侧活化能分别为 6.76Kcal/mol、9.32Kcal/mol, 且与温度成线性关系; 常温组草鱼酶活化能在 15.5℃ 处有一折点, 折点两侧活化能分别为 6.17Kcal/mol、18.04Kcal/mol (图 1, a, b)。

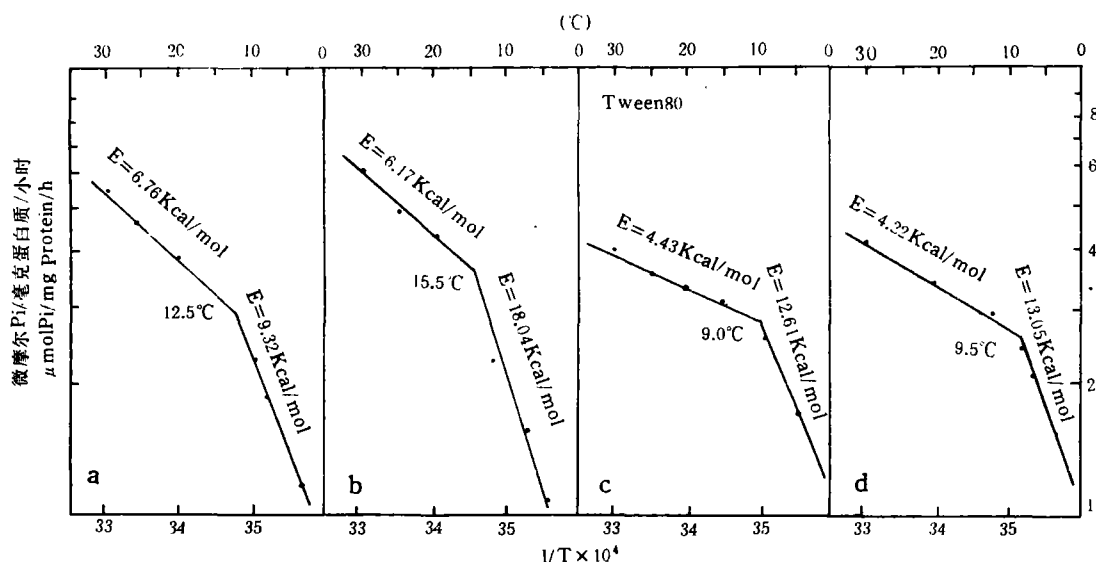


图 1 草鱼 ATPase 活化能对温度响应

Fig. 1 Effect of temperature on the activation energy for the ATP ase in *Ctenopharyngodon idella*

a. 低温组 ATPase 活化能 b. 常温组 ATPase 活化能; c. Tween-80 处理后 ATPase 活化能;

d. 洗涤后的 ATPase 活化能

a. Low temperature group; b. high temperature group; c. activation energy after treatment with Tween-80;

d. activation energy after washing

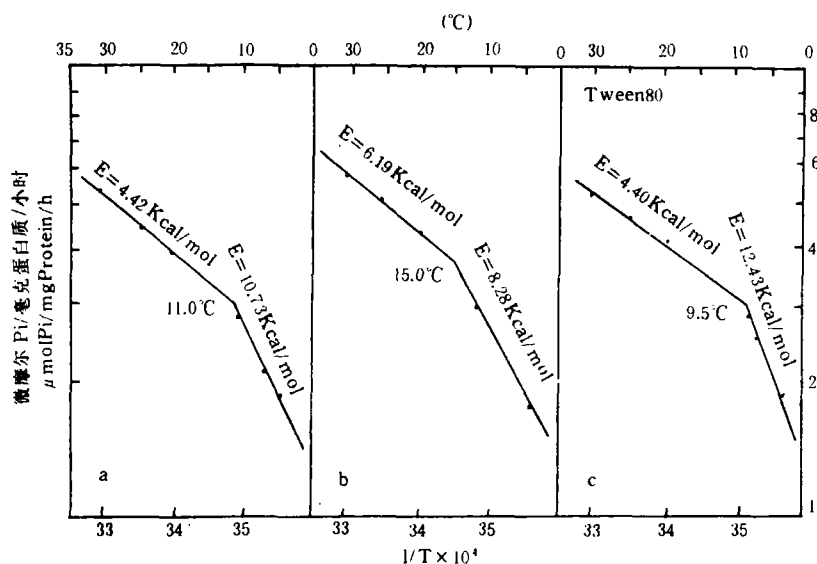


图2 瓦氏雅罗鱼ATP酶活化能对温度的响应

Fig. 2 Effect of temperature on the activation energy for the ATPase in *Leuciscus waleckii*

a. 低温组ATPase活化能; b. 常温组ATPase活化能; c. Tween-80处理后ATPase活化能  
a. Low temperature group; b. high temperature group; c. activation energy after treatment with Tween-80

瓦氏雅罗鱼低温组ATP酶活化能在11°C处有一折点,折点两侧活化能分别是4.42Kcal/mol、10.73Kcal/mol。常温组ATP酶活化能在15°C处有一折点,折点两侧活化能分别为6.19Kcal/mol、8.28Kcal/mol(图2,a,b)。

鲢鱼低温组线粒体ATP酶活化能在20°C处有一折点,折点两侧活化能分别是3.63Kcal/mol、16.92Kcal/mol。常温组ATP酶活化能在20.5°C处有一折点,折点两侧活化能分别为2.08Kcal/mol、16.38Kcal/mol(图3,a,b)。

## 2. 不同浓度的吐温80对线粒体ATP酶活力的影响

吐温是一种膜脂去垢剂,当它达到一定浓度,膜上类脂被解离致使膜的结构破损。从试验看到(图4)吐温浓度在5—10mmol/L时,酶活力高而稳定,20mmol/L及更高浓度时酶活力急剧下降,说明20mmol/L浓度以上都会造成线粒体膜的破损。

## 3. 吐温80对线粒体ATP酶活力的影响

三种常温组鱼线粒体ATP酶反应液中添加吐温80处理后,酶活化能折点温度比对照组都有了明显降低。草鱼由15.5°C降至9°C(图1,b,c);雅罗鱼由15°C降至9.5°C(图2,b,c);鲢鱼由20.5°C降至15.5°C(图3,b,c)。在不破坏膜结构的浓度下,吐温80明显有降低ATP酶活化能折点温度的作用。

## 4. 吐温处理后的清洗试验

为了鉴定吐温80是否与线粒体膜作用,做清洗对照试验,如图1(c)、(d)。(c)是处理后没有清洗时的状况,(d)是清洗了的状况。试验结果表明,清洗与否,酶活化能折点温度

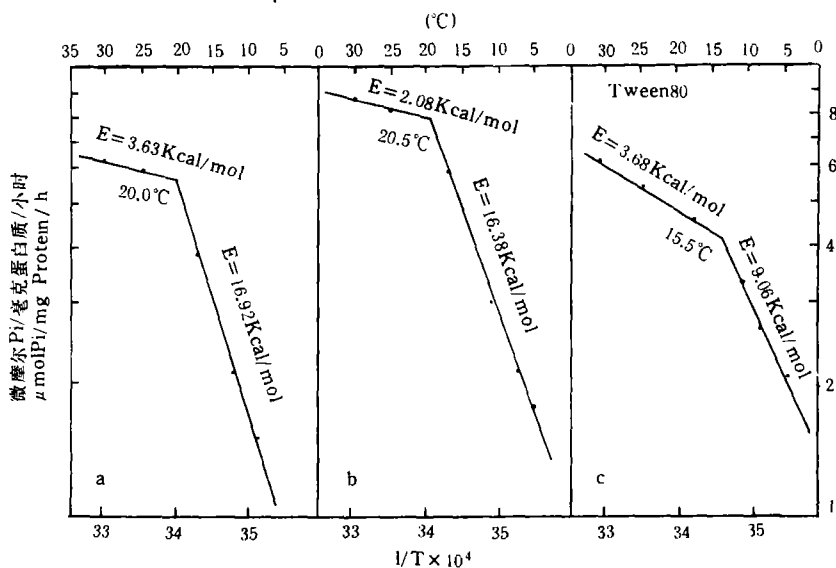


图3 鲮鱼 ATP 酶活化能对温度的响应

Fig. 3 Effect of temperature on the activation energy for the ATPase in *Cirrhinus molitorella*

a. 低温组 ATPase 活化能; b. 常温组 ATPase 活化能; c. Tween-80 处理后 ATPase 活化能

a. Low temperature group; b. high temperature group; c. activation energy after treatment with

Tween-80

及折点两侧的活化能都没有明显的差异,说明吐温 80 与线粒体膜以某种方式结合着,故清洗无效。

## 讨 论

草鱼、瓦氏雅罗鱼和鲮鱼在环境温度适应方面有典型的代表性。草鱼是广温性鱼类,瓦氏雅罗鱼是喜冷性鱼类,在极低的温度下仍能生存,甚至有“顶着冰凌产卵”的习性<sup>[7]</sup>,鲮鱼则是喜温性鱼类,水温在 7℃ 以下便开始死亡,对低温的耐受性很差<sup>[8]</sup>。从试验的结果看到,低温适应能力不同的鱼类,线粒体 ATP 酶活化能 Arrhenius 图折点温度存在差异,尤其在低温环境中,这种差异较明显。在折点两侧,ATP 酶活化能有明显变化,折点温度以下,ATP 酶活化能明显升高。草鱼、雅罗鱼 ATP 酶活化能的折点温度较低,这使它们在环境温度下降时,在更广的温度范围和更长的时间内维持酶的低活化能状态,从而提高对低温的耐受能力。鲮鱼 ATP 酶活化能折点温度比草鱼和雅罗鱼的高得多,因而,随着环境温度的降低,它过早地受到酶活化能升高的威胁。这一变化可能导致鲮鱼体内生化代谢的障碍,对于它在低温环境中的适应是不利的。由此看来,线粒体 ATP 酶活化能 Arrhenius 图折点温度的高低和鱼类耐寒能力相关。

至于酶活化能 Arrhenius 图折点温度的涵义,有人认为这可能反映膜脂的相变温度,有的则不同意这种看法。但一般认为这至少反映膜脂分子排列有序性有一定的改变<sup>[4,9]</sup>。随着环境温度的下降,膜的流动性降低,膜的这种低温“趋粘性”影响着膜结合蛋白低温环境中的正常

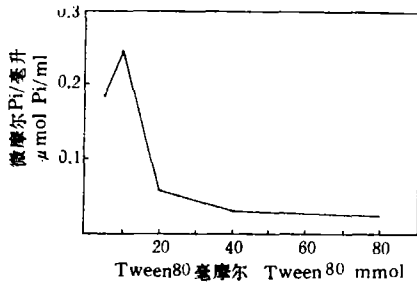


图 4 不同浓度的 Tween-80  
对 ATPase 活力的影响

Fig. 4 Effect of Tween-80 in different  
concentrations on the activation energy for the  
ATPase

构象的维持,而使膜活力下降<sup>[10]</sup>。针对低温环境,增加膜的流动性,可以补偿温度下降对酶活力的影响<sup>[11]</sup>。草鱼、雅罗鱼等低温适应性鱼类,在低温环境中 ATP 酶活化能折点温度的明显变化表明这一调节机制的真实存在,并行使功能。不耐寒的鲢鱼没有这一调节机制的表现,或者是这一调节机制的功能极其微弱,这可能是鲢鱼低温不适应的原因之一。膜结构调节机制的存在并行行使功能与否,对于鱼类的低温适应是很重要的。

在低温环境中,膜脂分子与水分子疏水作用的增强,熵值降低导致膜流动性的下降,进而影响膜结合酶正常构象的维持。如何克服低温状态下膜流动性的下降,实际上就是鱼类低温适应的膜结构调节机制问题。有研究表明,不饱和脂肪酸在膜脂中含量的增加能提高膜的流动性<sup>[12,13]</sup>。本文吐温 80 添加试验结果表

明,处理过的线粒体 ATP 酶活化能 Arrhenius 图折点温度都比对照有明显的降低,这种变化和草鱼及雅罗鱼在低温驯养时的变化相似。吐温 80 是一种含油酸的化合物,油酸分子含有一个不饱和的烯键。吐温处理后的洗涤实验表明,吐温分子已和线粒体膜发生某种结合。由此推测,鱼类低温适应的膜调节机制可能是,在低温环境的刺激下,鱼类以某种方式,如细胞内脂肪酸去饱和酶活性提高,增加膜中不饱和脂肪酸的含量,从而提高膜流动性保持膜结合酶活力的正常表现,以适应低温环境中的生存。另外,鱼类膜脂组成的变化和摄入的脂肪酸有关<sup>[14,15]</sup>。在不耐寒品种的养殖中,冬季停止摄食前投放富含不饱和脂肪酸的饵料是提高耐寒能力的有效辅助途径。

## 参 考 文 献

- [1] Johnston I A. Calcium regulatory protein and temperature acclimation of actomyosin ATPase from a eurythermal teleost (*Carassius*). *J. Comp. physiol.* 1979, **129**:163-167.
- [2] Hazel J R. Prosser C L. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.* 1974, **54**:620-670.
- [3] 杨福愉等. 电离辐射对线粒体结构与功能的影响. 实验生物学报, 1964, **9**:261-272.
- [4] 杨福愉等. 低温对耐寒与不耐寒玉米线粒体膜的影响. 生物化学与生物物理学报, 1982, **13**:245-259.
- [5] Ames B N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase. *Methods in Enzymol.* 8:115, Neufeld, E., F. and Ginburg, V. (eds.), Academic Press, New York 1966.
- [6] Lowry O H. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**:265-273.
- [7] 解玉洁等. 达里湖瓦氏雅罗鱼的生物学. 动物学研究, 1982, **3**:235-244.
- [8] 王祖熊等. 鲢鱼遗传改良的研究. I. 杂交育种和遗传性状分析. 水生生物学集刊, 1983, **8**(2):195-206.
- [9] Chapelle S. The influence of acclimation temperature on the fatty acids composition of an aquatic crustacean (*Carcinus maenas*). *J. Exp. Zool.*, 1978, **24**:337-346.
- [10] Kimmelberg H K. Papahadjopoulos D. Phospholipid requirements for Na, K ATPase activity; Head-group specificity and fatty acid fluidity. *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, **182**:277-297.
- [11] Wodtke E. Discontinuities in the arrhenius plots of mitochondrial membranebound enzyme systems from a

- poikilotherm; Acclimation temperature of carp affects transition temperature. *J. Comp. Physiol.*, 1976, **110**: 145—157.
- [12] Christiansen J A. Changes in phospholipid classes and fatty acids desaturation and incorporation into phospholipids during temperature acclimation of green sunfish (*Lepomis cyanellus* R.). *Physiol. Zool.*, 1984, **57**(4): 481—492.
- [13] Wodtke E. Lipid adaptation in liver mitochondria membranes of carp acclimated to different environmental temperatures. *Biochem. Biophys. Acta*, 1978, **529**: 280—291.
- [14] Owen J M. Studies on the nutrition of marine flatfish; the effect of dietary acids on the tissue fatty acids of plaice (*Pleuronectes platessa*). *Marine Biol.*, 1972, **13**: 160—165.
- [15] Roots B I. Phospholipids of goldfish (*Carassius auratus* L.) brain; the influence of environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1968, **25**: 457—466.

## A COMPARATIVE STUDY OF ACTIVITIES OF THE MITOCHONDRIA ATPase OF THE LIVER CELLS IN SEVERAL FISHES

Wang Yaping and Wang Zuxiong

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

### Abstract

This paper describes a comparative study of the activities of the mitochondria ATPase of the liver cells in *Ctenopharyngodon idella*, *Leuciscus waleckii* and *Cirrhina molitorella*, acclimated to low and high temperatures. Observations were made on the effect of Tween-80 treatment of the mitochondria on the transition temperature in the Arrhenius plot for the activation energy of the mitochondria ATPase. Compared with fish acclimated at higher temperatures, fish acclimated at lower temperatures showed lower transition temperatures in the Arrhenius plots for the activation energy of their mitochondria ATPase. Treatment with Tween-80 resulted in decreased transition temperatures. It was suggested that the magnitude of reduction in the transition temperature when the fish are acclimated to a lower temperature is correlated with the fish's capacity of cold-resistance. The transition temperature is related to tolerance to low temperature.

**Key words** Mitochondria ATPase, Transition temperature, Tween-80, Activation energy