

温度和低氧对白鲢乳酸与糖水平的影响*

何伟, 曹振东, 付世建

(重庆师范大学 进化生理与行为学实验室 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 400047)

摘要:考察温度对鱼类低氧耐受生化反应的影响,以白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)幼鱼为对象;分别在15、30℃条件下驯化2周;随后将实验鱼置于密闭呼吸室中通过鱼体自发耗氧进行低氧处理,并以不经历急性低氧处理的实验鱼为对照组;分别测定实验鱼的血液和白肌中乳酸、白肌和肝脏中的糖原、葡萄糖含量。实验结果显示,经急性低氧处理后高、低温组血乳酸含量均显著上升($p < 0.05$),而低氧处理后15℃下肌糖原和30℃下肝葡萄糖含量却显著降低($p < 0.05$);随着温度的升高(不论低氧处理与否)肌乳酸含量均显著降低($p < 0.05$),而温度的升高并未改变实验鱼的肌葡萄糖以及肝葡萄糖的含量;统计检验结果表明温度与低氧处理间不存在交互作用。研究表明,白鲢幼鱼在面临温度变化和低氧胁迫时鱼体内代谢底物和无氧代谢产物水平均产生相应的变化,这种变化对实验鱼适应不同温度环境及低氧胁迫有着重要的意义。

关键词:白鲢;温度;急性低氧;乳酸;糖原

中图分类号:Q594.1

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2013)05-0027-05

自然水体中的温度、溶氧等非生物因子通常呈现昼夜和季节的短期或长期波动,鱼类在进化的历程中需要适应这些环境的变化^[1-2]。温度不仅对生物化学反应速率有着显著的影响,而且与水的溶氧量密切相关^[3]。温度升高会导致鱼体代谢率提升并使水中氧的饱和溶解度降低,进而造成对鱼类的低氧胁迫^[4]。由于近些年全球气候变暖、水体污染及富营养化、水利工程建设等因素,使许多水生生态系统频繁出现低氧现象^[5],迫使鱼类的生存与繁衍面临水体缺氧的严峻挑战^[4]。

鱼类对缺氧环境的耐受能力在一定程度上与氧化底物的储备和代谢产物的积累有关^[6]。葡萄糖(糖原)作为鱼类代谢供能的主要底物,对鱼类生命活动的维持具有重要作用;在缺氧的环境下,鱼类需要启动无氧代谢,而乳酸作为鱼类无氧代谢的主要产物,过多的积累会对鱼体产生伤害^[7]。尽管关于温度驯化和低氧处理分别对鱼类底物及代谢产物积累的影响已有较多研究^[8-11],然而有关温度驯化和急性低氧处理共同作用于鲤科鱼类的相关生化水平的研究还相对较少。

为了考察不同温度下鲤科(Cyprinidae)鱼类的对急性低氧的耐受能力,本研究选择广温性、好静水环境的鲤科鱼类——白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)作为实验对象;该鱼分布广泛且为中国主要淡水养殖鱼类之一^[12],在它的生活史中可能会面临不同程度的温度和溶氧波动,因此是一种理想的实验材料。本研究分别在15、30℃条件下对该鱼幼鱼进行急性低氧处理,测定实验鱼不同组织中乳酸、糖原及葡萄糖的含量,从生物化学的角度分析、探讨不同温度下白鲢幼鱼的低氧耐受对策,从而为相关研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼的来源与驯养

购自重庆市合川区水产校的白鲢幼鱼在实验室自净化循环控温水槽(专利号:ZL200520010485.9)中适应性驯养2周。驯养用水为曝气后自来水,水温(15±1)℃,水中溶氧量不低于每升8mg,每日以池塘中捞取的浮游

* 收稿日期:2013-01-01 修回日期:2013-02-15 网络出版时间:2013-09-17 17:38

资助项目:国家自然科学基金(No. 31172096);重庆市科技创新能力建设项目(No. 2110CA1010)

作者简介:何伟,女,硕士研究生,研究方向为鱼类生理生化,E-mail:victoria0830@126.com;通讯作者:付世建,E-mail:shijianfu9@hotmail.com

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20130917.1738.201305.27_002.html

生物投喂 1 次,日换水量约为驯养水体体积的 10%,光制为 12 h 光照:12 h 黑暗。挑选驯养 2 周后身体健康的 33 尾体质量为 (8.13 ± 0.15) g 的白鲢幼鱼作为实验对象。

1.2 实验方案与操作方法

1.2.1 温度驯化 将挑选的白鲢幼鱼随机分为 15 °C 实验组和 30 °C 实验组,体质量分别为 (8.37 ± 0.41) 、 (8.46 ± 0.37) g,体长分别为 (8.58 ± 0.15) 、 (8.8 ± 0.13) cm;置于 250 L 自循环控温水槽中,按照每天 2 °C 的速度上升或维持至目标温度后持续 2 周。驯化期间实验鱼饲喂、水质维护及光周期均与适应性驯养时条件一致。实验前禁食 24 h。

1.2.2 急性低氧处理 通过实验鱼自发耗氧降低密闭呼吸室中溶氧量,进而实现对实验鱼的急性低氧处理。为确保每个呼吸室中溶氧降低的速率基本一致,将经过 15、30 °C 驯化的实验鱼分别置于两种体积(190 或 330 mL)不同的呼吸室中驯化 24 h。呼吸室采用微型水泵使密闭水体的溶氧均匀,采用溶氧仪(HQ20, Hach Company, Loveland, Colorado, USA)连续监测呼吸室中溶氧变化,直达到呼吸室中溶氧量低于饱和溶氧量 3%后则完成低氧处理。

1.3 样品的采集与处理

急性低氧处理后,迅速取出实验鱼(样本数 $n=6$)放入 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS-222 麻醉液中^[10],待鱼完全麻醉后断尾,在 1 min 之内完成取血并于 4 °C、 $3400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min 后吸取血清;取血后即将鱼置于冰块上,取尾部白肌和肝组织,与血清共同置于 -80 °C 下保存待测。15 与 30 °C 常氧处理组除不经历急性低氧处理外,其余操作及样本量均与低氧处理组的实验过程一致。此外,由于实验过程中取样出现问题,导致部分处理样本数 $n=4$ 或 $n=5$ 。

1.4 生化测定方法

采用对羟基联苯比色法、蒽酮显色法分别测定乳酸含量、糖原和葡萄糖测定方法^[13-14]。

1.5 数据处理

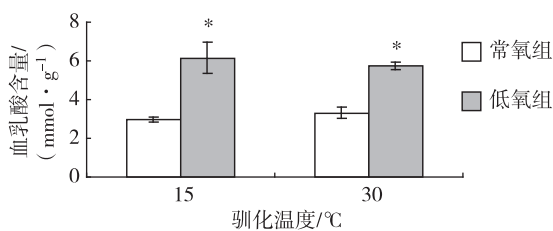
采用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件对数据进行统计处理,其中温度和急性低氧处理的数据进行双因素方差分析,组间比较采用 t 检验。实验数据均用“平均值±标准误”(Mean±SE)表示,显著性水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果

2.1 温度和急性低氧对乳酸含量的影响

在 15、30 °C 两个温度条件下,常氧组实验鱼血乳酸含量分别为 2.96 和 $3.32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,无显著差异;经急性低氧后,血乳酸含量分别为 6.15 和 $5.74 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,也无显著差异;但与常氧组相比,低氧处理后两个温度下血乳酸含量均显著上升($p < 0.05$)(图 1)。对温度处理与低氧处理的数据进行的双因素方差分析显示二者之间不存在交互作用。

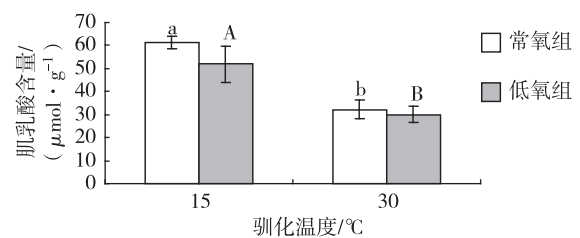
肌乳酸变化趋势与血乳酸不同,随着温度的升高,常氧组与低氧组肌乳酸含量均显著降低($p < 0.05$,其中 30 °C 低氧组样本数 $n=5$);然而急性低氧处理对实验鱼的肌乳酸含量无显著影响(图 2)。经统计检验,温度与急性低氧处理之间无交互作用。



注: * 表示该处数据与常氧组含量有显著差异($p < 0.05$)

图 1 温度和急性低氧对白鲢幼鱼血乳酸含量的影响

Fig. 1 The effects of temperature and acute hypoxia on plasma [lactate] in juvenile silver carp



注: ab 表示温度处理下常氧组之间的差异; AB 表示温度处理后低氧组之间的差异($p < 0.05$)。

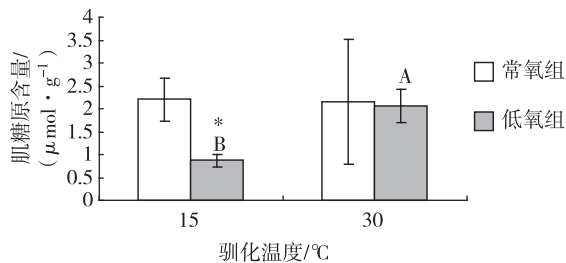
图 2 温度和急性低氧对白鲢幼鱼肌乳酸含量的影响

Fig. 2 The effects of temperature and acute hypoxia on muscle [lactate] in juvenile silver carp

2.2 温度和急性低氧对糖原和葡萄糖含量的影响

实验结果显示,常氧组实验鱼的肌糖原、肝糖原含量随温度升高未表现出显著变化(图3~4);肌糖原含量在15℃常氧处理后为 $2.20\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (样本数 $n=5$),经历急性低氧后显著下降为 $0.86\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ($p<0.05$);在30℃下经历急性低氧后肌糖原含量无显著变化(样本数 $n=5$)(图3)。肝糖原在15、30℃条件下经历急性低氧后均呈现出下降趋势,但差异不显著(图4)。

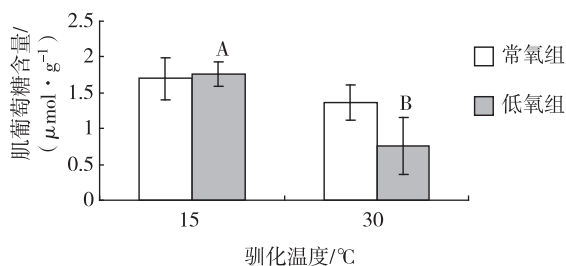
温度的升高并未改变常氧组实验鱼的肌葡萄糖以及肝葡萄糖的含量(图5~6);肌葡萄糖及肝葡萄糖的含量在15℃条件下,经急性低氧处理后也无显著变化(样本数 $n=5$,图5~6);在30℃条件下分别由 1.36 和 $1012.93\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 下降至 0.76 和 $581.17\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (样本数 $n=4$),其中肝葡萄糖含量显著下降($p<0.05$)(图5~6)。



注: *表示该处数据与常氧组含量有显著差异,AB表示温度处理后低氧组之间的差异($p<0.05$)

图3 温度和急性低氧对白鲢幼鱼肌糖原含量的影响

Fig. 3 The effects of temperature and acute hypoxia on muscle [glycogen] in juvenile silver carp



注: AB表示温度处理下低氧组之间的差异($p<0.05$)

图5 温度和急性低氧对白鲢幼鱼肌葡萄糖含量的影响

Fig. 5 The effects of temperature and acute hypoxia on muscle [glucose] in juveniles of silver carp

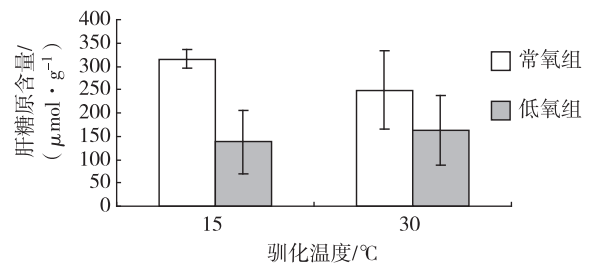
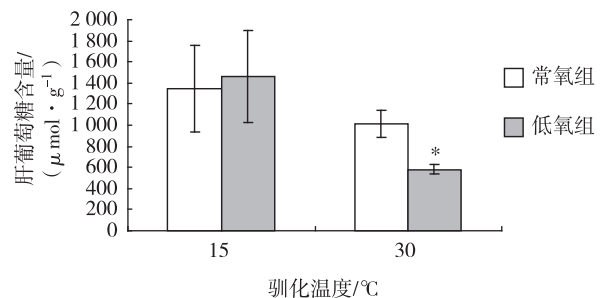


图4 温度和急性低氧对白鲢幼鱼肝糖原含量的影响

Fig. 4 The effects of temperature and acute hypoxia on liver [glycogen] in juvenile silver carp



注: *表示该处数据与常氧组含量有显著差异($p<0.05$)

图6 温度和急性低氧对白鲢幼鱼肝葡萄糖含量的影响

Fig. 6 The effects of temperature and acute hypoxia on liver [glucose] in juvenile silver carp

3 讨论

3.1 温度对乳酸、糖原及葡萄糖含量的影响

温度对鱼类能量代谢有着显著的影响^[15]。鱼类的代谢率及能量需求均随着温度的升高而上升^[15]。有研究发现银鲈(*Rhamdia quelen*)在31℃下的肌乳酸水平低于15℃下的含量^[11],本实验结果与上述研究一致。这可能是由于较高温度下乳酸脱氢酶活性较高,使得乳酸清除速率加快所致,还可能与肝乳酸的大量积累有关^[16]。有研究发现鲢鱼(*Silurus asotus*)幼鱼不存在“乳酸泄露”的现象^[17]。本研究结果显示血乳酸含量在两个不同温度下均远远低于肌乳酸的水平,表明白鲢幼鱼也是一种非“乳酸泄露”的鱼类;同时说明温度的变化对“乳酸泄露”不会产生影响。

肝脏在鱼体各种器官中是储存糖原的重要器官^[11]。糖原的储存量对于硬骨鱼的代谢产能至关重要^[18],在寒冷的冬季鲫鱼(*Carassius carassius*)在肝脏、肌肉中囤积大量糖原以应对低氧胁迫^[19]。本研究发现实验鱼的肌糖原、肝糖原、肌葡萄糖以及肝葡萄糖的含量均未随温度升高表现出显著变化,表明白鲢幼鱼与其他鱼类相似,银鲈在高温条件下蛋白质成为除糖类之外的重要能量来源之一^[11];温度上升可提高红海鲷(*Chrysophrys major*)的脂质代谢能力^[20];以往研究还发现,鳗鱼(*Anguilla rostrata*)在不同温度下整体碳水化合物水平保持

相对稳定^[21]。有关白鲢幼鱼在高温下的蛋白质及脂质代谢的情况还有待进一步研究。

3.2 急性低氧对乳酸、糖原及葡萄糖含量的影响

鱼类面临组织缺氧时,通常采用无氧代谢方式满足能量需求^[22],乳酸是无氧酵解的首要产物,因此可将其作为评价无氧代谢能力的重要指标^[23-24]。经急性低氧处理后,实验鱼的血乳酸含量较常氧组显著上升,表明在低氧条件下白鲢幼鱼更多采用无氧代谢以满足自身能量需求,在相关研究中有类似报道^[10,25]。糖原是除肌糖原之外鱼体内碳水化合物主要储存能源,与无氧酵解后的乳酸积累量有关,其一旦合成则不轻易动用^[11]。在急性低氧后,实验鱼的肝糖原含量呈下降趋势,表明急性低氧处理有助于启动糖原的利用,在此条件下乳酸水平的升高也与此有关。银鲑鱼经低氧处理后的肝糖原迅速分解并加速糖异生^[11],与本研究结果一致。另外,温度对鱼类的葡萄糖水平变动有重要影响^[11]。本研究发现,在高温条件下(30℃),肌肉及肝脏葡萄糖经历急性低氧后均呈下降趋势,其中肝葡萄糖的下降达到显著水平;而低温条件下(15℃),肌肉及肝脏葡萄糖均未见明显变化。结果表明,温度的变化对葡萄糖特别是肝葡萄糖水平产生重要影响。这种现象可能与高温会提升鱼类代谢的能量需求有关;还可能由于急性低氧后实验鱼的无氧代谢方式所产生的 ATP 效率远低于有氧供能的水平^[26],因此就需要消耗更多的葡萄糖以满足自身能量需求。

综上所述,白鲢幼鱼在面临温度变化和低氧胁迫时,其代谢底物和无氧代谢产物水平均产生相应的变化,这种变化对与实验鱼适应不同温度环境及面对低氧胁迫有着重要的意义。

参考文献:

- [1] Almeida-Val V M F, Chippari Gomes A R, Lopes N P. Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the Amazon[J]. *Fish Physiology*, 2006, 21: 443-499.
- [2] Clarke A. Temperature and the metabolic theory of ecology [J]. *Functional Ecology*, 2006, 20(2): 405-412.
- [3] Cordiner S, Egginton S. Effects of seasonal temperature acclimatization on muscle metabolism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, 16(4): 333-343.
- [4] 陈波见, 曹振东, 付世建, 等. 温度对鳊鱼静止代谢和耐低氧能力的影响[J]. *动物学杂志*, 2010, 45(5): 1-8.
Chen B J, Cao Z D, Fu S J, et al. Temperature effect on rest metabolic rate and hypoxia tolerance in Chinese bream (*Parabramis pekinensis*) [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(5): 1-8.
- [5] Richards J G. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2011, 214(2): 191-199.
- [6] Bickler P E, Buck L T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes; life with variable oxygen availability [J]. *Annual Review of Physiology*, 2007, 69: 145-170.
- [7] Franklin C E, Johnston I A, Batty R S, et al. Metabolic recovery in herring larvae following strenuous activity [J]. *Journal of Fish Biology*, 1996, 48(2): 207-216.
- [8] Delahunty G, De Vlaming V L. Photoperiod-temperature interactions on liver and plasma metabolites in the goldfish, *Carassius auratus* [J]. *Comparative Biochemistry Physiology A*, 1980, 66(3): 507-512.
- [9] Dean J M, Goodnight C J. A comparative study of carbohydrate metabolism in fish as affected by temperature and exercise [J]. *Physiological Zoology*, 1964, 37(3): 280-299.
- [10] Zhao W W, Pang X, Peng J L, et al. The effects of hypoxia acclimation, exercise training and fasting on swimming performance in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*) [J]. *Fish Physiology Biochemistry*, 2012, 38: 1367-1377.
- [11] Lermena C L, Lappea R, Crestani M. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen* [J]. *Aquaculture*, 2004, 239(1): 497-507.
- [12] 丁瑞华. 四川鱼类志 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994: 139-319.
Ding R H. *Sichuan ichthyography* [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Publishing House. 1994: 139-319.
- [13] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 422-427.
Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Biochemistry experiments and technology* [M]. Beijing: High Education Press, 1997: 422-427.
- [14] 黄如彬, 丁昌玉, 林厚怡. 生物化学实验 [M]. 北京: 世界图书出版社, 1995: 109-110.
Huang R B, Ding C Y, Lin H Y. *Biochemistry experiments* [M]. Beijing: World Publishing Co., Ltd., 1995: 109-110.
- [15] 付成, 曹振东, 付世建. 温度和饥饿对鲤鱼幼鱼静止代谢率及自发运动的影响 [J]. *动物学杂志*, 2012, 47(2): 85-90.
Fu C, Cao Z D, Fu S J. The influence of temperature and starvation on resting metabolic rate and spontaneous activity in juvenile *Cyprinus carpio* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2012, 47(2): 85-90.
- [16] Sfakianakis D G, Kentouri M. Effect of temperature on

- muscle lactate metabolic recovery in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles exposed to exhaustive exercise [J]. *Fish Physiology Biochemistry*, 2010, 36(3):387-390.
- [17] 李黎,曹振东,付世建. 力竭性运动后鲈鱼幼鱼乳酸、糖原和葡萄糖水平的变动[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(6):880-885.
- Li L, Cao Z D, Fu S J. Lactate, glycogen and glucose levels of juvenile Chinese catfish (*Silurus asotus* Linnaeus) [J]. *Acta Hydro-biol Sinica*, 2007, 31(6):880-885.
- [18] Polakof S, Mi'guez J M, Moon T W, et al. Evidence for the presence of a glucosensor in hypothalamus, hindbrain, and Brockmann bodies of rainbow trout [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 292(4):1657-1666.
- [19] Hyvärinen H, Holopainen I J, Piironen J. Anaerobic wintering of crucian carp (*Carassius carassius* L.)-I. Annual dynamics of glycogen reserves in nature [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 1985, 82(4):797-803.
- [20] Woo N Y S. Metabolic and osmoregulatory changes during temperature acclimation in the red sea bream, *Chrysophrys major*; implications for its culture in the subtropics [J]. *Aquaculture*, 1990, 87(2):197-208.
- [21] Mayerle J A, Butler D G. Effects of temperature and feeding on intermediary metabolism in North American eels (*Anguilla rostrata* LeSueur) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 1971, 40(4):1087-1095.
- [22] 朱晏苹,曹振东,付世建. 力竭性运动后瓦氏黄颡鱼幼鱼乳酸和血糖变化[J]. *重庆师范大学学报:自然科学版*, 2010, 27(2):14-17.
- Zhu Y P, Cao Z D, Fu S J. Muscle lactate and blood glucose levels of juvenile Darkbarbel Catfish (*Pelteobagrus vachelli* Richardson) in response to exhaustive exercise [J]. *Journal of Chongqing Normal University: Natural Science*, 2010, 27(2):14-17.
- [23] Haman F, Zwingelstein G, Weber J M. Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are misleading [J]. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1997, 273(6):2046-2054.
- [24] Virani N A, Rees B B. Oxygen consumption, blood lactate and interindividual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 2000, 126(3):397-405.
- [25] Fu S J, Brauner C J, Cao Z D, et al. The effect of acclimation to hypoxia and sustained exercise on subsequent hypoxia tolerance and swimming performance in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2011, 214(12):2080-2088.
- [26] Hochachka P W, Somero G N. *Biochemical adaptation* [M]. New York: Oxford University Press, 2002.

Animal Sciences

Effects of Temperature and Hypoxia on Lactate and Carbohydrate Level in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

HE Wei, CAO Zhen-dong, FU Shi-jian

(Laboratory of Evolutionary Physiology and Behaviour, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: In order to investigate the effects of temperature on biochemical reactions of hypoxia tolerance in fish, we select juvenile silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) as the experimental animal. All the fish were divided into two groups (15 and 30 °C) for temperature acclimation for two weeks then the half fish of each temperature group were put into the closed respirometer chambers for experiencing a treatment of acute hypoxia through spontaneous oxygen consumption individually, the other half fish without the treatment of acute hypoxia of each temperature group as the control. The blood lactate, white muscle lactate, white muscle glycogen, liver glycogen and liver glucose content of each group were measured. The blood lactate content of each temperature group increased significantly after acute hypoxia ($p < 0.05$) while both the muscle glycogen content at 15 °C and liver glucose content at 30 °C decreased significantly after hypoxia ($p < 0.05$). The muscle lactate content of both hypoxia and normoxia groups decreased significantly with the increase of the temperature ($p < 0.05$). The glucose content of both muscle and liver showed no change with temperature. Furthermore, there was no interaction effect between temperature and hypoxia. The study showed that when undergoing the change of temperature and hypoxic situation, both the metabolic substrates and anaerobic metabolic products changed correspondingly in juvenile silver carp, to handle the thermal and hypoxia stresses.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; temperature; acute hypoxia; lactic acid; glycogen

(责任编辑 方 兴)