

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號: NSC89-2313-B002-095

執行期限: 88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人: 郭欽明, 國立臺灣大學漁業科學研究所

計畫參與人員: 陳淑華、謝淑玲

淡水長臂大蝦壓迫生理反應之研究

中文摘要

淡水長臂大蝦為台灣養殖之重要經濟品種是屬於熱帶及亞熱帶蝦種, 其耐寒性欠佳, 每當寒季來臨, 造成嚴重之死亡, 為此, 本研究之主要目的在於探討該蝦種對低溫壓迫之生理反應, 以及與能量相關酵素活性盛衰及途徑遷移。藉此瞭解淡水長臂大蝦對低溫調適之狀況。

高血糖現象乃是低溫壓迫之次級反應, 藉由 X 器官—靜竇腺複合體分泌 CHH 所調控且兒茶酚胺參與甲殼類促高血糖激素 (Crustacean Hyperglycemic Hormone, CHH) 之分泌釋放, 在低溫刺激下, 正腎上腺素 (norepinephrine) 及 octapamine 不但作用於 CHH 分泌之層次, 亦直接作用於組織層次上, 促進血糖量之上升。至於低溫下所引起肝糖分解及糖新生作用之旺盛乃是促進高血糖現象之原因, 且在生理調適所需能量在急迫刺激下促進糖解作用並經無氧代謝途徑, 提供調節所需能量。

關鍵詞, 促高血糖反應, 兒茶酚胺, 能量代謝酵素

Abstract

The freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, an commercially important shrimp in Taiwan, is a tropical and subtropical species, which are known to be less tolerant to the cold. The shrimp

culture industry has often suffered from the heavy loss from the winter-kill. The main objective of this research is aimed to document the physiological responses of this species under cold shock and to examine the changes in the activities and pathways of the enzymes involved in energy metabolism, and finally to comprehend the process and mechanisms involved in the cold acclimation.

Hyperglycemia, a secondary stress responses, is regulated by crustacean hyperglycemic hormone (CHH), which is synthesized and released, under the influences of catecholamines, from the x-organ sinus gland complex in the crustaceans. Under the cold shock, norepinephrine and octapamine not only act on the CHH release, but also at the tissue level to induce the blood glucose elevation. In the meantime, glycogenolysis and glyconeogenesis are both activated and resulted in the hyperglycemic response. The energy produced through glycolysis and anaerobic metabolic pathway plays important roles in the cold adaptation under the acute cold stress.

Key Words : Hyperglycemia, catecholamines, energy metabolism, enzymes.

緣由及目的

甲殼類屬於變溫動物，其體溫隨著環境溫度而變動，生物體為適應棲地環境，經演化適應出現不同的適溫型態。且在每一生物最適生存之溫度範圍內，體內的生理機能得以維持恆定狀態(homeostasis)。若水溫之變動，造成生物體之壓迫，亟需能量之供應，經內生理之調節，以維持生理狀況之穩定。若超過生理所能調節之範圍，則個體將面臨生存危機。

生物對溫度變動短暫性之調適及長時間性的適應，表現於行為反應及在能量代謝上，達到生理機能之適應調整，充分反映在代謝酵素活性作用之增減，或代謝酵素作用途徑之變動，促使魚體在變動水溫環境下，在能量充分支援下調適、馴應。

溫度影響魚類生理，相當廣泛且錯綜複雜。短期的低溫壓迫下，魚體可藉著神經內分系統的調節，以增強生理機能，因應暫時的需要。魚體能否在低溫衝擊下存活，牽涉到它是否能適當運用能量以維持生理機能。就目前所知，耐寒性魚種在低溫長期馴養下，發展出完備的代謝補償機制(temperature metabolic compensation)，即低溫下某些代謝途徑(metabolic pathway)的酵素活性大幅改變(量的適應策略, quantitative compensation strategy)，或是有適宜低溫下作用的同功異構酵素(isozyme)表現(質的適應策略, qualitative compensation strategy)或酵素特性及動力學(Kinetics)之調整(調節之適應策略, Modulative strategy)。參與能量代謝酵素主要包含糖解作用(Glycolysis)中的丙酮酸激酶(Pyruvate kinase)，無氧呼吸的乳酸去氫酶(Lactate Dehydrogenase)，有氧呼吸循環(TCA cycle)中的檸檬酸合成酶(Citrate Synthase)及蘋果酸去氫酶(Malate Dehydrogenase)，電子傳遞鏈(Oxidative electron transport)中的細胞色素C氧化酶(Cytochrome c Oxidase)，五碳糖代謝(Pentose shunt pathway)的葡萄糖-6-磷酸去氫酶(Glucose-6-phosphate

dehydrogenase)，及糖質新生(Gluconeogenesis)中的果糖-1,6-雙磷酸化酶(Fructose-1,6-Bisphosphatase)，肝糖分解(Glycogenolysis)中的肝糖廠磷酸化酶(Glycogen phosphorylase a)等。由於這些酵素主要涉及到能量的產生與利用，低溫下這些酵素活性在質與量上的改變，就蝦類對低溫適應甚具它的生理意義(Hochachka and Somero, 1984)。

淡水長臂大蝦(*Macrobrachium rosenbergii*)屬於熱帶性蝦種，耐寒性欠佳，水溫的變動對淡水蝦之影響甚鉅，每在冬季寒流來襲之際，因其耐寒性欠佳而大量凍斃，產業損失甚為慘重，有鑑於此，本研究擬就淡水長臂大蝦對低溫之生理反應與能量代謝的調節進行全盤性研究，期能改善耐寒性，對產業之發展將有所助益。

結果與討論

馴化於26°C水溫下之淡水長臂大蝦，以16°C低溫處理，定時追蹤低溫壓迫所引起之生理反應及參與能量代謝酵素活性之時程變化。

一、低溫壓迫生理反應：

在水溫26°C對照組中2小時內血糖含量的變化相當平穩，於 $15.94 \pm 3.18 \sim 22.42 \pm 2.41$ 之範圍內變動(Fig. 1)至於16°C低溫處理下，血糖量由 15.94 ± 3.18 mg/dl 持續上升，在1小時及2小時血糖量分別增加到 52.06 ± 5.85 及 84.06 ± 27.11 mg/dl，顯示低溫刺激確引起高血糖(hyperglycemia)的反應，且與刺激時間呈現顯著相關性($r^2=0.994$)。以馴化在26°C水溫之淡水長臂大蝦(*M. rosenbergii*)，直接轉至16°C低溫刺激2小時，血糖含量呈持續升高的趨勢，升高程度達5.3倍，以血糖量之變化可做為壓迫反應之指標。

生物體所表現的高血糖現象(hyperglycemia)為普遍的次級壓迫反應現象。甲殼類高血糖反應是受到眼柄中X器官-靜竇腺複合體釋放之甲殼類促高糖激素(CHH)所調節，經肝胰臟及肌肉組織

等肝糖釋出葡萄糖。至於CHH的釋放主要受到神經傳導物質 (neurotransmitters) 調節如serotonin (5-HT)、dopamine (Keller and Beyer, 1968; Lushen *et al.*, 1993; Sarolini *et al.*, 1995)及enkephalins (Jaros, 1990; Rothe *et al.*, 1991; Sarolini *et al.*, 1995)。至於低溫刺激下, 促高血糖現象則源自於該激素之作用, 或經由catecholamines之合成, 直接作用於組織上, 其中正腎上腺素 (Norepinephrine)及Octapamine為主要因子 (Kuo and Yang, 1999) (Table 1)。

二、參與葡萄糖代謝相關酵素活性包括葡萄糖新生作用之Fructose-1,6-biphosphatase (FBPase), 有氧代謝盛衰指標之Citrate Synthase (CS), 檸檬酸循環(TCA cycle)指標之Malate dehydrogenase (MDH), 肝糖分解作用之Phosphorylase a (PH a), 血糖供組織利用指標之Glucokinase (GK), 糖解作用指標之Pyruvate kinase (PK)等, 其活性之時程變化, 綜合表示於Table 2。

追蹤葡萄糖生合成相關酵素活性如果糖-1,6-雙磷酸化酵素 (Fructose-1,6-biphosphatase, FBPase) 及 Glycogen phosphorylase a (PH a), 顯示低溫刺激初期葡萄糖新生作用及肝糖分解反應有明顯上升的趨勢。除肝胰臟組織在 1 小時時間點 PH a 活性達高值 0.0091 ± 0.0021 U/g protein 外, 其餘均在 0.5 小時時程點達活性高值, 與血糖值比較, 在低溫刺激 1 小時內呈正相關。但 2 小時時間點 PH a 和 FBPase 活性降低, 而血糖值仍有上揚的現象。因此, 低溫刺激下, 會增進肝糖分解及葡萄糖新生作用, 以增加血糖的含量。

低溫刺激下, 蝦體累積大量血糖是否能提供組織利用, 作為該組織葡萄糖能量之來源, 故選擇以 Glucokinase (GK) 活性作為此反應指標。脊椎動物調節血糖供組織利用的調控酵素 Hexokinase 及 GK。兩種酵素分別存在不同組織, 其最大差異在於 Hexokinase 不受 Glucose-6-phosphate 產物之濃度調節, 出現於肌肉中; 而 GK 多存於肝臟較受葡萄糖-6-磷酸去氫酵素 (Glucose-6-phosphate) 之濃度抑制。於低溫刺激下, 肌肉組織 GK 活性有

明顯升高的趨勢, 而肝胰臟則否。顯示肌肉除本身利用肝糖分解及葡萄糖新生產生葡萄糖外, 並可利用血淋巴中高濃度的葡萄糖作為能量來源。至於肝胰臟可能有旺盛的肝糖分解及葡萄糖新生, 導致有高濃度的葡萄糖-6-磷酸去氫酵素 (glucose-6-phosphate) 為轉換成血糖之主要器官。

丙酮酸激活酵素 (Pyruvate kinase, PK) 為糖解作用之調節酵素之一。低溫刺激下 PK 活性呈上揚曲線但與對照組 PK 活性比較則無顯著差異。在肝胰臟組織 PK 活性呈倒 V 字型變動, 於 0.5 小時時程點 PK 活性達到最高點 (0.55 ± 0.022 U/g protein)。顯示, 水溫 26°C 下的肌肉組織糖解作用維持相當高的水平。 13°C 低溫刺激下肝胰臟進行的糖解作用遠高於 26°C 對照組。

檸檬酸合成酵素 (Citrate synthase, CS) 為 TCA cycle 之起始酵素, 故以 CS 做為細胞進行有氧代謝之指標。肌肉組織 CS 活性在低溫刺激下, 各時程活性均較對照組低約 3-4 倍。而肝胰臟則無顯著差別。低溫刺激下蝦體肌肉有氧代謝受到抑制, 推測可能與低溫壓迫肌肉對能量需求殷切, 會以快速經由無氧代謝獲取能量方式。就肌肉組織 LDH 活性而言, 低溫刺激下其活性上揚, 幾近於 26°C 對照組之 2~2.5 倍。

低溫刺激下, 肌肉組織蘋果酸去氫酵素 (MDH) 活性在 3.18 ± 0.37 至 4.07 ± 0.25 範圍內呈平穩變動。於低溫刺激 1 小時內, 與對照組比較 MDH 活性有顯著上升。就活性變動趨勢而言, 與 CS 活性變動頗為吻合。但與對照組比較, 則 MDH 活性高於對照組而 CS 活性低於對照組; 推測低溫刺激下仍有其他因素或異構酶的表現。如自魚體胞質分離出二種 MDH, 一為熱穩定型 (thermostable) 及熱不穩定型 (thermolabile) 之 c-MDH (Lin and Somero, 1996)。至於淡水長臂大蝦在低溫刺激下, MDH 之調節、表現仍待進一步深入研究。

總之, 低溫壓迫下, 纖經由肝糖分解及葡萄糖新生作用相關酵素之增強, 呈現高血糖之生理反應, 至於對水溫變動之調適, 乃藉由糖解作用及無氧代謝途徑獲得

急迫性能量需求。

在正腎上腺素注射之後，在肌肉、肝胰臟組織中 gluconate kinase 活性明顯較生理食鹽水注射組之 GK 活性高。與低溫刺激比較，肌肉組織能利用血糖做為葡萄糖來源是無庸置疑了，推測肝胰臟中 GK 活性升高可能與葡萄糖再生成肝糖的作用有關。由 pyruvate kinase (PK) 作為糖解作用之指標顯示正腎上腺素注射會增進肝胰臟組織的糖解作用進行有氧化代謝 CS、

MDH 活性上升，對肌肉則否。在離體培養中正腎上腺素會促進肝胰臟釋放大量的葡萄糖，為血糖增加之主要器官。正腎上腺素亦有促進肌肉組織釋出葡萄糖，雖量上不如肝胰臟多，但由於肌肉是蝦體最大的組織，故對血糖的累積應有一定的貢獻。此外，於 16°C 低溫培養中葡萄糖釋出量較 26°C 培養下低，似乎溫度效應對正腎上腺素引發之一連串酵素反應有相當程度的影響。

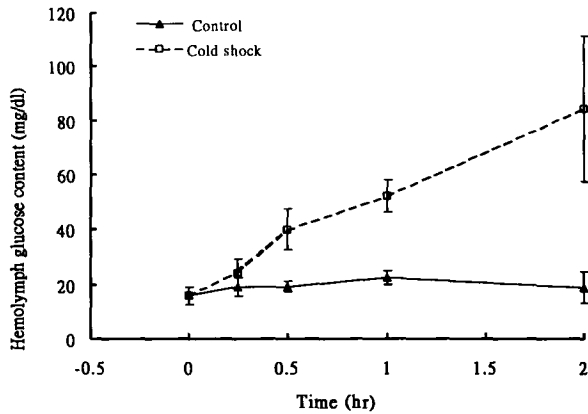


Fig. 1. Hyperglycemic responses of *Macrobrachium rosenbergii* under cold shock.

Table 1 Hyperglycemic effects of biogenic amines in intact and eyestalk-ablated freshwater giant prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Saline is represented by phosphate buffer. Injection dose

of biogenic amines was 2 nmol per prawn (NS not significantly different from sham control)

	Intact			Eyestalk-ablated		
	Mean \pm SEM (n) (mmol \cdot l ⁻¹)	Percent response	t-value	Mean \pm SEM (n) (mmol \cdot l ⁻¹)	Percent response	t-value
Control	1.17 \pm 0.09 (37)	66.6		0.687 \pm 0.06 (27)	99.6	
Saline	1.75 \pm 0.20 (22)	100.0		0.690 \pm 0.10 (20)	100.0	
Epinephrine	2.72 \pm 0.23 (18)	155.3	3.21**	0.76 \pm 0.12 (16)	110.5	0.47 NS
DOPA	1.96 \pm 0.27 (20)	111.8	0.63 NS	0.59 \pm 0.08 (14)	85.6	-0.71 NS
Dopamine	2.99 \pm 0.30 (11)	170.5	3.53**	0.83 \pm 0.15 (11)	119.8	0.79 NS
Serotonin(5-HT)	3.66 \pm 0.30 (5)	208.7	4.36**	0.77 \pm 0.33 (5)	111.3	0.30 NS
Norepinephrine	2.78 \pm 0.30 (11)	158.9	2.98**	1.17 \pm 0.19 (5)	169.3	2.15*
Octapamine	2.62 \pm 0.37 (16)	149.5	2.22*	1.08 \pm 0.11 (22)	155.9	2.63*

* and **: mean values are different from sham control (saline) at 5% and 1% significance level, respectively (t-test)

Table 2. Time-course changes of carbohydrate metabolic enzymes activity (U/g protein) muscle and hepatopancreas of freshwater giant prawns, *Macrobrachium rosenb*

Time (hr)	Muscle		Hepatopancreas					
	Cold Shock (13°C)		Control (26°C)		Cold Shock (13°C)		Control (26°C)	
Glycogen phosphorylase								
0	0.016 ± 0.005	0.016 ± 0.005	0.0024 ± 0.0004	0.0024 ± 0.0004	0.0024 ± 0.0004	0.0024 ± 0.0004	0.0024 ± 0.0004	0.0024 ± 0.0004
0.25	0.021 ± 0.008	0.010 ± 0.002	0.0033 ± 0.0002	0.0033 ± 0.0002	0.0021 ± 0.0008	0.0021 ± 0.0008	0.0021 ± 0.0008	0.0021 ± 0.0008
0.5	0.034 ± 0.004	0.007 ± 0.004	0.0055 ± 0.0009	0.0055 ± 0.0009	0.0036 ± 0.0014	0.0036 ± 0.0014	0.0036 ± 0.0014	0.0036 ± 0.0014
1	0.016 ± 0.003	0.007 ± 0.003	0.0091 ± 0.0021	0.0091 ± 0.0021	0.0040 ± 0.0014	0.0040 ± 0.0014	0.0040 ± 0.0014	0.0040 ± 0.0014
2	0.016 ± 0.004	0.011 ± 0.005	0.0044 ± 0.0004	0.0044 ± 0.0004	0.0047 ± 0.0022	0.0047 ± 0.0022	0.0047 ± 0.0022	0.0047 ± 0.0022
Fructose-1,6-biphosphatase								
0	0.090 ± 0.007	0.090 ± 0.007	0.006 ± 0.004	0.006 ± 0.004	0.006 ± 0.004	0.006 ± 0.004	0.006 ± 0.004	0.006 ± 0.004
0.25	0.134 ± 0.030	0.083 ± 0.007	0.018 ± 0.003	0.018 ± 0.003	0.009 ± 0.003	0.009 ± 0.003	0.009 ± 0.003	0.009 ± 0.003
0.5	0.191 ± 0.024	0.087 ± 0.018	0.063 ± 0.020	0.063 ± 0.020	0.009 ± 0.005	0.009 ± 0.005	0.009 ± 0.005	0.009 ± 0.005
1	0.105 ± 0.032	0.086 ± 0.010	0.032 ± 0.008	0.032 ± 0.008	0.022 ± 0.002	0.022 ± 0.002	0.022 ± 0.002	0.022 ± 0.002
2	0.092 ± 0.024	0.084 ± 0.031	0.020 ± 0.004	0.020 ± 0.004	0.020 ± 0.005	0.020 ± 0.005	0.020 ± 0.005	0.020 ± 0.005
Gluconate kinase								
0	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.023 ± 0.003	0.023 ± 0.003	0.023 ± 0.003	0.023 ± 0.003	0.023 ± 0.003	0.023 ± 0.003
0.25	0.046 ± 0.005	0.027 ± 0.004	0.030 ± 0.005	0.030 ± 0.005	0.035 ± 0.005	0.035 ± 0.005	0.035 ± 0.005	0.035 ± 0.005
0.5	0.038 ± 0.005	0.017 ± 0.001	0.049 ± 0.008	0.049 ± 0.008	0.032 ± 0.021	0.032 ± 0.021	0.032 ± 0.021	0.032 ± 0.021
1	0.053 ± 0.007	0.017 ± 0.003	0.039 ± 0.007	0.039 ± 0.007	0.025 ± 0.012	0.025 ± 0.012	0.025 ± 0.012	0.025 ± 0.012
2	0.068 ± 0.009	0.027 ± 0.004	0.026 ± 0.004	0.026 ± 0.004	0.04 ± 0.018	0.04 ± 0.018	0.04 ± 0.018	0.04 ± 0.018
Citrate synthase								
0	98.34 ± 13.23	98.34 ± 13.23	18.78 ± 5.05	18.78 ± 5.05	18.78 ± 5.05	18.78 ± 5.05	18.78 ± 5.05	18.78 ± 5.05
0.25	36.98 ± 4.11	119.23 ± 14.52	13.62 ± 1.72	13.62 ± 1.72	15.24 ± 1.95	15.24 ± 1.95	15.24 ± 1.95	15.24 ± 1.95
0.5	30.29 ± 5.49	140.10 ± 14.10	16.95 ± 2.40	16.95 ± 2.40	18.27 ± 1.37	18.27 ± 1.37	18.27 ± 1.37	18.27 ± 1.37
1	42.62 ± 5.52	126.76 ± 14.52	18.09 ± 1.60	18.09 ± 1.60	18.93 ± 1.74	18.93 ± 1.74	18.93 ± 1.74	18.93 ± 1.74
2	40.93 ± 3.93	94.20 ± 12.69	14.91 ± 1.49	14.91 ± 1.49	18.86 ± 2.43	18.86 ± 2.43	18.86 ± 2.43	18.86 ± 2.43
Malate dehydrogenase								
0	2.80 ± 0.44	2.80 ± 0.44	0.36 ± 0.11	0.36 ± 0.11	0.36 ± 0.11	0.36 ± 0.11	0.36 ± 0.11	0.36 ± 0.11
0.25	3.18 ± 0.37	2.30 ± 0.44	0.14 ± 0.06	0.14 ± 0.06	0.33 ± 0.27	0.33 ± 0.27	0.33 ± 0.27	0.33 ± 0.27
0.5	4.07 ± 0.25	2.76 ± 0.79	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.32 ± 0.17	0.32 ± 0.17	0.32 ± 0.17	0.32 ± 0.17
1	3.69 ± 0.18	2.44 ± 0.80	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01
2	4.07 ± 0.37	2.14 ± 1.03	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.05
Pyruvate kinase								
0	1.377 ± 0.247	1.377 ± 0.247	0.037 ± 0.008	0.037 ± 0.008	0.033 ± 0.008	0.033 ± 0.008	0.033 ± 0.008	0.033 ± 0.008
0.25	1.420 ± 0.142	1.733 ± 0.227	0.071 ± 0.019	0.071 ± 0.019	0.054 ± 0.017	0.054 ± 0.017	0.054 ± 0.017	0.054 ± 0.017
0.5	1.854 ± 0.519	2.426 ± 0.415	0.155 ± 0.022	0.155 ± 0.022	0.090 ± 0.011	0.090 ± 0.011	0.090 ± 0.011	0.090 ± 0.011
1	2.230 ± 0.654	2.494 ± 0.611	0.132 ± 0.030	0.132 ± 0.030	0.095 ± 0.015	0.095 ± 0.015	0.095 ± 0.015	0.095 ± 0.015
2	2.441 ± 0.600	2.536 ± 0.725	0.055 ± 0.010	0.055 ± 0.010	0.089 ± 0.012	0.089 ± 0.012	0.089 ± 0.012	0.089 ± 0.012
Lacctate Dehydrogenase								
0	16.43 ± 1.14	8.89 ± 0.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.25	17.15 ± 1.06	9.25 ± 0.82	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.5	15.90 ± 1.91	9.18 ± 0.84	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	16.74 ± 1.59	9.21 ± 0.92	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	25.18 ± 1.53	9.35 ± 0.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Remarks: ND: not detectable.