

葛氏鲈塘鳢与七彩神仙鱼心肌细胞钠离子通道的温度响应特征

赵紫寒 尹传玲 王云飞 程鲲* 黄璞祎*

东北林业大学野生动物与自然保护地学院 哈尔滨 150040

摘要: 温度适应对于动物的生存至关重要, 而目前对于鱼类这样的外温动物的温度适应相关研究仍然缺乏。葛氏鲈塘鳢 (*Percottus glenii*) 可以在结冰的环境中生存数天, 而七彩神仙鱼 (*Symphysodon aequifasciatus*) 是被广泛饲养的热带观赏鱼类, 本研究将这 2 种鱼类作为冷水鱼与热带鱼的代表, 探究其温度耐受性。为此, 测定了它们的临界温度以及不同温度下 (0 ~ 38 °C) 的心率, 并利用原代细胞急性分离, 结合膜片钳电生理技术与控温技术, 测定了上述 2 种鱼类心肌电压门控钠离子通道在不同温度下的电生理特征。结果显示, 葛氏鲈塘鳢和七彩神仙鱼的温度耐受范围具有较大差异, 分别为 -2.0 ~ 27.4 °C 以及 13.1 ~ 39.3 °C。葛氏鲈塘鳢的心率在 0 ~ 19 °C 之间随着温度的升高而稳定升高, 在 19 °C 时达到最高, 其后逐渐降低, 这与葛氏鲈塘鳢心肌细胞上的电压门控钠离子通道在 20 °C 时电流峰值最大且通道的开放概率最大这一电生理特征具有一致性。而七彩神仙鱼的心率则在 14 ~ 31 °C 之间稳定升高, 这与其心肌细胞电压门控钠离子通道电流峰值和开放概率在 15 ~ 30 °C 的实验范围内随温度的升高而升高的电生理特性也一致。以上结果说明, 这 2 种鱼类的心率、心肌细胞电压门控钠离子通道复合电流对于温度的响应与其自身的温度耐受范围以及原产栖息地温度紧密相关。因此, 鱼类心肌细胞上的电压门控钠离子通道可能存在对温度的适应机制, 保证鱼类循环系统在不同温度下正常运行。

关键词: 葛氏鲈塘鳢; 七彩神仙鱼; 心; 心率; 电压门控钠离子通道; 温度适应

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 06-926-11

Temperature Response Characteristics of Sodium Channels in Cardiomyocytes of *Percottus glenii* and *Symphysodon aequifasciatus*

ZHAO Zi-Han YIN Chuan-Ling WANG Yun-Fei CHENG Kun* HUANG Pu-Yi*

College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: [Objectives] Temperature adaptation is very important for the survival of animals. However, there is still a lack of correlational research on the temperature adaptation of ectothermic animals such as fish. *Percottus glenii* can survive for several days in frozen environments, and *Symphysodon aequifasciatus* is a

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (No. 2572020BE01), 黑龙江省自然科学基金项目 (No. LH2022C017);

* 通讯作者, E-mail: chengkc@163.com, puyihuang@nefu.edu.cn;

第一作者介绍 赵紫寒, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物生理学; E-mail: joyzhaozihan@sina.com.

收稿日期: 2022-09-20, 修回日期: 2023-08-06 DOI: 10.13859/j.cjz.202322239

widely-reared tropical ornamental fish. These two species of fish were regarded as the representative of the cold-water fish and tropical fish in this study. **[Methods]** To investigate their temperature tolerance, we performed linear regression on the percentage of experimental fish that were out of balance at different temperatures and then interpolated the temperature value corresponding to 50% individual imbalance to obtain the critical temperature of the two fish species. We also measured their heart rate across the temperature gradient. Then the cardiomyocytes of *P. glenii* and *S. aequifasciatus* were acutely isolated, and whole-cell patch-clamp and temperature control techniques were also used to explore the electrophysiological characteristics of voltage-gated sodium channels in two kinds of fish cardiomyocytes at different temperatures (15 °C, 20 °C, 25 °C, and 30 °C). PatchMaster was used to record the original data, and Igor Pro 6.37 was used to fit the data and draw curves, the significance was inspected using one-way ANOVA. **[Results]** The temperature tolerance ranges of *P. glenii* and *S. aequifasciatus* were - 2.0 to 27.4 °C and 13.1 to 39.3 °C, respectively. The heart rate of *P. glenii* increased steadily from 0 °C to 19 °C, reached the highest at 19 °C, and then decreased gradually (Fig. 3), which was consistent with the electrophysiological characteristics of the voltage-gated sodium channel in the myocardial cells: voltage-gated sodium channels in the cardiomyocytes of *P. glenii* had the highest peak current (normalized current: -0.93 ± 0.11) and the highest opening probability (G50: -29.48 ± 0.33 mV) at the temperature of 20 °C (Fig. 4 and Fig. 6). The heart rate of *S. aequifasciatus* increased steadily from 14 °C to 31 °C, which was consistent with the electrophysiological characteristics that the peak current and open probability of voltage-gated sodium channel in cardiomyocytes increased with the increase of temperature within the experimental range between 15 °C and 30 °C, and voltage-gated sodium channels of *S. aequifasciatus* had the highest peak current (normalized current: -1 ± 0) and the highest opening probability (G50: -31.46 ± 0.33 mV) at 30 °C (Fig. 5 and Fig. 6). **[Conclusion]** These results indicate that the temperature response of the heart rate and voltage-gated sodium channel complex current in the cardiomyocytes of these two fish species is closely related to their own temperature tolerance range and the temperature of their native habitat. Therefore, the voltage-gated sodium channel of fish cardiomyocytes may play an important role in the temperature adaptation process of the two species of fish and maybe a key protein in the temperature adaptation of the two species of fish.

Key words: *Perccottus glenii*; *Symphysodon aequifasciatus*; Heart; Heart rate; Voltage-gated sodium channels; Temperature adaption

鱼类作为地球上最古老的脊椎动物,除了极少部分种类(约 30 种)外,大部分属于外温动物(Dickson et al. 2004, Vornanen 2016)。鱼类种类众多,分布广泛,几乎栖居于地球上所有的水生环境,如南极地区的鱼类可以在低于冰点的海水环境(-1.91 °C)中生存(Cziko et al. 2006);冷水鱼类如葛氏鲈塘鳢(*Perccottus glenii*)能够在结冰的环境中($-1.5 \sim 2$ °C)冬眠 3 个月(Karanova 2009);热带鱼类如七彩神仙鱼(*Symphysodon aequifasciatus*)的自然

栖息温度则为 28 °C 左右(Mattos et al. 2015)。据统计,鱼类的温度耐受范围为 $-2.5 \sim 44$ °C (Somero et al. 1967, Bennett et al. 1997, Vornanen 2016)。不同于内温动物通过新陈代谢使体温维持在相对高而稳定的状态,外温动物如鱼类、两栖类与爬行类的体温接近于环境温度,因此需要采取特定策略以适应栖息地不同的环境温度。例如,龟类通过晒背,沙漠蜥蜴通过阴阳穿梭等方式进行体温调节。

循环呼吸能力被认为是影响鱼类温度耐受

范围的关键因子,在体温随着环境温度变化期间,不同的循环呼吸能力意味着不同的氧供应能力,进而影响机体的正常运转(Pörtner et al. 2017, Dahlke et al. 2020)。心率是调节鱼类循环系统的主要因素,其对温度敏感且对温度具有依赖性(Farrell 2009, Vornanen 2017)。在鱼类适应温度变化的过程中,心肌细胞产生的动作电位的电兴奋需要根据心率的变化进行调节,这需要心肌细胞达到电兴奋与电稳定的平衡,也就是说,在心率调节的过程中心肌细胞既要维持动作电位收缩、舒张的持续时间平衡,还要防止心律不齐(Vornanen 2017)。电压门控钠离子通道(voltage-gated sodium channel, VGSC)在心电兴奋性、稳定性及传导上扮演着关键角色。这类离子通道由形成孔区的 α 亚基和辅助 β 亚基组成,可以产生去极化的钠离子内流电流(I_{Na}),其负责产生动作电位0期的上升支,决定心电兴奋的冲动传导和传导速度,且在参与心室肌细胞动作电位的重要离子通道(钾离子通道、钠离子通道和钙离子通道)中,由钠离子通道产生的 I_{Na} 热敏感性最强(Haverinen et al. 2004),因此,推测电压门控钠离子通道可能在鱼类温度适应过程中起到一定的作用。

葛氏鲈塘鳢主要栖息于高寒地区的浅水区,在水面完全被冰覆盖的环境条件下仍能存活(Karanova 2009),而原产于南美洲亚马孙河流域的七彩神仙鱼作为热带鱼类,能够适应高温水域的生存条件。本研究选取这2种温度适应范围存在显著差异的鱼类作为冷水鱼类和热带鱼类的代表,通过研究这2种鱼类的温度耐受范围、不同温度梯度下的心率变化以及温度对其心肌细胞电压门控钠离子通道的电生理特征的影响,探索鱼类除行为热调节与内分泌热调节外蛋白分子层面可能的温度适应机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验对象是成体葛氏鲈塘鳢和七彩神仙

鱼,分别来源于水产市场及观赏鱼市场,鱼类体况状态良好并饲养于适宜温度下。

1.2 2种鱼类临界温度的测定

葛氏鲈塘鳢和七彩神仙鱼各分为2组,即升温组和降温组,每组24条,每组再分为3小组,每小组8条,做平行实验。测定前提前在水槽中加注充分曝气及经过控温后与两种鱼类适宜温度相近的自来水,葛氏鲈塘鳢20℃左右,七彩神仙鱼28℃左右,安置好温度计,同时用报纸围住水槽,防止阳光直晒和人为活动惊吓等对实验鱼造成不必要的干扰。进行临界高温值的测定时,将一组实验鱼转移到水槽中,使其适应约10 min,观察等待其状态稳定后开始加入热水进行升温。实验结束后,更换槽内的水,进行下组实验。进行临界低温值的测定时,同样将一组实验鱼转移到水槽中,使其适应约10 min,观察等待其状态稳定后开始加入冰进行降温。在变温过程中对每条实验鱼失去平衡时的温度进行观察和记录。

1.3 2种鱼类心率的测定

葛氏鲈塘鳢和七彩神仙鱼各4条做平行实验。将实验鱼处死后,快速切除心并取出,将心置于盛有生理溶液(NaCl 102 mmol/L, KCl 1.6 mmol/L, CaCl₂ 1.3 mmol/L, NaHCO₃ 2.4 mmol/L, NaH₂PO₄·2H₂O 0.06 mmol/L, 葡萄糖 11 mmol/L)的培养皿中部,葛氏鲈塘鳢心率实验的初始生理溶液温度约为0℃,七彩神仙鱼则约为14℃。将温度记录仪探头浸没在生理溶液水面下以随时记录温度。用3个导联线夹住培养皿边缘并与培养皿内的生理溶液接触,记录心电波形。记录实验过程中每个整数温度取4段有明显规律的心电波形,确定升温过程中心率的变化情况。在室内培养皿的温度会逐渐升高,随时记录,当超过室温以后继续用灯加热升温,至肉眼观察到心不再跳动且心电图出现明显的不规律波形为止。

1.4 2种鱼类心肌细胞急性分离

葛氏鲈塘鳢和七彩神仙鱼各3条做平行实验。将实验鱼处死并迅速取出心,主动脉插管

插入主动脉, 成功后固定于灌流装置上, 用鱼心灌流液 (NaCl 137 mmol/L, KCl 4.6 mmol/L, MgCl₂·6H₂O 1 mmol/L, NaH₂PO₄·2H₂O 3.5 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, NaOH 调 pH 至 7.4) 灌注 30 min。灌注结束后剪下心组织置于富氧 DMEM 培养基 (ThermoFisher) 中, 用维纳斯剪 (北京百隆兴达) 将其剪碎, 加入胶原蛋白酶 (1.5 g/L, Solarbio) 和胰蛋白酶 (0.5 g/L, Solarbio), 在 37 °C 条件下消化 20 min。待心组织消化完成后, 加入 DMEM 培养基终止消化, 并在室温 (22 ~ 26 °C) 下用离心机 (5424R, Eppendorf) 在转速 800 ~ 1 000 r/min 的条件下离心 3 min, 以去除培养基。用新鲜的细胞培养液 (10% FBS, ThermoFisher; 0.1% 双抗, Cytiva) 重新悬浮心肌细胞, 分装到细胞培养皿中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱 (BPN-50CH (UV), 上海一恒科学仪器有限公司) 中进行培养, 2 ~ 3 h 待细胞贴壁后准备进行实验。

急性分离及培养出的鱼类心肌细胞大部分形态良好、边缘锐利, 可用于膜片钳实验 (图 1)。

1.5 膜片钳功能验证

1.5.1 微电极拉制 使用玻璃电极拉制仪

(P-97, Sutter) 通过五步拉制法制备硼硅酸盐玻璃微电极, 高温抛光后置于电极防尘盒中备用, 其阻抗为 3 ~ 5 MΩ。

1.5.2 全细胞膜片钳记录

打开膜片钳放大器 (EPC10 USB, HEKA), 将温度控制灌流装置 (自制, 图 2)、温度探测系统 (HCT-30, ALA Scientific) 连接于膜片钳工作台上, 微电极中灌注细胞内液 (CsF 140 mmol/L, NaCl 10 mmol/L, HEPES 5 mmol/L, CsOH 调 pH 至 7.4)。把贴壁的两种鱼类原代心肌细胞从培养箱中取出, 放入盛有细胞外液 (NaCl 140 mmol/L, CaCl₂ 1 mmol/L, KCl 3 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, CsOH 调 pH 至 7.4) 的培养皿中开始实验。在倒置显微镜 (CKX53, Olympus) 下从每条鱼的原代心肌细胞中选择至少 3 个状态良好的心肌细胞进行膜片钳实验。使用微操纵器 (MP-225, Sutter) 使电极尖端接触所选取的细胞, 稍加负压待电极与细胞膜形成高阻封接 (1 ~ 5 GΩ) 后, 进行快电容补偿, 并将细胞膜电位钳制于 -80 mV, 继续施加负压, 吸破细胞膜, 形成全细胞记录模式。通过温度控制灌流装置, 在 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C 这 4 种不同温度下给予该

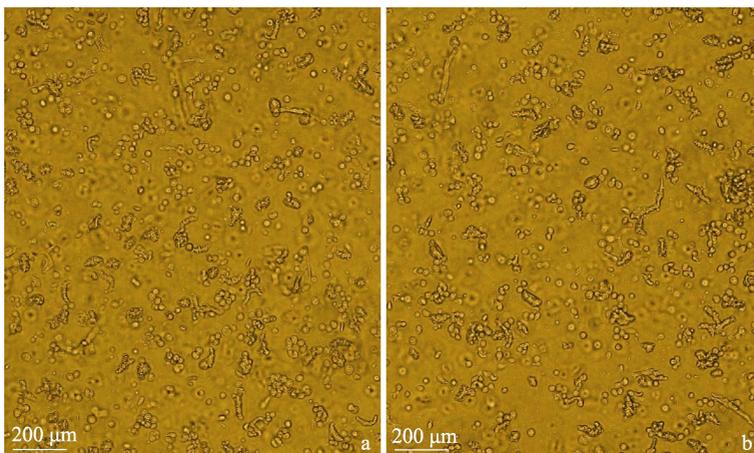


图 1 用于膜片钳实验的鱼类心肌细胞形态

Fig. 1 The morphology of fish cardiomyocytes for patch-clamp experiment

a. 葛氏鲈塘鳢心肌细胞; b. 七彩神仙鱼心肌细胞。

a. Cardiomyocytes of *Perccottus glenii*; b. Cardiomyocytes of *Symphysodon aequifasciatus*.

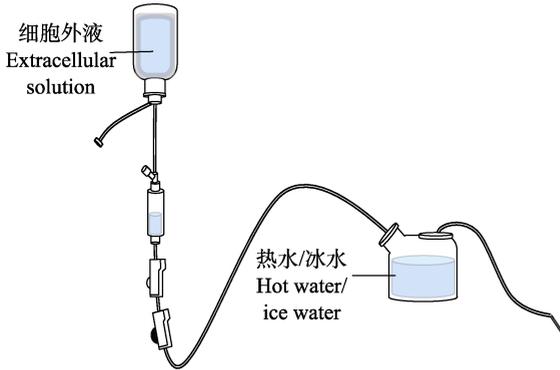


图 2 自制温度控制灌流装置

Fig. 2 Schematic diagram of self-made temperature controlled perfusion device

心肌细胞一个指令电压 - 80 ~ 90 mV、阶跃 10 mV、持续时间 100 ms 的方波串刺激，以记录其在不同温度下电压门控钠离子通道激活电流情况。

1.6 数据处理

1.6.1 2 种鱼类的临界温度 使用 Excel 2019 对不同温度下失衡的实验鱼的百分比进行线性回归，再由内插法得到 50% 个体失衡所对应的温度值，求得 2 种鱼的临界温度。

1.6.2 2 种鱼类的心率 根据温度记录仪记录的整数温度，通过电脑软件计算每个特定温度时取用的 4 组心电波形的心率，取平均值；再综合整理 3 组平行实验的数据，Excel 2019 计算平均值和标准差。

1.6.3 膜片钳实验 使用 PatchMaster 软件记录得到膜片钳实验的原始数据，导入 Excel 2019 中，通过将一组中的所有数据除以该组中绝对值最大的数据进行标准化处理。标准化处理后的数据使用 Igor Pro 6.37 软件作图，2 种鱼在不同温度下的电压门控钠离子通道复合电流（同一类型离子通道多个家族形成的综合电流）的变化图用 Gauss 函数进行拟合，不同温度下电压门控钠离子通道电导的变化图用 Boltzmann 函数进行拟合。利用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析，数据采用平均值 \pm 标准误差表示， $P < 0.05$ 视为差异具有显著性。

2 结果

2.1 2 种鱼类的临界温度

为确定葛氏鲈塘鳢和七彩神仙鱼在个体水平上的温度耐受性，测定了 2 种鱼的临界温度。结果显示，葛氏鲈塘鳢的临界低温值为 $(-2.0 \pm 0.2) ^\circ\text{C}$ ，临界高温值为 $(27.4 \pm 1.0) ^\circ\text{C}$ 。七彩神仙鱼的临界低温值为 $(13.1 \pm 0.4) ^\circ\text{C}$ ，临界高温值为 $(39.3 \pm 0.6) ^\circ\text{C}$ 。两种鱼类的临界温度范围差异较大，适于作为鱼类温度适应性对比的研究对象，且温度范围与两种鱼类的原产栖息地温度相关：主要生活于高纬度寒冷地区的葛氏鲈塘鳢的临界温度范围偏低温，而原产于南美洲亚马孙河流域的热带鱼类七彩神仙鱼的临界温度范围偏高温。

2.2 温度梯度下 2 种鱼类的心率变化

为确定葛氏鲈塘鳢和七彩神仙鱼心率调节能力与温度的关系，记录了在温度梯度变化下 2 种鱼离体心的心率变化（图 3）。葛氏鲈塘鳢的心率从 $0 ^\circ\text{C}$ 开始随温度升高而稳定增加，在 $19 ^\circ\text{C}$ 出现拐点后逐渐下降， $27 ^\circ\text{C}$ 时心跳停止。七彩神仙鱼的心率从 $14 ^\circ\text{C}$ 开始也随着温度的升高而稳定增加，在 $31 ^\circ\text{C}$ 出现拐点后逐渐下降，并于 $38 ^\circ\text{C}$ 时心跳停止。结果表明，葛氏鲈塘鳢和七彩神仙鱼的心率调节范围存在明显差异，但与其在个体上的温度耐受范围一致，因此可以推测鱼类心存在与其温度耐受性相关的关键蛋白受体。

2.3 温度调控下 2 种鱼类电压门控钠离子通道的电生理特征

2.3.1 葛氏鲈塘鳢电压门控钠离子通道的电生理特性 葛氏鲈塘鳢为低温生存代表性鱼类，我们首先测定了葛氏鲈塘鳢原代心肌细胞的电压门控钠离子通道复合电流（图 4a），以膜电位为横坐标，以进行标准化处理后的电流为纵坐标绘制电流-电压 ($I-V$) 曲线（图 4b）。在 $20 ^\circ\text{C}$ 时，葛氏鲈塘鳢的电压门控钠离子通道电流峰值最大，为 -0.93 ± 0.11 ，之后温度升高到 $25 ^\circ\text{C}$ 和 $30 ^\circ\text{C}$ 时电压门控钠离子通道电流

峰值都显著降低 ($P < 0.05$)。

葛氏鲈塘鳢原代心肌细胞的电压门控钠离

子通道的电导变化以电导-电压 ($G-V$) 曲线 (图 4c) 表示, 其纵坐标为进行标准化处理后的电

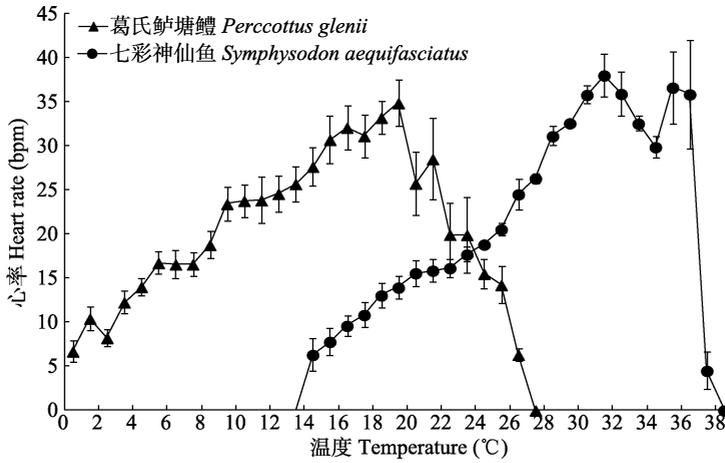


图 3 温度梯度下两种鱼类的心率变化

Fig. 3 Heart rate changes of two species of fish under temperature gradient

bpm 表示每分钟心跳的次数。bpm means beats per minute.

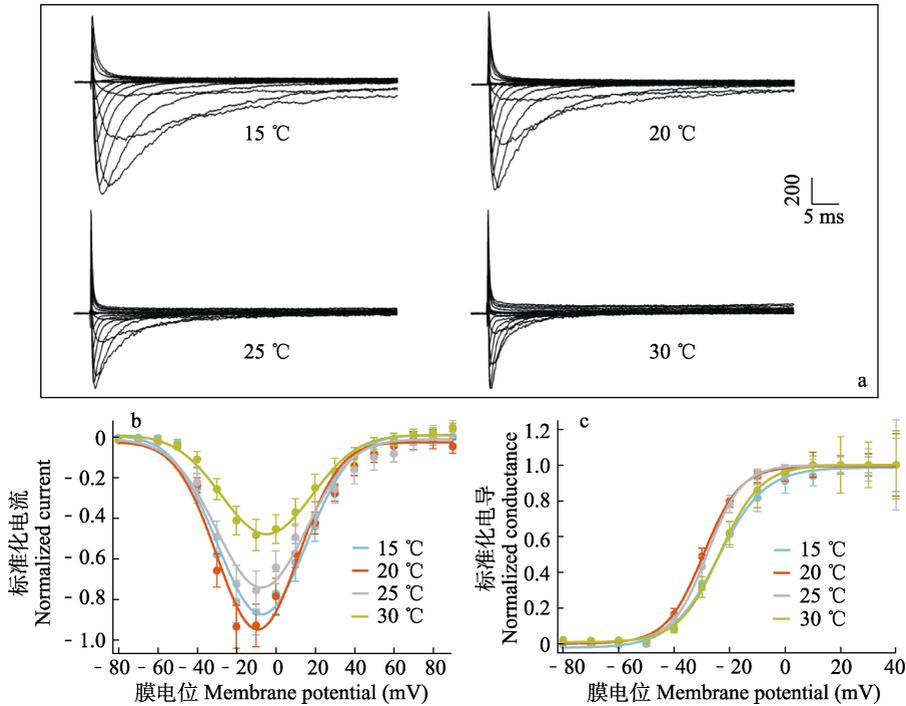


图 4 温度对葛氏鲈塘鳢心肌细胞电压门控钠离子通道的影响

Fig. 4 Effects of temperature on voltage-gated sodium channels in cardiomyocytes of *Percottus glenii*

a. 电压门控钠离子通道产生的内向电流; b. 电流-膜电位 ($I-V$) 曲线; c. 电导-膜电位 ($G-V$) 曲线。

a. Inward current generated by the voltage-gated sodium channel; b. Current-membrane potential ($I-V$) curve; c. Conductivity-membrane potential ($G-V$) curve.

导，通道电导表现出和 $I-V$ 曲线类似的变化趋势，即葛氏鲈塘鳢电压门控钠离子通道的 $G-V$ 曲线在 20 °C 时向左偏移最多。这与葛氏鲈塘鳢的在温度梯度下的心率数据一致，其心率在 19 °C 达到最高。

2.3.2 七彩神仙鱼电压门控钠离子通道的电生理特性 七彩神仙鱼为高温生存代表性鱼类，在 15 ~ 30 °C 温度范围内，其钠离子电流峰值大小随温度升高而升高(图 5a, b)，在 30 °C 时通道电流峰值最大，为 -1.00 ± 0.00 ，其与 15 °C 和 20 °C 的钠离子电流峰值差异显著 ($P < 0.05$)。而通道电导的变化具有相似的特征，即七彩神仙鱼的电压门控钠离子通道的电导-电压($G-V$)曲线在 30 °C 时向左偏移最多(图 5c)。这与七彩神仙鱼在温度梯度下的心率数据也一致，其心率在 31 °C 达到最高。

2.4 2 种鱼类心肌细胞电压门控钠离子通道的电生理特性比较

为了进一步探究 2 种鱼类心肌电压门控钠离子通道对温度的反应，对 2 种鱼类心肌细胞在不同温度下的电压门控钠离子通道的峰值电流(图 6a)，以及不同温度下通道开放 50% 时对应的激活电压 (G_{50}) (图 6b) 进行比较。在 15 ~ 30 °C 范围内，冷水鱼类葛氏鲈塘鳢心肌细胞的电压门控钠离子通道在 20 °C 时电流峰值最大且 G_{50} 最低，为 (-29.48 ± 0.33) mV，这表明其心肌细胞的电压门控钠离子通道在温度较低时通道的开放概率最大。而热带鱼类七彩神仙鱼的电压门控钠离子通道在 30 °C 时电流峰值最大且 G_{50} 最低，为 (-31.46 ± 0.33) mV，这表明其心肌细胞的电压门控钠离子通道在温度较高时通道的开放概率最大。

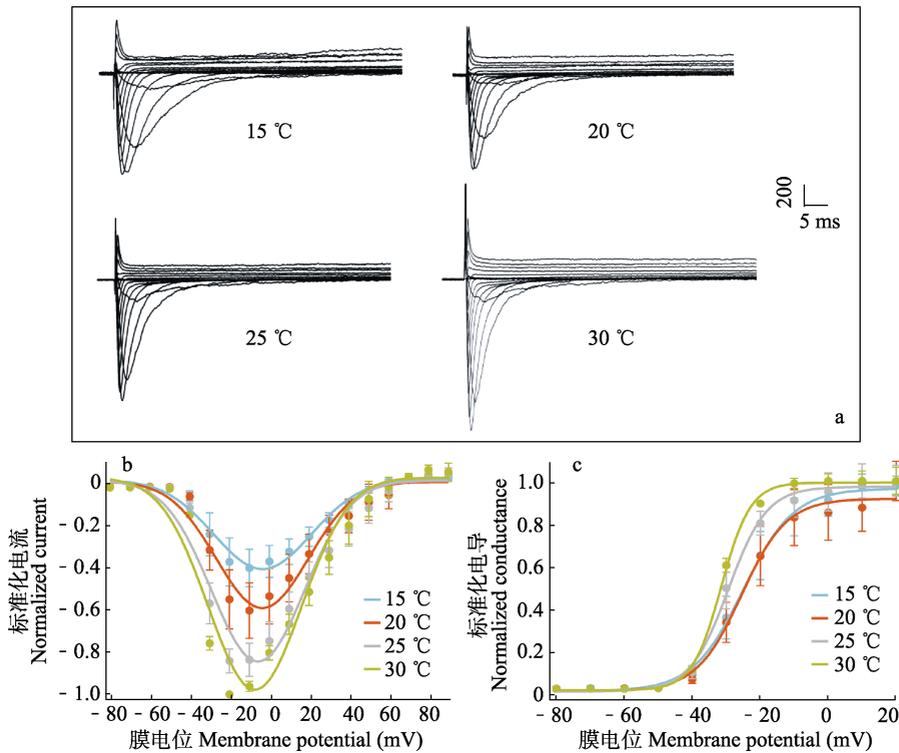


图 5 温度对七彩神仙鱼心肌细胞电压门控钠离子通道的影响

Fig. 5 Effects of temperature on voltage-gated sodium channels in cardiomyocytes of *Symphysodon aequifasciatus*

a. 电压门控钠离子通道产生的内向电流; b. 电流-膜电位 ($I-V$) 曲线; c. 电导-膜电位 ($G-V$) 曲线。
 a. Inward current generated by the voltage-gated sodium channel; b. Current-membrane potential ($I-V$) curve; c. Conductivity-membrane potential ($G-V$) curve.

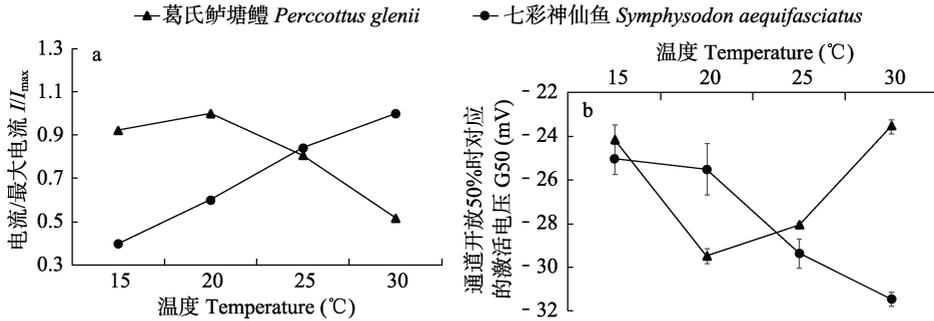


图 6 温度对 2 种鱼类心肌细胞电压门控钠离子通道电生理特征的影响

Fig. 6 The effects of temperature on electrophysiological characteristics of voltage-gated sodium channels in cardiomyocytes of two fish species

两种鱼类心肌细胞在不同温度下, a. 电压门控钠离子通道的峰值电流的对比 (I/I_{max}); b. 电压门控钠离子通道开放 50% 时对应的激活电压 (G50) 的对比。

Cardiomyocytes of two kinds of fish at different temperatures: a. The comparison of peak current of voltage-gated sodium channels (I/I_{max}); b. The comparison of activation voltage when voltage-gated sodium channels are 50% open (G50).

3 讨论

温度作为重要的生态因子,对动物的生存、繁殖、行为、分布等有着直接或间接的影响,且由于地球气候的变化,动物的温度生存适应一直为相关领域的研究热点。

作为外温动物的鱼类对于温度的适应存在种间差异,甚至同一物种的不同地理种群对温度的耐受范围也存在不同,不同的地理种群会形成与当地环境温度相适应的循环呼吸能力,由此出现温度耐受范围的差异。例如红大马哈鱼 (*Oncorhynchus nerka*) 在河流洄游过程中为了适应当地环境条件,不同种群的循环呼吸生理表现出明显不同,耗氧、循环和心率范围的最适温度与每个种群的历史河流温度范围一致 (Eliason et al. 2011)。对于三种斑马鱼的研究则发现,当它们处于适宜的温度范围内,其心率会随温度升高而增加,当接近耐受温度时,它们的心率会出现明显的异常 (Sidhu et al. 2014)。对其他多种鱼类的类似研究中也发现相同的趋势,它们的心率对温度具有明显的依赖性 (Farrell 2009),且当接近其高温上限时,其心率会出现明显的降低 (心动过缓)。在本研究中,在温度梯度下对葛氏鲈塘鳢和七彩神仙鱼

的心率记录也发现,当接近这两种鱼类的温度耐受上限时,它们的心率出现了明显的降低,甚至心跳停止。以往研究及本研究都表明,心功能是鱼类耐受高温的限制因子。

研究人员通过记录虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的心电图发现,在接近高温耐受上限时,虹鳟之所以出现了心率异常,是因为其心出现了 2:1 甚至 3:1 房室传导阻滞 (Haverinen et al. 2020)。在哺乳动物的心中,房室传导阻滞主要有三类,即一度、二度和三度传导阻滞。高温诱导的鱼类房室阻滞类似于哺乳动物中二度 II 型房室传导阻滞,且出现 QRS 波群的增宽,因此鱼类的该房室传导阻滞不是由于房室管 (与哺乳动物房室结同源的结构) 内脉冲传导的失败,而是与心室兴奋的抑制有关 (Vornanen 2020)。

鱼类心肌细胞的电兴奋性是由 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 等离子的电化学梯度驱动,离子的不均匀分布和细胞膜内外的电压差为离子通过离子选择性通道提供了驱动力,当膜电位变化或外部配体与通道蛋白结合时,离子通道被打开 (Sands et al. 2005),而离子通道的开启和关闭导致了动作电位的产生,这些动作电位在心传播,并导致心房和心室的收缩。其中,电压门

控钠离子通道产生的 Na^+ 电流 (I_{Na}) 是导致细胞膜去极化的主要电流, 电压门控钠离子通道的打开速度非常快, 一旦达到阈值电压, 心肌细胞所有可用的电压门控钠离子通道都将在几毫秒内打开, 这将导致大量 Na^+ 内流, 而后大部分电压门控钠离子通道通过快速失活机制而自发关闭, 动作电位进入复极化阶段, 因此, I_{Na} 对于鱼类心房和心室动作电位的产生是必要的, 并决定了通过心的脉冲传导速率。

除了内向的钠离子电流 I_{Na} 外, 以往的研究表明, 外向的钾离子电流 I_{K1} 对于心动电位的启动也十分重要。在静息状态下, 细胞质膜主要通过钾离子通道的离子外流来维持负的静息电位 (Hibino et al. 2010), 细胞的电激发需要向内的钠离子电流流入细胞并使静息膜电位去极化到阈值电位, 而对这两种拮抗离子电流的研究发现, 它们的温度依赖性有很大的不同, I_{K1} 具有更强的耐热性, 并且会随着温度的升高线性增加 (Vornanen et al. 2014, Badr et al. 2018)。也就是说, 温度越高, 静息质膜的电阻 R_m 越小, 细胞质膜的静息电位越负, 因此将膜电位从静息电位改变到阈值电位所需的内向电流越大, 但由于内向的 I_{Na} 对于温度敏感程度高于 I_{K1} (Vornanen et al. 2014, Badr et al. 2018), 这使得 I_{Na} 随着温度的增加而增加的趋势在相对更低的温度条件下停止并且开始下降, 理论上最终导致在某一温度条件下, 内向的 I_{Na} 不足以将膜电位从静息电位改变到阈值电位, 从而使得动作电位启动失败, 无法继续在心中传导。

对葛氏鲈塘鳢和七彩神仙鱼原代心肌细胞的电压门控钠离子通道电流的研究表明, 主要生活于高纬度寒冷地区的葛氏鲈塘鳢心肌细胞电压门控钠离子通道在较低温度 ($15 \sim 20^\circ\text{C}$) 时通道的开放概率较高, 单个离子通道的开放是“全或无”的, 在有数个离子通道的细胞膜上, 膜对于离子的通透度取决于所对应离子通道开放概率的高低。这表明葛氏鲈塘鳢的心肌细胞膜在较低温度时对于钠离子的通透度较

高, 因此在低温时该种鱼类心肌细胞的电压门控钠离子通道能保持较好的功能。这对于心的电活动尤为重要。但在温度较高时, 即超过 20°C 时, 电压门控钠离子通道功能受到抑制, 这样的结果也与葛氏鲈塘鳢心率在 19°C 时最大, 但随着温度的升高心率逐渐降低的现象具有一致性。而热带鱼类七彩神仙鱼的自然栖息地温度在 $24 \sim 33^\circ\text{C}$ 之间, 相对于葛氏鲈塘鳢的栖息地温度更高, 其心肌细胞电压门控钠离子通道对于温度的响应则是在较低温时开放概率低, 这表明其功能受到抑制。而在七彩神仙鱼更适宜的温度下, 即相对更高温的 30°C 时通道开放概率最大, 这与七彩神仙鱼心率实验结果也一致。因此, 这 2 种鱼类的心率以及心肌细胞电压门控钠离子通道对于温度的响应都与其自身的温度耐受范围以及适应的原产栖息地温度相关。猜测鱼类心的电压门控钠离子通道已根据其适应的栖息地温度发生了特化, 在其生存可能遇到的温度范围内, I_{Na} 随着温度的上升增加, 以抵消 I_{K1} 随温度增加导致的静息电位变得更负的问题。而当温度超过该温度范围, 鱼类心的电压门控钠离子通道功能受到抑制, 并最终导致动作电位的传导失败, 且对于鱼类心房肌细胞的研究发现, 心房 I_{K1} 的密度较小, 因此心房肌细胞的输入电阻大约比心室肌细胞高一个数量级, 这使得心房肌细胞更易兴奋 (Vornanen et al. 2002, Haverinen et al. 2009, Abramochkin et al. 2015, Badr et al. 2017), 结果表现为鱼类心电图在温度耐受上限附近所出现的房室传导阻滞现象和心率下降。综上所述, 电压门控钠离子通道在 2 种鱼类心的温度适应过程中发挥着重要的功能, 是 2 种鱼类心的温度适应关键蛋白。

电压门控钠离子通道中的 $\text{Na}_v1.5$ 是心肌细胞主要表达的钠通道。由于突变或其他原因导致的 $\text{Na}_v1.5$ 功能障碍会引起严重的心律失常, 甚至危及生命 (Liu et al. 2003)。虽然其他电压门控钠离子通道在心中也有表达, 但它们都无法弥补 $\text{Na}_v1.5$ 的功能障碍所造成的后果,

这凸显了该钠离子通道在心生理和病理生理学中的重要性 (Jiang et al. 2020)。而目前对于 $\text{Na}_V1.5$ 与温度之间关系的研究主要集中于人和哺乳类, 例如, 人 $\text{Na}_V1.5$ 突变体 E1784K 表现出强热敏感性, 当发热或运动引起升温后通过控制钠离子通道门控改变 I_{Na} , 产生较大的持续电流, 从而引起心律不齐 (Abdelsayed et al. 2015)。与人和哺乳类相比, 鱼类的钠通道直系同源基因表现出结构和功能的多样性 (Hoekstra et al. 2007)。而在哺乳类和鱼类的钠通道基因之间存在大量基因分化, 导致了这两类动物分支直系同源基因的多样性 (Jegla et al. 2009)。由于不同鱼类具有差异性的钠通道基因, 使得不同鱼类心的 I_{Na} 动力学对温度变化的响应可能也不同, 由此造成功能差异, 使得不同的鱼类可以适应不同的生境温度, 对于这些结构及功能差异的电生理特征和分子机制我们仍需进行探究。

参 考 文 献

- Abdelsayed M, Peters C, HRuben P C. 2015. Differential thermosensitivity in mixed syndrome cardiac sodium channel mutants. *The Journal of Physiology*, 593(18): 4201–4223.
- Abramochkin D, Vornanen M. 2015. Seasonal acclimatization of the cardiac potassium currents (I_{K1} and I_{Kr}) in an arctic marine teleost, the Navaga Cod (*Eleginus navaga*). *Journal of Comparative Physiology B*, 185(8): 883–890.
- Badr A, Hassinen M, El-Sayed M F, et al. 2017. Effects of seasonal acclimatization on action potentials and sarcolemmal K^+ currents in Roach (*Rutilus rutilus*) cardiac myocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 205: 15–27.
- Badr A, Korajoki H, Abu-Amra E S, et al. 2018. Effects of seasonal acclimatization on thermal tolerance of inward currents in Roach (*Rutilus rutilus*) cardiac myocytes. *Journal of Comparative Physiology B*, 188(2): 255–269.
- Bennett W A, Beitinger T L. 1997. Temperature Tolerance of the Sheepshead Minnow, *Cyprinodon variegatus*. *Copeia*, 1997(1): 77–87.
- Cziko P A, Evans C W, Cheng C H, et al. 2006. Freezing resistance of antifreeze-deficient larval Antarctic fish. *The Journal of Experimental Biology*, 209(3): 407–420.
- Dahlke F T, Wohlrab S, Butzin M, et al. 2020. Thermal bottlenecks in the life cycle define climate vulnerability of fish. *Science*, 369(6499): 65–70.
- Dickson K A, Graham J B. 2004. Evolution and consequences of endothermy in fishes. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77(6): 998–1018.
- Eliason E J, Clark T D, Hague M J, et al. 2011. Differences in thermal tolerance among sockeye salmon populations. *Science*, 332(6025): 109–112.
- Farrell A P. 2009. Environment, antecedents and climate change: lessons from the study of temperature physiology and river migration of salmonids. *Journal of Experimental Biology*, 212(23): 3771–3780.
- Haverinen J, Vornanen M. 2004. Temperature acclimation modifies Na^+ current in fish cardiac myocytes. *Journal of Experimental Biology*, 207(16): 2823–2833.
- Haverinen J, Vornanen M. 2009. Responses of action potential and K^+ currents to temperature acclimation in fish hearts: Phylogeny or thermal preferences? *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(5): 468–482.
- Haverinen J, Vornanen M. 2020. Reduced ventricular excitability causes atrioventricular block and depression of heart rate in fish at critically high temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 223(12): jeb225227.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, et al. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews*, 90(1): 291–366.
- Hoekstra H E, Coyne J A. 2007. The locus of evolution: Evo devo and the genetics of adaptation. *Evolution*, 61(5): 995–1016.
- Jegla T J, Zmasek C M, Batalov S, et al. 2009. Evolution of the human ion channel set. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 12(1): 2–23.
- Jiang D, Shi H, Tonggu L, et al. 2020. Structure of the cardiac sodium channel. *Cell*, 180(1): 122–134.e110.
- Karanova M V. 2009. Free amino acid composition in blood and

- muscle of the gobi *Precottus glehni* at the period of preparation and completion of hibernation. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 45(1): 67–77.
- Liu H, Clancy C E, Cormier J W, et al. 2003. Mutations in cardiac sodium channels. *American Journal of Pharmacogenomics*, 3(3): 173–179.
- Mattos D D, Cardoso L D, Fosse P J, et al. 2015. Description of the ontogenic and larval period of Discus Fish (*Symphysodon aequifasciatus*). *Zygote*, 23(3): 460–466.
- Pörtner H-O, Bock C, Mark F C. 2017. Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: Bridging ecology and physiology. *Journal of Experimental Biology*, 220(15): 2685–2696.
- Sands Z, Grottesi A, Sansom M S. 2005. Voltage-gated ion channels. *Current Biology*, 15(2): 44–47.
- Sidhu R, Anttila K, Farrell A P. 2014. Upper thermal tolerance of closely related Danio species. *Journal of Fish Biology*, 84(4): 982–995.
- Somero G N, DeVries A L. 1967. Temperature tolerance of some Antarctic fishes. *Science*, 156(3772): 257–258.
- Vornanen M. 2016. The temperature dependence of electrical excitability in fish hearts. *Journal of Experimental Biology*, 219(13): 1941–1952.
- Vornanen M. 2017. Electrical excitability of the fish heart and its autonomic regulation // Gamperl A K, Gillis T E, Farrell A P et al. *Fish Physiology*. London: Academic Press, 99–153.
- Vornanen M. 2020. Feeling the heat: source-sink mismatch as a mechanism underlying the failure of thermal tolerance. *Journal of Experimental Biology*, 223(16): jeb225680.
- Vornanen M, Haverinen J, Egginton S. 2014. Acute heat tolerance of cardiac excitation in the Brown Trout (*Salmo trutta fario*). *Journal of Experimental Biology*, 217(2): 299–309.
- Vornanen M, Ryökkinen A, Nurmi A. 2002. Temperature-dependent expression of sarcolemmal K^+ currents in rainbow trout atrial and ventricular myocytes. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(4): 1191–1199.