

鱼类白化病的研究进展*

ADVANCES ON THE STUDIES OF FISH ALBINISM

黄冰 郭华荣 张士瑾

(中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

中图分类号 S941 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)05-0011-04

白化病是由于动物的眼睛和皮肤中的黑色素细胞缺乏或黑色素的生成发生障碍所导致的一种体色异常病。在各种脊椎动物,如哺乳动物、两栖类、鸟类和鱼类中都常有白化个体出现。由于白化个体通常会伴随着一系列病理学上的改变,如贫血、内耳功能缺陷、巨结肠、骨硬化症、小眼和神经系统疾病等^[1],又由于缺乏保护色,易被天敌捕食,因而白化个体在自然环境中的生存能力大大低于正常个体,这也是野生白化个体比较少见的主要原因。

近10年来,人们对于白化病的研究和认识有了很大的进展。对于白化病的研究,以哺乳动物如人和小鼠中开展得最多。研究表明,在哺乳动物、两栖类、鸟类和青鳞鱼中,引起白化病的主要原因是与酪氨酸酶基因的突变有关,是一种常染色体隐性遗传病。但是 Nakamura 等^[2]在虹鳟中分离出一个白化个体,其白化与酪氨酸酶无关,是一种显性遗传病,具体与哪一种酶有关目前尚不清楚。另一方面, Kajishima 等^[3]证明金鱼的白化则是由两个常染色体基因控制的隐性遗传病,其中基因 C 对基因 P 和 p 是上位显性的。

鱼类白化病的研究报道有限,涉及的鱼类主要有青鳞鱼^[4~10]、虹鳟^[2]、斑马鱼^[11,12]、大菱鲆^[13,14]、牙鲆^[15]和金鱼^[3]等。但研究表明,鱼类的白化要比哺乳动物复杂得多。尤其是人工养殖的重要经济鱼类——鲆鲽类如大菱鲆,其白化率可高达100%,而且常常是白化皮肤与正常皮肤镶嵌分布于同一个体的身体表面,从视觉上难以被消费者接受,因而大大影响了商品的市场价格。所以研究如何防治鱼类特别是经济鱼类的白化病问题,在水产养殖上具有重要的理论和实际意义。

1 鱼类白化病的致病机理

白化病是由于色素细胞的发育或色素的生成出

现异常所导致的一种体色异常病,因而任何一种遗传缺陷或生理生化改变,只要能够干扰鱼类黑色素细胞发育和分化过程中的任一环节,或者干扰黑色素生成过程中的任一环节,都会导致鱼类白化病的发生。因此,不同种类或同一种类中不同个体之间,鱼类白化病的致病机制可能有很大的差别。下面,主要从鱼类色素细胞的发育分化、黑色素的生成、黑色素生成的关键酶(酪氨酸酶)、酪氨酸酶基因的突变等方面探讨鱼类白化病的可能致病机制。

1.1 鱼类的色素细胞

人的色素细胞有两种:真黑色素细胞和浅黑色素细胞。与此不同,鱼类的色素细胞有3种:黑色素细胞(含有黑色素)、黄色素细胞(含有黄色素)和银白色素细胞^[11]。这3种不同色素细胞在鱼类皮肤中的数量和分布的不同,表现为具有不同颜色和花纹的鱼类。

鱼类和其它脊椎动物的色素细胞都是由神经嵴细胞迁移到皮肤、眼睛或毛发等处,分化成前色素细胞如成黑色素细胞,再由前色素细胞分化形成黑色素细胞、黄色素细胞和银白色素细胞3种色素细胞。神经嵴细胞是一种多能干细胞,它不仅形成色素细胞,而且还形成外周神经系统的大部分及多种外胚层间质细胞,因而神经嵴细胞分化成色素细胞以及色素细胞的增殖和分布是受到严格调控的。Kelsh 等人^[12]报道,斑马鱼胚胎发育时期某些基因的突变可影响神经嵴细胞向色素细胞的发育分化。他将斑马鱼成黑色素细胞标记基因,即多巴色素互变异构酶基因导入

* 国家科技部 863 计划资助项目 2001AA628130 号。

第一作者:黄冰,出生于1978年,硕士。E-mail: qdhibing@yahoo.com.cn

收稿日期:2002-11-18;修回日期:2003-02-24

10 种体色异常突变纯合体的斑马鱼早期胚胎中, 通过多巴色素互变异构酶基因的表达, 来研究基因突变与成黑色素细胞的数目和分布之间的关系。结果发现, 在突变体中的成黑色素细胞的数目在起始阶段同正常的个体相同, 随个体的发育, 成黑色素细胞的数目明显减少, 并且分化和迁移也出现了异常。

1.2 黑色素的生成和酪氨酸酶

生物体内, 黑色素的生成是以酪氨酸为底物, 经

过一系列复杂的生化反应完成的(图 1)。酪氨酸酶又称为单酚单加氧酶或多酚氧化酶, 是一种含铜的酶, 兼有加氧酶和氧化酶两种功能。在黑色素生成过程中, 催化酪氨酸羟基化为多巴(dihydroxyphenylalanine, DOPA), 以及多巴氧化为多巴醌(DOPA quinone)的最初两步反应, 是黑色素合成的限速酶。此后, 多巴醌在空气中自发氧化形成黑色素。

酪氨酸酶由糙面内质网合成后, 被运送到高尔基

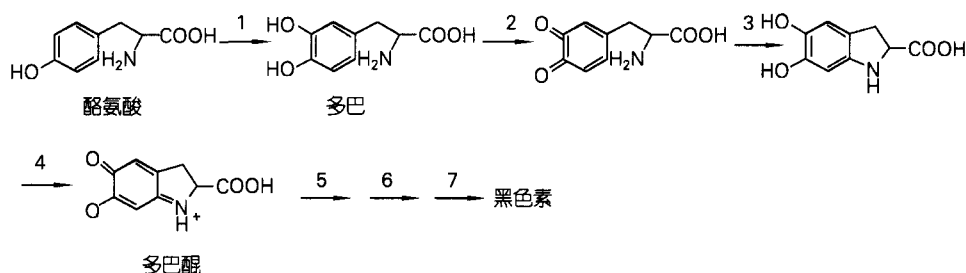


图 1 黑色素的生成

体, 经过高尔基体的加工和包装, 被运送到色素细胞的黑色素体中, 催化其中的酪氨酸氧化形成黑色素。对酪氨酸酶的结构研究发现: 酪氨酸酶中含有两个铜离子, 它的存在能促进酪氨酸酶的正确折叠, 并且两个铜离子表现出协同效应, 一个位点的连接有助于另一个位点的连接。在酪氨酸酶的铜离子结合位点中具有两个富含组氨酸的区域, 它们位于多肽的 N 末端, 对于酪氨酸酶多肽和铜离子的正确连接, 以及酪氨酸酶的酶活性都具有重要的作用^[16]。

酪氨酸酶是一种色素细胞专一性酶, 酪氨酸酶基因发生突变, 导致酪氨酸酶失活是脊椎动物白化病的一个重要原因。在人类中有两种白化(oculocutaneous albinism, OCA)类型: OCA1 和 OCA2, 两种患者的眼睛和皮肤中都缺乏色素。不同的是, OCA1 患者的眼睛和皮肤中检测不到酪氨酸酶活性, 而 OCA2 患者的眼睛和皮肤中可以检测到酪氨酸酶活性。研究表明, OCA1 患者可能的白化机制是酪氨酸酶基因发生某种突变, 产生的酪氨酸酶蛋白不能正确折叠, 被滞留在内质网中, 最终不能被转运到高尔基体中, 因而不能被包装分泌到黑色素体中形成黑色^[17, 18]; 而 OCA2 患者可能的白化机制是 P 基因编码专一性的酪氨酸转运蛋白, 该基因位点发生突变导致色素细胞中的酪氨酸不能穿膜运输到黑色素体中, 因而虽然酪氨酸酶是有活性的, 但由于缺乏相应的底物, 所以仍然不能形成黑色

素^[19]。

在小鼠中, 同样是 P 基因位点的突变却产生了与人类不同的表型: 粉眼小鼠, 即突变体的眼睛呈浅粉红色。Potterf 等人^[20]研究了体外培养的粉眼小鼠黑色素细胞系 melan-P1 的酪氨酸转运能力, 发现 melan-P1 细胞能将酪氨酸正常转运到黑色素体中, 但酪氨酸酶不能稳定存在于黑色素体中, 因而认为 P 基因的蛋白质产物的作用可能是与稳定酪氨酸酶的活性有关。Puri 等^[21]和 Fuller 等^[22]研究发现哺乳动物黑色素体中的 pH 值呈中性时, 有利于酪氨酸酶的活性和黑色素的生成, 而当黑色素体中的 pH 值呈酸性时, 则抑制酪氨酸酶的活性和黑色素的生成, 因而推测 P 基因蛋白的产物参与了黑色素体膜上的离子交换, 从而调控黑色素体中的 pH 值。

Halaban^[23]在 2001 年研究人恶性黑色素瘤细胞系时发现, 细胞能够表达正常的酪氨酸酶, 但被阻滞在内质网中, 不能生成黑色素。当向培养基中加入过量的 DOPA 或酪氨酸时, 可促进酪氨酸酶从内质网向高尔基体转运, 从而形成黑色素。Halaban 认为, 黑色素瘤白化突变细胞中具有酪氨酸酶, 可能是由于肿瘤细胞代谢方式发生了某种改变, 抑制了酪氨酸酶的活性和 DOPA 的生成, 因而发生白化。

在鱼类中, 尚未见有关黑色素生成和酪氨酸酶的报道, 但推测很可能也存在有类似哺乳动物的白化机

制。

1.3 酪氨酸酶基因

酪氨酸酶基因的突变可导致白化病的发生。酪氨酸酶基因的不同突变体产生白化程度不同的白化个体。随着不同生物的酪氨酸酶基因的克隆及其不同白化突变体的酪氨酸酶基因的分离鉴定,对于了解酪氨酸酶的生物学功能,包括酪氨酸酶的蛋白质合成、运输及其结构与功能的关系,有重大理论意义。但是,对于酪氨酸酶基因的隐蔽突变体对酶活性的影响以及确保视力正常发育所需的色素细胞最小量还不清楚^[24, 25]。

鱼类中, Inagaki 等人^[4]1998 年已把青鳞鱼的酪氨酸酶基因分离克隆出来, 其编码区为 4.7 kb, 包括 5 个外显子和 4 个内含子, 其外显子的数目和大小与哺乳动物相似, 但编码区总长度 (4.7 kb) 比哺乳动物的 1/10 还要小 (小鼠 ≈ 70 kb, 人 > 70 kb)。从青鳞鱼中分离出多个白化突变体, 对它们酪氨酸酶突变基因的分析表明, 缺失突变和转座子 (transposable element) 插入是导致白化的两种主要突变类型。实验证明: 将正常的酪氨酸酶基因转移到白化鱼体内, 转基因鱼的体色得到了不同程度的恢复^[5, 6, 26, 27]。

2 鱼类白化病的预防和治疗

不同种类鱼发生白化的机制不尽相同, 因而其防治白化病的措施也应该是不同的。人工养殖鲢鳙鱼类的白化率比其它鱼类的要高得多, 人们用改进营养的方式来治疗经济鱼类的白化病。例如: 通过把不饱和脂肪酸加到饲料中, 强化牙鲈仔稚鱼的营养, 明显降低牙鲈鱼的白化率。盐度也可以影响牙鲈仔稚鱼的白化率^[15]。Estevez 等^[13, 14]报道, 饲料中添加高剂量维生素 A 可降低大菱鲈的白化率, 但这又会明显提高仔鱼的畸形率; 饲料中添加不同的不饱和脂肪酸, 例如在幼体变态时用富含花生四烯酸 (ARA), 或二十二碳六烯酸 (DHA) 的饵料都可以影响色素的生成。

鲢鳙鱼类色素细胞的发育分化过程与其他鱼类是不同的, 分为两个阶段: (1) 在胚胎和幼体阶段与成体是不同的, 胚胎和幼体阶段的色素细胞在眼侧和腹侧都存在; (2) 幼体变态后, 幼体色素细胞消失, 出现成体色素细胞, 并且只分布于眼侧。鲢鳙鱼白化一般都发生在第二阶段, 因而关于人工养殖的鲢鳙鱼类的体色异常机制有两种观点: 一种认为变态时成体色素细胞不能在眼侧皮肤中正常分化, 从而导致白化病; 另一种认为营养不良抑制了视网膜的发育, 导致视力

差, 对光线的强弱产生错觉, 从而产生错误的激素信号使眼侧色素细胞不能正常发育分化^[28]。但是关于鲢鳙鱼类的白化机制尚不十分清楚, 有待于进一步研究。

酪氨酸酶基因突变是引起青鳞鱼等鱼类白化的一个重要原因, 因而采用基因治疗防治鱼类白化病也是一条重要的途径。Hyodo-Tagushi 等人^[7]在 1997 年将小鼠的酪氨酸酶基因导入青鳞鱼两种白化突变体的受精卵中, 使转基因鱼的色素呈嵌合式表达, 并且可稳定地传递给子代。Inagaki 等人^[8, 9]将青鳞鱼酪氨酸酶基因片段注射到白化突变体 (i 位点) 青鳞鱼的受精卵中, 结果大约 10% 胚胎的色素呈镶嵌式表达。Fu 等人^[10]在 2000 年将 17 kb 大小的青鳞鱼酪氨酸酶基因片段导入酪氨酸酶阴性的白化突变体青鳞鱼的受精卵中, 得到了 2 条性成熟色素嵌合体, 其中一条青鳞鱼的子代有 16% 的个体体色完全恢复正常。但是, 基因治疗防治鱼类白化病的可行性有赖于转基因技术的进一步成熟。

3 鱼类白化病研究的前景展望

对于酪氨酸酶基因突变导致的鱼类白化病的治疗, 基因治疗是一条有效的途径, 但转基因技术的提高是关键。对青鳞鱼多个白化突变体的分析表明, 白化多数是由于一个核苷酸的突变引起的, 往往是决定氨基酸的第三个密码子的突变, 而其他的基因序列都是正常的, 只要把突变的核苷酸校正就能达到基因治疗的目的, 不必置换或整合整个基因就能永久性的治愈。基因定位修复技术能够有效地解决转入基因的定点整合和可控表达的问题, 把它应用于鱼类白化病的基因治疗中将可能会非常有效。但总而言之, 由于不同种类鱼类白化病的致病机制可能很复杂, 要完全搞清楚并达到防治的目的可能还需要大量艰苦的工作。

参考文献

- 1 Searle A G. Comparative genetics of albinism. *Ophthalmic Paediatr Genet*, 1990, 11(3): 159-164
- 2 Nakamura K, Ozaki A, Akutsu T, et al. Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Genet Genomics*, 2001, 265(4): 687-693
- 3 Kajishima T, Takeuchi I K. Ultrastructural analysis of gene interaction and melanosome differentiation in the retinal pigment cell of the albino goldfish. *J Exp Zool*, 1977, 200(3): 349-357

- 4 Inagaki H, Koga A. The tyrosinase gene from medakafish: transgenic expression rescues albino mutation. *Pigment Cell Res*, 1998, 11(5): 283-290
- 5 Koga A, Inagaki H, Bessho Y, et al. Insertion of a novel transposable element in the tyrosinase gene is responsible for an albino mutation in the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Mol Gen Genet*, 1995, 249(4): 400-405
- 6 Koga A, Wakamatsu Y, Kurosawa J, et al. Oculocutaneous albinism in the i6 mutant of the medaka fish is associated with a deletion in the tyrosinase gene. *Pigment Cell Res*, 1999, 12(4): 252-258
- 7 Hyodo-Taguchi Y, Winkler C, Kurihara Y, et al. Phenotypic rescue of the albino mutation in the medakafish (*Oryzias latipes*) by a mouse tyrosinase transgene. *Mechanisms of Development*, 1997, 68(1-2): 27-35
- 8 Inagaki H, Bessho Y, Koga A, et al. Expression of the tyrosinase-encoding gene in a colorless melanophore mutant of the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Gene*, 1994, 150: 319-324
- 9 Inagaki H, Koga A. The tyrosinase gene from medakafish: transgenic expression rescues albino mutation. *Pigment Cell Res*, 1998, 11(5): 283-290
- 10 Lijuan Fu, Mambrini M. Stable and full rescue of the pigmentation in a medaka albino mutant by transfer of a 17kb genomic clone containing the medaka tyrosinase gene. *Gene*, 2000, 241: 205-211
- 11 Eun-Jung Jin, Giselle T. Effect of lithium on pigmentation in the embryonic zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Biochemica et Biophysica Acta*, 1999, 1449: 93-99
- 12 Kelsh R N, Schmid B. Genetic analysis of melanophore development in zebrafish embryos. *Dev Biol*, 2000, 225: 277-293
- 13 Estevez A, McEvoy L A, Bell J G, et al. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture*, 1999, 180(3/4): 321-343
- 14 Estevez A, Kanazawa A. Effect of (n-3) PUFA and Vitamin A Artemia enrichment on pigmentation success of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture Nutrition* (United Kingdom), 1995, 1(3): 159-168
- 15 王涵生. 海水盐度对牙鲆仔稚鱼的生长、存活率及白化率的影响. *海洋与湖沼*, 1997, 28(4): 399-404
- 16 Sanchez-Amat A, Lucas-Elio P, Fernandez E. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochemica et Biophysica Acta*, 2001, 154: 104-116
- 17 Halaban R, Cheng E. Aberrant retention of tyrosinase in the endoplasmic reticulum mediates accelerated degradation of the enzyme and contributes to the dedifferentiated phenotype of amelanotic melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(12): 6 210-6 215
- 18 Halaban R, Svedine S, Cheng E, et al. Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism. *Proc Natl Sci USA*, 2000, 97(11): 5 889-5 894
- 19 Rinchik E M, Bultman S J, Horsthemke B, et al. A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature*, 1993, 361: 72-76
- 20 Potterf S B, Furumura M, Sviderskaya E V, et al. Normal tyrosinase transport and abnormal tyrosinase routing in pink-eyed dilution melanocytes. *Experimental Cell Research*, 1998, 244: 319-326
- 21 Puri N, Gardner J M, Brilliant M H. Aberrant pH of melanosomes in pink-eye dilution(p) mutant melanocytes. *J Invest Dermatol*, 2000, 115, 607-613
- 22 Fuller B B, Spaulding D T, Smith D R, et al. Regulation of the catalytic activity of pre-existing tyrosinase in black and Caucasian human melanocyte cell cultures. *Exp Cell Res*, 2001, 262: 197-208
- 23 Halaban R, Cheng E, Svedine S, et al. Proper folding and endoplasmic reticulum to Golgi transport of tyrosinase are induced by its substrates, dopa and tyrosine. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 15: 11 933-11 938
- 24 Richard A. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene*, 2001, 277: 49-62
- 25 Oetting W S. The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1(OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res*, 2000, 13(5): 320-325
- 26 Koga A, Hori H. Albinism due to transposable element insertion in fish. *Pigment Cell Res*, 1997, 10(6): 377-381
- 27 Hori H, Suzuki M, Inagaki H, et al. An active Ac-like transposable element in teleost fish. *Journal of Marine Biotechnology*, 1998, 6(4): 206-207
- 28 Bolker J A, Hill C R. Pigmentation development in hatch-ery-reared flatfishes. *Journal of Fish Biology*, 2000, 56(5): 1 029-1 052

(本文编辑:刘珊珊)