

动物抗冷性的基因表达机制*

李跃强 盛承发**

(中国科学院动物研究所 北京 100080)

摘要: 简要综述了包括抗冻蛋白作用机理在内的动物抗冷性的基因表达调节机制。通过在寒冷逆境下转录抗冻蛋白、纤维蛋白原等耐冻性相关蛋白基因,形成 mRNA,然后在各种转录翻译调节因子的调节下表达形成蛋白质和酶,从而形成冰冻耐性或冰冻避性或毁损修复反应。其中,转录后调节和上调是动物常用的抗冷基因表达机制。小分子有机物质在提高动物的耐冻性中有非常的增效作用。

关键词: 抗冻蛋白; 基因; 上调; 小分子

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)03-97-06

The Gene Expression Mechanism of Cold Resistance in Animals

LI Yue-Qiang SHENG Cheng-Fa

(Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The gene expression mechanisms of cold resistance in animals including the functional mechanism of antifreeze proteins are summarized in this paper. Under the adverse circumstance of cold, the genes of antifreeze protein, fibrinogen and other cold-related proteins are transcribed into mRNA and then, translated into proteins or enzymes under the regulation of translational modulators. The post-transcriptional regulations and up-regulations are most important for the establishment of cold resistance. Small organic molecules have prominent cooperative effects in the enhancement of animal cold resistance. The cold resistance genes are one type of growth redundancy.

Key words: Antifreeze protein; Gene; Upregulate; Small molecule

在动物的整个生命周期中常会遇到寒冷和冰冻环境。然而,多数动物在经过寒冷环境后却都能够继续进行生存和繁衍,并最终使整个物种在地球上得以延续。活跃动物个体具有应付不利逆境的作用,动物通过代谢调节应付不利低温环境的过程也是动物抗冷性形成的过程。对动物抗冷机理的研究,不仅可以揭开生物冷适应的奥秘^[1],而且可为农业秋冬季节提高畜牧产量以及医学器官移植中的器官冷冻保存提供有效的理论和技术指导。因此,动物抗冷性机理研究成为近年来研究的一个热点。本文试就近年来有关动物抗冷性的基因表达机制的研究进展作一简要综述,并谈谈作者的看法。

1 抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)

许多动物在低温下可以合成具有热滞效应、冰晶形态效应和重结晶抑制效应的抗冻蛋白,过量降低体

液冰点,从而最大限度地保持体液的液体状态。现在对鱼类(南极鱼)(antarctic fishes)抗冻蛋白的研究最为透彻。它们分别是抗冻糖蛋白(AFGPs)、I型抗冻蛋白(AFP I)、II型抗冻蛋白(AFP II)、III型抗冻蛋白(AFP III)和IV型抗冻蛋白(AFP IV)^[2]。

AFP I首先由Duman和DeVries于1974年在北大西洋沿海的美洲拟鲈(*Pseudopleuometes americanus*)(俗称冬鲈)的血清中发现。AFP I的一级结构由11个氨基

* 中国科学院知识创新工程领域前沿项目(KSCX3-IOZ-04),国家自然科学基金优秀中青年人才专项基金(No. 39221001)资助;

** 通讯作者, E-mail: shengcf@panda.ioz.ac.cn;

第一作者介绍 李跃强,男,博士,助理;主要从事化学和分子生态学研究。

收稿日期:2003-11-21,修回日期:2004-02-20

酸残基组成的多肽单元 [-Thr-(Ala)₂-Asx-(Ala)₇-] 重复串联而成。Ala 含量约为 65%，分子量为 3.3 ~ 4.5 ku。Asn/Asp 的比例和 Thr 是确定其抗冻功能的主要影响因素。通过 X-射线研究其晶体结构,发现其二级结构全为 α -螺旋,且为双亲螺旋结构,可以黏附到不同的冰晶表面,抑制冰的生长^[3]。AFP I 在鱼体内有两种不同的分布:一类称为肝型 AFP,由肝脏分泌进入血液循环;另一类称为皮肤型 AFP I,它广泛分布于与环境直接接触的组织细胞内,甚至在脑中也有表达。

AFP II 仅发现于少数几种鱼类(如海渡鸦 sea raven、胡爪鱼 smelt 和鲱鱼 herring 等)的血清中。其一显著特点是 Cys 含量比较高(约为 8%),并且半数 Cys 都能形成二硫键,用巯基乙醇或二硫苏糖醇处理都会导致 THA 丧失,因此这些二硫键对保持分子结构稳定性及抗冻活性有重要作用。AFP II 的分子量为 11 ~ 24 ku,是鱼类中分子量最大的一类,也是惟一在蛋白质序列中查出与其它蛋白质具有同源性的 AFPs。AFP II 与动物凝集素-C 的糖识别结构域(carbohydrate-recognition domain, CRD)同源,但它不能与糖结合,故早期研究认为它是由原始的 Ca²⁺-依赖性凝集素分别独立进化而来。但最近通过对海渡鸦 AFP II 基因的内含子和外显子结构研究表明:它与结石蛋白(urinary stone proteins)基因的关系可能比凝集素基因的关系更为密切^[4]。AFP II 分子的二级结构缺乏明显的 α -螺旋,Sönnichsen 等认为 AFP II 中有 2 个 α -螺旋、2 个 β -折叠和大量无规则结构。

糖蛋白也可以是抗冻蛋白。1968 年 DeVries 在南极 Mcmurdo 海峡的一种 Nototheniid 鱼 *Trematomus borohgrevinki* 的血液中发现特殊抗冻物质。它有共同的三肽糖单位: H₂N [Ala-Ala (β -galactosyl (1 → 3) α -N-acetylgalactosamine) Thr]_n Ala-Ala-COOH,根据重复数(n)的多少形成 8 种分子量不等(2.5 ~ 33.7 ku)的抗冻糖蛋白。它们的活性随其分子量的增加及重复数的增多而提高。通过化学修饰(乙酰化或过氧化)糖基后会致使其抗冻活性的丧失,因此认为糖基是决定其抗冻活性的主要基团^[5]。

一些越冬昆虫体内存在超活性的 AFPs,维持其体液的过冷状态。目前,昆虫中 AFPs 的分离纯化主要在 4 种昆虫中开展,这 4 种昆虫是黄粉虫(*Tenebrio molitor*)、美洲脊胸长椿(*Oncopeltus fasciatus*)、枞色卷蛾(*Choristoneura fumiferana*)和 *Dendroides canadensis*。昆虫 AFPs 的分子量一般为 8 ~ 9 ku,无糖基且含有较多的亲水氨基酸,有 40% ~ 50% 的氨基酸残基能形成氢键。实验表明^[6],黄粉虫血淋巴中的 AFPs 的热滞活性是鱼

类的 100 多倍,分子量约为 8.4 ku,富含 Thr 和 Ser,其一级结构主要由 12 个氨基酸残基(TCTXSXCXXAX)的重复序列组成。枞色卷蛾 AFPs 与鱼类(如杜父鱼 *Myoxocephalus scorpius*) II 型 AFPs 有免疫交叉反应,说明这些昆虫、鱼类的 AFPs 之间有着共同的或相似的抗原决定簇。用家兔为实验动物制作 AFPs 的抗体,发现昆虫中 AFPs 的生物活性可因添加剂其特异性多克隆抗体而大大增强。将羊抗兔 IgG(二抗)添加到 AFPs⁺ 抗体(一抗)复合物中,生物活性得到进一步增强。这些有趣现象同时也说明昆虫血液中可能存在着另外一些可以与 AFPs 结合的蛋白质,从而大幅度提高 AFPs 的生物活性,这些蛋白质可以称为 AFPs 活化蛋白,并且在 *D. canadensis* 中发现了分子量为 70 ku 的内源 AFPs 活化蛋白。该 AFPs 活化蛋白是一种有冰核剂活性的蛋白质,当温度降低时,它能诱发细胞周围结冰,从而避免细胞内结冰造成致死性伤害。最近发现 *D. canadensis* 幼虫中的 AFPs 可因添加低分子量溶质而增加热滞活性。其中效应最强的溶质为柠檬酸,它能提高热滞活性近 6 倍。其次是琥珀酸、苹果酸、天冬氨酸、谷氨酸和硫酸铵,它们能提高热滞活性约 4 倍。丙三醇、山梨醇、丙氨酸和重碳酸氨提高热滞活性约 3 倍。引发最高热滞活性的溶质浓度为 0.25 ~ 1 mol/L。

2 动物抗冷性的基因表达机制

蛋白质在行使抗冷性功能之前,首先应该是 mRNA 和基因的启动与合成。

2.1 抗冷性 mRNA 的不变化 首先应该注意许多蛋白质在适应低温时很少表现出变化,包括数量上的变化和分子品种上的变化^[7]。通过高活性代谢途径以已有的组成型方式保证生物的初步抗冷性,结果生物净流量不变。定态(steady state)底物水平变化、多元醇及其它溶质的稳定化作用、依赖于温度的细胞 pH 变化或膜磷脂组份包括转运蛋白的变化等,可通力合作而最后使生物的外在变化表现为零变化。如冷刺激可以加强甘油的合成从而保护蛋白质活性,而蛋白质 mRNA 不变化^[7]。

对其它酶来说,可有两种调节作用方式。首先是低温导致酶浓度的调节变化。乳酸脱氢酶-B(LDH)在 *Fundulus heteroclitus* 北方冷水种的心脏中比南方冷水种活性高,这归因于冷水鱼组中 LDH 基因转录水平较高,LDH-B mRNA 数量较多^[8]。但鱼体总 mRNA 以及肌动蛋白、微管蛋白的 mRNA 数量在两种群间没有差别。另一种方式是酶的等位变异混合物的变化。*Fundulus heteroclitus* 中 LDH-B 有 6 个等位变异体,每个或在动力

学特性或在热稳定性上存在微小的差异,在不同热环境下,鱼中的混合形式不同。在另一些情况下表达异构体也可以提供温度补偿^[9]。鲤鱼在低温下可通过表达不同的编码肌球蛋白重链异构体的 28 种基因的混合物而重新调节肌肉功能,以获得高的专一性肌原纤维 ATP 酶活性^[10]。金鱼适应不同温度时也可以表达 Ca^{2+} 腺苷三磷酸酶的不同异构体,而鳟鱼在适应时也类似地在脑中诱导乙酰胆碱脂酶的不同异构体^[11]。

2.2 抗冷性可变化 mRNA 在冬季比目鱼(winter flounder)中至少含有两套不同的 AFP 基因——肝型 *wfAFP* 和皮肤型 *wfsAFP*。*wfAFP* 在其基因组有多个拷贝,其包含 7~8 kb 长的重复串联序列,每个重复序列中包含有约 1 kb 的 AFP。与 *wfAFP* 一样,*wfsAFP* 也为多拷贝基因(30~40 拷贝)^[12,13]。蛋白 *wfAFP* 与 *wfsAFP* 的主要差别为前者具有信号肽编码序列而后者无,从而造成两种 AFP 在比目鱼体内的定位完全不同。其中 *wfAFP* 要被分泌到血液中去发挥作用,而 *wfsAFP* 则留在细胞内。在冬季比目鱼中,*wfsAFP* 在各种鱼组织中(包括肝脏中)均能表达,而 *wfAFP* 却只能在肝中表达。但短角杜父鱼的皮肤型 sssAFP-2 与冬季比目鱼的 *wfsAFP* 不同,它不在肝中表达。对 *wfAFP* 的序列分析表明^[14],*wfAFP* 含有惟一的一个内含子(+106~+602),具有肝特异性的增强子活性,能为肝中富含的转录激活因子所结合。利用内含子缺失分析实验发现,+192~+334 bp 序列对其表达非常重要。与大鼠肝细胞核抽提物中的蛋白质进行相互作用实验发现,此序列的增强子构件 B(+303~+332 bp)含有 C/EBP α CCAAT/增强子结合蛋白 α (肝中特有的一种转录因子),和 AEP(antifreeze enhancer binding protein,抗冻增强子结合蛋白,一种新的激活蛋白 AP-1 位点结合蛋白)的结合位点。随后,在比目鱼的肝中也直接发现了转录因子 C/EBP α ,它可特异性地与增强子构件 B 发生反式相互作用^[15]。AEP 为激活 *wfAFP* 转录所必需,通过对基因组进行 Southern 杂交,在比目鱼中也发现了 AEP 的存在。

海渡鸭 AFP II 的基因在基因组中有 12~15 个拷贝^[16],对其中一个拷贝进行序列分析表明,在 2.2 kb 的序列中含有 6 个外显子和 5 个内含子,而且在该基因两侧 25 kb 的区域内没有第二个基因拷贝的存在。该基因转录起始点上游的 90 bp 是一个含有 3 个 21 bp 串联重复的顺式调控元件,翻译起始点位于第 3 个 AUG 处。AFP III 的编码基因在基因组中也多为拷贝基因,纽芬兰大洋条鳕(*Macrozoarces americanus*)的基因组中约含有 150 拷贝的 AFP 基因(0.7 kb)。狼鱼(*Anarhichas lupus*)

AFP III^[17,18] 基因在其基因组中含有 80~85 个拷贝,其中含有许多不规则相连的基因和较大的串联重复,每个串联重复都包含两个方向相反、结构相似的基因,不同方向的基因均具有活性^[19]。

AFP 的表达受季节性影响较大,如黄盖鲈肝脏中 AFP I mRNA 的含量在冬季可高达其总 RNA 的 0.5%~1.0%;而在夏季则低于 0.001%~0.0007%^[20,21]。此外,肝与非肝来源的 AFP I 基因对季节及激素的反应甚为不同:肝型 AFP 的 mRNA 在冬季夏季两季的表达水平相差 1000 倍左右,而皮肤中非肝型 AFP 的 mRNA 在冬夏两季的表达水平仅仅相差 5~10 倍;在垂体切除之后,肝型 AFP mRNA 的表达可提高 40 倍左右,而非肝型 AFP mRNA 几乎没有变化^[22]。表明肝型 AFP mRNA 的表达很可能要受到垂体激素的调控。

2.3 hsp 及其基因表达 将生物放在高温下,细胞中正常蛋白质合成暂时停止,替代的是产生一套保守蛋白质,称为热休克蛋白(hsp)。它们可分为典型的三种分子量,约 90、70、和小蛋白质(15~30 ku)^[23]。热休克反应在动物遇到寒冷时也常常发生^[24]。在昆虫,37~41℃的热休克在滞育的吉普赛蛾(*Lymantria dispar*)幼虫上可以诱发 7 种 hsp 的合成(90,75,73,60,42,29 和 22 ku)。而 -10~-20℃的冷休克导致产生两种高分子量蛋白质(90,75 ku)(4℃下恢复),当在 25℃下恢复时另外合成 29 ku 蛋白质^[25]。冷暴露也诱发蚊(*Culicoides varripennis*)合成上述 7 种不同的胁迫蛋白,在肉蝇成虫(*Sarcophaga cracipalpis*)合成 72 和 92 ku 蛋白质^[26]。*Drosophila melanogaster* 在冷暴露后恢复期间热休克 mRNA 也在唾液腺中累积^[27]。热和冷(热 32℃,冷 5℃)都促进牛蛙(*Rana catesbeiana*)组织培养的表皮中 65 ku 蛋白质的合成。但 *Xenopus laevis* 肾细胞株只在热暴露刺激下合成 hsp。组织培养的人细胞从 4℃暂冷下再转回 37℃后合成 hsp70,热休克转录因子激活调节的转录事件在该过程中起作用^[28]。类似,冷可诱导小鼠在棕色脂肪组织中合成 hsp70 mRNA;该诱导伴随着增强的热休克转录因子结合到 DNA 上,当以肾上腺素受体拮抗剂处理时可以被阻断^[29]。有人从木蛙(*Rana sylvatica*)中分离到 *fr10*、*li16*、*fr47* 等 5 个与耐冻相关的新奇基因,它们都属于上游调节基因,*fr47* 基因在 24 小时冰冻后,其 mRNA 水平增加 1.5 倍,属于转录后调节^[30]。*fr47* 蛋白是一有 390 个氨基酸残基构成的蛋白质,连同蛋白激酶 C 调节的信号途径一起,在木蛙的冰冻适应中发挥作用。木蛙在 -2.5℃冰冻,随后在 5℃下融化,肝中纤维蛋白原亚基 α 和 γ 亚基基因的 mRNA 在 8 h 冰冻时达到最大,比对照高 3 倍。但冰冻 24 h 后 mRNA 水

平只保持在最大量时的 70%^[31]。

在冰冻生存中这些基因的蛋白质产物起什么作用? 纤维蛋白原尤其有意义。纤维蛋白原是一急性相 (acute-phase) 血浆蛋白质。它主要在脊椎动物肝中合成并分泌到血浆, 可被胁迫因子如感染、发炎和组织伤害刺激合成^[32]。作为凝血步骤中的最后一步, 凝血酶在 A α 和 B β 链的 N-末端裂解, 释放出 A 和 B 纤维蛋白多肽, 露出作用位点, 进入正在生长的血凝块的纤维网中^[33]。因此, 当冰扩张入蛙体造成不利的组织伤害时, 或者在预期的组织伤害时触发肝脏合成纤维蛋白原, 随血液流动并输送到目标组织, 产生的纤维蛋白多肽可以发生随后聚合而起到缝合组织的作用。因此, 纤维蛋白原合成的上调可以被视为毁损修复反应 (damage repair responses)。在低温医学中冷冻被移植组织和器官时有许多冰冻伤害初始原因。其间, 冰在微血管腔中扩张而造成物理伤害、撕破导管壁, 导致融化后血管的完整性丧失^[34]。在冰冻时纤维蛋白原合成的上调有助于血液的凝结能力, 以便在融化期间破坏的毛细血管壁能快速有效地封合, 减少内出血伤害。同时纤维蛋白原基因在其它器官也可以被上调。该蛋白在哺乳动物中被视为典型的肝专一性, 在两栖类蛙中也主要在肝中合成, 肝外器官中只有很微量的转录本。然而, α 亚基和 γ 亚基的转录本 mRNA 水平冰冻后在膀胱、中肠和心脏 (都具有中央腔或室) 特别是肺中都升高。这可能对每个器官的内部伤害修复起直接作用。所有这些器官都对冰冻伤害特别敏感, 因为膀胱、中肠和心脏都具有中央腔或室, 内容液体易形成冰, 肺在蛙中更是一个非常精致的组织。与线粒体生物能产生相关的蛋白质及其基因, 如蛙中的 *Aat*、海龟 *Cox1* 和 *Nad5* 的平行诱导和表达可为诸如可能的启动者、第二信使和转录因子所调节表达^[32]。

3 结 语

通常情况下, 生活在寒冷地区中的动物特别是变温动物 (poikilotherms) 主要采用三种方式抵抗寒冷, (1) 行为方式离开冷环境, 即迁徙, 或将自己放于一个孤立的微环境中, 那里的温度保持在零上, 如筑巢、在水下休眠或在地下休眠; (2) 启动各种代谢适应保持体液处于液体状态以忍耐严酷的零下低温, 称作冷冻避性 (freeze avoidance); (3) 忍耐细胞外体液的结冰, 称为冷冻耐性 (freeze tolerance)。然而以上每种抗冷性方式的行使和表达, 都离不开基因活动。

除加强代谢保持生物稳态平衡 (homeostasis) 而需要稳态相关基因活动 (如膜蛋白) 外, 耐冻生物具有抗冷

性基因 (cold induced genes)。南极鱼抗冻蛋白的发现为人们深入动物抗冷性研究和培育耐冻动物物种启开一新的曙光。通过在寒冷逆境下转录抗冻蛋白等耐冻性相关蛋白基因, 形成 mRNA, 然后在各种转录翻译调节因子的调节下表达形成蛋白质和酶, 从而形成冰冻耐性或冰冻避性或毁损修复反应。其中, 转录后调节和上调是动物常用的抗冷基因表达机制。小分子有机物质在提高动物的耐冻性中有着非常的增效作用。动物在直接利用蛋白质和酶的功能抵抗寒冷外, 还合成抗冻活性激活小分子如琥珀酸、苹果酸等。因此, 这些小分子物质生产某些相关的酶和蛋白质的合成及其基因转录、表达的调节, 也是动物抗冷性基因表达机制的重要组成部分。

动物与环境的关系问题一直是动物学家关心的问题, 动物只有与环境条件协调配合才能够顺利生存下去。而动物的诱导表达适应机制提示人们, 动物对环境的适应是一个能动的过程。动物通过启动与抗冷性有关的基因和表达, 给出逆境保护措施, 从而协助动物度过难关或逆境。因此, 如何迅速诱导动物的冷适应机制的高效运作, 提高动物在不利环境下的存活率, 将是现在乃至将来动物学家应倾力研究的课题。由此看来, 在正常的生活条件下, 动物体内的许多基因包括诸多抗冷性基因及其多拷贝个体都处于闲置和被埋没的状态。这些闲置基因是动物在非极端条件下不需要的, 是额外或多余的, 因此, 符合人们对于生物生长冗余的定义^[35]。生长冗余学说是本课题组研究的核心内容。即试图通过研究动物低温抵抗力的生长冗余关系的分子机制来提高动物抗冷性, 以便深入研究动物机器运转的客观规律, 揭示动物自身拥有的巨大的生存潜力。现已经发现, 抗冷能力与动物基因组中抗冻蛋白基因的拷贝个数成正比。可以认为, 诱导和开发动物的这种巨大潜力, 必将为人类正确认识和合理利用现有动物资源、增加农业秋冬季节畜牧产量、以及提高医学器官移植的成功率等作出贡献。

在转抗冷性基因动物中, 有时会达不到预期的抗冷性。这可能由于动物体是一个综合的系统, 个别抗冷性基因可因基因沉默或蛋白修饰而失效。因此动物抗冷性基因表达的综合机制, 诸如最有效抗性基因的筛选、蛋白质功能的多基因效应调节等应当是今后动物抗冷性研究的方向。生长冗余机理在这个过程中也发挥着重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Storey K B, Storey J M. Natural freeze tolerance in

- ectothermic vertebrates. *Ann Rev Physiol*, 1992, **54**: 619 ~ 637.
- [2] 钟其旺,樊廷俊. 鱼类抗冻蛋白的研究进展. *生物化学与生物物理学报*, 2002, **34**: 124 ~ 130.
- [3] Steffen P G, Carolyn M S, Peter L D, *et al.* Structure of type I antifreeze protein and mutants in supercooled water. *Biophys J*, 2001, **81**: 1 677 ~ 1 683.
- [4] Cambi A, Figdor C G. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Cur Opin Cell Biol*, 2003, **15**: 539 ~ 546.
- [5] Graether S P, Gagne S M, Spyropoulos L, *et al.* Spruce budworm antifreeze protein: change in structure and dynamics at low temperature. *J Mol Biol*, 2003, **327**: 1 155 ~ 1 168.
- [6] Yih-Cherng L, Ante T, Peter L D, *et al.* Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta-helix antifreeze protein. *Nature*, 2000, **406**: 322 ~ 324.
- [7] Somero G N. Proteins and temperature. *Ann Rev Physiol*, 1995, **57**: 43 ~ 68.
- [8] Crawford D L, Powers D A. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation. *Mol Biol Evol*, 1992, **9**: 806 ~ 813.
- [9] Powera D A, Smith M, Gonzalez-Villasenor I, *et al.* A multidisciplinary approach to the selection/neutralist controversy using the model teleost, *Fundulus heteroclitus*. In: Futuyma D, Antonovics J, eds. *Oxford Surrey in Evolutionary Biology*, Vol 9. Oxford: Oxford Univ. Press, 1993, 43 ~ 107.
- [10] Goldsprink G, Turay L, Hansen E, *et al.* Switches in fish myosin genes induced by environmental temperature in muscle of the carp. *Symp Soc Exp Biol*, 1992, **46**: 139 ~ 149.
- [11] Havang G C, Watabe S, Hashimoto K. Changes in carp myosin ATPase induced by temperature acclimation. *J Comp Physiol B*, 1990, **160**: 233 ~ 239.
- [12] Duman J G, Serianni A S. The role of endogenous antifreeze protein enhancers in the haemolymph thermal hysteresis activity of the beetle *Dendroides canadensis*. *J Insect Physiol*, 2002, **48**: 103 ~ 111.
- [13] Gong Z, King M J, Fletcher G L, *et al.* The antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, are differentially regulated in liver and non-liver tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **206**: 387 ~ 392.
- [14] Chan S L, Miao M, Fletcher G L, *et al.* The role of CCAAT/ enhancer-binding alpha and a protein that binds to the activator-protein-1 cite in the regulation of liver specific expression of the winter flounder antifreeze protein gene. *Eur J Biochem*, 1997, **247**: 44 ~ 51.
- [15] Miao M, Chan S L, Fletcher G L, *et al.* The rat ortholog of the presumptive flounder antifreeze enhancer-binding protein is a helicase domain-containing protein. *Eur J Biochem*, 2000, **267**: 7 237 ~ 7 246.
- [16] Hayes P H, Scott G K, Nig N F, *et al.* Cysteine-rich type II protein precursor is initiated from the third AUG codon of its mRNA. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 18 761 ~ 18 767.
- [17] Koike M, Okamoto T, Isuda S, *et al.* A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specially induced during cold acclimation. *Biochem Biophys Research Comm*, 2002, **298**: 46 ~ 53.
- [18] Amir G, Rubinsky B, Smolinsky A K, *et al.* Successful use of ocean pout thermal hysteresis protein (antifreeze protein III) in cryopreservation of transplanted mammalian heart at subzero temperature. *J Heart Lung Transplantation*, 2002, **21**: 137 (单页).
- [19] Baardsnes J, Davies P L. Contribution of hydrophobic residues to ice binding by fish type III antifreeze proteins. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 2002, **1 601**: 49 ~ 54.
- [20] Gong Z, Ewart K V, Hu Z, *et al.* Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 4 106 ~ 4 112.
- [21] Evans R P, Fletcher G L. Isolation and characterization of type I antifreeze proteins from Atlantic snailfish (*Liparis atlanticus*) and dusky snailfish (*Liparis gibbus*). *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 2001, **1 547**: 235 ~ 244.
- [22] Sicheri F, Yang D S C. Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. *Nature*, 1995, **375**: 427 ~ 431.
- [23] Schlesinger M J, Ashburner M, Tissieres A. *Heat Shock from Bacteria to Man*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- [24] Airaksinen S, Jokilehto T, R bergh C M I, *et al.* Heat- and cold-inducible regulation of HSP70 expression in zebrafish ZF4 cells. *Comp Biochem Physiol Part B*, 2003, **136**: 275 ~ 282.
- [25] Yocum G D, Joplin K H, Denlinger D L. Expression of heat shock proteins in response to high and low temperature extremes in diapausing pharate larva of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1992, **18**: 239 ~ 249.
- [26] Nunamaker R A, Dean V C, Murphy K E, *et al.* Stress proteins elicited by cold shock in the biting midge, *Culicoides variipennis sonorensis* Wirth and Jones. *Crop Biochem Physiol*, 1996, **113B**: 73 ~ 77.
- [27] Peterson N S, Young P, Burton V. Heat shock mRNA accumulation during recovery from cold shock in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem*, 1990, **20**: 679 ~ 684.

- [28] Liu A Y C, Bian H, Huang L E, *et al.* Transient cold shock induces the heat shock response upon recovery at 37°C in human cells. *J Biol Chem*, 1994, **269**:14 768 ~ 14 775.
- [29] Matz J M, Blake M J, Tatelman H M, *et al.* Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue. *Am J Physiol*, 1995, **269**:R38 ~ R47.
- [30] McNally J D, Sturgeon C M, Storey K B. Freeze-induced expression of a novel gene, *fr47*, in the liver of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1 625**:183 ~ 191.
- [31] Cai Q, Storey K B. Freeze-induced genes in wood frog (*Rana sylvatica*): fibrinogen upregulation by freezing and dehydration. *Am J Physiol*, 1997, **272**:R1 480 ~ R1 491.
- [32] Huber P, Laurent M, Dalmon J. Human B-fibrinogen gene expression: upstream sequences involved in its tissue specific expression and its dexamethasone and interleukin 6 stimulation. *J Biol Chem*, 1990, **265**:5 695 ~ 5 701.
- [33] Roberts L R, Nichols L A, Holland L J. cDNA and amino-acid sequences and organization of the gene encoding the B β subunit of fibrinogen from *Xenopus laevis*. *Gene*, 1995, **160**:223 ~ 228.
- [34] Rubinsky B, Lee C Y, Bastacky J, *et al.* The process of freezing and the mechanism of damage during hepatic cryosurgery. *Cryobiology*, 1987, **27**:85 ~ 87.
- [35] Li Y Q, Sheng C F. The characteristic of molecular redundancy in life evolution. *Scientific Chinese*, 1996, **6**:38 ~ 41.