

## 草鱼 *hsp70* 和 *hsp90* 对温度急性变化的响应

周 鑫<sup>1</sup>, 董云伟<sup>2\*</sup>, 王 芳<sup>1</sup>, 董双林<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 为研究不同温度条件下草鱼热休克蛋白 (*hsp70* 和 *hsp90*) 的表达模式, 了解草鱼对温度的耐受和适应机理, 实验将在 20 °C 下驯化的草鱼在 7 个实验温度 (22, 24, 26, 28, 30, 32 和 34 °C) 中热激 3 h, 然后 20 °C 恢复 2 h, 取肝脏, 肌肉和鳃测定 *hsp70* 和 *hsp90* 表达。结果表明, *hsp70* 和 *hsp90* 表达量随着温度升高而上升, 当温度达到 34 °C 时, 肌肉与鳃热休克蛋白基因表达量显著下降, 草鱼耗氧率、热休克蛋白表达和死亡率之间的关系符合氧限制热耐受理论 (OCLTT)。基于 OCLTT 理论, 草鱼生理临界温度为 28 °C, 当温度超过 28 °C, 热休克蛋白表达所需能量主要由无氧代谢提供, 进而导致体内氧自由基和变性蛋白的增加, 影响草鱼的生长和存活。

**关键词:** 草鱼; 温度变化; *hsp70*; *hsp90*

**中图分类号:** Q 178.1; S 917.4

**文献标志码:** A

温度对鱼类生长, 代谢以及其它生理活动具有重要影响<sup>[1]</sup>。草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国的四大家鱼之一, 根据中国渔业统计年鉴数据, 2010 年我国草鱼年产量超过 400 万 t, 为我国产量最高的淡水鱼类。研究发现, 在养殖池塘中, 草鱼在夏季会遭受高温胁迫, 在运输过程中也会经常面临温度的急剧变动<sup>[2]</sup>, 进而影响草鱼存活<sup>[3-4]</sup>, 生长和免疫应答<sup>[5-6]</sup>, 严重影响养殖产量和经济效益。因此揭示高温影响草鱼生长和存活的生理机制成为草鱼养殖业中迫切需要解决的问题。

作为分子伴侣, 高温下热休克蛋白具有协助变性蛋白复性<sup>[7]</sup>, 保护生物体免受损伤的重要作用<sup>[8-11]</sup>, 是对温度极为敏感的分子标记, 可用来分析生物对环境变化的响应<sup>[12]</sup>。Hsp70 和 Hsp90 作为热休克蛋白家族中的重要成员, 对可能造成蛋白损伤的环境因素, 例如温度刺激, 盐度变化, 重金属暴露等均会产生诱导性表达<sup>[13-15]</sup>。已有研究表明, 环境因子可显著诱导草鱼 Hsp70 和 Hsp90 表达, 并且表达模式间具有组织特异

性<sup>[16]</sup>。但是缺乏有关草鱼耗氧率, 热休克蛋白表达和死亡率之间整合性分析, 本研究拟通过测定草鱼热休克蛋白在不同温度处理下的表达模式, 结合以往草鱼耗氧率和死亡率数据, 分析生理模型在草鱼中的适用性, 阐明草鱼对温度突变的生理适应阈值, 从而进一步解释高温下草鱼死亡的生理诱因和关键机制。本实验可丰富草鱼生理生态学方面的研究, 并为草鱼健康高效养殖提供理论支撑。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 实验材料

本实验所需草鱼购买于青岛市胶南淡水鱼种试验场, 平均体长为 9.2 cm。运回实验室后, 草鱼置于室内水族箱中, 保持连续充气。养殖水使用充分曝气的自来水, 隔天投喂一次配合饲料。驯化期间, 水温控制在 20 °C, 光照周期为 12 L: 12 D, 每天换水 1/3。

#### 1.2 实验方法

**热激实验** 经过 20 d 驯化, 实验鱼禁食

收稿日期: 2012-02-05 修回日期: 2012-12-01

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究发展计划 (2009CB118706)

通信作者: 董云伟, E-mail: dyw@ouc.edu.cn

1 d。设置 8 个温度实验组,分别为 20,22,24,26,28,30,32 和 34 °C。将草鱼从 20 °C 置于各实验温度下热激 3 h,热激结束后,放回 20 °C 恢复 2 h,取肝,肌肉,鳃,液氮冷冻后保存于 -80 °C 冰箱中。每个温度处理设置 3 个重复。

总 RNA 的提取及 cDNA 第一链合成 使用 Trizol Reagent(Invitrogen) 提取总 RNA,经琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性,使用 1 μL RNA 作为模板,以 Oligo dT18 作为引物合成 cDNA,cDNA 置于 -80 °C 保存备用。以  $\beta$ -actin 基因作为内参,引物根据 GenBank 搜索所得的序列设计(表 1)。

表 1 草鱼 *hsp* 基因半定量分析所用引物  
Tab.1 Primer sets designed for semi-quantitative RT-PCR analysis of *hsp70* and *hsp90* mRNA in *C. idella*

引物名称 primer	引物序列 primer sequence
Hsp70-F	5'-GTGTCCATCCTGACCATTGA-3'
Hsp70-R	5'-ATCTGGATT GATGCTCTTGTT-3'
Hsp90-F	5'-AGCTGGCGGATCGTTCACCTGTC-3'
Hsp90-R	5'-AAAACCTGCGGTACTCCTCATTGG-3'
$\beta$ '-AAAAC	5-CAGAGCTTCTCCTTGATGTC-3'
$\beta$ -actin-R	5'-GATATGGAGAAGATCTGGCA-3'

基因表达定量 PCR 反应采用 25 μL 体系,包括:2.5 μL MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L),2.0 μL dNTPs(2.5 mmol/L),各 1 μL 的上下游引物(10 pmol/mL),15.875 μL 灭菌水,0.125 μL (5 U/μL) Taq DNA 聚合酶,以及 1 μL cDNA 模板。RT-PCR 反应程序如下:94 °C 5 min;接着是 32 个循环(*hsp70* 和 *hsp90*),28 个循环( $\beta$ -actin):94 °C 45 s,56.5 °C (*hsp70* 和 *hsp90*) 或 55 °C ( $\beta$ -actin) 45 s,72 °C 1 min;最后 72 °C 延伸 10 min。RT-PCR 产物使用 EB 染色的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,为了确保 RT-PCR 反应的特异性,产物进行胶回收并测序。电泳图使用 GeneTools 软件分析(Syngene, USA),基因表达量通过其电泳图中光密度值与内参基因光密度值的比值表示( $C_{hsp70}/C_{\beta-actin}$ ,  $C_{hsp90}/C_{\beta-actin}$ )。

### 1.3 数据分析

数据统计分析采用 SPSS (Version 16.0) 进行,同一组织不同处理间的表达采用单因子方差分析,不同组织与处理间差别及其交互作用采用双因子方差分析,以  $P < 0.05$  作为显著性差异水平。不同温度下 *hsp70* 和 *hsp90* 表达量采用三次

方曲线利用 Prism 软件进行模拟。

## 2 结果

### 2.1 不同温度下 *hsp70* 的表达

在不同温度下,*hsp70* 在各组织中均表现为先上升后下降的趋势(图 1)。双因子方差分析显示,在不同温度处理下,*hsp70* 表达量有显著差异( $F = 89.617, P < 0.01$ ),不同组织间差异也极显著( $F = 30.397, P < 0.01$ )。

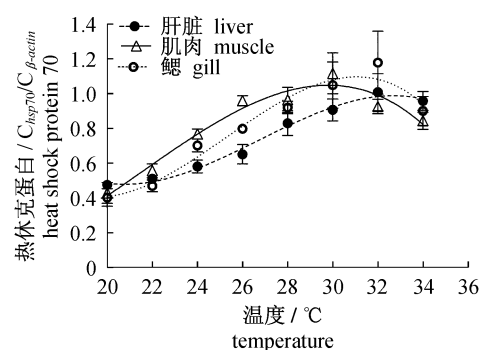


图 1 不同温度下草鱼 *hsp70* 基因的表达

Fig.1 Expression of *hsp70* of *C. idella* heat-shocked at different temperatures

在肝脏中,*hsp70* 水平在 26 °C 时显著高于对照组(20 °C),22 和 24 °C;在 28,30,32 和 34 °C 下显著高于 26 °C;在 30,32 和 34 °C 达到最高值,在 30~34 °C 无显著差异。

在肌肉中,*hsp70* 表达量亦随着温度升高而上升,在 22 °C 时出现上调,在 30 °C 达到最大值,表达量显著高于其余各组,温度达到 32 和 34 °C 时,表达量呈下降趋势。

在鳃中,*hsp70* 的表达随温度升高而上升,在 24 °C 时出现上调,在 34 °C 达到最大值,显著高于其余各组,温度达到 34 °C 时,表达量下降。

### 2.2 不同温度下 *hsp90* 的表达

温度胁迫会能诱导 *hsp90* 的上调表达(图 2),与 *hsp70* 表达模式相似。双因子方差分析结果表明,*hsp90* 表达量在不同温度处理间有显著差异( $F = 109.382, P < 0.01$ ),且有组织特异性( $F = 23.178, P < 0.01$ )。

在肝脏中,*hsp90* 表达随着温度上升逐渐上升,在 26 °C 时开始出现上调表达,在 30,32 和 34 °C 显著高于其余各组。

在肌肉中,*hsp90* 在 24 °C 开始上调表达,在 30 和 32 °C 时达到最高值,并显著高于其余各组,

34 °C 时表达量显著下降。

在鳃中, *hsp90* 水平在 26 °C 开始上调表达, 然后随温度的升高而升高, 在 32 °C 时表达量达到峰值, 34 °C 时下降。

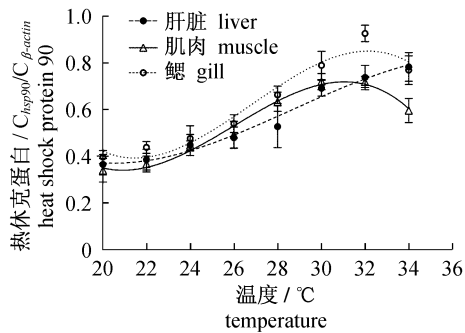


图2 不同温度下草鱼 *hsp90* 基因的表达  
Fig. 2 Expression of *hsp90* of *C. idella* heat-shocked at different temperatures

### 3 讨论

草鱼热休克蛋白基因的表达对温度变化非常敏感。本研究发现, 2~6 °C 的升温可造成草鱼热休克蛋白基因表达量的显著上调, 高水平的基因表达会维持到 34 °C, 基因表达的温度幅度可达 10 °C 以上。以往研究表明, 热休克蛋白基因的表达与生物温度耐受性直接相关。南极鱼长期生活在 -2 °C 左右的水中, 其对温度的耐受上限为 5 °C 左右, 作为对长期恒定低温的适应, *Trematomus bernacchii* 缺乏热休克蛋白的表达<sup>[17]</sup>。而生活在潮间带的虾虎鱼 (*Gillichthys mirabilis*) 和 *G. seta* 为适应潮间带高温, 其热休克蛋白基因在冬季上调表达温度为 28 °C, 而在夏季为 32 °C, 这表明热休克蛋白基因的表达不仅受遗传的控制, 同时也受到环境温度的影响<sup>[18]</sup>。草鱼较宽的热休克蛋白基因表达幅与其广温性的特性相一致。在 34 °C 下 *hsp70* 和 *hsp90* 水平的下降, 表明 34 °C 为草鱼温度耐受上限。

以往研究表明, 在 15~30 °C, 草鱼摄食率和生长率随温度上升而上升<sup>[19]</sup>, 当温度超过 28 °C 时, 草鱼耗氧率随温度升高而下降<sup>[20]</sup>, 而 24 h 草鱼半致死温度 ( $LT_{50}$ ) 为 33.9 °C<sup>[21]</sup>。将草鱼热休克蛋白基因表达量, 耗氧率与半致死温度 ( $LT_{50}$ ) 结果进行整合 (图 3), 发现三个参数之间存在明显相关性。随温度升高, 耗氧率表现为先升后降趋势, 当耗氧率下降时, 热休克蛋白基因表达量继

续升高; 温度继续升高, 热休克蛋白基因表达量开始下降, 此时草鱼死亡率迅速提高。这进一步证明, 草鱼热休克蛋白基因的表达与代谢有明显的相关性, 而热休克蛋白基因的表达需要能量支持。

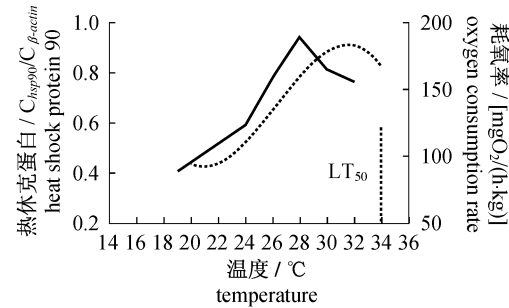


图3 草鱼热休克蛋白, 耗氧率以及 24 h 半致死温度的关系模式图

实线为耗氧率, 虚线为肌肉中热休克蛋白基因表达量。耗氧率数据引自文献[20], 24 h 半致死温度 ( $LT_{50}$ ) 数据引自文献[21]。

Fig. 3 The relationship between expression of heat shock protein, oxygen consumption and 24 h  $LT_{50}$  with temperature increase in *C. idella*

Solid line and dotted line represent oxygen consumption and heat shock proteins mRNA in muscle, respectively. Oxygen consumption data are cited from reference [20], and 24 h  $LT_{50}$  data are cited from reference [21].

草鱼热休克蛋白、耗氧率和死亡率之间的关系可用氧限制的热耐受性理论 (oxygen- and capacity-limited thermal tolerance, OCLTT)<sup>[22-23]</sup> 进行更加深入的解释。按照 OCLTT 理论, 生物的需氧量与氧气供给能力之间的不平衡是限制生物温度耐受性的首要因素, 当环境温度超过最适温度后, 血液中有氧代谢的比例会因为循环系统运输能力下降而下降; 当温度继续升高, 血液中含氧量继续下降, 有氧代谢因此而继续下降, 最终会导致有氧代谢功能的丧失, 线粒体内代谢将变为厌氧代谢, 变性蛋白和氧自由基的增加会诱导应激蛋白的表达。而应激蛋白的表达可为生物提供进一步的保护, 但应激蛋白表达会消耗能量, 只能提供短期保护<sup>[22,24]</sup>。在本实验中, 草鱼耗氧率, 热应激蛋白和死亡率之间的关系符合 OCLTT 模型, 证明 OCLTT 模型是可以应用到淡水广温性鱼类。根据 OCLTT 模型和图 3, 28 °C 应当为草鱼临界温度 (critical temperature), 当温度超过 28 °C, 热休克蛋白的上调表达只能为草鱼提供有限的抗高温能力。这与当温度超过 32 °C, 草鱼免

疫应答效果减弱<sup>[5-6]</sup>相吻合。因此,尽管草鱼是一种广温性鱼类,在夏季草鱼运输和养殖过程中,水温如果高于 28 ℃ 会诱导热休克蛋白上调表达,耗能巨大,导致免疫应答效果减弱,影响草鱼成活率。

热休克蛋白的表达具有组织特异性。肝脏中 *hsp70* 和 *hsp90* 的表达随温度升高而升高,在 34 ℃,基因表达量也达到峰值。在肌肉和鳃中,*hsp70* 和 *hsp90* 表达峰值出现在 30 ℃ 或者 32 ℃,在 34 ℃ 表达量显著下降,这与以往研究结果相符<sup>[25]</sup>。热休克蛋白组织特异性表达与不同组织对温度变化的敏感和耐受程度有关。肝脏是机体重要的器官,保证其正常功能对鱼体是至关重要的,因此肝脏中热休克蛋白的表达对温度变化相对不敏感,持续表达热休克蛋白以维持肝脏的正常机能;而肌肉和鳃与水环境热交换迅速,对水温变化敏感,因此其热休克蛋白表达的峰值会在较低温度出现。

本研究表明,热休克蛋白是分析草鱼耐热性的重要分子标记,草鱼耗氧率,热休克蛋白和死亡率之间的关系完全符合 OCLTT 理论,证明了 OCLTT 理论在淡水广温性鱼类的适用性。基于 OCLTT 理论,草鱼生理临界温度为 28 ℃,当温度超过 28 ℃,草鱼体内出现有氧代谢向无氧代谢的转换,热休克蛋白表达所需能量也主要由无氧代谢提供,进而导致体内氧自由基增加,影响免疫应答,会造成草鱼大规模患病和死亡。因此在养殖和运输过程中,需尽量保持水环境的稳定,避免温度超过 28 ℃。

#### 参考文献:

- [1] Elliott J A. A comparison of thermal polygons for British freshwater teleosts [J]. *Freshwater Forum*, 1995,5(3):178-184.
- [2] 张扬宗,谭玉钧. 中国池塘养鱼学[M]. 北京:科学出版社,1989:172-221.
- [3] Opuszynski K. Comparison of temperature and oxygen tolerance in grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.), silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Ekologia Polska, Serial A*, 1967, 15 (17): 385-400.
- [4] Stott B, Cross D G. A note on the effect of lowered temperatures on the survival of eggs and fry of the grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) [J]. *Journal of Fish Biology*, 1973,5(6):649-658.
- [5] 李亚南,王冀平,邵健忠,等. 鱼类免疫应答中的温度效应研究[J]. *浙江大学学报:理学版*, 1999, 26(3):87-91.
- [6] 杨先乐,左文功. 水温与草鱼免疫应答关系的研究[J]. *动物学报*, 1997,43(1):42-48.
- [7] Heredia-Middleton P, Brunelli O, Drew R E, et al. Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 149(4):552-556.
- [8] Wiech H, Buchner J, Zimmermann R, et al. Hsp90 chaperones protein folding *in vitro* [J]. *Nature*, 1992, 358(6382):169-170.
- [9] Holley S J, Yamamoto K R. A role for Hsp90 in retinoid receptor signal transduction [J]. *Molecular biology of the cell*, 1995,6(12):1833-1842.
- [10] Deane E E, Woo N Y S. Impact of heavy metals and organochlorines on *hsp70* and *hsc70* gene expression in black sea bream fibroblasts [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006,79(1):9-15.
- [11] Rosic N N, Pernice M, Dove S, et al. Gene expression profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 from symbiotic dinoflagellates in response to thermal stress: possible implications for coral bleaching [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2011,16(1):69-80.
- [12] Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena D K, et al. Heat shock response: *hsp70* in environmental monitoring [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 2003,17(5):249-254.
- [13] Palmisano A N, Winton J R, Dickhoff W W. Tissue-specific induction of Hsp90 mRNA and plasma cortisol response in chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge [J]. *Marine Biotechnology*, 2000,2(4):329-338.
- [14] Cara J B, Aluru N, Moyano F J, et al. Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005,142(4):426-431.
- [15] Li F H, Luan W, Zhang C S, et al. Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (*FcHSP90*) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2009,14(2):161-172.

- [16] Zhang A, Zhou X F, Wang X Y, *et al.* Characterization of two heat shock proteins (Hsp70/Hsc70) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Evidence for their differential gene expression, protein synthesis and secretion in LPS-challenged peripheral blood lymphocytes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 159(2): 109 – 114.
- [17] Hofmann G E, Buckley B A, Airaksinen S. *et al.* Heat-shock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (family Nototheniidae) [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2000, 203(15): 2331 – 2339.
- [18] Dietz T J, Somero G N. The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus *Gillichthys*) [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1992, 89(8): 3389 – 3393.
- [19] 崔奕波, 陈少莲, 王少梅. 温度对草鱼能量收支的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 1995, 26(2): 169 – 174.
- [20] 廖朝兴, 黄忠志. 草鱼在不同状况下耗氧率的测定 [J]. *淡水渔业*, 1986(3): 14 – 16.
- [21] 汪锡钧, 吴定安. 几种主要淡水鱼类温度基准值的研究 [J]. *水产学报*, 1994, 18(2): 93 – 100.
- [22] Pörtner H O, Berdal B, Blust R, *et al.* Climate effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish; developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*) [J]. *Continental Shelf Research*, 2001, 21(18 – 19): 1975 – 1997.
- [23] Pörtner H O, Farrell A P. Physiology and climate change [J]. *Science*, 2008, 322(5902): 690 – 692.
- [24] Pörtner H O, Knust R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance [J]. *Science*, 2007, 315(5808): 95 – 97.
- [25] Ji T T, Dong Y W, Dong S L. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka; aestivation and temperature [J]. *Aquaculture*, 2008, 283(1 – 4): 180 – 187.

## Effect of rapid temperature change on expression of *hsp70* and *hsp90* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

ZHOU Xin<sup>1</sup>, DONG Yunwei<sup>2\*</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, DONG Shuanglin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Oceanography and Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is one of the most important cultured fishes in China. During transportation in summer, massive mortality often occurs. As molecular chaperones, Hsps assist cells in their recovery from stress and promote cytoprotection. Limited reports described the expression of Hsps in grass carp at high temperatures, and the relationship between oxygen consumption, expression of heat shock protein and mortality needs to be investigated based on the oxygen- and capability- limited thermal tolerance theory (OCLTT) to further elucidate the thermal adaptation of this species to high temperature in view of integrated biology. In the present study, the expressions of *hsp70* and *hsp90* after rapid temperature increase were studied. Grass carps were acclimated at 20 °C and then exposed to designated temperatures (20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 °C) for 3 h heat shock. After 2 h-recovery at 20 °C, liver, muscle and gill of tested fish were sampled and *hsp70* and *hsp90* were determined using semi-quantitative real-time PCR. Expression of *hsp*s increased with temperature increase until 32 °C in muscle and gill, and then decreased at 34 °C. In liver, expression of *hsp*s kept increasing in all temperature treatments. These results indicated that *hsp70* and *hsp90* were sensitive to temperature increase in grass carp. Analyzed heat shock proteins data with previous results of oxygen consumption and lethal temperatures of grass carp, the physiological adaptations of grass carp could be explained by oxygen- and capability- limited thermal tolerance theory (OCLTT), which pointed out that the imbalance between oxygen demand and tissue oxygen supply ability was the primary factor which limited organisms' thermal tolerance and the ability of aerobic metabolism greatly limited the survival of organism beyond critical temperatures. With temperature increase, the maximum value of oxygen consumption in grass carp occurred at 28 °C, and then the oxygen consumption decreased when temperature was beyond 28 °C, indicating a transformation from aerobic metabolism to anaerobic metabolism at this critical temperature. The expressions of heat shock proteins kept increasing until 32 °C in muscle and gill in grass carp, and provided defense against high temperature. However, this protection of heat shock proteins was limited and then death occurred when temperature was beyond 32 °C. The change of metabolism, increase of oxygen free radicals and the consumption of energy due to stress proteins synthesis of grass carp were closely related to the decrease of capability of immune response when water temperature was beyond 28 °C. In general, high water temperature could alter the metabolic pathway, induce heat shock protein expression, reduce immune response, and then cause large-scale mortality. Therefore, appropriate ways should be applied to maintain water temperature under 28 °C to avoid large-scale mortality during transportation.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; temperature change; *hsp70*; *hsp90*

**Corresponding author:** DONG Yunwei. E-mail: dongyw@xmu.edu.cn