

文章编号: 1000-0615(2017)10-1562-09

DOI: 10.11964/jfc.20160910536

## 急性胁迫对团头鲂铁稳态及其相关基因表达的影响

高金伟<sup>1,2</sup>, 刁丙文<sup>2\*</sup>, 滕涛<sup>3</sup>, 陈凯<sup>2</sup>, 秦婷<sup>2</sup>, 谢骏<sup>2\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,

农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081;

3. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081)

**摘要:** 为研究急性应激反应对鱼体铁含量及铁稳态相关基因的影响, 以团头鲂为研究对象, 通过腹腔注射皮质醇来模拟急性应激, 在注射后不同时间点对团头鲂的血液、肠和肝脏进行取样, 采用分光光度法测定血清和肝脏中的铁含量, 采用实时荧光定量PCR对铁稳态相关基因的表达量进行检测。结果显示, 皮质醇注射后血浆皮质醇显著升高, 血浆中铁含量在4、8、10和12 h显著高于对照组, 而肝脏中的铁含量在4、8、10和12 h时显著低于对照组。团头鲂肝脏中铁调素(*hep*)基因表达量显著增加, 并分别在8和10 h达最大值, 随后有所下降。肠道和肝脏中转铁蛋白基因(*Tf*)的表达量均呈先升高后下降的趋势。研究表明, 急性应激下机体细胞内储存铁大量释放到体液中, 造成病原感染和体内增殖风险增加; *hep*及*Tf*上调表达降低细胞内铁释放和促进体液铁向胞内蓄积, 在鱼体内铁稳态的调控和固有免疫反应中发挥着重要的作用。

**关键词:** 团头鲂; 铁; 皮质醇; 铁调素; 转铁蛋白; 急性胁迫

**中图分类号:** S 965.1

**文献标志码:** A

铁是动物体内具有多种生物活性的重要微量元素, 参与生物体内氧气运输、细胞增殖和分化、电子转移等许多生理活动和生命代谢过程。另外, 铁也是大多数病原菌生长、增殖不可或缺的微量元素, 并且对病原菌入侵宿主和致病具有重要影响<sup>[1]</sup>。机体铁缺乏会导致贫血, 铁过载可引起脂质过氧化, 体内非蛋白结合铁能通过Fenton反应产生大量自由基, 引发氧化应激, 对组织或细胞造成损伤。因此, 为了维持体内的铁稳态及生命活动正常有序的进行, 生物体内存在一套精细地维持铁稳态的调控机制, 主要包括铁调素(*hepcidin*, *hep*)和转铁蛋白(*transferrin*, *Tf*)等铁稳态调控基因。*hep*主要在肝脏器官表达, 进化上高度保守, 由22~25个氨基酸组成。最早发现于人尿液<sup>[2]</sup>和血清<sup>[3]</sup>中, 曾被命名为肝脏抗菌多肽(*liver-expressed antimicrobial*

*peptide*, *LEAP*), 能够调节机体内铁的代谢, 是机体铁稳态的关键负性调节因子。此外, *hep*具有广谱抗细菌和真菌的作用, 是鱼体固有免疫的重要组成部分, 属于防御素蛋白家族<sup>[4]</sup>。*Tf*属于可以结合铁的 $\beta$ -球蛋白家族成员, 在铁的吸收、转运、存储及再循环利用等过程中发挥着至关重要的作用<sup>[5]</sup>。除此之外, 转铁蛋白也参与呼吸、能量平衡、细胞增殖和免疫系统的调节, 还有抗菌杀菌功能<sup>[6-7]</sup>。

在水产养殖中由应激引起的疾病受到了广泛关注。养殖密度、水质、温度和溶解氧等因素造成的应激可显著影响养殖动物的健康生长和抗病力。应激通常指一些不利因素(应激原)引起的生物体一系列非特异性的生理防御反应的总和, 它是生物机体的一种适应性机制<sup>[8]</sup>。鱼体应激反应中下丘脑—垂体—肾间组织调控轴

收稿日期: 2016-09-12 修回日期: 2017-02-12

资助项目: 国家自然科学基金(31572662); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45); 江苏省水产三新工程项目(D2015-13)

通信作者: 刁丙文, E-mail: xibw@ffrc.cn; 谢骏, E-mail: xiej@ffrc.cn

(hypothalamus-pituitary-interrenal axis, HPI)发挥了重要作用。应激引起肾间组织皮质醇的合成和分泌, 皮质醇的升高往往会导致鱼体呼吸系统、能量代谢和免疫系统等生物学功能的改变<sup>[9]</sup>。血浆皮质醇被普遍认为是鱼类应激反应的重要指标之一。养殖实践中适度的刺激可以增强鱼类的免疫力和适应能力, 过度或过多的刺激则会对养殖鱼类的生长和发育产生影响, 导致其抗病能力下降, 诱发疾病, 严重的导致死亡<sup>[10]</sup>。团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)属于硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 鲃亚科(Abramidinae), 鲃属(*Megalobrama*), 为我国主要的淡水养殖对象之一。在生产养殖中, 团头鲂容易出现应激, 造成继发病原体感染和发病几率较高。此前采用捕捞、缺氧或温度等手段模拟应激, 在不同实验批次间应激反应变化大, 难以控制, 因此本实验通过注射定量外源性皮质醇激素模拟鱼体的急性应激反应, 检测团头鲂铁代谢水平和肝脏 $hep$ 和 $Tf$ 及肠道 $Tf$ 等铁代谢相关基因表达量变化趋势, 探讨应激条件下机体铁代谢相关基因对鱼体铁稳态调控的作用, 以期缓解鱼体应激危害和防控疾病发生提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

团头鲂取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉养殖基地, 鱼体健康, 室外网箱驯养10 d, 体质量( $139\pm 10$ ) g, 体长( $22\pm 2$ ) cm, 水温( $25\pm 2$ ) °C。

皮质醇(纯度>99%)购自成都西亚化工股份有限公司; 无水乙醇购自上海联试化工试剂有限公司; 铁(Fe)测定试剂盒(比色法), 皮质醇(CORTISOL)测定试剂盒(化学发光法)购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; RNAiso plus, PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.2 实验设计

将6个网箱分成2组, 实验组腹腔注射皮质醇溶液(1 mL/kg体质量, 质量浓度为10 mg/mL, 溶剂为乙醇), 对照组注射相同剂量的乙醇。实

验组和对照组各有75尾鱼, 分为3个网箱, 每箱25尾鱼, 分别在注射后0、2、4、8、10、12、24和48 h取样, 每个时间点取6尾鱼, 用浓度为100 mg/L MS-222快速深度麻醉, 每尾鱼测量体质量、体长等生物学数据, 取肝脏、肠分别放入2 mL离心管和1.5 mL离心管(RNAase free)中, RNAase free离心管预先加入1 mL预冷的RNAiso plus试剂; 每尾鱼均静脉取血, 3000 r/min 4 °C离心10 min, 吸取上清液放入新的1.5 mL离心管中, 并于-80 °C冰箱中保存。

### 1.3 肝脏和血浆生化指标的测定

在肝脏样品解冻后, 准确称取0.10 g肝脏组织, 按质量(g): 体积(mL)=1: 9的比例加入9倍体积的4 °C无菌生理盐水, 匀浆, 制成10%匀浆液, 2500 r/min离心10 min, 制得肝脏匀浆上清液, 取400  $\mu$ L肝脏匀浆上清液和血浆至比色杯中, 应用铁(Fe)测定试剂盒在迈瑞BS-400全自动生化分析仪上测定铁含量, 检验原理: 在酸性条件下, 与转铁蛋白结合的铁被释放出来, 并被抗坏血酸还原成亚铁离子, 再与Ferrozine形成蓝色络合物, 在570 nm波长下测定蓝色络合物的吸光度。取300  $\mu$ L血浆于MAGLUMI®反应杯中, 使用皮质醇(CORTISOL)测定试剂盒在MAGLUMI 1000全自动化学发光免疫分析仪上检测血浆皮质醇含量。

### 1.4 总RNA提取、反转录及实时荧光定量PCR检测

按照RNAiso plus说明书上的方法提取并纯化样品总RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, 用Thermo Scientific NanoDrop 2000测定总RNA浓度, 并将所有样品浓度调整至400 ng/ $\mu$ L, 根据TaKaRa反转录试剂的操作说明, 反转录合成cDNA, 保存在-80 °C冰箱中备用。以 $\beta$ -actin作为内参基因, 采用嵌合荧光法进行Real Time PCR扩增反应, 在ABI PRISM 7500 Real-time PCR System仪器中检测铁调素(LEAP1和LEAP2)和转铁蛋白(Tf)基因的相对表达量, 引物见表1。Real Time PCR反应体系: SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(2 $\times$ ) 10  $\mu$ L, PCR Forward Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, PCR Reverse Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) 0.5  $\mu$ L, template\*3 1  $\mu$ L, RNAase free water 7.5  $\mu$ L, 共20  $\mu$ L。

表 1 本研究所用引物序列

引物 primer	序列(5'→3') sequence	用途 usage
LEAP1 F	GGAGATTGAAACACCACAGC	LEAP1定量正向引物
LEAP1 R	TATCCACAGCCTTTGTTGCG	LEAP1定量反向引物
LEAP2 F	ACTAAACCTCACGGTGCCTA	LEAP2定量正向引物
LEAP2 R	GCATTGCACATTCAAGTTGCC	LEAP2定量反向引物
Tf F	CTCCCAAAGAGCACAGACTC	Tf定量正向引物
Tf R	GTTCTGCACTCCATACGAGG	Tf定量反向引物
$\beta$ -actin F	TCGTCCACCGAAATGCTCTA	$\beta$ -actin定量正向引物
$\beta$ -actin R	CCGTCACCTTCACCGTTCCAGT	$\beta$ -actin定量反向引物

1.5 数据处理

所有实验数据均用Excel 2010进行统计, 计算平均值和标准差, 所有的结果均以平均值±标准差(mean±SD)表示。实验数据用SPSS 20.0统计软件包中的单因素方差分析(One-Way ANOVA)和Duncan氏多重比较, 检验各组间的差异, 不同的大小写字母表示各组之间比较差异显著(P<0.05)。以管家基因 $\beta$ -actin作为内参, 运用双标准曲线法计算基因相对表达量, 所有数据以平均相对表达量展现。

2 结果

2.1 血浆皮质醇和铁含量的变化

团头鲂腹腔注射皮质醇后, 实验组血浆皮质醇含量在0 h采样点达到最大值(5.4  $\mu$ g/mL)并显著高于对照组(12倍), 此后, 皮质醇含量逐渐消退(图1)。血浆皮质醇含量在2和4 h时均维持较高的水平, 并且显著高于对照组(P<0.05); 8和10 h时相较于0~4 h显著下降(约2倍), 但仍显著高于对照组(P<0.05); 在12~24 h时与对照组皮质醇含量基本持平, 无统计学显著差异; 甚至在48 h时实验组血浆皮质醇显著低于对照组(P<0.05)。对照组中, 不同时间点鱼体皮质醇含量并无显著变化。

与对照组相比, 实验组血浆铁含量整体呈现先上升后下降的趋势。血浆铁含量在4 h时显著增加, 在8 h时血浆中铁的含量有最大值, 随后迅速下降, 10和12 h仍高于对照组(P<0.05), 24和48 h时与对照组之间差异无显著性。血浆铁含量在4、8、10和12 h时分别为28.2、46.2、

15.6和15.2  $\mu$ mol/L, 是对照组的3.4、5.7、1.8和1.9倍(P<0.05)(图2)。

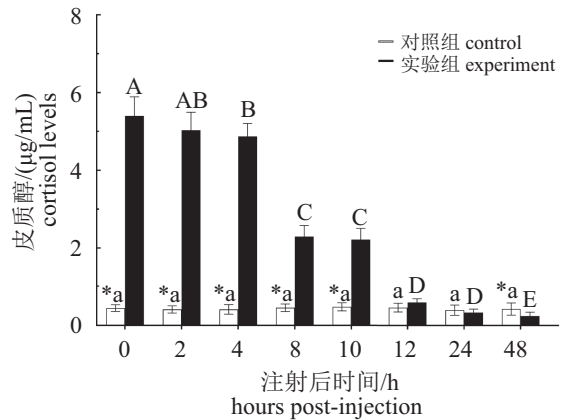


图 1 皮质醇注射后血浆皮质醇的含量

\*. 同一时间点差异显著(P<0.05); 柱状图上方不同的大小写字母表示实验组和对照组在不同时间点差异显著(P<0.05), 下同

Fig. 1 Content of plasma cortisol after cortisol injection

\*. significant differences at the same point of time (P<0.05); bar with different upper capital and small letters at different points of time have significant difference in experimental group and control group (P<0.05), the same below

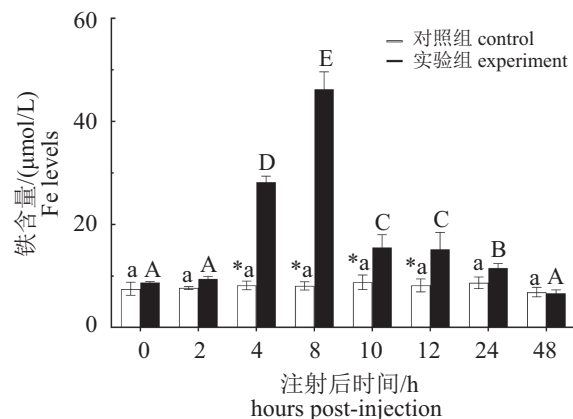


图 2 皮质醇对血浆铁含量的影响

Fig. 2 Effect of cortisol on iron levels in plasma

2.2 肝组织铁含量的变化

腹腔注射皮质醇4 h后团头鲂肝脏组织中铁的含量开始下降, 显著低于对照组(P<0.05); 10 h时肝组织中铁含量最低; 12 h时肝脏铁的含量略有增加, 但仍显著低于对照组; 24 h后恢复至正常水平; 呈现“V”字形变化趋势(图3)。实验组肝脏中铁含量在4、8、10和12 h时分别为对照组的0.7、0.5、0.1和0.8倍, 均与对照组存在显著差异(P<0.05)。

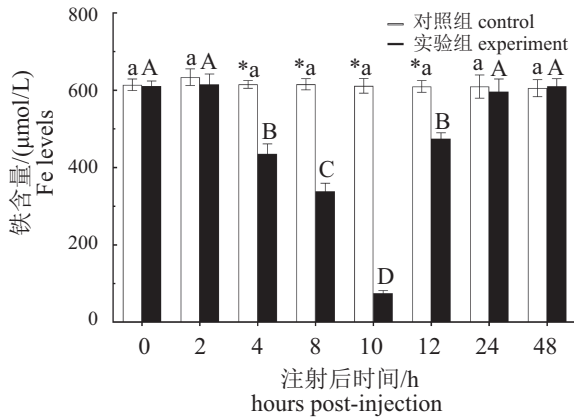


图 3 皮质醇对肝脏铁含量的影响

Fig. 3 Effect of cortisol on iron levels in liver

### 2.3 肝脏铁调素和转铁蛋白基因的表达

腹腔注射皮质醇后, 0和2 h时团头鲂肝组织中 *LEAP1* 基因在转录水平上与对照组没有显著差异 ( $P>0.05$ ); 4 h时肝脏中 *LEAP1* 表达量显著上调; 在8 h时达到最大值, 为对照组的5.9倍; 10 h时 *LEAP1* mRNA水平略微降低, 但仍维持较高的表达水平, 为对照组的4.7倍; 12~24 h时 *LEAP1* mRNA表达量逐渐下降, 但仍显著高于对照组 ( $P<0.05$ ); 48 h后 *LEAP1* 表达水平与对照组差异不显著(图4)。

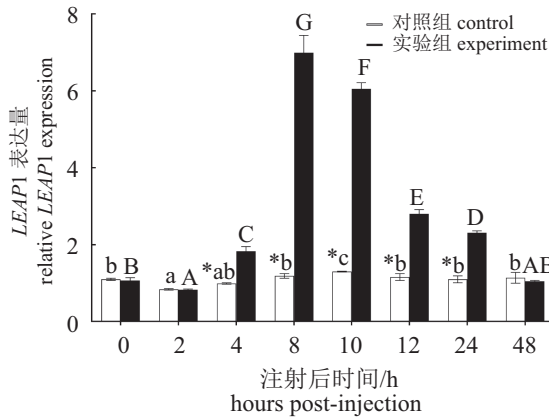


图 4 皮质醇对肝脏 *LEAP1* 基因表达量的影响

Fig. 4 Effect of cortisol on relative *LEAP1* mRNA expression in liver

团头鲂腹腔注射皮质醇以后, 肝脏 *LEAP2* mRNA表达呈先上升后下降的趋势。在0和2 h时肝脏 *LEAP2* 基因表达无变化, 与对照组相比无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 4 h时肝脏 *LEAP2* 表达量显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 为对照组的2.2倍, 8 h时 *LEAP2* mRNA表达量持续增加, 为对照组的

4.4倍; 10 h时 *LEAP2* 表达量最高, 为对照组的5.1倍; 12 h时 *LEAP2* 基因表达量显著下降, 但仍明显高于对照组(3.1倍), 24~48 h时恢复至初始水平。对照组中, 4、8、10和24 h时团头鲂肝脏 *LEAP2* 基因表达量显著高于其他采样点 ( $P<0.05$ ), 表明实验用溶剂或其他因素可能导致团头鲂 *LEAP2* 基因在不同采样点表达变化(图5)。

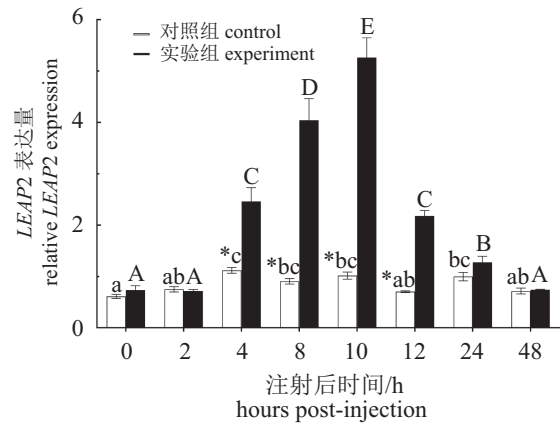


图 5 皮质醇对肝脏 *LEAP2* 基因表达量的影响

Fig. 5 Effect of cortisol on relative *LEAP2* mRNA expression in liver

与对照组相比, 皮质醇处理组在0 h时肝脏 *Tf* 基因表达水平显著高于对照组(1.4倍), 而在2和4 h时 *Tf* 表达量与对照组相比无显著性差异; 8、10、12和24 h时实验组肝脏中 *Tf* 的表达量显著增加 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的3.6、6.2、2.8和2.6倍, 其中10 h时 *Tf* mRNA转录水平最高, 整体呈现先上升后下降的变化趋势; 48 h时 *Tf* 表达水平降为正常水平 ( $P>0.05$ )(图6)。

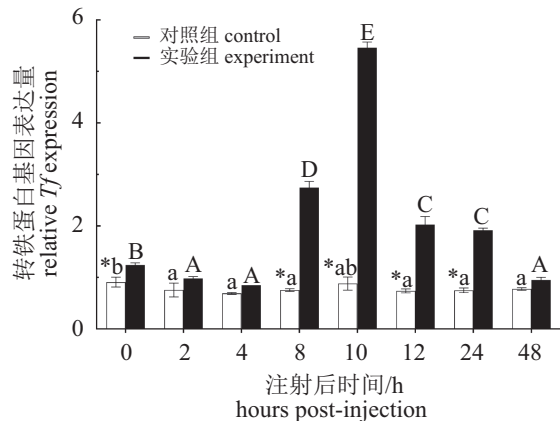


图 6 皮质醇对肝脏 *Tf* 基因表达量的影响

Fig. 6 Effect of cortisol on relative *Tf* mRNA expression in liver

## 2.4 肠道转铁蛋白基因的表达

与对照组相比,注射皮质醇后团头鲂肠道 *Tf* 基因表达水平在0 h显著降低(0.5倍),在2、8、10和12 h时 *Tf* mRNA表达水平显著上调( $P < 0.05$ ),分别为对照组的3.1、1.8、3.1和5.4倍,其中12 h时 *Tf* 表达量有最大值,24 h后迅速下降,与对照组相比无显著性差异,48 h时 *Tf* 表达水平与24 h时 *Tf* 表达水平基本持平,整体呈现先升后降的变化特点。对照组中, *Tf* 基因表达水平首先略有下调,在8 h时有最小值,然后快速升高,48 h时表达量最大,整体呈现“U”型的变化趋势(图7)。

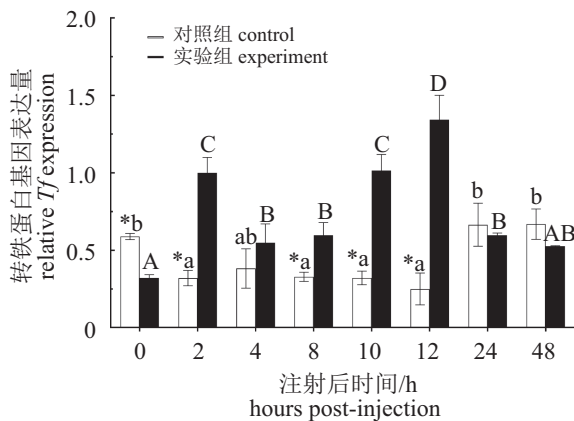


图7 皮质醇对肠道 *Tf* 基因表达量的影响  
Fig. 7 Effect of cortisol on relative *Tf* mRNA expression in intestines

## 3 讨论

水产养殖过程中的放养密度、病原微生物的侵袭等生物因素及运输、转塘和捕捞等非生物因素均能引起养殖动物应激反应。应激显著影响机体的神经、免疫、血液和消化等生理功能,造成养殖动物饵料转化率低、生长缓慢、抗病力差,甚至死亡等现象。应激状态下机体通过分泌应激激素(如皮质醇、儿茶酚胺等)来调控生理反应。皮质醇通常被视为检测鱼类应激较为敏感的指标之一。鱼体产生应激后,血液中皮质醇水平迅速升高。胁迫下皮质醇水平的升高是机体长期以来对不良环境的适应结果<sup>[10]</sup>。研究表明,拥挤胁迫<sup>[11]</sup>、运输<sup>[12]</sup>、高温<sup>[13]</sup>及氢化可的松投喂<sup>[14]</sup>均能引起动物体血浆皮质醇的升高,使动物处于应激状态。本实验中,注射外源性皮质醇后,0、2、4、8和10 h时皮质醇能快速被吸收进入血液,并逐渐被代谢,这表明实

验采用注射方法适宜于建立团头鲂氧化应激模型。此外,本实验结果与国外研究者在鲤(*Cyprinus carpio*)幼鱼中注射皮质醇后血浆皮质醇变化趋势相一致<sup>[15]</sup>。

铁是机体必需的微量元素和最丰富的过渡金属,是血红蛋白、肌红蛋白及多种酶的重要组成部分,广泛参与机体生命代谢活动,如氧气运输、氧化还原反应、细胞增殖与分化、基因表达调控等基本生命过程。*hep*作为机体铁代谢的重要调节因子,主要通过抑制十二指肠对外源性铁的吸收和网状内皮系统铁的再利用和释放来精细地调控机体的铁稳态<sup>[16]</sup>。*Tf*主要与血液中的 $Fe^{3+}$ 结合,形成 $Fe_2-Tf$ 复合物,由血液循环运送至肝脏或其他需要铁的组织或器官,在铁的吸收、转运、存储及再利用等过程中发挥着至关重要的作用<sup>[5]</sup>。研究发现,团头鲂体内存在两种类型的*hep*,分别命名为*LEAP1*和*LEAP2*,分别在肝脏和中肠中表达量较高<sup>[17]</sup>。*Tf*在健康团头鲂中主要在肝脏中表达,包含N-端和C-端2个相似的结构域,分子大小为70~80 u<sup>[18]</sup>。本实验中,外源性皮质醇急性胁迫后,血浆中皮质醇的含量在短时间内急剧升高,随后血浆中的铁含量显著升高,而肝脏中的铁含量显著下降,在分子水平上肝脏*LEAP1*和*LEAP2*及*Tf*基因的表达上调,而且肠道的*Tf*基因表达水平升高,这可能是由于急性应激引起鱼体内血浆铁含量的升高,激活了机体的铁调控系统。研究表明,*hep*作为机体铁代谢的负性调控因子,可直接作用于细胞膜上的膜铁转运蛋白(ferroportin, FPN),引起FPN表达量下降并导致其内化、降解,进而控制铁吸收和巨噬细胞对铁的再循环过程<sup>[19]</sup>,因而机体血浆铁含量与*hep*基因的表达水平存在正相关的关系。研究表明,转铁蛋白可作为铁调素的上游调节因子及血浆铁感应系统的成分之一,调控铁调素的表达<sup>[20]</sup>,当机体血浆铁含量过高时,*Tf*基因的表达量增加有利于将血浆过量的铁转运至需要铁的部位或以铁蛋白的形式储存起来,避免机体铁过载,维持机体铁代谢的动态平衡。从本实验模拟急性应激结果可以看出,应激造成细胞内的铁释放到体液中,为病原菌感染和增殖提供重要营养,增加发病风险。在养殖中鱼类面临的pH、溶解氧、氨氮等应激因素多数都是缓慢长期累积,这种应激是否有与本实验相同的现象仍需

要进一步探究。

鱼体内 *hep* 基因的表达变化受到如细菌<sup>[21]</sup>和病毒<sup>[22]</sup>的感染、养殖密度<sup>[23]</sup>、投喂量<sup>[23]</sup>、激素<sup>[24]</sup>等多方面因素的影响, 但是这些刺激因素可导致 *hep* 基因的表达水平有不同的变化趋势, 如鞍带石斑鱼<sup>[21]</sup>(*Epinephelus lanceolatus*)感染溶藻弧菌后 *hep* 基因表达水平上调, 高密度养殖和低投喂量可引起塞内加尔鲷<sup>[23]</sup>(*Solea senegalensis*) *hep* 基因表达量下降, 这表明鱼体内可能存在多种调控铁调素的分子信号通路。Lee等<sup>[25]</sup>报道 *hep* 基因的转录受白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的调控。杨永波等<sup>[26]</sup>发现感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)后, 团头鲂肝脏中 *IL-6*、*jak3*和*stat3*及*hep*基因表达水平上调, 这表明病原菌感染引起团头鲂体内 *IL-6* 表达上调, 激活了 JAK/STAT 信号通路,

进而调控下游 *hep* 基因的表达。除了 IL-6/JAK/STAT 铁调素信号调控通路外, 在哺乳动物中的 HJV/BMP/SMAD 信号通路和 HFE/TfR 信号通路均可调控铁调素的表达(图 8)。铁调素调节蛋白(hemojuvelin, HJV)与转化因子超家族的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)的结合以及遗传性血色病蛋白(hereditary hemochromatosis protein, HFE)与转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)的结合, 均可活化下游的信号转导分子 SMAD (drosophila mothers against decapentaplegic protein), 引起信号的级联反应, 调节铁调素的表达, 维持机体铁稳态<sup>[27-28]</sup>。研究发现, 舌齿鲈<sup>[29]</sup>(*Dicentrarchus labrax*)接受不同处理导致机体出现铁过载和铁缺乏后可激活 HJV/BMP/SMAD 和 HFE/TfR 铁调素信号调控通路, 这表明硬骨鱼类与哺乳动物类似, 体内存在多种调控机制维

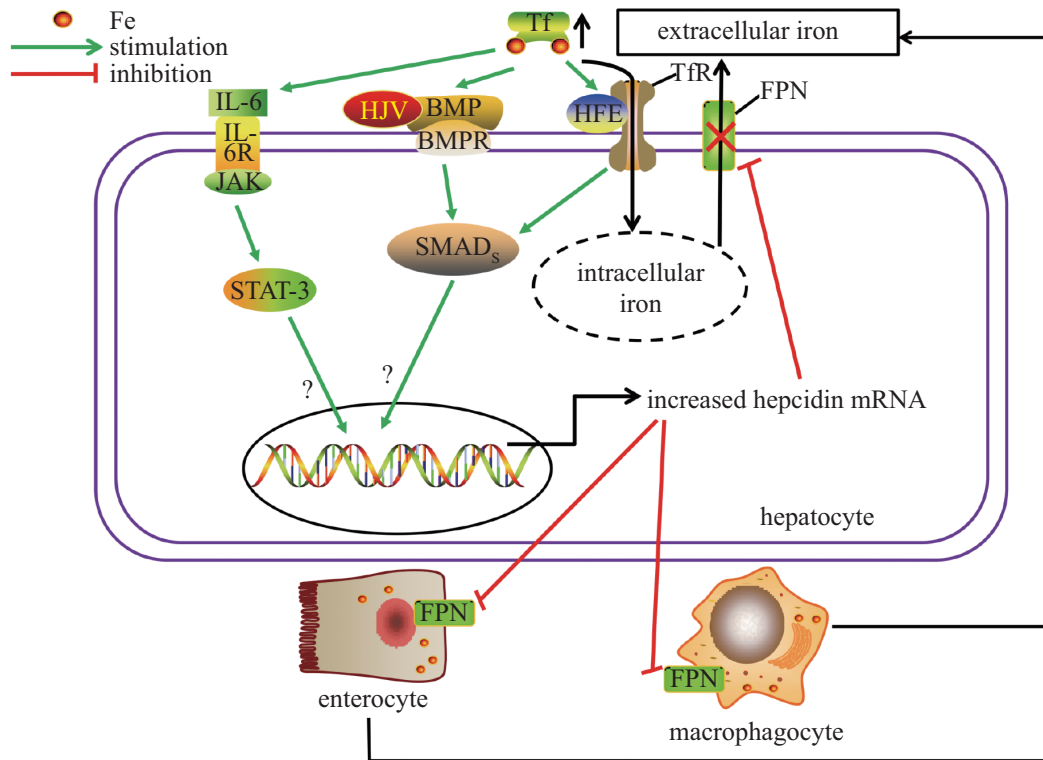


图 8 铁稳态调控示意图

Tf. 转铁蛋白, IL-6. 白细胞介素6, IL-6R. 白细胞介素6受体, JAK. 酪氨酸蛋白激酶, STAT-3. 信号传导与转录激活因子3, HJV. 铁调素调节蛋白, BMP. 骨形态发生蛋白, BMPR. 骨形态发生蛋白受体, SMAD. 信号转导分子smad蛋白, HFE. 遗传性血色病蛋白, TfR. 转铁蛋白受体, FPN. 膜铁转运蛋白, stimulation. 促进作用, inhibition. 抑制作用, extracellular iron. 胞外铁, intracellular iron. 胞内铁, hepatocyte. 肝细胞, enterocyte. 肠上皮细胞, macrophagocyte. 巨噬细胞, increased hepcidin mRNA. 铁调素上调表达

Fig. 8 Regulatory network of iron homeostasis

Tf. transferrin, IL-6. interleukin-6, IL-6R. interleukin-6 receptor, JAK. janus kinase, STAT-3. signal transducer and activator of transcription 3, HJV. hemojuvelin, BMP. bone morphogenetic proteins, BMPR. bone morphogenetic protein receptor, SMAD. drosophila mothers against decapentaplegic protein, HFE. hereditary hemochromatosis protein, TfR. transferrin receptor, FPN. ferroportin

持体内铁平衡,避免体内铁代谢紊乱的发生。本实验中,急性应激可引起团头鲂肝脏 $hep$ 基因表达水平的上调,这与杨永波等<sup>[26]</sup>的研究结果一致,但团头鲂在急性应激时通过何种信号途径调控铁调素的表达及铁调素调控具体的分子机制有待进一步地阐述和研究。生物体在不同的生理状况下通过复杂多样的信号转导机制精细地调控 $hep$ 基因表达,进而调节铁稳态,以满足机体对铁水平的不同需求。机体铁稳态的变化也会以不同方式反馈给调控 $hep$ 基因表达的信号通路,反过来调控 $hep$ 基因表达。因此 $hep$ 基因的表达变化既是应对外界因素维持体内铁稳态的被动反应,也是生物体自我调节维持内环境稳态的主动调控。

在养殖过程中,鱼体常面对各种外界因素的刺激(例如氨氮、缺氧、捕捞、运输、pH和养殖密度等)。团头鲂应激反应较为强烈,如捕捞后容易出现鱼体黏液减少、体色改变和体表充血等现象。应激严重影响团头鲂的饵料系数、生长速率和免疫力,增加疾病感染风险,影响经济效益<sup>[30]</sup>。为了减轻团头鲂的应激反应,目前主要是在饲料中添加维生素(维生素C和维生素E)和中草药制剂(如大黄素)以提高团头鲂的抗氧化性能和抗逆能力<sup>[31-32]</sup>,而对于应激后团头鲂自身的调控机制和抗逆的分子机制的研究尚不清楚。因而,本实验通过腹腔注射皮质醇模拟急性应激,研究微量元素铁在血浆和组织中的变化规律,有利于加深对鱼体应激反应的认识,掌握铁稳态相关基因 $hep$ 和 $Tf$ 在组织中的表达变化规律,为鱼体胁迫反应的分子机制研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Patruta S I, Hörl W H. Iron and infection[J]. *Kidney International*, 1999, 55(S69): S125-S130.
- [2] Park C H, Valore E V, Waring A J, *et al.* Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(11): 7806-7810.
- [3] Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, *et al.* Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using protein Chip system[J]. *Blood*, 2006, 108(4): 1381-1387.
- [4] 何建瑜,刘慧慧,薛超波. 鱼类铁调素(Hepcidin)的研究进展[J]. *水产养殖*, 2011, 32(7): 50-53.
- He J Y, Liu H H, Xue C B. Development of hepcidin in fish[J]. *Journal of Aquaculture*, 2011, 32(7): 50-53(in Chinese).
- [5] 刘佳. 脊椎动物转铁蛋白的研究进展[J]. *生命科学仪器*, 2009, 7(5): 11-14.
- Liu J. Research advances on transferrins of vertebrates [J]. *Life Science Instruments*, 2009, 7(5): 11-14(in Chinese).
- [6] Hirono I, Aoki T. Characteristics and genetic analysis of fish transferrin[J]. *Fish Pathology*, 1995, 30(2): 167-174.
- [7] Parkkinen J, von Bonsdorff L, Ebeling F, *et al.* Function and therapeutic development of apotransferrin[J]. *Vox Sanguinis*, 2002, 83(S1): 321-326.
- [8] 胡应高. 鱼类的应激反应[J]. *淡水渔业*, 2004, 34(4): 61-64.
- Hu Y G. On stress response of fishes[J]. *Freshwater Fisheries*, 2004, 34(4): 61-64(in Chinese).
- [9] 洪磊,张秀梅. 环境胁迫对鱼类生理机能的影响[J]. *海洋科学进展*, 2004, 22(1): 114-121.
- Hong L, Zhang X M. Effects of environmental stress on physiological function of fish[J]. *Advances in Marine Science*, 2004, 22(1): 114-121(in Chinese).
- [10] 王庆萍,方春林,芮学党. 鱼类的应激反应[J]. *江西水产科技*, 2013(3): 36-39.
- Wang Q P, Fang C L, Rui X D. Stress response in fish[J]. *Jiangxi Fishery Sciences and Technology*, 2013(3): 36-39(in Chinese).
- [11] 田芊芊,胡毅,毛盼,等. 低鱼粉饲料中添加牛磺酸对青鱼幼鱼生长、肠道修复及抗急性拥挤胁迫的影响[J]. *水产学报*, 2016, 40(9): 1330-1339.
- Tian Q Q, Hu Y, Mao P, *et al.* Effect of dietary taurine supplementation on growth, intestine structure and resistance to acute crowding stress in juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*) fed low fish meal diets[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(9): 1330-1339 (in Chinese).
- [12] 张伟,王有基,李伟明,等. 运输密度和盐度对大黄鱼幼鱼皮质醇、糖元及乳酸含量的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(7): 973-980.
- Zhang W, Wang Y J, Li W M, *et al.* Effects of transportation density and salinity on cortisol, glycogen and lactate of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) juveniles[J]. *Journal of Fisheries of China*,

- 2014,38(7): 973-980.
- [13] 张亚晨, 温海深, 李兰敏, 等. 急性温度胁迫对妊娠期许氏平鲈血清皮质醇和血液生理指标的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(12): 1872-1882.
- Zhang Y C, Wen H S, Li L M, *et al.* Effect of acute temperature stress on serum cortisol and hematological physiology of gestated *Sebastes schlegelii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(12): 1872-1882(in Chinese).
- [14] 魏炳栋, 陶浩, 于维, 等. 黄芪多糖对氢化可的松氧化应激状态下肉仔鸡生长性能、脏器指数及抗氧化能力的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(10): 1939-1945.
- Wei B D, Tao H, Yu W, *et al.* Effects of *Astragalus* polysaccharide on growth performance, viscera indexes and antioxidant capacity in broilers under oxidative stress by hydrocortisone induction[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(10): 1939-1945(in Chinese).
- [15] Dziejulska-Szwajkowska D, Łozińska-Gabska M, Adamowicz A, *et al.* The effect of high dose of cortisol on glucose-6-phosphatase and fructose-1, 6-bisphosphatase activity, and glucose and fructose-2, 6-bisphosphate concentration in carp tissues (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 135(3): 485-491.
- [16] 谢祥红. Hecpudin与FP1的研究进展及Hecpudin和FP1与HH疾病的关系[J]. 武警医学院学报, 2007, 16(4): 458-461.
- Xie X H. Progress on the study of hepcidin and FP1 and the relation between hereditary hemochromatosis and hepcidin and FP1[J]. Acta Academiae Medicinae CPAPF, 2007, 16(4): 458-461(in Chinese).
- [17] Liang T, Ji W, Zhang G R, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of liver-expressed antimicrobial peptide 1 (LEAP-1) and LEAP-2 genes in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 553-563.
- [18] Ding Z J, Zhao X H, Su L N, *et al.* The *Megalobrama amblycephala* transferrin and transferrin receptor genes: molecular cloning, characterization and expression during early development and after *Aeromonas hydrophila* infection[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 49(2): 290-297.
- [19] Nemeth E, Tuttle M S, Powelson J, *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization[J]. Science, 2004, 306(5704): 2090-2093.
- [20] Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2012, 1820(3): 188-202.
- [21] Wang Y D, Wang Y H, Hui C F, *et al.* Transcriptome analysis of the effect of *Vibrio alginolyticus* infection on the innate immunity-related TLR5-mediated induction of cytokines in *Epinephelus lanceolatus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 52: 31-43.
- [22] Yang C G, Liu S S, Sun B, *et al.* Iron-metabolic function and potential antibacterial role of hepcidin and its correlated genes (Ferroportin 1 and Transferrin Receptor) in Turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(3): 744-755.
- [23] Salas-Leiton E, Anguis V, Martín-Antonio B, *et al.* Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(2): 296-302.
- [24] Salas-Leiton E, Coste O, Asensio E, *et al.* Dexamethasone modulates expression of genes involved in the innate immune system, growth and stress and increases susceptibility to bacterial disease in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(5): 769-778.
- [25] Lee P, Peng H, Gelbart T, *et al.* Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(6): 1906-1910.
- [26] 杨永波, 扶晓琴, 陈柏湘, 等. 嗜水气单胞菌感染对团头鲂肝脏铁代谢的影响[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(4): 97-101.
- Yang Y B, Fu X Q, Chen B X, *et al.* Effect of *Aeromonas hydrophila* infection on iron metabolism in *Megalobrama amblycephala* liver[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2015, 34(4): 97-101(in Chinese).
- [27] Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2012, 1823(9): 1434-1443.



- [28] Drakesmith H, Prentice A M. Hepcidin and the iron-infection axis[J]. *Science*, 2012, 338(6108): 768-772.
- [29] Neves J V, Caldas C, Wilson J M, *et al.* Molecular mechanisms of hepcidin regulation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 1154-1161.
- [30] 崔立奇, 叶元土, 唐精. 团头鲂应激反应的原因分析及防治策略[J]. *饲料博览*, 2013(12): 43-46.  
Cui L Q, Ye Y T, Tang J. Cause analysis and control strategy of stress response in blunt snout bream[J]. *Feed Review*, 2013(12): 43-46(in Chinese).
- [31] 明建华, 谢骏, 徐跑, 等. 大黄素、维生素C及其配伍对团头鲂抗拥挤胁迫的影响[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(3): 400-413.
- Ming J H, Xie J, Xu P, *et al.* Effects of emodin, vitamin c and their combination on crowding stress resistance of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(3): 400-413(in Chinese).
- [32] 刘波. 高温应激与大黄蓼醌提取物对团头鲂生理反应及相关应激蛋白表达的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 1-155.  
Liu B. Effects of high temperature stress and anthraquinone extract from *Rheum officinale* bail on the physiological response and gene expression of stress heat shock protein of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*)[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012: 1-155 (in Chinese).

## Effects of acute stress on iron homeostasis and iron homeostasis related genes in *Megalobrama amblycephala*

GAO Jinwei<sup>1,2</sup>, XI Bingwen<sup>2\*</sup>, TENG Tao<sup>3</sup>, CHEN Kai<sup>2</sup>, QIN Ting<sup>2</sup>, XIE Jun<sup>2\*</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** To study the effects of acute stress reaction on iron concentration and iron homeostasis in *Megalobrama amblycephala*, we stimulated stress response by intraperitoneal injection of cortisol. The iron content in serum and liver was determined by spectrophotometer, and the iron homeostasis related gene (hepcidin & transferrin) expression were detected by quantitative real-time PCR at 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 and 48 h after cortisol injection. The results showed that the content of serum cortisol immediately increased significantly after injection, almost 10 folds compared with the control group, and gradually decreased backward. The content of serum iron in experimental group is higher than that in control group at 4, 8, 10 and 12 hours post injection (hpi), but the content of liver iron led to the opposite results. Hepcidin mRNA expression in liver rose remarkably, reaching the maximum at 8 hpi and 10 hpi, respectively, and then descended to the normal level. The transferrin showed similar expression pattern, and reached the peak at 10 hpi. The result indicated that large release of intracellular iron into body fluid led to increased risk of pathogenic infection and proliferation *in vivo*. Hepcidin and Tf were involved in regulation of iron metabolism and inflammatory response under stress in *M. amblycephala* and may play important roles in iron homeostasis and innate immune system.

**Key words:** *Megalobrama amblycephala*; iron; cortisol; hepcidin; transferrin; acute stress

**Corresponding author:** XI Bingwen. E-mail: xibw@ffrc.cn; XIE Jun. E-mail: xiej@ffrc.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31572662); Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-45); Aquaculture Research Program of Jiangsu Province (D2015-13)