

## 热应激对大正三色锦鲤非特异性免疫指标及 *HSP70* 基因表达的影响

张崇英<sup>1,2</sup>, 邢薇<sup>2</sup>, 李铁梁<sup>2</sup>, 马志宏<sup>2</sup>, 姜娜<sup>2</sup>, 罗琳<sup>2\*</sup>, 李云<sup>1\*</sup>

(1. 西南大学动物科技学院, 重庆 400715;

2. 北京市水产科学研究所, 北京 100068)

**摘要:** 为探讨锦鲤的抗逆机理, 在实验室条件下研究了持续热应激对大正三色锦鲤非特异性免疫指标及 *HSP70* 基因相对表达量的影响。分别于应激前、应激后 2、6、10、14、18、22、26 h 进行取样测定呼吸爆发、补体蛋白 3 (C3)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 以及热休克蛋白 70 (*HSP70*) 基因的相对表达量。结果发现, 热应激后呼吸爆发降低, 在应激后 2、10、18 ~ 26 h 降低显著 ( $P < 0.05$ ); 热应激 2 h 后血清中 C3 含量略有上升, 应激 6 ~ 26 h 过程中与应激前相比均下降, 应激 14 ~ 22 h 显著地下降 ( $P < 0.05$ ); 热应激下血清中 SOD 有上升的趋势, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 热应激下, 血清中 MDA 浓度升高, 应激 10 ~ 18 h 上升显著 ( $P < 0.05$ ); 应激后 2、26 h *HSP70* 基因的相对表达量与应激前相比显著性地上升了 5.93 倍、2 倍 ( $P < 0.05$ ), 应激后 6 ~ 22 h *HSP70* 基因的相对表达量与应激前水平无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。结果表明, 热应激影响锦鲤非特异性免疫指标, 降低锦鲤非特异性免疫力; *HSP70* 的表达受热应激调节, 热应激下诱导合成的 *HSP70* 对锦鲤起到一定的应激保护作用。

**关键词:** 大正三色锦鲤; 热应激; 非特异性免疫; 热休克蛋白 70

**中图分类号:** S 917; Q 786

**文献标志码:** A

应激是机体对外界或内部各种刺激所产生的非特异性应答反应的总和。鱼类属于水生低等脊椎动物, 容易受到水环境变化的刺激, 主要的环境因子有水温、溶解氧、盐度、氨、重金属离子等, 其中水温是重要的因素之一。当水温超过鱼体的最适生活水温时, 为保护其正常的代谢作用, 鱼体会产生各种热应激反应, 免疫系统的变化是鱼体应激反应的组成部分之一<sup>[1]</sup>。鱼类处于系统发育的较低级阶段, 其特异性免疫系统远不如高等脊椎动物的精细和发达, 而非特异性免疫系统在应对环境变化及抵抗病原生物入侵时发挥着更为重要的作用<sup>[2]</sup>。热休克蛋白 (heat shock protein, HSPs) 是生物体在不利环境因素刺激下应激合成的一组特殊的高度保守的蛋白质, 广泛存在于自然界的原核及真核生

物中, 其中 *HSP70s* 是最保守和最重要的一族, 研究也最为广泛<sup>[3]</sup>。鱼类 *HSP70* 在各种应激条件下的表达情况一直受到广泛的关注。各种应激下诱导表达的 *HSP70* 与生物体的适应能力有着重要的相关性, 其有助于维持细胞内稳态、改善细胞的生存能力以及提高对环境胁迫或伤害的耐受性。

锦鲤 (*Cyprinus carpio*) 在生物学上隶属鲤形目 (Cypriniformes), 鲤科 (Cyprinidae), 鲤属 (*Cyprinus*)。锦鲤游姿高雅, 体型优美, 色彩艳丽, 斑纹灿烂, 被称为“水中活宝石”, 是具有较高价值的较大型观赏鱼类, 其最适生活水温为 20 ~ 25 °C。在生产实践中, 不同品系的锦鲤应对环境胁迫如高温、高密度、缺氧、细菌和病毒侵染等的的能力各不相同, 而目前国内外鲜见有关锦鲤抗逆

收稿日期: 2011-08-31

修回日期: 2011-09-28

资助项目: 北京市科技项目 (D09060500430000); 现代农业产业技术体系—北京市观赏鱼创新团队建设

通讯作者: 罗琳, E-mail: luo\_lin666@sina.com; 李云, E-mail: yunlicn@126.com

机理方面的研究报道。鉴于非特异性免疫及 HSP70 在抗病抗逆中的重要作用,本研究以锦鲤中较为常见的品系——大正三色锦鲤(Taisho Sanke koi)为研究对象,探讨热应激下大正三色锦鲤非特异性免疫指标和 HSP70 基因表达量的变化,旨在为研究锦鲤的抗逆机理以及锦鲤抗应激品种的选育提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大正三色锦鲤由北京金竹苑锦鲤养殖场提供,挑选体格健康、大小均匀的锦鲤 100 尾,平均体重为  $(76.14 \pm 2.18)$  g,在水族缸中暂养一周,水温  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,持续充氧。

RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit With gDNA Eraser 及荧光定量试剂盒 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 均购自 TaKaRa 公司;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、补体蛋白 3(C3)酶联免疫检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;肝素试剂盒购自南京建成科技有限公司;荧光定量 PCR 仪为上海枫岭生物技术有限公司 FTC-3000 型荧光定量基因扩增仪;酶标仪为美国 BioTek PowerWave XS2 微孔板分光光度计。

### 1.2 热应激处理及取样

暂养结束后,采用加热棒逐渐升温方式,将水温从  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  逐渐升温至  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,升温时间为 2 h,保持增氧。水温上升至  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  后,持续应激 24 h。

热应激实验前取样:从水温  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  养殖系统中随机取 9 尾鱼,用三氯叔丁醇麻醉后,从尾静脉取血,置于肝素抗凝管中。取  $100\text{ }\mu\text{L}$  全血用于测定呼吸爆发;将剩下的抗凝血于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下  $3\ 000\text{ r/min}$  离心 10 min,收集上清液并保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,以备测定 MDA、SOD、C3 的含量。另将采血后的鱼心脏立即取出,速冻于液氮并贮存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,用于总 RNA 的提取。

热应激后取样:应激 2 h 后进行应激后第一次取样,以后每 4 小时取样一次。取样方法与热应激实验前方法一致。

### 1.3 非特异性免疫指标的测定

SOD、C3、MDA 的测定分别采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定,操作步骤按说明书进行。呼吸爆发的测定采用 NBT(氯化硝基

四氮唑蓝)法,参考 Sahoo 等<sup>[4]</sup>的方法测定。

### 1.4 荧光定量 PCR 检测 HSP70 mRNA 表达水平

引物设计 根据 GenBank 鲤 HSP70 序列 AY120894.1,应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, HSP70F: (5'-3') GTGTCATCCTGACCATTG-AAGA, HSP70R: (5'-3') CTGACTGATGTCCTTC TTGTGCTTC。根据 GenBank 鲤  $\beta$ -actin 序列 M24113.1,设计引物,  $\beta$ -actin-F: (5'-3') GCTGTCCCTGTATGCCTCTGGT,  $\beta$ -actin-R: (5'-3') GGCGTAACCCTCGTAGATGGG。所有引物均由华大基因合成,扩增片段为 100 ~ 150 bp。

总 RNA 的提取及反转录 心脏样品参照 Trizol Reagent 说明书操作,抽提总 RNA,凝胶电泳以及核酸蛋白仪鉴定其纯度和完整性,  $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$  为 1.8 ~ 2.0。按试剂盒 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit With gDNA Eraser(TaKaRa)的方法进行反转录合成 cDNA,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

实时荧光定量 PCR 扩增效率鉴定 以一个样品的 cDNA 为模板,进行 10 倍梯度稀释,分别取每个数量级稀释液  $2\text{ }\mu\text{L}$  作为模板进行荧光 PCR。荧光定量 PCR 反应液组成:  $12.5\text{ }\mu\text{L}$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II ( $2\times$ );  $1\text{ }\mu\text{L}$  PCR Forward Primer ( $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ );  $1\text{ }\mu\text{L}$  PCR Reverse Primer ( $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ );  $2\text{ }\mu\text{L}$  cDNA 模板;  $8.5\text{ }\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。反应条件为  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,进行 40 个循环。通过试验结果确定两个基因的扩增效率,采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法对基因表达进行相对定量分析,同时制作溶解曲线检验是否具有非特异性扩增。

实时荧光定量 PCR 检测 HSP70 基因的表达以  $\beta$ -actin 为内参,检测锦鲤热应激前后心脏组织中 HSP70 基因 mRNA 的表达情况,采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算相对表达量。

### 1.5 数据处理

对实验所测定的数据进行方差分析和多重比较,统计分析在 STATISTICA version 6.0 环境下进行,试验数据采用单因子方差分析(One-Way ANOVA),多重比较采用 Duncan 氏检验方法。

## 2 结果

### 2.1 非特异性免疫指标

热应激对大正三色锦鲤血细胞呼吸爆发活性的影响 热应激前呼吸爆发活性最大,应激后

2、6、10、14、18、22、26 h 呼吸爆发活性比应激前分别降低了 17%、8%、19%、4%、17%、22%、22%，应激后 2、10、18、22、26 h 呼吸爆发活性与应激前有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。

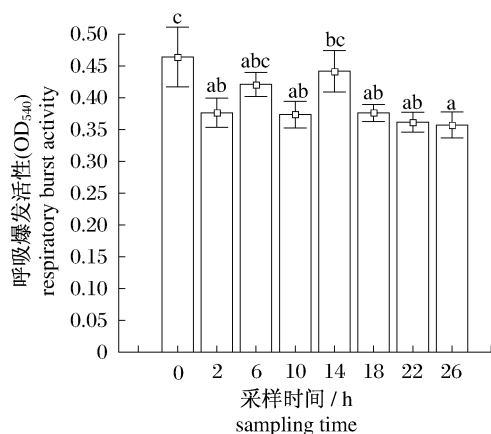


图 1 热应激对血细胞呼吸爆发活性的影响

图中数据表示为平均值 ± 标准误 ( $n = 9$ ), 不同的字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

Fig. 1 The effect of heat stress on respiratory burst of hemocyte

Values are expressed as mean ± SE ( $n = 9$ ), different letters in the figure mean significant differences ( $P < 0.05$ ). The same as the following.

热应激对锦鲤血清中 C3 的影响 应激后 2 h 血清中 C3 的含量比应激前上升了 1%，应激后 6~26 h 血清中 C3 含量均低于应激前的水平，应激后 6、10、14、18、22、26 h 血清中 C3 的含量比应激前分别降低了 0.08%、2%、7%、11%、10%、3%，应激后 14、18、22 h 与应激前有显著性的差异 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

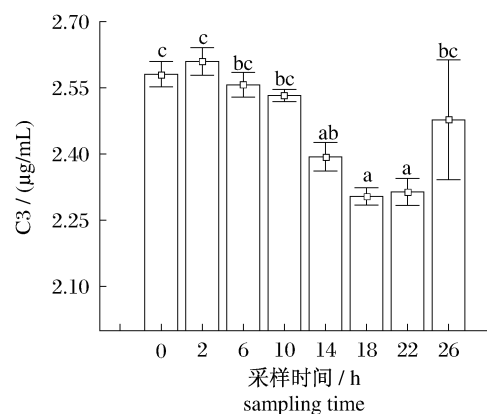


图 2 热应激对血清中 C3 含量的影响

Fig. 2 The effect of heat stress on the content of serum C3

热应激对锦鲤血清 SOD 的影响 应激后 2、6、14、18、22 h 血清中 SOD 的含量与应激前相比分别上升了 9%、4%、6%、2%、2%，应激后 10、26 h 血清 SOD 的含量与应激前相比均降低了 10%。应激后 SOD 含量与应激前的含量均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。

热应激对锦鲤血清 MDA 的影响 应激后血清中 MDA 的浓度均高于应激前的水平，应激后 2、6、10、14、18、22、26 h 与应激前相比分别上升了 27%、12%、40%、46%、45%、22%、31%，应激后 10、14、18 h 血清中 MDA 的浓度显著性高于应激前的水平 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

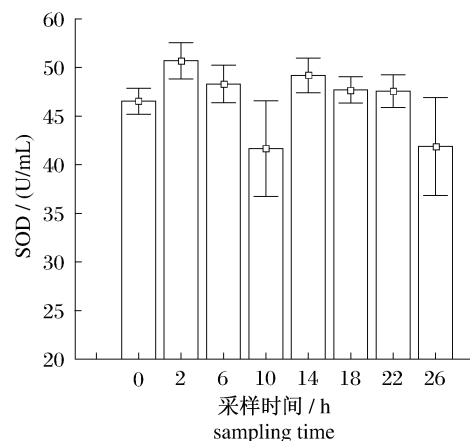


图 3 热应激对血清 SOD 含量的影响

Fig. 3 The effect of heat stress on the content of serum SOD

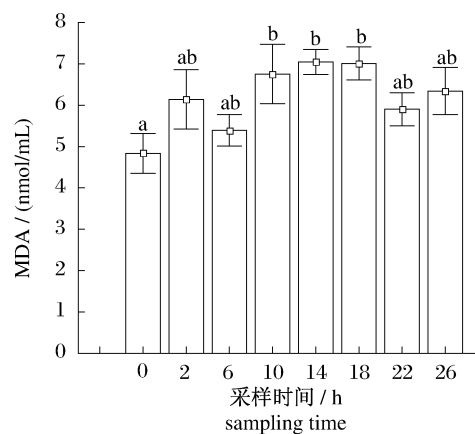


图 4 热应激对血清 MDA 含量的影响

Fig. 4 The effect of heat stress on the content of serum MDA

## 2.2 热应激对大正三色锦鲤 HSP70 基因的表达影响

应激后 2、26 h HSP70 基因的相对表达量与

应激前相比有显著性的差异 ( $P < 0.05$ ), 分别上升了 5.93 倍、2 倍, 应激后 6~22 h HSP70 基因的相对表达量与应激前水平无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (图 5)。

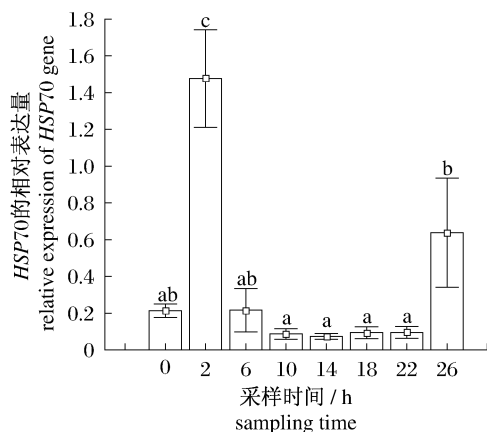


图 5 热应激对心脏组织中 HSP70 基因表达的影响

Fig. 5 The effect of heat stress on the relative expression content of HSP70 gene in heart tissue

### 3 讨论

#### 3.1 热应激对大正三色锦鲤非特异性免疫指标的影响

鱼类的单核细胞、巨噬细胞和各种粒细胞具有吞噬异物的能力<sup>[5]</sup>, 这些吞噬细胞吞噬异物后, 能量消耗剧增, 耗氧量随之相应增加, 称为呼吸爆发。呼吸爆发是鱼类非特异性细胞反应的主要指标之一, 可直接反映出鱼类非特异性免疫能力的大小。Verna 等<sup>[6]</sup>研究了鲤 (*Cyprinus carpio*) 鱼种分别在 26、31、33、36 °C 的水温下饲养 4 周后呼吸爆发随着饲养温度的升高出现显著性的降低。Ndong 等<sup>[7]</sup>报道了 27 °C 水温暂养下的莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 在 31 和 35 °C 的高温应激 24、48、96 h 后呼吸爆发均出现显著性的降低。Perez-Casanova 等<sup>[8]</sup>的研究发现温度升高对大西洋鳕 (*Gadus morhua*) 的呼吸爆发没有影响。本研究中, 热应激 2~26 h 的整个过程中呼吸爆发均低于应激前的水平, 应激 2 h 后呼吸爆发就显著性低于应激前的水平, 说明锦鲤吞噬细胞对高温应激较为敏感, 即使是短暂的高温应激也会对吞噬细胞的吞噬活性产生显著的影响, 在应激 6 h 和应激 14 h 时吞噬活性较前一时间点有略微的上升, 但是仍低于应激前的活

性, 这可能是持续热应激下机体会产生一些应激保护降低了应激造成的伤害, 但是这种应激保护的程度是有限的, 因而到应激结束时呼吸爆发活性降至最低。

鱼类补体系统由血清和体液中多种具有酶活性的球蛋白组成, 具有溶菌、中和外毒素、杀死寄生虫等直接的抗微生物作用, 是鱼类重要的非特异性体液免疫因子之一。目前在鱼类中已发现补体的活化途径有经典途径、凝集途径和旁路途径 3 种<sup>[9]</sup>。在补体系统的众多成分中, C3 是 3 种活化途径的共同成分, 其活性片段在机体防御中起着极为重要的作用, 是补体的关键成分<sup>[10]</sup>。本研究中, 热应激 2 h 后血清中 C3 的含量略有上升, 表明短时间的热应激能刺激机体迅速合成补体, 之后的应激过程中 C3 的含量均低于应激前的含量, 且在应激 14~22 h 时显著性地低于应激前的水平, 应激 18 h 时降至最低, 比应激前降低了 11%。说明长时间的刺激对锦鲤 C3 的合成具有抑制作用, 在应激 18 h 时抑制作用最为显著。Rotllant 等<sup>[11]</sup>将绝色棘鬣鱼 (*Pagrus pagrus*) 拥挤胁迫 23 d 后, 替代途径的补体活性 ACH<sub>50</sub> 明显降低。Ortuno 等<sup>[12]</sup>将海鲷 (*Sparus anrata*) 在 100 kg/m<sup>3</sup> 的密度下拥挤胁迫 2 h 后血清补体活性明显下降, 拥挤胁迫 5 d 后, 补体替代途径水平下降。这些结果似乎说明胁迫对补体大多有抑制作用。但 Ndong 等<sup>[7]</sup>报道了 27 °C 水温暂养下的莫桑比克罗非鱼在 31 °C 和 35 °C 的高温应激 24 h 后替代途径的补体 (ACH<sub>50</sub>) 显著性的上升, 说明补体系统的变化与应激手段、应急强度以及应激生物种类有关。Sakai 等<sup>[13]</sup>认为补体还具有调理作用, 可促进吞噬细胞的吞噬活性, 而本研究中吞噬细胞呼吸爆发的降低是否与补体活性受到热应激的抑制有关还有待于进一步研究。

应激会造成机体内自由基产生增加, 如果超出机体的清除能力, 破坏了体内自由基的产生与清除之间的动态平衡, 产生过多的自由基等活性氧具有很强的氧化性, 能攻击质膜中不饱和脂肪酸的双键, 造成脂质过氧化, 增加体内脂质过氧化物。脂质过氧化物进一步分解, 可产生大量的醛类、醇类和烃类, 其中 MDA 是具有很强生物毒性的物质, 会对机体造成伤害, 反应细胞受损伤程度以及脂质过氧化物程度<sup>[14-16]</sup>。超氧化物歧化酶 (SOD) 是一种广泛存在于生物界的金属酶, 是抗

氧化应激酶系中的重要成员,也是生物体内仅有的以超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )为作用底物的酶。它将 $O_2^{\cdot-}$ 歧化为 $H_2O_2$ 和 $O_2$ , $H_2O_2$ 经过氧化氢酶(CAT)或过氧化物酶分解或利用,避免氧化损伤<sup>[17]</sup>。SOD活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力,而MDA的高低间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。本研究中,在持续热应激下锦鲤血清中SOD的含量在应激的整个过程中主要表现为上升,仅在应激后10和26h时较应激前有所降低,但应激后与应激前的水平差异都不显著,说明应激会刺激机体合成一定的SOD用以清除热应激下产生的自由基。热应激2~26h血清中MDA的含量均高于应激前的含量,在应激10~18h时尤为显著,比应激前的含量升高了40%以上,表明热应激下机体产生的SOD对抗了锦鲤体内一定程度的氧化应激,但是持续的热应激打破了机体自由基产生与清除之间的动态平衡,加重了脂质过氧化程度,在持续应激10~18h时大正三色锦鲤体内脂质过氧化的程度最为严重。李大鹏等<sup>[18]</sup>研究发现,水温对中华鲟(*Acipenser sinensis*)血清中MDA的含量具有显著影响,随着水温的升高,MDA含量显著增加,高温胁迫使脂质过氧化程度增强,与本研究结果一致。

### 3.2 热应激对心脏组织中HSP70基因表达的影响

林亚秋<sup>[19]</sup>检测了HSP70基因在鲤心脏、肠、黏液、性腺、鳃、鳃、鳍等不同组织中的表达差异,发现其在心脏中的表达量最高。王云彪<sup>[20]</sup>指出温度对心脏HSP70具有明显的诱导作用。本研究中,热应激前心脏组织中HSP70 mRNA的相对含量较低,热应激后2h显著增加,比应激前上升了5.93倍,表明HSP70基因的表达受热应激调节,热应激导致细胞浆内的部分蛋白质变构或变性,变性的蛋白质启动热休克因子(HSF)蛋白质磷酸化并聚合形成三聚体,三聚体进入细胞核内,与热休克元件(HSE)结合,从而启动热休克基因的转录<sup>[21]</sup>,HSP70的表达量随之增加。热应激下合成的HSP70与变性蛋白或异常蛋白相结合,减少不溶性聚集物的产生并解离无法修复的蛋白质,另外,通过修复错误折叠蛋白,可加快正常蛋白的恢复,使热休克时因蛋白质变性而造成的蛋白量的减少得到补充,从而保持细胞的自稳定,保

护细胞免受变性蛋白的损害,起到应激保护的作用<sup>[22]</sup>。而应激6~22h过程中HSP70的表达量维持在与应激前相当的水平,这是因为HSP70的表达受到负反馈调控,即高含量的HSP70与HSF结合并抑制HSF的活性,从而减少HSF和HSE的特异性结合,控制热休克基因的转录<sup>[21]</sup>,使HSP70 mRNA的含量维持在一定的水平。Su等<sup>[23]</sup>认为HSP70还能提高抗氧化酶类的活性,消除氧自由基,同时其本身也具有抗氧化的作用。本研究中热应激诱导HSP70基因大量表达,而锦鲤血细胞呼吸爆发活性出现显著性的降低,血清中MDA的含量比应激前显著性的增加,说明持续热应激下HSP70应激保护及抗氧化作用是有限的。热应激下,诱导型HSP70基因的表达量上升,但这种上升在大量的研究中表现为短期的上升。团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)在34℃持续24h热应激下,肝脏组织中HSP70基因的相对表达量呈现先上升后降低的趋势,应激6h后相对表达量达最大值,之后HSP70 mRNA的相对含量降低<sup>[24]</sup>。地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)在35℃热激1h,然后16℃恢复3h后,消化腺HSP70 mRNA的含量达到最大值,随后的5~24h内逐渐减少<sup>[25]</sup>。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)RTG-2细胞在28℃持续应激24h后,两种HSP70基因的表达量均呈现先上升后降低的趋势,应激后3h表达量达最大值<sup>[26]</sup>。林亚秋<sup>[19]</sup>在鲤HSP70的组织差异性表达研究中指出,将HSP70作为鲤养殖中应激程度、应激能力、健康状况监测的分子标记物是可行的。本研究中持续热应激下心脏组织HSP70的表达变化也印证了这一点,但HSP70只在应激后2h具有显著的变化,之后HSP70的表达又恢复到之前的水平,这说明将HSP70作为应激监测指标时采样时间非常关键,而具体的采样时间要视应激手段、应激强度、实验物种以及实验组织而定。

综上所述,热应激下大正三色锦鲤呼吸爆发降低,血清中补体含量降低,体内脂质过氧化程度加深,持续的热应激对大正三色锦鲤造成免疫抑制,使鱼体非特异性免疫力降低;热应激下HSP70基因的表达受热应激调节,诱导表达的HSP70使机体获得了一定的高温耐受力,对应激起到一定的保护作用,但非常有限。本研究只开展了热应激对大正三色锦鲤的影响试验,对其他品系锦鲤

的影响还在研究中。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 王文博,李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况[J]. 水产学报,2002,26(4):368-374.
- [ 2 ] Jones S R M. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish [ J ]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(8-9):841-852.
- [ 3 ] Basu N, Todghama A E, Ackerman P A, *et al.* Heat shock protein genes and their functional significance in fish [ J ]. *Gene*, 2002, 295(2):173-183.
- [ 4 ] Sahoo P K, Kumari J, Mishra B K. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps [ J ]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2005, 21: 151-155.
- [ 5 ] Dalmo R A, Ingebrihtsen K, Bogwald J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system ( RES ) [ J ]. *Journal of Fish Diseases*, 1997, 20 ( 4 ): 241-273.
- [ 6 ] Verna A K, Pal A K, Manush S M, *et al.* Persistent sub-lethal chlorine exposure augments temperature induced immunosuppression in *Cyprinus carpio* advanced fingerlings [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(5):547-55.
- [ 7 ] Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H, *et al.* The immune response of *Tilapia Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(6):686-694.
- [ 8 ] Perez-Casanova J C, Rise M L, Dixon B, *et al.* The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5):600-609.
- [ 9 ] Claire M, Holland H, Lambris D J. The complement system in teleosts [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(5):399-420.
- [ 10 ] 昌鸣先, 裴品. 草鱼补体 C3 基因的克隆及在感染大中华鲮草鱼个体的表达分析 [ J ]. *自然科学进展*, 2004, 14(8):870-881.
- [ 11 ] Rotllant J, Pavlidis M, Kentouri M, *et al.* Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress [ J ]. *Aquaculture*, 1997, 156(3-4):279-290.
- [ 12 ] Ortuno J, Esteban M A, Meseguer J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus anrata* L) innate immune response [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, 11(2):187-197.
- [ 13 ] Sakai D K. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish [ J ]. *Annual Research of Fish Disease*, 1992, 2:223-247.
- [ 14 ] 刘波, 明俊超, 谢骏, 等. 大黄苜蓿提取物对罗氏沼虾高温下抗氧化能力与热应激蛋白 70 基因表达的影响 [ J ]. *水产学报*, 2010, 34(6):792-799.
- [ 15 ] 刘松岩. 环境胁迫对中华鲟体内自由基水平和抗氧化酶活力的影响 [ D ]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [ 16 ] 徐德立, 赵小立, 张铭. 低温胁迫下草鱼 ZC-7901 细胞系内丙二醛含量的变化 [ J ]. *曲阜师范大学学报: 自然科学版*, 2003, 29(4):88-90.
- [ 17 ] 刘存歧, 王伟伟, 张亚娟. 水生生物超氧化物歧化酶的酶学研究进展 [ J ]. *水产科学*, 2005, 24(11):49-52.
- [ 18 ] 李大鹏, 刘松岩, 谢从新, 等. 水温对中华鲟血清活性氧含量及抗氧化防御系统的影响 [ J ]. *水生生物学报*, 2008, 32(3):327-332.
- [ 19 ] 林亚秋. 鲤鱼 HSP70 基因组织表达差异研究 [ J ]. *安徽农业科学*, 2009, 37(11):4915-4916, 5077.
- [ 20 ] 王云彪. 热影响下鲤鱼 Hsp 组织特异性表达和应激反应 [ D ]. 吉林: 东北师范大学, 2008.
- [ 21 ] Morimoto R I. Cell in stress: transcriptional activation of heat shock genes [ J ]. *Science*, 1993, 259: 1409-1410.
- [ 22 ] 祝璟琳, 王国良. 鱼类 HSP70 的研究进展 [ J ]. *宁波大学学报: 理工版*, 2007, 20(4):446-450.
- [ 23 ] Su C Y, Chong K Y, Chen J, *et al.* A physiologically relevant hyperthermia selectively activates constitutive HSP70 in H902 cardiac myoblasts and confers oxidative protection [ J ]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1999, 31(4):845-855.
- [ 24 ] Ming J H, Xie J, Xu P, *et al.* Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(3):407-418.
- [ 25 ] Franzellitti S, Fabbri E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors [ J ]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 336 ( 4 ): 1157-1163.
- [ 26 ] Nobuhiko O, Michiaki Y, Shugo W. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells [ J ]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 329 (1):51-57.

## Effects of heat stress on non-specific immune parameters and *HSP70* gene expression in Taisho Sanke koi (*Cyprinus carpio*)

ZHANG Chong-ying<sup>1,2</sup>, XING Wei<sup>2</sup>, LI Tie-liang<sup>2</sup>, MA Zhi-hong<sup>2</sup>, JIANG Na<sup>2</sup>, LUO Lin<sup>2\*</sup>, LI Yun<sup>1\*</sup>

(1. School of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100068, China)

**Abstract:** In order to explore the mechanism of koi's anti-stress, the study was performed to examine the effect of continuous heat stress on non-specific immune parameters and *HSP70* gene expression in Taisho Sanke koi under the laboratory conditions. Samples for detections of respiratory burst, complement protein 3 (C3), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and relative expression content of heat shock protein 70 (HSP70) were taken before stress, 2, 6, 10, 14, 18, 22 and 26 h after stress, respectively. The results were as follows. Respiratory burst activity decreased after stress, and it decreased significantly after stress 2, 10, 18–26 h ( $P < 0.05$ ). The content of serum C3 was increased slightly 2 h after stress. Compared to before stress, the level of serum C3 decreased 6–26 h after stress, and it decreased significantly 14–22 h after stress ( $P < 0.05$ ). The level of serum SOD had the trend of augment, but not significantly ( $P > 0.05$ ). The concentration of serum MDA increased after stress, and it increased significantly after stress 10–18 h ( $P < 0.05$ ). Compared to before stress, the relative expression content of *HSP70* gene significantly increased by 5.93 times 2 h after stress and 2 times 26 h after stress ( $P < 0.05$ ). 6–22 h after stress, the relative expression content of *HSP70* gene had no significant difference from that before stress ( $P > 0.05$ ). These results indicated that heat stress affected non-specific immune parameters, and lowered non-specific immunity of Taisho Sanke koi. The expression of *HSP70* gene was regulated by heat stress. *HSP70* induced by heat stress played a role of stress protection to koi.

**Key words:** Taisho Sanke koi (*Cyprinus carpio*); heat stress; non-specific immunity; heat shock protein 70

**Corresponding author:** LUO Lin. E-mail: luo\_lin666@sina.com; LI Yun. E-mail: yunlicn@126.com