

亚硝酸盐急性胁迫对中华绒螯蟹幼体相关免疫指标和应激蛋白(HSP70)表达的影响*

洪美玲^{1,2} 陈立侨^{1**} 孙新谨¹ 李二超¹ 顾顺樟¹ 禹娜¹

(¹华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

(²海南师范大学生命科学学院 海口 571158)

摘要 为探讨亚硝酸盐急性胁迫对中华绒螯蟹机体免疫力的影响,以及机体在胁迫过程中的应对策略,分别测定了幼蟹(平均体重3.25 g)在10、20、30、40 mg L⁻¹亚硝酸盐暴露组和对照组中血细胞总数(Total hemocyte counts, THC)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活力、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量以及热休克蛋白70(Heat stress protein 70, HSP70)表达量在受胁迫2 d内的动态变化。结果表明:1)低浓度亚硝酸盐(10 mg L⁻¹)胁迫组THC在胁迫3 h时显著高于对照组,肝胰腺中SOD活性在胁迫3 h和6 h时亦显著提高,表现出一定的“毒物兴奋效应”。2)但随着暴露时间的延长和亚硝酸盐浓度的升高,幼蟹THC减少,肝胰腺SOD活性下降,而MDA含量升高。3)对照组中有少量的HSP70表达。幼蟹经10、20 mg L⁻¹亚硝酸盐处理后,鳃组织中HSP70表达量在胁迫6 h后达到最大,而经30、40 mg L⁻¹亚硝酸盐处理后,HSP70表达量在胁迫3 h后达到最大。各浓度组所诱导的HSP70最大表达量与水中亚硝酸盐的浓度呈正相关。以上结果说明亚硝酸盐胁迫可通过加剧组织中脂质过氧化方式导致机体免疫力下降,肝胰腺中MDA的含量变化可作为亚硝酸盐胁迫的有效评价指标之一,而HSP70表达量的变化可作为早期预警指标应用于亚硝酸盐胁迫评价中。图2 表1 参36

关键词 亚硝酸盐胁迫;中华绒螯蟹;超氧化物歧化酶;丙二醛;血细胞总数;HSP70

CLC X171.5 : Q966.16

Effects of Acute Nitrite Exposure on Immunity Indicators and HSP70 Expression in Chinese Mitten-hand Crab (*Eriocheir sinensis*)*

HONG Meiling^{1,2}, CHEN Liqiao^{1*}, SUN Xinjin¹, LI Erchao¹, GU Shunzhang¹ & YU Na¹

(¹School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai, 200062, China)

(²School of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou, 571158, China)

Abstract Nitrite is an intermediate product either in the bacterial nitrification of ammonia, or in the bacterial denitrification of nitrate. The concentration of nitrite may reach 50 mg L⁻¹ in intensive aquacultural systems due to an imbalance in biofilter resulting from overcrowding effect and poor water recirculation. High levels of nitrite in water were potential factors triggering stress on aquatic organisms. The sensitive indicators of stress evaluation for the Chinese mitten-hand crab *Eriocheir sinensis* were selected to investigate the effect of ambient nitrite on the immunity response. In this experiment, the juvenile crabs (mean weight: 3.25 g) were divided into four nitrite exposed groups (10, 20, 30 and 40 mg L⁻¹ ambient nitrite concentrations) and control group. The total hemocyte counts (THC), superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) level and HSP70 expression were measured after 3 h, 6 h, 1 d, and 2 d stress. The results were showed as follows: 1) After treated in low concentration (10 mg L⁻¹) nitrite exposure, THC increased significantly at 3 h and SOD activity in hepatopancreas increased significantly at 3 h and 6 h compared with the control group, which indicated a poison-intoxication effect. 2) With time elapsing and ambient nitrite increasing, THC and SOD activity in hepatopancreas decreased while MDA level in hepatopancreas increased, which indicated accelerating effect of lipid peroxidation by nitrite exposure. 3) HSP70 could be expressed at a low level in gills of crabs in the control group. The HSP70 expression reached a peak at 6 h stress when exposed in 10 and 20 mg L⁻¹

收稿日期: 2010-09-22 接收日期: 2010-10-28

*国家自然科学基金项目(No. 31172422)、公益性行业(农业)科研专项(No. 201003020)、上海市中华绒螯蟹现代农业产业技术体系建设、上海市科委重点项目(Nos. 08DZ1906401, 10JC1404100)、上海市科技兴农推广项目(沪农科推字(2009)第2-1号)和高等学校博士点专项基金(No. 200802690012) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31172422), the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest of China (No. 201003020), the Shanghai Technology System for Chinese Mitten-handed Crab Industry, the Key Project of Shanghai Committee of Science and Technology of China (Nos. 08DZ1906401, 10JC1404100), the Key Grant of Shanghai Agriculture Science and Technology (No. 2-1, 2009) and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 200802690012)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn)

nitrite and at 3 h stress when exposed to 30 and 40 mg L⁻¹ nitrite. The maximum expression was positively correlated with the concentration of ambient nitrite. Therefore, nitrite stress played a mainly role in decreasing of immunity by accelerating lipid peroxidation. The level of MDA in hepatopancreas was an effective indicator and HSP70 expression in gills also could be an early indicator of nitrite stress. Fig 2, Tab 1, Ref 36

Keywords nitrite stress; *Eriocheir sinensis*; superoxide dismutase; malondialdehyde; total haemocyte count; HSP70

CLC X171.5 : Q966.16

在水产动物集约化养殖过程中,由于水中氮含量升高和溶解氧相对缺乏,氮硝化和反硝化的动态过程受阻,导致水中亚硝酸盐浓度不断升高,有时可高达50 mg L⁻¹ [1]。研究表明,水中亚硝酸盐对鱼类的毒性主要是由于水体中浓度过高的亚硝酸根被机体吸收后,与血红蛋白反应生成高铁血红蛋白,从而造成血红蛋白活性下降,影响体内氧的运输、重要化合物氧化及器官损害,使得机体免疫力下降和疾病发生 [2-4]。由于甲壳动物缺乏特异性免疫,非特异性免疫在抵御外界不良环境时发挥着至关重要的作用,因此甲壳动物血淋巴中的血细胞及抗氧化酶在机体行使免疫功能时发挥着相当大的作用,可用作评价机体免疫状况和健康状况的重要指标 [5-8]。另一方面,机体在胁迫过程中也会启动一系列应对策略,如在受到环境、生理或病理胁迫时,热休克蛋白(HSP)的表达量明显增加 [9-10],主要作为分子伴侣参与稳定细胞结构,维持细胞正常生理功能。并且由于HSP可将机体所受的胁迫效应综合地表现在诱导蛋白的完整性上,即蛋白毒性(Proteotoxicity),用它作为生物标志物要比传统的生长、繁殖等生物学指标更敏感 [11-12]。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*, 河蟹)作为我国出口创汇的主要水产养殖品种之一,在江苏、浙江、安徽等地有着大面积的养殖,而水质恶化,疾病频发是蟹类养殖生产中面临的难题。研究环境胁迫对蟹类机体免疫力的影响,并做好及早预防是解决此难题的重要措施之一。我们以亚硝酸盐为胁迫因子,通过设定几种不同的暴露浓度,测定中华绒螯蟹血细胞总数、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量以及HSP70表达量在急性亚硝酸盐胁迫2 d内的动态变化过程,研究亚致死浓度的亚硝酸盐在短期内对机体相关免疫指标的影响及机体的应对策略,初步探讨亚硝酸盐对中华绒螯蟹免疫系统的毒害方式及蟹类对环境胁迫的免疫反应,同时也为蟹类环境胁迫评价体系的构建提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料及养殖管理

实验所用中华绒螯蟹幼体于2005年4月购自上海市近郊养殖场,暂养于华东师范大学生物站,试验用水为去氯自来水,使用前在空气中曝晒3 d以上。养殖过程中采用间歇充气,平均水温20 ℃, pH值7.45 ± 1.53,溶解氧6.5~7.0 mg L⁻¹,光周期12 L : 12 D。每天于上午8 : 00、下午4 : 00各投喂一定量的配合饲料,2 h后吸出剩余饲料,并于中午12 : 00换掉养殖水总体积的1/6。

暂养两周后再进行随机分组,挑选体色正常、健康活泼且平均体重为3.25 g的个体用于正式试验。试验前24 h停止投喂,试验期间不投喂任何食物。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 由于中华绒螯蟹对亚硝酸盐96 h半数致死浓度(96 h-LC₅₀)为25.91 mg L⁻¹ [13],因此本研究共设计4个亚硝酸盐胁迫组,水中表观浓度分别为10、20、30、40 mg L⁻¹,采用1 g L⁻¹亚硝酸钠母液调节至理想值,同时设一对照组(即不在水中加任何亚硝酸盐溶液),并各设3个重复。于胁迫3 h、6 h、1 d、2 d后分别从每试验组中取出9只个体进行取样。冰水浴中麻醉10 min,抽取一定量血淋巴用于血细胞计数(不加抗凝剂)。然后在冰上解剖,取出部分肝胰腺和鳃,制成匀浆液备用,其中肝胰腺匀浆液用于测定SOD活性和MDA含量,鳃匀浆液用于测定HSP70表达量。

1.2.2 相关免疫指标的测定 血细胞计数应在血淋巴取样结束后马上进行,血细胞总数(THC)测定采用血球计数板在Olympus光学显微镜下直接计数。

肝胰腺匀浆液制备:准确称取0.1 g肝胰腺,加入1 mL 50 mmol L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.5)于玻璃匀浆器中匀浆,4 000 r min⁻¹冷冻离心30 min,取上清液备用。

SOD活性测定采用连苯三酚自氧化法 [14],酶活单位定义:每毫克蛋白每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达50%的酶量定义为1个酶活单位(U mg⁻¹ protein)。

MDA含量测定采用硫代巴比妥(TBA)法 [15]。

组织匀浆液中蛋白浓度测定参照Bradford方法 [16],以牛血清蛋白(购于AMRESCO公司)为标准蛋白。

1.2.3 Western blot检测HSP70 准确称取不同浓度组 and 不同取样时间点的鳃丝0.1 g,剪碎,分别加入1 mL匀浆缓冲液中匀浆,超声波处理剪切DNA,直至溶液不黏稠为止。在4 ℃下,10 000 r min⁻¹冷冻离心10 min。上清沸水浴5 min,用Bradford法测定蛋白质浓度。等量蛋白上样进行SDS-PAGE电泳 [17],用半干法转印于硝酸纤维素(NC)膜后,再用PBS-T缓冲液漂洗,丽春红染色,确定HSP70和β-actin蛋白分子量标准的位置,在相应位置分别剪下这两条蛋白条带,置于封闭缓冲液(10%牛血清白蛋白)中4 ℃过夜,洗涤。

将HSP70蛋白条带置于HSP70(兔源,北京博奥森生物技术有限公司,1 : 1000)抗体稀释液中37 ℃、孵育2 h,洗涤;置于羊抗兔IgG(Sigma公司,1 : 5000)稀释液中37 ℃、孵育1 h,洗涤;将β-actin蛋白条带置于带有荧光标记的抗体中37 ℃孵育2 h,洗涤。在暗室中用ECL检测试剂处理NC膜,X光片(Kodak)曝光,显影,定影。

所得X光片定影后的HSP70和β-actin条带经Bio-profile软件分析,根据其灰度进行量化。

HSP70相对表达量 = HSP70灰度值/相应β-actin灰度值

1.3 数据处理

实验数据以 $\bar{X} \pm S.E.$ 表示,采用单因素方差分析(One-

way ANOVA), SPSS13.0软件系统中进行处理. 同一采样时间点不同亚硝酸盐处理组(含对照组)之间的比较分别采用LSD法进行, 而在相同亚硝酸盐处理组内, 不同采样时间点之间的多重比较则采用Duncan法进行, 差异显著临界值为0.05.

2 结果

2.1 急性亚硝酸盐胁迫对幼蟹血细胞总数 (THC) 的影响

由表1可知, 10 mg L⁻¹亚硝酸盐胁迫组THC在胁迫3 h时显著高于对照组, 而在胁迫1 d后却显著低于对照组, 另两个取样时间点的THC与对照组之间差异不显著. 当亚硝酸盐暴露浓度在20 mg L⁻¹以上时, THC显著低于对照组, 且暴露浓度越高THC下降幅度越大. 对照组THC在60×10⁶个mL⁻¹左右, 而10 mg L⁻¹和20 mg L⁻¹亚硝酸盐暴露组在胁迫1 d后THC最少, 在胁迫2 d后THC稍有回升, 其它两组THC随暴露时间的延长而不断下降.

2.2 急性亚硝酸盐胁迫对幼蟹肝胰腺超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量的影响

由表1可知, 10 mg L⁻¹亚硝酸盐可在短期(在胁迫3 h和6 h时)内使幼蟹肝胰腺中SOD活力显著提高, 但随暴露时间延长, SOD活性逐渐下降. 20 mg L⁻¹亚硝酸盐暴露组其肝胰腺SOD活性与对照组相比不存在显著差异, 而30 mg L⁻¹亚硝酸盐暴露组仅在胁迫2 d后与对照组存在显著差异, 40 mg L⁻¹亚硝酸盐暴露组在胁迫3 h与2 d后与对照组存在显著差异, 其余各取样时间点与对照组差异不显著. 随亚硝酸盐暴露时间的延长, 除40 mg L⁻¹暴露组外, 其余各组SOD活性均逐渐下降.

对照组中肝胰腺MDA含量为1 nmol mg⁻¹ prot.⁻¹左右, 随时间延长而变化不显著. 幼蟹经亚硝酸盐暴露后, 肝胰腺中MDA含量随暴露浓度的升高和暴露时间的延长而逐渐升高.

10 mg L⁻¹和20 mg L⁻¹亚硝酸盐暴露组中肝胰腺MDA含量差异不大, 除胁迫6 h时两组之间存在显著差异外, 其它取样时间点无显著差别; 类似地, 30 mg L⁻¹和40 mg L⁻¹亚硝酸盐

暴露组中肝胰腺MDA含量在胁迫3 h、6 h和2 d时均不存在显著差异, 但前两组与后两组之间却存在显著差别.

2.3 急性亚硝酸盐胁迫对幼蟹鳃组织中HSP70表达的影响

由图1、图2可知, 在未经任何处理的对照组中也有少量HSP70表达. 幼蟹经10 mg L⁻¹和20 mg L⁻¹亚硝酸盐处理后, HSP70相对表达量在胁迫6 h达最大, 经30 mg L⁻¹和40 mg L⁻¹亚硝酸盐处理后, 却在胁迫3 h时达到最大. 而且, 水中亚硝酸盐浓度越高, HSP70最大表达量越大, 但随时间的延长其表达量逐渐下降.

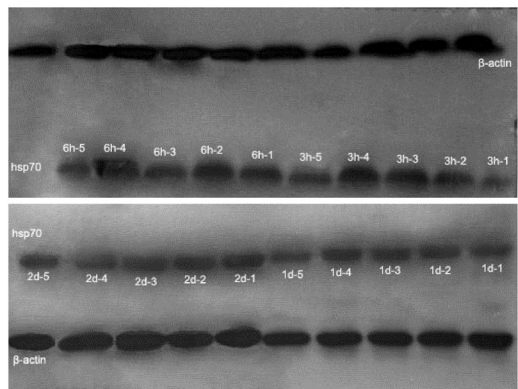


图1 不同处理组不同时间段幼蟹鳃组织中HSP70和β-actin的免疫印迹检测
Fig. 1 The HSP70 and β-actin bands of gills in *E. sinensis* juveniles by western blot detection

3 讨论

3.1 亚硝酸盐胁迫对中华绒螯蟹幼体血细胞数量的影响

由于甲壳动物缺乏像高等动物由免疫球蛋白介导的特异性免疫, 其防御功能的完成主要靠血细胞通过吞噬、包囊、形成肉芽肿等防御反应来清除血窦中侵入的异已颗粒, 因此血细胞既是细胞免疫的担当者, 又是体液免疫因子的提供者. 研究表明, 血细胞数量常随甲壳动物自身的生理状况及周围水体环境条件如温度、盐度、pH值等的改变而变化, 常被用作甲壳动物健康状况的评定指标之一^[18-20]. 将黄腿虾

表1 急性亚硝酸盐胁迫对幼蟹血细胞总数、肝胰腺中SOD活性和MDA含量的影响 (N = 9)

Table 1 Effect of acute nitrite exposure on THC, SOD activity and MDA level in hepatopancreas of *E. sinensis* (N = 9)

检测指标 Index	亚硝酸盐浓度 Nitrite content (μg mg L ⁻¹)	胁迫3 h 3 h-stress	胁迫6 h 6 h-stress	胁迫1 d 1 d-stress	胁迫2 d 2 d-stress
血细胞总数 THC (n/10 ⁶ mL ⁻¹)	40	27.00 ± 1.03 ^d	28.67 ± 1.26 ^d	34.50 ± 0.76 ^d	32.17 ± 0.70 ^c
	30	33.67 ± 0.95 ^d	42.00 ± 1.29 ^c	46.83 ± 1.40 ^c	43.33 ± 1.45 ^b
	20	49.17 ± 2.52 ^c	52.00 ± 1.81 ^b	47.83 ± 1.89 ^{bc}	49.50 ± 2.11 ^b
	10	75.00 ± 1.86 ^b	61.50 ± 1.31 ^a	54.83 ± 1.30 ^b	58.83 ± 2.15 ^a
	对照 Control	64.87 ± 4.21 ^a	63.84 ± 4.90 ^a	62.24 ± 4.23 ^a	64.26 ± 4.94 ^a
SOD (λ/U mg ⁻¹ protein)	40	22.84 ± 2.39 ^c	40.17 ± 3.73 ^a	36.64 ± 6.03 ^a	30.89 ± 2.78 ^b
	30	42.52 ± 10.58 ^a	41.52 ± 2.82 ^a	36.40 ± 3.42 ^a	31.96 ± 2.90 ^b
	20	51.81 ± 1.70 ^a	42.32 ± 2.23 ^a	37.38 ± 1.92 ^a	36.15 ± 5.05 ^{ab}
	10	76.96 ± 3.51 ^b	59.54 ± 1.93 ^b	45.40 ± 1.39 ^b	38.65 ± 2.02 ^{ab}
	对照 Control	45.32 ± 1.22 ^a	45.09 ± 5.96 ^a	44.14 ± 1.49 ^{ab}	45.21 ± 6.17 ^a
MDA (b/nmol mg ⁻¹ protein)	40	2.47 ± 0.16 ^b	3.56 ± 0.25 ^c	5.30 ± 0.36 ^d	6.62 ± 1.00 ^c
	30	2.10 ± 0.18 ^b	3.84 ± 0.10 ^c	4.15 ± 0.29 ^c	5.52 ± 0.22 ^c
	20	1.40 ± 0.23 ^a	2.33 ± 0.23 ^b	3.39 ± 0.11 ^b	3.84 ± 0.32 ^b
	10	1.17 ± 0.33 ^a	1.46 ± 0.18 ^a	3.07 ± 0.14 ^b	3.70 ± 0.41 ^b
	对照 Control	1.08 ± 0.11 ^a	1.01 ± 0.14 ^a	1.18 ± 0.16 ^a	1.01 ± 0.14 ^a

相同指标在同一列中不同字母代表差异显著 Values with different upper letters in the same column of the same indicator mean significant difference

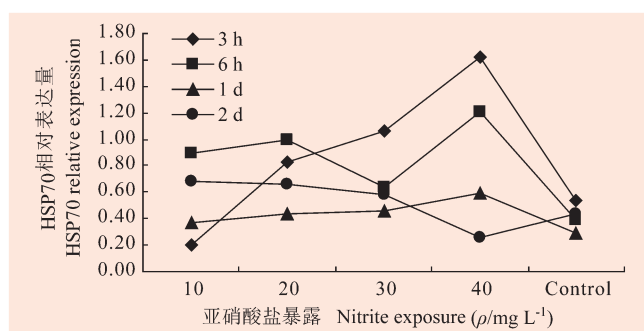


图2 不同亚硝酸盐浓度对幼蟹鳃组织中HSP70相对表达量的影响
Fig. 2 Effect of ambient nitrite concentration on relative expression of HSP70 in gills of *E. sinensis* juveniles

(*Farfantepenaeus californienseis*) 养殖温度从18 ℃ 升高到32 ℃ 时, 其血细胞总数显著下降^[21]。这些消失的血细胞主要是通过吞噬作用以用于吞噬外来异物或病毒, 或积聚于某些创伤处用于清除病灶, 从而导致自身死亡^[22]。在本研究中, 高浓度亚硝酸盐暴露亦可使血细胞总数显著下降。

尽管环境胁迫可阻碍造血器官血细胞生成过程, 从而使血细胞数量减少。但在一定强度下, 随胁迫时间的延长, 血细胞数量不可能持续下降。Pascual等研究发现, 机体为维持正常生理功能, 必须通过启动一系列复杂的生理生化反应, 然后将部分组织细胞迁移至循环系统中, 以补充不断减少的血细胞, 来应对外界环境中各种胁迫反应^[23]。因此血细胞总数随着胁迫时间的延长将处于周期性波动过程。将白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*) 环境温度从24 ℃ 升高到33 ℃ (每小时升高1 ℃), 其血细胞数逐渐升高, d 3开始下降, d 6降至最低, 然后又逐渐升高, 表现出一种周期性的波动过程, 即血细胞每隔48~96 h恢复和迁移一次^[23]。本研究结果也证实了这一现象的存在, 不同取样时间点血细胞数量的变化并不是简单的上升或下降, 而是表现出一种复杂的变化过程, 而且低浓度的亚硝酸盐可使血细胞数在短期内显著升高。但有关低浓度的亚硝酸盐胁迫导致血细胞数增加的机制以及亚硝酸对血细胞生成机制的影响尚不清楚, 有待于进一步研究。

3.2 亚硝酸盐胁迫对中华绒螯蟹幼体抗氧化及脂质过氧化的影响

Winston研究表明, 生物在外界逆境胁迫时可促使机体细胞内线粒体、微粒体和胞浆酶系统和非酶系统反应, 通过还原产生活性氧和氧自由基, 从而打破了生物体内活性氧代谢平衡, 如不及时消除就会造成生物体活性氧伤害^[24]。SOD和CAT是两种相互关联的抗氧化酶, 可联合清除活性氧自由基, 使机体免受氧化伤害。通常, SOD和CAT活力下降, 标志着机体清除自由基的能力下降^[25]。但SOD是一种诱导性酶, 当有较低强度的刺激物(即胁迫因子)存在时, SOD在短期内反而被激活, 其活性将有一定程度的升高, Stebbing认为这可能是毒物低浓度条件下的一种增益效应, 并称之为“毒物兴奋效应”(Poison-intoxication effect)^[26]。Wang等研究表明2 mg L⁻¹亚硝酸盐暴露可提高日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) SOD活性, 当亚硝酸盐浓度为4~13 mg L⁻¹时, SOD活性显著下降^[3]; 樊甄姣等研究发现当水中氨氮浓度为1.25~5 mg L⁻¹时, 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) SOD活性随氨

氮浓度增加而升高, 当氨氮浓度为10~40 mg L⁻¹时, 酶活性才显著下降, 其研究还表明氨氮胁迫下氧化酶系统的破坏和活性氧积累造成的氧化损伤很可能是氨氮产生毒害作用的重要原因^[27]。

在本研究中, 低浓度的亚硝酸盐暴露在短期内提高了SOD活性, 但高浓度的亚硝酸盐暴露却抑制了SOD活性, 说明低浓度胁迫条件在短期内可促进机体的防御能力。而高浓度胁迫条件下所表现出的抑制效应可能是由于活性氧自由基已超过自身的清除阈值而引起如上所说的氧化损伤。随着胁迫时间的延长, 低浓度的增益效应消失, 导致抗氧化酶活性下降或与对照组差异不显著。Parihar等^[28]和孔祥会等^[29]的研究也得到了相类似的结果。

与此同时, 过多的活性氧将使机体处于氧化胁迫状态, 脂质过氧化程度加剧, 脂质过氧化的代谢产物将急剧增加, 而丙二醛是脂质过氧化的代谢产物之一, 亦被广泛用作氧化胁迫中细胞膜氧化损伤的评价指标^[30]。在本研究中, 肝胰腺丙二醛含量随着水中亚硝酸盐浓度的升高而增加, 并随时间的延长, 在体内的累积量不断增加, 这提示亚硝酸盐胁迫下丙二醛的累积而造成的氧化损伤也可能是亚硝酸盐对中华绒螯蟹产生毒害作用的方式之一。

3.3 亚硝酸盐胁迫对中华绒螯蟹幼体HSP70表达量的影响

HSP70是已知热休克蛋白家族中最重要的一种, 作为应激保护蛋白, 在应激条件下其表达量显著升高, 在蛋白质的折叠、装配、转运和不可复性多肽的降解及其调控过程中起着关键作用^[9]。大量研究表明, HSP70可以维持细胞内稳态, 缓解或减轻机体(细胞)所受到的应激损伤, 它在细胞内的大量表达可以明显改善细胞的生存能力, 提高对环境胁迫或伤害的耐受性^[31-32]。除了受胁迫的情况外, 正常生理条件下的细胞中也有HSPs存在。本研究的结果也证实了这一点, 在对照组中有少量的HSP70表达。而且HSP70的诱导表达存在组织特异性, 曲凌云等通过研究热激条件下栉孔扇贝不同组织中HSP70的表达时发现, 热休克可以使扇贝鳃组织中HSP70的表达明显升高, 但血淋巴液、肌柱、外套膜和性腺中无HSP70的表达^[33]。对其它水生动物如贻贝(*Mytilus edulis*)、鲍鱼(*Haliotis rufescens*)、牡蛎(*Crassostrea gigas*)等的HSP70表达研究也多集中于鳃组织中HSP70的表达变化^[33], 这可能是由于水生动物生活在水中, 鳃在呼吸、排泄等方面行使着重要的生理功能, 因此鳃组织比其它组织对水环境的改变更为敏感。本研究也是在比较了肝胰腺、生殖腺等其它组织HSP70表达量的基础上, 发现鳃组织HSP70表达量最大, 因此本研究以鳃组织为研究材料, 研究鳃组织中HSP70的表达在亚硝酸盐胁迫过程中的时序变化。

HSP70作为一种灵敏的应激蛋白, 其表达量的变化可以反映出环境变化对动物体内环境的影响。Veldhuizen等将贻贝放置在不同程度的污水中时, 发现水体污染物异常敏感地诱导贻贝表达HSP^[34], 这表明在传统指标未发生变化时, HSP的表达就可灵敏地探测出水体污染的出现; Radlowska等观察到, 低浓度的重金属污染可导致贻贝体内HSP70的轻微变化, 而高浓度的重金属污染可诱导HSP70高水平表达^[35]。

在本研究中, HSP70表达量的变化也具有相对灵敏的优势, 且其最大表达量与亚硝酸盐的暴露浓度还存在一定的剂量关系。

HSP70作为信息传递的介质和对抗损伤的保护因子, 在应激反应中明显表达, 并且其表达量具有一定的时序性。应激后不同月龄大鼠的海马组织中HSP70 mRNA均有迅速明显的表达, 逐渐升高达高峰后, 随时间延长而降低, 6 h后稍高于基础水平, 这提示HSP70的表达是一个迅速而短暂的过程^[36]。在本研究中, HSP70的最大表达量在胁迫后3 h或6 h时达到最大表达量。这说明HSP70可作为一种较为敏感的早期应激评价指标, 但应注意其表达的时序性, 抓住其最大表达量的关键时刻。

References

- 1 Kroupova H, Machova J, Svobodova Z. Nitrite influence on fish: A review. *Vet Med Czech*, 2005, **50** (11): 461~471
- 2 Jensen FB. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol*, 2003, **135A**: 9~24
- 3 Wang WN, Wang AL, Zhang YJ, Li ZH, Wang JX, Sun RY. Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture*, 2004, **232**: 679~686
- 4 Tseng IT, Chen JC. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish & Shellfish Immunol*, 2004, **17**: 325~333
- 5 Winston GW, Giulio RT. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol*, 1991, **19**: 137~161
- 6 Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem Eng*, 1995, **64**: 97~112
- 7 Pedrajas JR, Peinado J, Lopez-Barea J. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem Biol Interact*, 1996, **98**: 267~282
- 8 LeMoullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in crustacean. *Aquaculture*, 2000, **191**: 121~131
- 9 Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther*, 1998, **80** (2): 183~201
- 10 Fede ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response. *Annu Rev Physiol*, 1999, **61**: 243
- 11 Sanders BM. Stress-proteins in aquatic organisms: An environmental perspective. *Crit Rev Toxicol*, 1993, **23**: 49~75
- 12 Luis AC, Chu FLE. Heat shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and suspended field contaminated sediments. *Aquatic Toxicol*, 2002, **60**: 157~168
- 13 Hong ML, Chen LQ, Qin JG., Sun XJ, Li EC, Gu SZ, Yu N. Acute tolerance and metabolic responses of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles to ambient nitrite. *Comp Biochem Physiol*, 2009, **149C** (3): 419~426
- 14 Ding XY (丁秀云), Li GY (李光友), Zhai YM (翟玉梅). Study on the changes of some factors in haemolymph of induced *Haliotis discus* Hannai. *Oceanol Limnol Sin* (海洋与湖沼), 1996, **27** (4): 362~367
- 15 Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1978, **52**: 302~310
- 16 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **2**: 248~254
- 17 Li YM (李永明), Zhao YQ (赵玉琪). Practical Protocols in Molecular Biology. Beijing, China: Publishing House of Science (北京: 科学出版社), 2001. 325
- 18 Chen GF (陈国福), Huang J (黄健), Song XL (宋晓玲). General situation of the immunological capability of shrimp. *J Fish China* (水产学报), 2004, **28** (2): 209~215
- 19 Le Moullac G, Soyez C, Saulnier D, Ansquer D, Avarre JC, Levy P. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Immunol*, 1998, **8**: 621~629
- 20 Cheng SY, Chen JC. Joint action of elevated ambient nitrite and nitrate on hemolymph nitrogenous compounds and nitrogen excretion of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol*, 2002, **131C**: 303~314
- 21 Vargas-Albores F, Hinojosa-Baltazar P, Portillo-Clark G, Magallon-Barajas F. Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. *Aquacul Res*, 1998, **29** (8): 549~553
- 22 Gilles LM, Philippe H. Environmental factors affecting immune responses in crustacean. *Aquaculture*, 2000, **191**: 121~131
- 23 Pascual C, Sánchez A, Sánchez A, Vargas-Albores F, LeMoullac G, Rosas C. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: The effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, 2003, **218**: 637~650
- 24 Winston GW. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol*, 1991, **100C**: 173~176
- 25 Sies H. Oxidative stress II: Oxidants and Antioxidants. New York, USA: Academic Press, 1991. 58~73
- 26 Stebbing ARD. Hormes is the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci Tol VI*, 1982, **22**(1): 213~234
- 27 Fang ZJ (樊甄姣), Liu ZG (刘志鸿), Yang AG (杨爱国). Effect of ammonia-N on the content of ROIs and the activities of antioxidant enzyme in the haemolymph of *Chlamys farreri*. *Mar Fish Res* (海洋水产研究), 2005, **26** (1): 23~27
- 28 Parihar MS, Javeri T, Hemnani T, Dubey AK, Prakash P. Response of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *J Therm Biol*, 1997, **22**: 151~156
- 29 Kong XH (孔祥会), Wang GZ (王桂忠), Li SJ (李少菁), Ai CX (艾春香). Antioxidant effects and ATPase activity changes in hepatopancreas of mud crab *Scylla serrata* under low temperature acclimation. *J Fish Sci China* (中国水产科学), 2005, **12** (6): 708~713
- 30 Lepage G, Mnuoz G, Champagne J, Roy CC. Preparative steps for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 1991, **197**: 277~283

- 31 Müller WEG, Koziol C, Dapper J, Kurelec B, Batel R, Rinkevich B. Combinatory effect of temperature stress and nonionicorganic pollutants on stress protein (HSP70) gene expression in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Environ Toxicol Chem*, 1995, **14**: 1203~1208
- 32 Tedengren M, Olsson B, Reimer O, Brown D C, Bradley B P. Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP70 levels in Baltic Sea mussels. *Aquatic Toxicol*, 1999, **48**: 1~12
- 33 Qu LY (曲凌云), Xiang JH (相建海), Sun XQ (孙修勤), Hong XG (洪旭光), Zhang JX (张进兴). Expression analysis of HSP70 in various tissues of *Chlamys farreri* under thermal stress. *Chin High Technol Lett* (高技术通讯), 2005, **15** (5): 96~100
- 34 Veldhuizen-Tsoerkan MB, Holwerda DA, van der Mast CA, Zandee DI. Synthesis of stress proteins under normal and heat shock conditions in gill tissue of sea mussels (*Mytilus edulis*) after chronic exposure to cadmium. *Comp Biochem Physiol*, 1991, **100C**: 699
- 35 Radlowska M, Pempkowiak J. Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ Int*, 2002, **27** (8): 605
- 36 Shao SH (邵淑红). Experiment study of impact of change of stress intensity and duration on the expression and the habituational expression of HSP70mRNA in different month rats hippocampus: [Master Degree Dissertation]. Jinan, China: Shangdong University (济南: 山东大学), 2005. 4~7

欢迎订阅 欢迎投稿

《应用与环境生物学报》(双月刊)

刊号: ISSN 1006-687X /CN 51-1482/Q 邮发代号: 62-15

《应用与环境生物学报》由中国科学院主管、中国科学院成都生物研究所主办、科学出版社出版, 国内外公开发行, 是我国应用生物学和环境生物学的核心刊物。主要报道生物学及相关学科在资源开发利用与可持续发展、环境整治、退化生态系统恢复与重建, 以及在农、林、牧、医、能源、轻工、化工、食品等领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的新成果、新技术、新方法和新进展。包括研究论文、研究简报和本刊邀约的综述或述评。读者对象主要为本学科的科研人员、大专院校师生和科研管理干部。

本刊为国内外多个重要、知名数据库收录(国外如CA、BA、CSA、PЖ、ZR、EP等, 国内如CSTPCD、CSCD、《中文核心期刊要目总览》、CAJCED、CJFD等), 曾获得四川省一级学术期刊、中国期刊方阵双效期刊、中国农业期刊金犁奖学术类一等奖、中国精品科技期刊和RCCSE中国核心学术期刊等荣誉。

本刊创刊于1995年, 1999年由季刊改为双月刊至今, 双月25日出版, 每期160页, 全铜版纸印刷。每期定价60.00元, 年定价360.00元。全国各地邮局(所)均可订阅。新订户可向本刊编辑部补购自1995年以来的各卷期, 以及1999年增刊(环境微生物学研究专辑)。

地址: 四川省成都市人民南路4段9号 中国科学院成都生物研究所 《应用与环境生物学报》编辑部

邮编: 610041

电话: 028-85237341 (联系人: 刘东渝)

传真: 028-85237341

E-mail: biojaeb@cib.ac.cn

网址: <http://www.cibj.com>