

DOI: 10.12264/JFSC2021-0058

高温胁迫对日本沼虾热休克蛋白基因的表达、抗氧化酶活力及组织结构的影响

翟书华¹, 傅洪拓^{1,2}, 乔慧², 张文宜², 金舒博², 蒋速飞², 熊贻伟², 许蕾¹,
王亚冰¹, 胡宇宁¹, 龚永生², 吴滢²

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: 为探究日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)应对高温胁迫的响应机制, 设置了水温对照组(20±0.5) °C 和高温组(30±0.5) °C, 溶氧浓度(6.5±0.5) mg/L, 分别在高温胁迫 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h 测定了日本沼虾肝胰腺和鳃组织中热休克蛋白 21 (heat shock protein 21, HSP21)、热休克蛋白 60 (heat shock protein 60, HSP60)、热休克同源蛋白 70-3 (heat shock protein cognate 70-3, HSC70-3)和热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90)基因的表达, 相关抗氧化酶——超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性以及组织结构的变化。结果表明, 高温胁迫下肝胰腺和鳃组织中的 4 个热休克蛋白基因均被诱导表达上升, 其中 HSC70-3 基因表达上升最为显著; 同时, 肝胰腺中的基因表达上升趋势比鳃中的基因表达趋势更为明显。高温胁迫下相关抗氧化酶活力均发生不同程度的变化, 肝胰腺中 SOD、GST 和 CAT 酶活力均有显著上升趋势, 而 GPX 酶活力仅有轻微变化; 鳃组织中的 SOD 酶活性显著低于对照组($P<0.05$), GST、GPX 和 CAT 酶活性显著高于对照组($P<0.05$)。肝胰腺和鳃组织结构均发生变化, 肝胰腺组织中分泌细胞及内部转运泡体积增大, 鳃组织结构层状上皮轻微弯曲, 血细胞排列紊乱等。综上所述, 高温胁迫激活了日本沼虾抗氧化系统, 并诱导了热休克蛋白基因的表达上升, 其中 HSC70-3 基因可能在日本沼虾的耐热性中起重要作用。高温胁迫下抗氧化酶活力的变化可能对于避免氧化损伤至关重要。本研究旨在通过了解日本沼虾应对高温胁迫的响应机制从而为日本沼虾的健康养殖提供参考。

关键词: 日本沼虾; 高温胁迫; 热休克蛋白; 抗氧化酶; 组织学

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)05-0684-12

水体是水生生物生存的必要条件之一, 温度上升将导致其呼吸强度和耗氧率增加, 从而使水生动物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量产生和积累引发氧化胁迫, 而由过量 ROS 引发的氧化应激会损坏机体 DNA、蛋白质等细胞大分子, 从而导致生物体的存活率降低^[1]。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在高温胁迫下鳃组织出

现明显病理性变化, 氧化应激相关指标(相关抗氧化酶)发生显著变化以及生长和存活率受高温影响较大^[2-3]。高温影响日本鼓虾(*Alpheus japonicus*)的抗氧化防御体系、能量代谢过程以及能量储备能力, 长期持续暴露可能会对其种群维持构成潜在威胁^[4]。因此, 水体温度越来越成为限制水生动物养殖的重要因素。水生动物可以通过新陈代谢

收稿日期: 2021-02-03; 修订日期: 2021-03-18.

基金项目: 江苏现代农业产业技术体系建设专项 (JATS[2019]472); 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201745); 国家虾蟹产业技术体系建设专项(CARS-48).

作者简介: 翟书华(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物抗逆育种. E-mail: zhaish018@163.com

通信作者: 傅洪拓, 研究员, 从事水产动物遗传育种. E-mail: fuht@ffrc.cn

和生化反应或发展抗氧化防御能力来适应胁迫^[5-6]。例如, 相关分子、抗氧化酶的诱导及组织结构的某些变化。其中, 生物体可以通过合成不同的应激蛋白来应对不同的环境压力带来的损伤, 热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)就是最为关键的应激蛋白, 其在诱导先天免疫和适应性免疫反应中都起着重要的作用^[7-8]。生物体具有完善的抗氧化系统, 在生物体应对高温胁迫时, 可以维持自由基平衡并减少氧化损伤^[9-10]。主要的抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽-S 转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)和过氧化氢酶(CAT), 其具有将体内形成的过氧化物转换为毒害较低或无害的物质的功能^[11-12]。此外, 当虾类受高温胁迫时, 其组织结构会发生变化, 组织学分析已被用作评估虾环境压力的实用手段^[13]。

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)俗称青虾, 隶属节肢动物门(Arthropoda), 甲壳纲(Crustacea), 长臂虾科(Palaemonidae), 沼虾属, 是我国重要的淡水养殖虾类。日本沼虾营底栖生活, 其最适温度为20~25℃, 耐温范围为18~30℃, 但已有研究^[14]发现27.5℃已对日本沼虾鳃组织生理代谢造成负面影响。高温环境不仅会影响日本沼虾代谢、摄食行为及呼吸频率等生命活动, 使其产生过量活性氧物质引起氧化应激反应, 并对免疫系统造成损伤, 甚至造成停食和死亡^[15], 高温还会影响养殖水体质量, 使溶氧浓度急剧下降, 加剧机体因缺氧死亡, 对日本沼虾养殖业造成严重的影响。因此, 探究日本沼虾对高温的响应机制, 对于日本沼虾养殖产业健康发展有重要意义。

本研究采用RACE技术首次克隆了*MnHSP21*及*MnHSC70-3*基因的全长序列, 并从NCBI网站获得*MnHSP60* (GenBank 登录号: AHF22058.1)和*MnHSP90* (GenBank 登录号: ADK66920.1)基因全序列。实验设置了高温组与对照组, 分别在高温0 h、12 h、24 h、36 h、48 h的各个时间点进行采样, 通过探究30℃对日本沼虾肝胰腺及鳃组织中热休克蛋白基因的应答、抗氧化酶活力变化以及组织结构的影响, 从生理生化及组织水平分析高温胁迫对日本沼虾的影响, 为日本沼虾的健康

养殖提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用日本沼虾体重(2.5±0.5) g, 均取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心大浦养殖基地。选取健康有活力的日本沼虾暂养两周, 暂养条件: 水温(20.0±0.5)℃, pH (8.2±0.08), DO (6.5±0.5) mg/L。按其体重的3%~5%每天两次定时投喂新鲜螺蛳肉, 每2天换水1次, 换水量为总水体体积的30%。

1.2 实验设置

依据前言描述, 本实验设置(30±0.5)℃为高温组, 以实验室养殖温度(20±0.5)℃作为对照组。每组设置3个平行, 每个平行各50尾虾。高温组使用加热棒使水温控制在(30±0.5)℃, 高温胁迫48 h。

1.3 样品的采集与处理

选择日本沼虾重要的代谢和呼吸器官—肝胰腺和鳃作为检测靶组织, 分别在高温0 h、12 h、24 h、36 h、48 h的各个时间点采样, 每个时间点从各平行缸选取6尾日本沼虾(即高温组18尾, 对照组18尾), 获取完整的肝胰腺及鳃组织, 其中每个时间点的9尾虾的肝胰腺及鳃组织于液氮速冻后, 保存于-80℃冰箱用以抗氧化酶活力的测定, 6尾虾组织用于HSPs基因的表达分析, 剩余肝胰腺和鳃组织固定于Bouin氏固定液中, 用以制作组织切片。

1.4 *MnHSP21* 和 *MnHSC70-3* 基因的克隆

1.4.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 根据RNAiso Plus 试剂(TaKaRa, Dalian, 中国)使用说明书, 从日本沼虾的实验组织中提取RNA, 使用分光光度法检测所有RNA的浓度, A_{260}/A_{280} 之比1.9~2.1为正常范围。在1.2%的琼脂糖凝胶上检测RNA的质量。根据反转录试剂(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser Perfect Real Time)说明书反转录合成第一链cDNA, 合成后保存于-20℃备用。

1.4.2 *MnHSP21* 和 *MnHSC70-3* cDNA 的克隆及序列分析 根据实验室前期研究, 从日本沼虾转

录组 cDNA 文库 (NCBI, PRJNA656359) 获得 *MnHSP21* 和 *MnHSC70-3* 基因序列中间片段。根据序列信息, 设计和筛选引物, 以上述合成的 cDNA 为模板进行克隆。并使用 3'-RACE 试剂盒 (TaKaRa, Kusatsu, 日本) 完成 cDNA 序列 3' 末端的快速扩增。表 1 列出了 *MnHSP21* 和 *MnHSC70-3* 的所有扩增引物。使用凝胶提取试剂盒 (CWBIO,

中国) 纯化聚合酶链式反应 (PCR) 产物。将产物送至上海亦欣生物公司进行测序。测序所得序列利用 DNAMAN 6.0 软件进行拼接以获得基因全序列。使用 NCBI 在线网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析 *MnHSP21* 和 *MnHSC70-3* 的 cDNA 序列。ORF Finder 在线程序 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 推导其氨基酸序列。

表 1 引物列表
Tab. 1 List of primers used in this study

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
MnHSP21-F1 (open reading frame)	CACAAGTCAATAGCGATGCAGAG
MnHSP21-R1 (open reading frame)	AACAGCTGCAGTCTTAGAACGTA
MnHSP21-F2 (open reading frame)	GTGAGGGTTCGTTCTTCTGTTTG
MnHSP21-R2 (open reading frame)	CTTTGTCCTTCTGCTGTTCTTGG
MnHSP21-F3 (open reading frame)	CCAAGAACAGCAGAAGGACAAAG
MnHSP21-R3 (open reading frame)	CTGCATTTGACCAACACATCCTT
MnHSP21-F4 (open reading frame)	AAGAGGAGACTCAAGCAGTTCAG
MnHSP21-R4 (open reading frame)	TTCATATTCTCAGCCTTGCCCTT
MnHSC70-3-F1 (open reading frame)	TGATATTCAGGATGAGGTGCTGG
MnHSC70-3-R1 (open reading frame)	AGTTCCTCAAATTTAGCCCGAGT
MnHSC70-3-F2 (open reading frame)	GATGAAAGAAGTTGCCGAAGCAT
MnHSC70-3-R2 (open reading frame)	AGAAGGTGGTTGTCTTTGGTCAT
MnHSC70-3-F3 (open reading frame)	CTGCTGACAACCAAAATGCTGTA
MnHSC70-3-R3 (open reading frame)	TGGCACGGCTACTATAACTCATC
MnHSC70-3-F4 (open reading frame)	ATATTCAGGATGAGGTGCTGGAC
MnHSC70-3-R4 (open reading frame)	TTTTTGGCAGCATCTCCAATCAG
3'-MnHSP21 (3' RACE out primer)	GGAAAGGGTCCTTCCTTGAAGAT
3'-MnHSP21 (3' RACE in primer)	AAGGCAAGGCTGAGAATAGTGAA
3'-MnHSC70-3 (3' RACE out primer)	AAACAGGCTGAGCAAAGAGGATA
3'-MnHSC70-3 (3' RACE in primer)	GGAGTCCTTTGCATACAGTCTGA
MnHSP21-F (qPCR primer)	TTTCAAACGCAGTGACATGAGTC
MnHSP21-R (qPCR primer)	GCATTTGACCAACACATCCTTGA
MnHSC70-3-F (qPCR primer)	GCTGAAAGAACGAGTGGAGTCTA
MnHSC70-3-R (qPCR primer)	GCATCTGCATTATTTCCAGCCA
MnHSP60-F (qPCR primer)	CACTATCTCGGCAAGTAACCACT
MnHSP60-R (qPCR primer)	TGTCTTGCCATCCTTCACTGTTA
MnHSP90-F (qPCR primer)	AGATTAGTCACTTCCCCATGCTG
MnHSP90-R (qPCR primer)	CAAAGAGCAGCATCACAAGATCC
EIF-F (qPCR primer)	CATGGATGTACCTGTGGTGAAAC
EIF-R (qPCR primer)	CTGTCAGCAGAAGTCCTCATTA

1.5 日本沼虾 HSPs 基因在高温胁迫下表达分析
以上述实验组织的反转录 cDNA 为模板, 真核翻译起始因子 5A(EIF)^[16] 为内参基因, 通过实

时荧光定量 PCR(qPCR) 分析 *MnHSP21*、*MnHSP60*、*MnHSC70-3* 和 *MnHSP90* 基因在高温胁迫下的表达谱。反应条件如前研究所述^[17]。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方


```

1      ttcaaatcaggATGAGGTGCTGGACGCTTAGCCCTACTGGCTGTGGCGGCTGCGGTA
1      M R C W T A L A L L A V A A A V
61     ACGCAGGCCAAGATAAGAACACGAGGATGTTGGTACGTCATTGGTATTGACTTGGGA
17     T Q A K D K N T E D V G T V I G I D L L G
121    ACAACATACATGTTGTTGGTCTTCAAGAACGGTGGTGTGAAATATTGGCAATGAC
37     T T Y S C V G V F K N G R V E I I A N D
181    CAAGGCAACGGCATCACACCATCGTACGTTGCTTTACCGCTGATGGCGAACGGCTGATT
57     Q G N R I T P S Y V A F T A D G E R L I
241    GGAGATGCTGCCAAAATCACTGACTCAAAACCCAGAGAACACGATATTGATGCCAAG
77     G D A A K K N Q L T T N P E N T I F D A K
301    CGCTGATAGGCAGAGAATGAGTGCACAAAGCTGTCCAAAATGACATCAAAATTTTCCT
97     R L I G R E W S D K A V Q N D I K F F P
361    TTCAAGTAATCAACAAAATGACAACTCAGTGAAGTGCAGCTTCTCAAGGGGAC
117    F K V I N K N D K P H M K V S T S Q G D
421    AAAATATTGCTGCAAGAGATTCTGCCATGTTCTTGAAAGATGAAAGATTGCG
137    K I F A A E E I S A M V L G K M K E V
481    GAAGCATATTGGGCAAGAATGTGACGACGCGGTGTCACGGTTCACGGTATTTCAC
157    E A Y L G K N V T H A V V T V P A Y F N
541    GAGCCCGAGCGCAAGCACTAAAGATGACGGTACCATTGCTGGGTGACGGTATGAGA
177    D A Q R Q A T K D A G T I A G L T V M R
601    ATCATTAAATGAACCCACAGCAGCAATGTCATGTTGATGACAAAAAAGATGGTGAA
197    I N E P T A A A I A Y G I D K K D G E
661    AAGAATATTAGTATTGATTGGGAGGAGAACATTGACGTTTCCCTTCTGACTATT
217    K N I L V F D L G G G T F D V S L I T I
721    GACTCAGGAGTATTGAGGTGTGGCAACAGTGGCGACACTACTTAGAGGTGAAGAC
237    D S G V F E V G S D G D T H L G G E D
781    TTGATCAGCGTGTGATGATCCTTCTCAAGCTGTACAGAAAAAGAGGCAAGGAC
257    F D Q R V M D H F F K L Y K K K K G D
841    ATAAGAAAGACACCCGAGCAGTCCAGAACTTCGTCGTGAAGTGAAGAGGCAAGAGA
277    I R K D N R A V Q K L R R E V E K A K R
901    GCATTCTTCCAGCCATCAAGTCAGGATGAAATGAATCTTCTACGAGGGGAAGAT
297    A L S S S H Q V R I E I E S F Y E G E D
961    TTTTCGAGAGCTGCTCGGGCTAAATTGAGGAAGTGAATGAGTCTCTCAAGAGC
317    F S E T L T R A K F E E L N M D L F K S
1021   ACAATGAACCTGTCTAAAGGTGATAGAGGACTGTGGCTCCAGAGAAAGAGATTGAT
337    T M K P V Q K V I E D S G L Q K K K E I D
1081   GAAATTGTGCTGTGGGTGATCTACGGTATTCCAAAATTCAGCAACTTGTAAAGGA
357    E I V L V G G S T R I P K I Q Q L V K E
1141   TTCTTCAATGTAAGAACTTCTCGAGGCACTCAATCCTGATGAAGCAGTAGCATGTT
377    F F N G K E P S R G I N P D E A V A Y G
1201   GCTGCTGTTCAAGCCGGTCTTATCAGGAGAGACGACAAACGATCTCGTGATTG
397    A A V Q A G V L S G E D D T N D L V L L
1261   GAGCTTAATCTTGACTATGGGCTTGAACGGTGTGGTGAAGTAATGCAAAAATAA
417    D V N P L T M G I E T V G G V M S K I I
1321   CCCAGAAATAGTGCATACCCACAAAGAGTCCAAATCTTTTACAGCTGTGACAAAC
437    P R N T V I P T T K K S Q I F S T A A D N
1381   CAAAATGCTGTAACATCCAAGCTTTGAAGGAGAAAGGCCATGACCAAGAGCAACAC
457    Q N A V T I Q V F E G E R P M T K D N H
1441   CTCCTTGGCACCTTGCAGTTCAGAGGATCCACCTGCACCCCGAGGTATCCCTCAGATT
477    L L G T F D L T G I P P A P R G I P Q I
1501   GAAGTCACCTTTGAGATTAAATGAGATGGTATCTGCAAGTTTCTGCTGAGGACAAGGGC
497    E V T F E I N A D G I L Q V S A E D K G
1561   ACCGGTAACAGAGAAAGATACAAATGATCAAAACAGCTGAGCAAGAGGAT
517    T G N R E K I T I T N D Q N R L S K E D
1621   ATTGAGAAGATGATCAAGATGAGAGTTATTGTCAGATGAAGCAAGAGCTTGAAGAA
537    I E K M I Q D A E L F A D E D K K L K E
1681   CGAGTGGAGTCTAGAAATGAATGGAGTCTTGCATACAGTCTGAAGAAATCAATCAAT
557    R V E S R N R E L E A G S F A Y S L K N Q I N
1741   GACCAAGAGAAATTAGAGCCAAGTTAAGTGAGGAGAGAAACGATGATGAAGAGGCA
577    D Q E K L G A K L S E E E K T M I E E A
1801   ATAGATGATAAGCTTACATGGCTGAAAATAATGCAGATGCTGATGCAGAGAATTCAAG
597    I D D K L T W L E N N A D A D A E E F K
1861   GCTCAGAGAAAGTCCCTGGAAGACCTTGTACAGCAATATTGCAAGCTTTATCAAGAT
617    A Q K K S L E D L V Q P I I A K L Y Q D
1921   GCAGAGGGCTCTCCACAGACTCTGATGATGACGATTACAGAGATGATGATAGtag
637    A G G A P P T D S D D D D Y R D E L *
1981   ccgtgcattggctattttctgactactcaactatttttagtcagttcttcactgttaa
2041   ttgtagaacatacttgagatgttttgatcaataattcattatcaaaagttttatttggtta
2101   tgacattacgtatactagtttctgtaaatgcagttatattttttccataaagaatgagata
2161   ttacaaaaaa

```

图 2 日本沼虾 *MnHSC70-3* cDNA 的

核苷酸和预测的氨基酸序列

起始密码子(ATG)以粗体显示;终止密码子标有星号;黄色显示了 3 个特征性的 HSP70 序列;假定的 ATP-GTP 结合位点显示为蓝色;潜在的非细胞器真核共有基序 RAKFEEL 以绿色表示;一个 AATAAA 以灰色显示;poly-A 尾巴标有下划线。

Fig. 2 Nucleotide and predicted amino acid sequence of *MnHSC70-3* cDNA in *Macrobrachium nipponense*. The start codon (ATG) is in bold; The stop codon is marked with an asterisk; three characteristic HSP70 family signatures are shown in yellow; the putative ATP-GTP binding site is shown in blue; the potential non-organelle eukaryotic consensus motif RAKFEEL is indicated in green; One AATAA sequences are potential polyadenylation signals are shown in gray; the poly-A tail is underline.

2.2 高温胁迫对日本沼虾 HSPs 基因表达的影响

在肝胰腺组织中(图 3), 4 个 HSPs 基因均被高温诱导表达上升。*MnHSP60* 和 *MnHSP90* 基因的表达水平呈现出相似趋势(图 3b, 图 3d)。*MnHSP21* 基因的最大表达量出现在高温胁迫 36 h ($P<0.05$), 并在胁迫 48 h 时恢复到对照组水平 ($P>0.05$)(图 3a); *MnHSC70-3* 基因的最大表达量出现在胁迫 24 h ($P<0.05$)。

在鳃组织中(图 4), 所有基因表达呈现出不同趋势。*MnHSP21* 基因最大表达量出现在胁迫 12 h ($P<0.05$), 在 36 h 时恢复到对照组水平 ($P>0.05$)(图 4a); 高温胁迫 48 h 时 *MnHSP60* 基因表达量恢复到对照组水平(图 4b); *MnHSC70-3* 和 *MnHSP90* 基因最大表达量分别出现在胁迫 36 h 和 48 h ($P<0.05$)(图 4, c 和 d)。

2.3 高温胁迫对日本沼虾抗氧化酶的影响

高温胁迫下, 肝胰腺组织中 SOD 与 CAT 活性均呈现出波动趋势, SOD 活性在胁迫 12 h 和 36 h 显著高于对照组 ($P<0.05$)(图 5a); CAT 活性在胁迫 36 h 显著高于对照组 ($P<0.05$)(图 5d); GST 活性在高温胁迫期间均显著高于对照组 ($P<0.05$)(图 5b); GPX 活性在胁迫期间呈现先升高后降低趋势, 在 48 h 时显著低于对照组 ($P<0.05$)(图 5c)。

高温胁迫下, 鳃组织中 SOD、GST 及 GPX 活性在 12 h 与对照组均无显著差异; SOD 活性在 12 h 后均显著低于对照组 ($P<0.05$)(图 6a); GST 活性在 24 h 及 36 h 显著高于对照组 ($P<0.05$)(图 6b); GPX 活性在高温胁迫 24 h 及 48 h 显著高于对照组 ($P<0.05$)(图 6c); CAT 活性在胁迫期间均显著高于对照组 ($P<0.05$)(图 6d)且 12 h 为最大值。

2.4 高温胁迫对日本沼虾组织结构的影响

高温胁迫 0 h(图 7a), 肝胰腺组织结构呈正常状态, 12 h 和 24 h(图 7, b 和 c)时, 日本沼虾肝胰腺组织中分泌细胞(B 细胞)体积明显增大; 在 36 h 和 48 h(图 7, d 和 e)时, 肝胰腺组织结构相对稳定。在高温胁迫过程中, 肝胰腺组织中储存细胞(R 细胞)没有显著变化。

高温胁迫 0 h(图 7A), 鳃组织结构呈正常状态, 上皮细胞及血细胞整齐排列。在 12 h、24 h 及 36 h(图 7, B、C 和 D)时, 鳃组织结构中, 层状

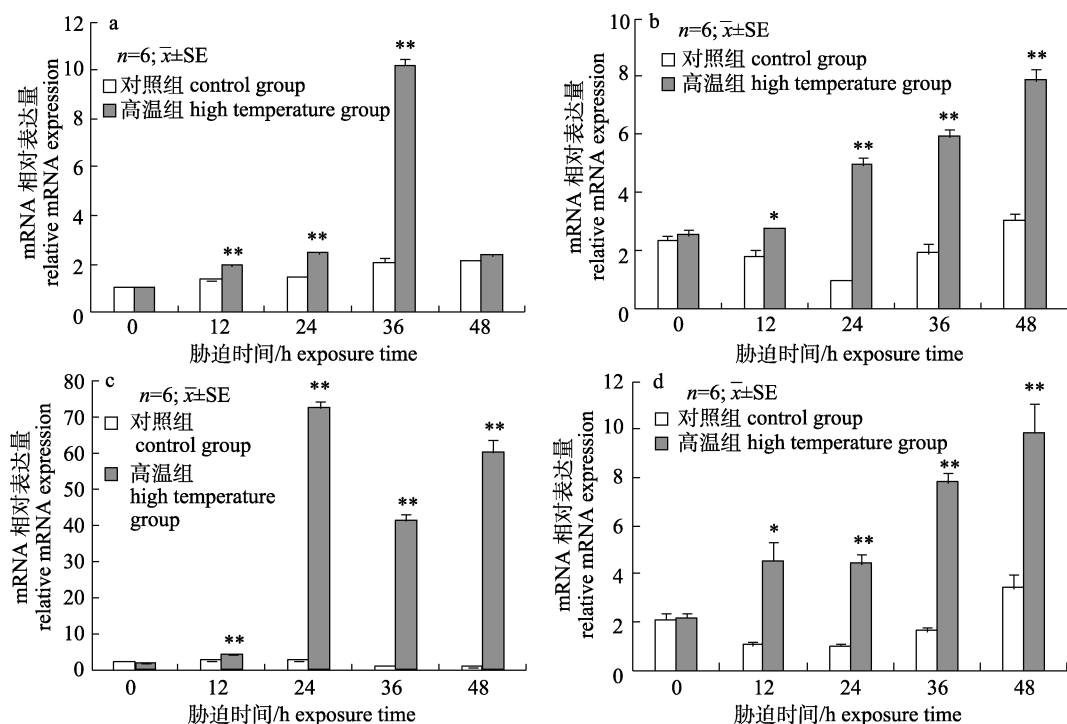


图 3 qPCR 对高温胁迫下日本沼虾肝胰腺组织中 *MnHSP21* (a)、*MnHSP60* (b)、*MnHSC70-3* (c) 和 *MnHSP90* (d) 基因的表达分析

“*”表示实验组和对照组在胁迫后同一时间点差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Analysis of *MnHSP21* (a), *MnHSP60* (b), *MnHSC70-3* (c) and *MnHSP90* (d) expression by quantitative real-time PCR in *Macrobrachium nipponense* under heat shock treatment in hepatopancreas

“*” means significant differences ($P < 0.05$) between high temperature group and the control group at the same time.

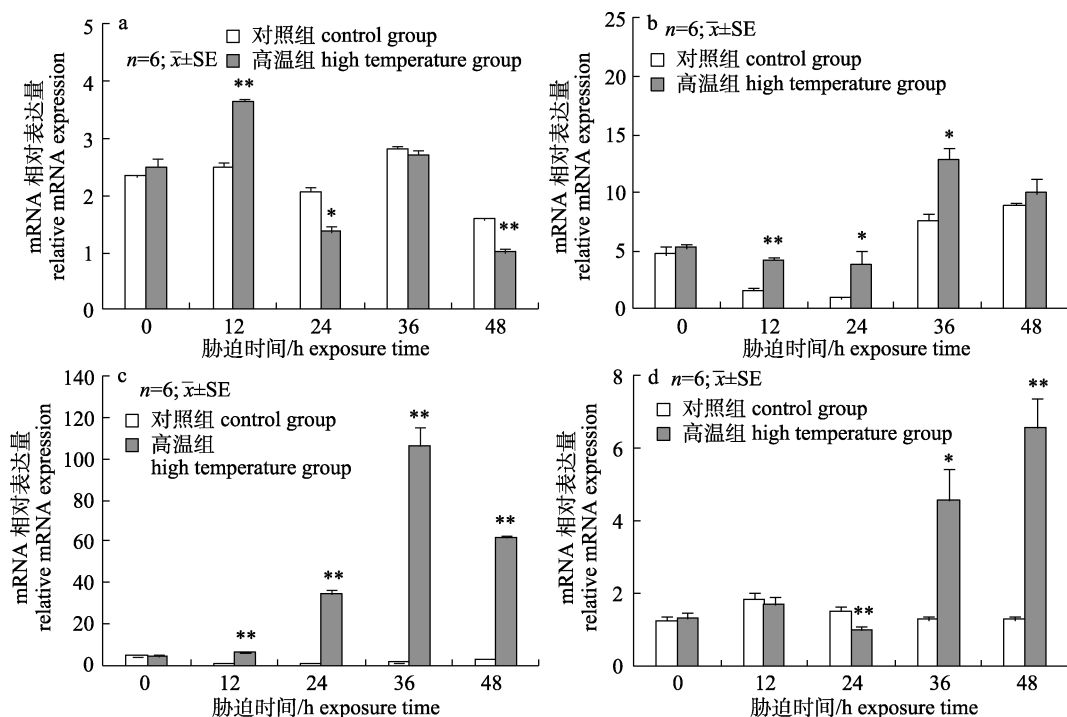


图 4 qPCR 对高温胁迫下日本沼虾鳃组织中 *MnHSP21* (a)、*MnHSP60* (b)、*MnHSC70-3* (c) 和 *MnHSP90* (d) 基因的表达分析

“*”表示实验组和对照组在胁迫后同一时间点差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Analysis of *MnHSP21* (a), *MnHSP60* (b), *MnHSC70-3* (c) and *MnHSP90* (d) expression by quantitative real-time PCR in *Macrobrachium nipponense* under heat shock treatment in gills

“*” means significant differences ($P < 0.05$) between high temperature group and the control group at the same time.

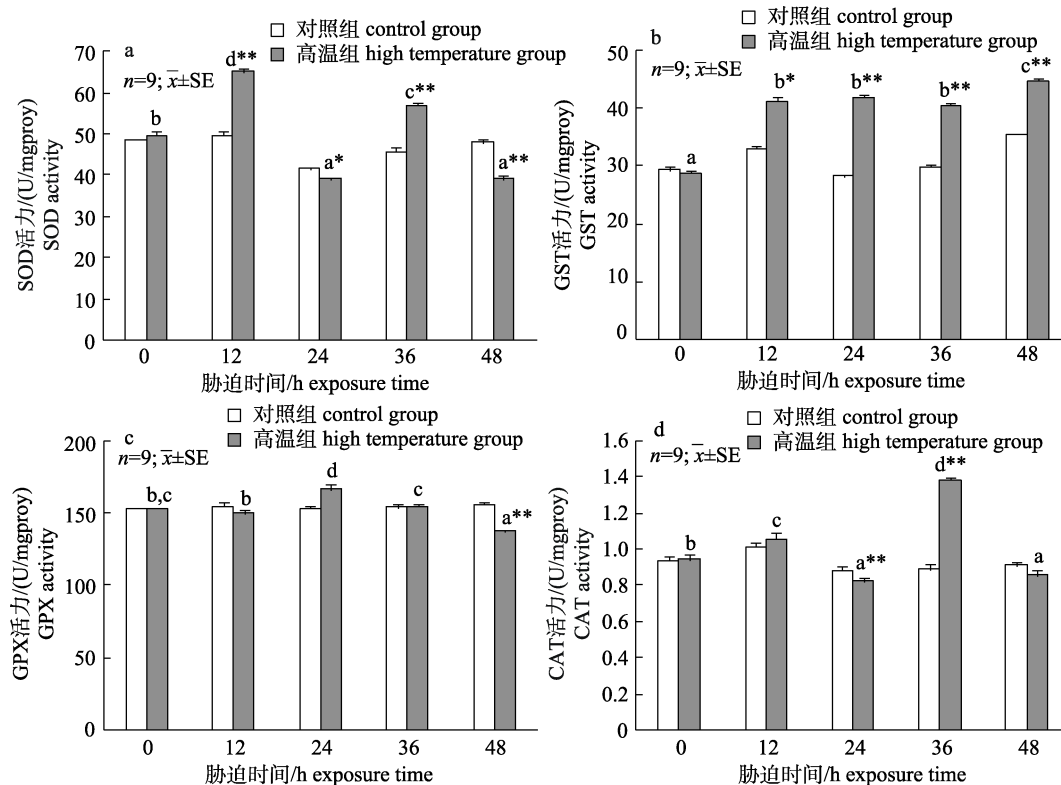


图 5 高温胁迫对日本沼虾肝胰腺组织 SOD (a)、GST (b)、GPX (c) 和 CAT (d) 活力的影响
不同小写字母表示同一处理不同时间点之间差异显著 ($P<0.05$); “*”表示实验组和对照组在胁迫后同一时间点差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 5 Effect of high temperature on SOD (a), GST (b), GPX (c) and CAT (d) activities in hepatopancreas of *Macrobrachium nipponense*

Different lowercase superscripts mean significant differences ($P<0.05$) within the same treatment among different times; “*” means significant differences ($P<0.05$) between high temperature group and the control group at the same time.

上皮出现轻微弯曲及肿胀现象; 在 36 h (图 7D) 时, 鳃组织结构中的血细胞还出现杂乱现象; 高温胁迫 48 h (图 7E) 时, 鳃组织结构仍然存在层状上皮细胞肿胀及弯曲现象。

3 讨论

3.1 日本沼虾热休克蛋白基因的克隆及序列分析

根据分子量划分, *MnHSP21* 属于小分子热休克蛋白 (small heat shock proteins, sHSPs)。sHSPs 的特征是存在大约 100 个氨基酸残基的假定保守 α -晶状蛋白结构域 (ACD)^[18-20]。根据氨基酸序列分析结果, *MnHSP21* 具有 α -晶状蛋白结构域。HSP70 家族包括诱导型 HSP70 和组成型 HSC70^[21-23]。根据 *MnHSC70-3* 的氨基酸序列分析可知, 其含有 HSP70 家族具有的高度保守典型结构域, 例如: 保守序列 RAKFEEL, 由此证明 *MnHSC70-3* 基因属于 HSP70 家族^[24]。

3.2 高温胁迫对日本沼虾热休克蛋白基因的影响

热应激会诱导甲壳动物的 HSPs 基因的表达^[25-27]。在我们的研究中, 高温胁迫诱导了日本沼虾的 *MnHSP21*, *MnHSP60*, *MnHSC70-3* 和 *MnHSP90* 基因的表达上升。在对其他物种的研究中, Huang 等^[28]发现凡纳滨对虾的 *HSP60* 基因表达上升。在对斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 以及中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的研究中, *HSP70* 和 *HSP90* 的表达被显著诱导上升^[29-31]。在罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[24] 及三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[32] 的研究中也有相似结果。而本研究中发现, 4 个基因在高温胁迫下的表达趋势有所不同。在肝胰腺组织中, *MnHSC70-3* 基因的最大表达量在胁迫 24 h 时出现, 早于其他 3 个基因。此结果表明, *MnHSC70-3* 基因应对高温胁迫最为敏感。*MnHSP60* 和 *MnHSP90* 基因表达呈现相同持续上升趋势, 此结果表明高温胁迫下

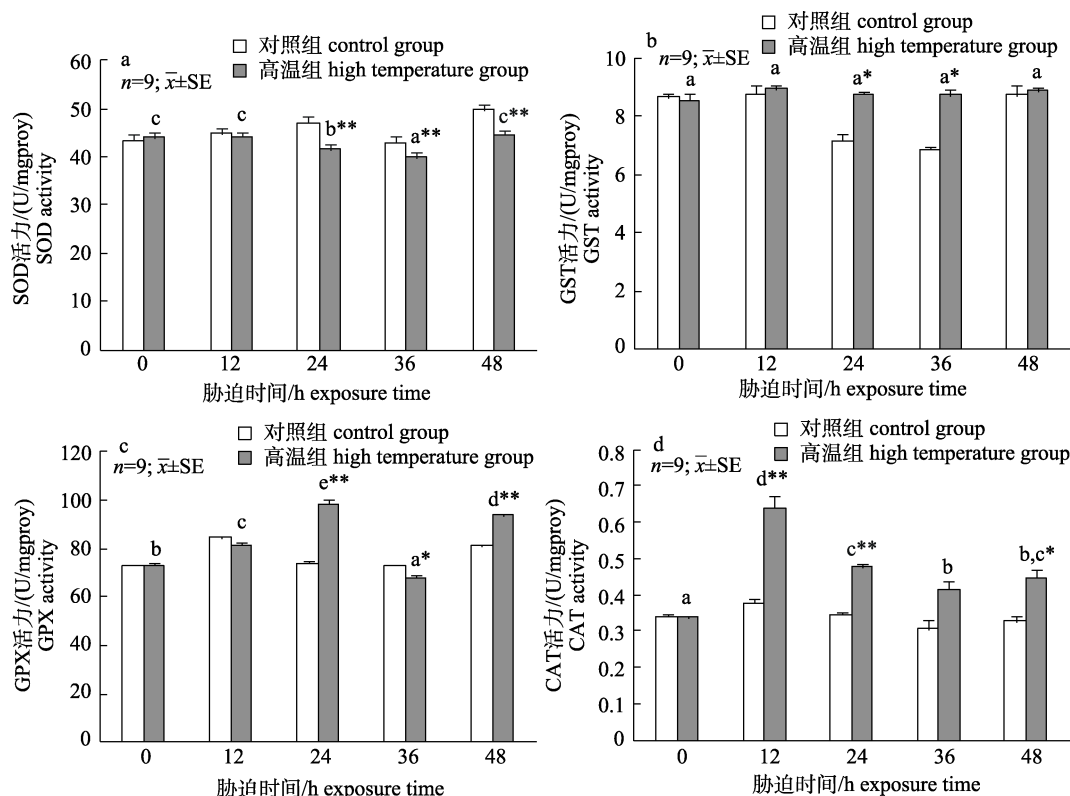


图 6 高温胁迫对日本沼虾鳃组织 SOD (a)、GST (b)、GPX (c)和 CAT (d)活力的影响

不同小写字母表示同一处理不同时间点之间差异显著($P<0.05$), *表示实验组和对照组在胁迫后同一时间点差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 Effect of high temperature on SOD (a), GST (b), GPX (c) and CAT (d) activities in gill of *Macrobrachium nipponense*. Different lowercase superscripts mean significant differences ($P<0.05$) within the same treatment among different times; *means significant differences ($P<0.05$) between high temperature group and the control group at the same time.

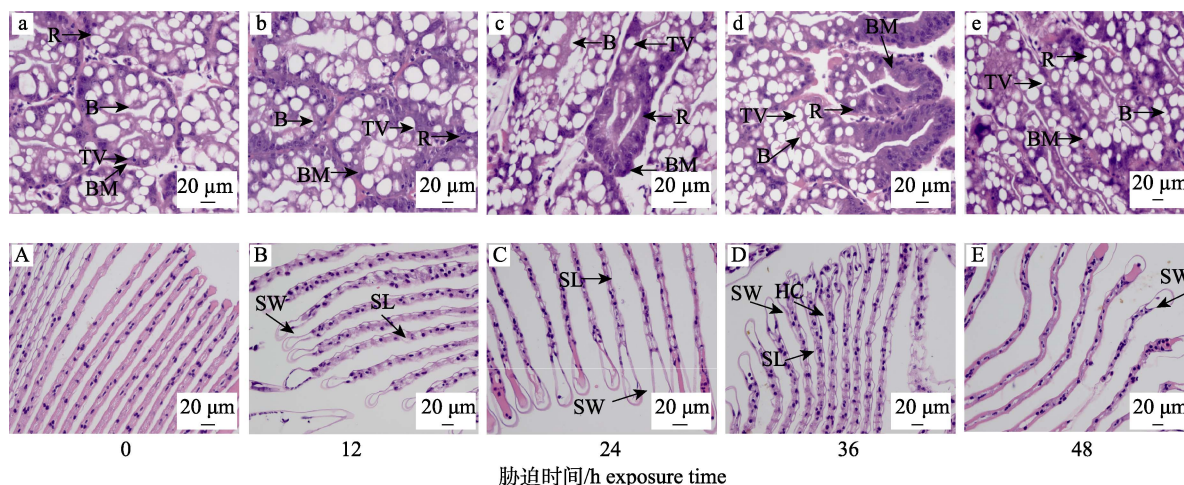


图 7 高温胁迫对日本沼虾肝胰腺和鳃显微结构的影响

a、b、c、d、e 分别表示高温胁迫 0 h (对照组)、12 h、24 h、36 h、48 h 肝胰腺组织显微结构图, HE 染色;

A、B、C、D、E 分别表示高温胁迫 0 h (对照组)、12 h、24 h、36 h、48 h 鳃组织显微结构图, HE 染色;

B: 分泌细胞; BM: 基膜; R: 储存细胞; TV: 转运泡; SL: 层状上皮轻微弯曲; SW: 肿胀; HC: 血细胞紊乱。

Fig. 7 Effect of high temperature on hepatopancreas and gill microstructure in *Macrobrachium nipponense*

a, b, c, d and e represent the microscopical hepatopancreas structure of *Macrobrachium nipponense* in response to high temperature at 0 h, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h, HE; A, B, C, D and E represent the microscopical gill structure of *Macrobrachium nipponense* in response to high temperature at 0 h, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h, HE;

B: secretory cells; BM: basement membrane; R: storage cells; TV: transferred vacuoles; SL: slight curvature of the lamellar epithelium; SW: swelling; HC: the clutter of hemocytes.

MnHSP60 和 *MnHSP90* 基因在日本沼虾肝胰腺组织中可能行使相似功能。基于以上结果,我们推测 4 个基因中, *MnHSC70-3* 基因是日本沼虾肝胰腺组织应对高温胁迫时较为重要的基因,在其耐热性上有重要作用。在日本沼虾鳃组织中,4 个 HSPs 基因应对高温胁迫时的表达与肝胰腺组织中的表达不同。*MnHSC70-3* 基因在鳃组织中同样被显著诱导表达上升,但 *MnHSP21*, *MnHSP60* 和 *MnHSP90* 基因表达仅被轻微诱导上升,表明高温胁迫下肝胰腺组织中的相关分子应答比鳃组织更为显著,而肝胰腺组织是免疫保护过程中的主要组织^[33],因此我们推测高温胁迫下,肝胰腺是日本沼虾应对高温胁迫的重要组织。

3.3 高温胁迫对日本沼虾抗氧化酶活力的影响

正常生理状态下,水生动物的抗氧化系统会及时清除机体代谢过程产生的活性氧。而在环境胁迫下,机体内会有大量活性氧产生,从而造成机体损伤^[34]。SOD 负责将机体产生的毒性 $O_2^{\cdot-}$ 转化为 H_2O_2 , 后者继续被 CAT 代谢为无毒的 H_2O , GPX 可催化过氧化氢物质^[11-12]。在高温对中华鲟(*Acipenser sinensis*)^[34]和军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[35]的研究中发现,高温使其 SOD 与 CAT 活力上升。而在 Lushchak 等^[36]对金鱼(*Carassius auratus*)的研究中发现, SOD 在其组织中发生热失活,活性显著下降。本研究高温胁迫下,日本沼虾肝胰腺组织中 SOD 与 CAT 酶活性显著高于对照组,表明高温胁迫诱导了日本沼虾的抗氧化能力增强;而 GPX 活性与对照组相比无显著变化,可能由于 SOD 与 CAT 活性升高,使高温胁迫下产生的过多活性氧物质被清除,因此不需要过多 GPX 参与反应。鳃组织中的 SOD 酶活性显著低于对照组,表明鳃组织中 SOD 可能发生热失活;与肝胰腺组织相反, GPX 活性显著高于对照组,可能由于鳃组织中 SOD 失活,因此 GPX 与 CAT 活性上升以清除活性氧等有毒物质。GST 具有清除机体代谢所产生的脂质过氧化物的作用^[37-38], 本研究高温胁迫使日本沼虾肝胰腺和鳃组织中的 GST 酶活性均显著高于对照组,从而表明高温胁迫使日本沼虾产生了过氧化物,引发了氧化应激反应。

3.4 高温胁迫对日本沼虾组织结构的影响

肝胰腺组织是甲壳动物重要的代谢、消化器官,其组织结构变化与生理状态的改变有重要联系^[39]。肝胰腺组织中主要细胞包括 B 细胞和 R 细胞。B 细胞具有分泌、消化吸收作用,主要分泌消化酶类, R 细胞具有储存营养物质的功能^[40-41]。环境胁迫下,甲壳动物会通过降低一系列活动,将营养物质更多地用于基本生理代谢,主要的消化过程发生在 B 细胞^[42]。当日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[43]以及白梭吻鲈(*Sander lucioperca*)^[44]暴露于高温环境下时,肝胰腺组织均出现损伤现象。本研究中,高温胁迫使日本沼虾肝胰腺组织中 B 细胞及内部转运泡体积增大,可能是由于高温时日本沼虾代谢增强, B 细胞及内部转运泡体积增大有助于更快消化吸收营养物质来维持自身基础代谢^[45-46]。而高温胁迫期间 R 细胞形态及数量没有明显变化,表明高温胁迫对肝胰腺组织中的 R 细胞影响不大。鳃作为甲壳动物的呼吸器官,与外部环境直接接触,是进行气体交换的重要场所^[47]。高温胁迫下,日本沼虾鳃组织结构血腔肿大,层状上皮轻微弯曲,血细胞增多且排列紊乱,从而表明高温使日本沼虾鳃组织结构发生变化,鳃组织结构受损会影响其正常的生理功能,降低气体交换能力,从而造成组织缺氧现象。这也解释了高温容易造成水生动物严重缺氧的现象。

综上所述,高温胁迫激活了日本沼虾抗氧化系统, *MnHSP21*, *MnHSP60*, *MnHSC70-3* 和 *MnHSP90* 基因均被诱导表达上升,其中 *MnHSC70-3* 基因在高温应激响应过程中最为敏感,表明 *MnHSC70-3* 基因可能在日本沼虾耐热性中有重要作用。同时高温胁迫对日本沼虾肝胰腺和鳃组织结构造成了一定的损伤,肝胰腺组织中分子响应更为显著,抗氧化酶活力的变化可能对于避免氧化损伤至关重要。本文研究结果可为进一步研究日本沼虾对高温胁迫的响应机制提供参考。

参考文献:

- [1] Zhou J, Wang L, Xin Y, et al. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Ther-

- mal Biology, 2010, 35(6): 284-289.
- [2] Xiong D L, Duan Y F, Xu J M, et al. Physiological responses in gills of *Litopenaeus vannamei* exposed to the combined stress of temperature and ammonia[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(9): 2296-2303. [熊大林, 段亚飞, 徐敬明, 等. 凡纳滨对虾鳃组织对高温和氨氮胁迫的生理响应[J]. 南方农业学报, 2020, 51(9): 2296-2303.]
- [3] Ponce-Palafox J, Martinez-Palacios C A, Ross L G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931[J]. Aquaculture, 1997, 157(1-2): 107-115.
- [4] Li X, Qu Y, Zhang Q Q, et al. Effects of seawater acidification and thermal stress on the antioxidant responses and energy metabolism of *Alpheus japonicus* miers[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(6): 1412-1421. [李笑, 曲艺, 张倩倩, 等. 海水酸化和热应激对日本鼓虾氧化应激和能量代谢的影响[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(6): 1412-1421.]
- [5] Sun S M, Gu Z M, Fu H T, et al. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of p53 from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, in response to hypoxia[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 68-76.
- [6] Welker A F, Moreira D C, Campos É G, et al. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2013, 165(4): 384-404.
- [7] Asea A, Rehli M, Kabingu E, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular hsp70: Role of toll-like receptor (tlr) 2 and tlr4[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(17): 15028-15034.
- [8] Vabulas R M, Ahmad-Nejad P, Ghose S, et al. HSP70 as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(17): 15107-15112.
- [9] Ottiloju A, Olagoke O. Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2011, 182(1-4): 205-213.
- [10] Yang S, Yan T, Wu H, et al. Acute hypoxic stress: Effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of HIF-1 α and GLUT-1 genes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 67: 449-458.
- [11] Wu Z H, You F, Wang Y F, et al. The effects of hypoxia and hyperoxia on nucleus anomaly, SOD, CAT activities and MDA content in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(6): 808-813. [吴志昊, 尤锋, 王英芳, 等. 低氧和高氧对大菱鲆幼鱼红细胞核异常及氧化抗氧化平衡的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(6): 808-813.]
- [12] Ren H, Li J, Li J T, et al. Effects of acute ammonia stresses on antioxidant enzyme activities and GPx gene expression in *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(4): 647-655. [任海, 李健, 李吉涛, 等. 急性氨氮胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(4): 647-655.]
- [13] Sun S M, Xuan F J, Fu H T, et al. Transcriptomic and histological analysis of hepatopancreas, muscle and gill tissues of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in response to chronic hypoxia[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 491.
- [14] Wu Y T, Lv G T, Ren S Y, et al. The effect of consumption rate and CAT, SOD enzyme activity from water temperature on *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2012, 31(3): 197-201. [吴一挺, 吕敢堂, 任凤艺, 等. 水温对日本沼虾耗氧率及鳃组织 CAT、SOD 活力的影响[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2012, 31(3): 197-201.]
- [15] Fu H T, Gong Y S, Jiang S F, et al. Strategies for efficient breeding of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015, 2-5. [傅洪拓, 龚永生, 蒋速飞, 等. 青虾高效养殖模式攻略[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015, 2-5.]
- [16] Hu Y N, Fu H T, Qiao H, et al. Validation and evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Macrobrachium nipponense*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(8): 2258.
- [17] Qiao H, Xiong Y W, Zhang W Y, et al. Characterization, expression, and function analysis of gonad-inhibiting hormone in Oriental River prawn, *Macrobrachium nipponense* and its induced expression by temperature[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2015, 185: 1-8.
- [18] Ding L, Candido E P. HSP43, a small heat-shock protein localized to specific cells of the vulva and spermatheca in the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. The Biochemical Journal, 2000, 349(Pt 2): 409-412.
- [19] Basha E M, O'Neill H, Vierling E. Small heat shock proteins and α -crystallins: Dynamic proteins with flexible functions[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2012, 37(3): 106-117.
- [20] Franck E, Madsen O, van Rheede T, et al. Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins[J]. Journal of Molecular Evolution, 2004, 59(6): 792-805.
- [21] Lindquist S, Craig E A. The heat-shock proteins[J]. Annual Review of Genetics, 1988, 22: 631-677.
- [22] Mayer M P, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism[J]. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 2005, 62(6): 670-684.
- [23] Lee J S. Genomic cloning of a heat shock cognate 71-1 gene

- (HSC71-1) From The Hermaphroditic Fish *Rivulus Marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae)[J]. DNA Sequence: the Journal of DNA Sequencing and Mapping, 2004, 15(1): 33-38.
- [24] Liu J, Yang W J, Zhu X J, et al. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Cell Stress & Chaperones, 2004, 9(3): 313-323.
- [25] Zhao W H, Chen L Q, Qin J G, et al. MnHSP90 cDNA characterization and its expression during the ovary development in oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(2): 1399-1406.
- [26] Huang P Y, Kang S T, Chen W Y, et al. Identification of the small heat shock protein, HSP21, of shrimp *Penaeus monodon* and the gene expression of HSP21 is inactivated after white spot syndrome virus (WSSV) infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(3): 250-257.
- [27] Qian Z Y, Liu X L, Wang L J, et al. Gene expression profiles of four heat shock proteins in response to different acute stresses in shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2012, 156(3-4): 211-220.
- [28] Huang W J, Leu J H, Tsau M T, et al. Differential expression of LvHSP60 in shrimp in response to environmental stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(2): 576-582.
- [29] Rungrasamee W, Leelatanawit R, Jiravanichpaisal P, et al. Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(10): 1082-1089.
- [30] 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 & Chaperones, 2009, 14(2): 161-172.
- [31] Luan W, Li F H, Zhang J Q, et al. Identification of a novel inducible cytosolic Hsp70 gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and comparison of its expression with the cognate Hsc70 under different stresses[J]. Cell Stress & Chaperones, 2010, 15(1): 83-93.
- [32] Zhang X Y, Zhang M Z, Zheng C J, et al. Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(4): 465-473.
- [33] Cheng W, Wang L U, Chen J C. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*[J]. Aquaculture, 2005, 250(3-4): 592-601.
- [34] Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes E M, et al. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à trois[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2009, 674(1-2): 3-22.
- [35] Liu S Y. Effect of environmental stress on free radical level and antioxidant enzymes activities of Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006. [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.]
- [36] Yang J, Chen G, Huang J S, et al. Effects of temperature and salinity on the growth and activities of antioxidant enzymes of cobia (*Rachycentron canadum*) juveniles[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2007, 27(4): 25-29. [杨健, 陈刚, 黄建盛, 等. 温度和盐度对军曹鱼幼鱼生长与抗氧化酶活性的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(4): 25-29.]
- [37] Lushchak V I, Bagnyukova T V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2006, 143(1): 30-35.
- [38] Fang Y Z, Yang S, Wu G Y. Free radicals, antioxidants, and nutrition[J]. Nutrition, 2002, 18(10): 872-879.
- [39] Wang Q, Feng L, Liu Z J, et al. Effect of dietary supplementation of DHA/EPA on the histology of hepatopancreas in swimming crab(*Portunus trituberculatus*)[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(15): 147-149, 4. [汪倩, 丰浪, 刘智俊, 等. 饲料中 DHA/EPA 对三疣梭子蟹肝胰腺组织结构的影响[J]. 广东农业科学, 2012, 39(15): 147-149, 4.]
- [40] Wang H W, Lin R N, Zhang C, et al. Cell culture from hepatopancreas of *Penaeus japonicus*[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2004, 24(2): 175-179. [王宏伟, 林瑞年, 张晨, 等. 日本对虾肝胰腺的细胞培养[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2004, 24(2): 175-179.]
- [41] Wang H W, Liu R L, Guo M S, et al. Effect of linoleic acid on cell culture of hepatopancreas from *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2005, 25(1): 79-83. [王宏伟, 刘瑞兰, 郭明申, 等. 亚油酸对培养日本沼虾肝胰腺细胞的影响[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2005, 25(1): 79-83.]
- [42] Yu H N. Effects of environmental stress on behavior, growth and physiological activity of *Macrobrachium rosenbergii* and *Litopenaeus vannamei*[D]. Guangzhou: Jinan University, 2007. [于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2007.]
- [43] Zheng J B, Cao J W, Mao Y, et al. Effects of thermal stress on oxidative stress and antioxidant response, heat shock proteins expression profiles and histological changes in *Marsupenaeus japonicus*[J]. Ecological Indicators, 2019, 101: 780-791.
- [44] Wang G C. Effect of high temperature stress on physiology and biochemistry, HSC70 gene cloning and expression of pikeperch (*Sander lucioperca*)[D]. Suzhou: Soochow University, 2017. [王国成. 高温胁迫对白梭吻鲈生理生化影响及其 HSC70 基因的克隆与表达[D]. 苏州: 苏州大

- 学, 2017.]
- [45] Al-Mohanna S Y, Nott J A. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle[J]. Marine Biology, 1989, 101(4): 535-544.
- [46] Al-Mohanna S Y, Nott J A. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda)[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1986, 66(2): 403-414.
- [47] Bechmann R K, Arnberg M, Gomiero A, et al. Gill damage and delayed mortality of Northern shrimp (*Pandalus borealis*) after short time exposure to anti-parasitic veterinary medicine containing hydrogen peroxide[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 180: 473-482.

Effects of high temperature on heat shock proteins, antioxidant enzyme activity, and histology of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*

ZHAI Shuhua¹, FU Hongtuo^{1, 2}, QIAO Hui², ZHANG Wenyi², JIN Shubo², JIANG Sufei², XIONG Yiwei², XU Lei¹, WANG Yabing¹, HU Yuning¹, GONG Yongsheng², WU Yan²

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

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

Abstract: To study the response mechanism of *Macrobrachium nipponense* to high-temperature stress, we set up a control (20±0.5) °C and high-temperature (30±0.5) °C groups. The dissolved oxygen concentration was (6.5±0.5) mg/L. The expression profiles of heat shock proteins 21 (*MnHSP21*), 60 (*MnHSP60*), 70-3 (*MnHSC70-3*), and 90 (*MnHSP90*) in *M. nipponense* hepatopancreas and gill tissues were measured at 0, 12, 24, 36, and 48 h under high-temperature stress. Then we measured the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPX), and catalase (CAT), as well as tissue structure of *M. nipponense* under high-temperature stress. The results showed that four heat shock protein genes were induced in hepatopancreas and gill tissues. The expression of *MnHSC70-3* gene was the most significant among the four heat shock protein genes, indicating that this gene is an important molecule for high-temperature stress response in *M. nipponense*. At the same time, expression trends of the four genes were more obvious in the hepatopancreas than in gill tissue, indicating that hepatopancreas is a more important organ for *M. nipponense* in terms of high-temperature stress response. Under high-temperature stress, the activity of all related antioxidant enzymes changed to varying degrees. The activity of SOD, GST, and CAT in the hepatopancreas increased significantly, while the activity of GPX changed only slightly. The SOD enzyme activity in gill tissue was significantly lower than in the control group ($P<0.05$), and the enzyme activity levels of GST, GPX, and CAT were significantly higher than in the control group ($P<0.05$). The structure of hepatopancreas and gill tissue changes under high-temperature stress. The secretory cells and internal transport vesicles in hepatopancreas increase in volume, while the layered epithelium of the gill tissue structure was slightly curved, and the arrangement of blood cells was disordered. Compared with 36 h, there was no obvious change in tissue structure after 48 h of stress. In summary, high-temperature stress activated the antioxidant system of *M. nipponense* and induced the expression of heat shock protein genes. The *MnHSC70-3* gene may play an important role in the heat tolerance of *M. nipponense*. Changes in the activity of antioxidant enzymes under high-temperature stress may be essential to avoid oxidative damage. This study aimed to provide a reference for healthy farming by clarifying the response mechanism of *M. nipponense* to high-temperature stress.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; high-temperature stress; heat shock proteins; antioxidant enzymes; histology

Corresponding author: FU Hongtuo. E-mail: fuht@ffrc.cn