

温度突变对凡纳滨对虾己糖激酶和丙酮酸激酶活力以及热休克蛋白表达的影响

郭彪¹, 王芳¹, 侯纯强¹, 董双林¹, 孙皓²

(1. 中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 国家海洋信息中心, 天津 300171)

摘要: 研究了水温从 17 °C 突变为 27 °C 对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 稚虾己糖激酶 (HK) 和丙酮酸激酶 (PK) 活力及热休克蛋白 (HSP70) 表达的影响。主要结果如下: (1) 温度突变后, 凡纳滨对虾肝胰腺中己糖激酶活力逐渐增大, 温度突变后 3 h 达到最高, 是温度突变前的 2.54 倍 ($P<0.05$)。随后, 对虾己糖激酶的活力逐渐下降, 72 h 酶活力基本恢复到温度突变前的水平。(2) 温度突变后 1 h, 凡纳滨对虾丙酮酸激酶的活力降到最低, 随后逐渐增大; 6 h 达到最高, 随后对虾丙酮酸激酶的活力逐渐下降并在 72 h 恢复到温度突变前的水平。(3) 温度突变 0.5 h 后, 凡纳滨对虾肌肉中 HSP70 的表达量迅速升高, 1 h 达到最高, 与温度突变前差异显著 ($P<0.05$), 随后下降到比温度突变前稍高的水平并趋于稳定。实验结果表明, 温度突然升高后, 己糖激酶活力升高, 随后恢复到起始水平; 糖酵解过程先受到抑制, 之后得以恢复; 温度突变可导致凡纳滨对虾对环境的抗逆性提高。[中国水产科学, 2008, 15(5): 885-889]

关键词: 凡纳滨对虾; 温度突变; 己糖激酶; 丙酮酸激酶; HSP70

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)05-0885-05

温度是影响水生生物代谢水平的重要因素之一。研究发现, 温度突变后, 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis* Osbeck) 的代谢率发生变化^[1]。但温度突变后, 与能量代谢有关的酶活力变化以及关于对虾适应温度突变的机制研究报道很少。

己糖激酶 (Pyruvate kinase, HK) 和丙酮酸激酶 (Hexokinase, PK) 是糖酵解反应过程中的关键酶, 其活性的变化对维持机体血糖水平具有重要作用。研究表明, 己糖激酶可以和细胞膜上葡萄糖转运蛋白功能相互偶联, 对机体细胞内葡萄糖流量和代谢产生一定的影响^[2]。丙酮酸激酶可调节细胞中 ATP、ADP 和糖酵解的中间产物, 对糖酵解速率的控制起关键作用^[3]。研究已发现这 2 种酶和能量代谢有关, 通过酶活力短时间的变化, 产生更多的能量 ATP, 以应对环境的变化^[4]。

研究发现, 当生物体处于环境胁迫状态下时, 机体可提高其热休克蛋白 (Heat shock proteins, HSP) 的表达量以适应环境的变化。如太平洋长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 和美国东部牡蛎 (*C. virginica*) 处于高温时, 宿主鳃组织和血淋巴细胞内 HSP70 累积, 同时宿主获得对环境高温的耐受性^[5];

在虾类研究中, 通过亚致死温度刺激与对照组比较, 说明了 HSP70 的表达量增加与机体自身保护能力的提高有着紧密的联系^[6]。

本研究以凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 为实验材料, 测定水温从 17 °C 突变至 27 °C 后, 对虾肝胰腺组织中己糖激酶, 丙酮酸激酶活力的变化以及对虾肌肉中 HSP70 的表达, 以期为进一步了解温度突变对凡纳滨对虾稚虾生理的影响提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 实验虾的来源及驯化

实验于 2006 年 11 月进行。凡纳滨对虾稚虾取自青岛市郊养殖场, 为健康活泼的个体。对虾运回后, 在室内正常海水 (盐度 28~31, 水温 15 °C) 中暂养 2~3 d 后, 将其水温升至 17 °C, 驯化 10 d。

暂养和驯化期间, 连续充气, 每天定时投喂配合饲料 [水分 (8.41±0.06)%、粗蛋白 (43.39±0.22)%、脂肪 (9.74±0.30)%、灰分 (9.91±0.05)%] 2 次 (8:00 和 18:00), 每天换水 1/2~2/3, 光照周期为 14L:10D, 实验前 1 d 停食。

1.2 实验设计

从驯化槽中选取个体相近、体色透明、健

收稿日期: 2007 12 18; 修订日期: 2008 04 16.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571441); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD09A07)。

作者简介: 郭彪 (1980-), 男, 博士研究生, 主要从事水产养殖生理生态学研究. E-mail: oucgb@ouc.edu.cn

通讯作者: 王芳, 教授. Tel: 0532 82032117; E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn

康的凡纳滨对虾稚虾[湿体质量为 (6.699 ± 1.269) g]40~50尾,直接放到HBS-1100型恒温水槽中,盐度为28~31,水温 27°C 。分别在温度突变后0.5 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h和72 h取对虾的肝胰脏和肌肉。每个取样时间点取6尾对虾,每尾对虾样品作为1个样本,测定对虾肝胰脏中己糖激酶和丙酮酸激酶活力以及肌肉中HSP70表达。同时,从驯化槽中取大小相近、健康的对虾6尾,取其肝胰脏和肌肉,用作温度突变前上述指标的测定。实验期间,连续充气,温度突变24 h后,每天换水1/2~2/3。为了避免换水对水温的影响,提前将用于换水的海水温调到实验设定的温度,实验期间不投喂。

1.3 实验方法

用吸水纸吸干对虾的体表水分,在冰盘上迅速解剖,去壳后取对虾的肌肉和肝胰脏,放入1.5 mL的离心管中,迅速放入液氮,而后转入 -80°C 冰箱保存3~4 d后测定。

1.3.1 己糖激酶和丙酮酸激酶活力的测定 取0.1~0.3 g对虾的肝胰脏,剪碎,加入4倍体积的冰冷生理盐水(0.86%),制成20%匀浆,在2 000 g离心10 min,取出上清液分装待测。用Folin-酚法测定样本蛋白质浓度^[7]。己糖激酶活力采用了6-磷酸葡萄糖脱氢酶偶联比色法^[8]测定。丙酮酸激酶活力采用Ireland等的方法测定^[9]。

1.3.2 对虾肌肉组织中HSP70含量的测定 称取0.4~0.6 g对虾的肌肉组织,剪碎,加入1.5 mL的冰冷的匀浆缓冲液,匀浆。在 4°C 下,10 000 g离心10 min,取出上清液分装待用。将蛋白浓度调到同一个水平,加入等体积的 $2\times$ 上样缓冲液,沸水煮5 min。12.5%的分离胶电泳分离蛋白,每个泳道的上样量为10 μL (其中包含40 μg 线粒体蛋白)。通过考马斯亮蓝和丽春红检测后用5%的脱脂牛奶封闭。兔抗小鼠HSP70抗体(1:5 000, SIGMA)和二抗(羊抗兔Ig G,稀释5000倍; Sigma产品)室温孵育1 h。冲洗液冲洗4次,每次5 min,冲洗后用ECL信号检测试剂(Amersham)检测HSP70的蛋白表达量。HSP70相对含量的分析采用Scion Image for Windows软件(Scion Corporation)。

1.4 数据处理

所得数据用SPSS11.0软件进行单因子方差(ANOVA)及Duncan多重比较进行分析处理,以 $P<0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 温度突变对凡纳滨对虾稚虾肝胰脏中己糖激酶(HK)活力的影响

温度突变对凡纳滨对虾稚虾肝胰脏中己糖激酶(HK)活力产生一定的影响(图1)。当温度从 17°C 突变到 27°C 时,随着距离温度突变时间的延长,己糖激酶活力逐渐增大,温度突变3 h后酶活力达到最大值(0.036 96 U/g prot),是温度突变前的2.54倍($P<0.05$);3 h后,己糖激酶的活力逐渐下降,72 h时基本恢复到温度突变前的水平。

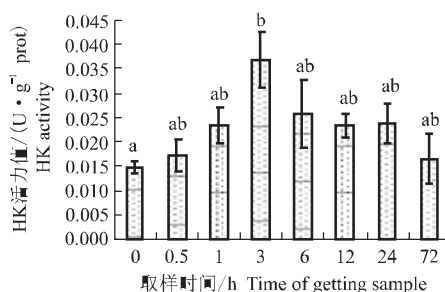


图1 温度突变对凡纳滨对虾稚虾肝胰脏中己糖激酶活力的影响

图中不同的字母上标表示差异显著($P<0.05$)。

Fig.1 Effect of abrupt temperature fluctuation on HK activity in hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei*
Different subscripts on diagram mean significant difference ($P<0.05$).

2.2 温度突变对凡纳滨对虾稚虾肝胰脏中丙酮酸激酶(PK)活力的影响

温度突变对凡纳滨对虾稚虾丙酮酸激酶(PK)活力产生一定的影响(图2)。当温度从 17°C 突变到 27°C 时,对虾丙酮酸激酶的活力表现出下降趋势,温度突变1 h时达到最低(2.523 8 U/g prot),但与温度突变前相比差异不显著($P>0.05$);1 h后,随着距离温度突变时间的延长,对虾丙酮酸激酶的活力逐渐增大,6 h时达到最高值(4.708 0 U/g prot),但与温度突变前相比差异不显著($P>0.05$);温度突变72 h时,对虾丙酮酸激酶的活力基本恢复到温度突变前的水平。

2.3 温度突变对凡纳滨对虾稚虾肌肉HSP70表达量的影响

温度对凡纳滨对虾肌肉中HSP70的含量产生一定的影响(图3)。当温度从 17°C 突变到 27°C 时,对虾肌肉组织中HSP70的含量逐渐升高,在

温度突变 1 h 时, 对虾 HSP70 的表达量最高, 为温度突变前的 2.76 倍, 与温度突变前相比差异显著 ($P<0.05$); 随着距离温度突变时间的延长, 对虾 HSP70 的表达量逐渐下降, 72 h 时的对虾肌肉 HSP70 的表达量是温度突变前的 1.81 倍, 与温度突变前相比差异显著 ($P<0.05$)。

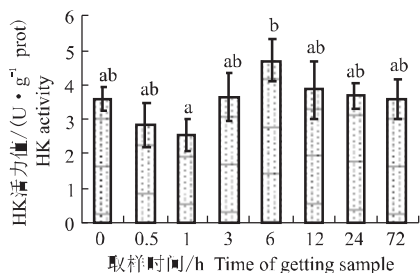


图2 温度突变对凡纳滨对虾稚虾肝胰脏中丙酮酸激酶 (PK) 活力的影响

图中不同的字母上标表示差异显著 ($P<0.05$)。

Fig.2 Effect of abrupt temperature fluctuation on PK activity in hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei*
Different subscripts on diagram mean significant difference ($P<0.05$).

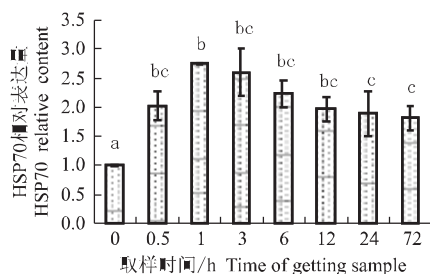


图3 温度突变对凡纳滨对虾稚虾肌肉中 HSP70 表达量的影响

图中不同的字母上标表示差异显著 ($P<0.05$)。

Fig.3 Effect of abrupt temperature fluctuation on HSP70 expression in muscle of juvenile *Litopenaeus vannamei*
Different subscripts on diagram mean significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 温度突变对凡纳滨对虾己糖激酶和丙酮酸激酶活力的影响

温度是影响动物代谢的重要环境因子之一。田相利^[1]研究发现, 温度由 19 °C 突变到 31 °C 后, 中国明对虾的耗氧代谢迅速升高。汪玉松等^[3]指出, 生物体耗氧代谢的升高或机体供氧不充足必然导致机体能量消耗增大; 机体内主要提供能量的

物质是葡萄糖^[2], 且机体细胞内葡萄糖流量与己糖激酶的活力有关^[1]。在本实验中, 温度突变后, 对虾肝胰脏中己糖激酶的活力迅速增大, 温度突变 3 h 时达到最高, 是温度突变前的 2.54 倍, 这说明温度突变后, 机体提高了葡萄糖的流量, 以满足耗氧代谢的需要。Metón 等^[10]在研究金头鲷 (*Sparus aurata*) 时发现, 机体通过糖酵解和糖异生这两个相对立的过程来保持葡萄糖水平的动态平衡。机体葡萄糖的大量消耗, 通过糖异生作用来补充, 本实验中, 温度突变 3 h 后, 对虾己糖激酶的活力达到最高水平, 糖酵解作用加剧, 糖异生作用抑制, 以维持机体的血糖水平, 满足呼吸代谢的需要。

机体生存所需能量 -ATP 的形成包括有氧的氧化磷酸化和无氧的糖酵解过程。当机体的供氧不足时, 需氧的氧化磷酸化过程受到抑制, 而糖酵解成为主要的供能方式。本研究发现, 丙酮酸激酶出现最低值后, 其活力开始回升, 而且温度突变后 3~6 h 仍有一个继续增高的过程, 这说明随着耗氧率的升高, 机体供氧不足, 糖酵解作用加强。6 h 后, 由于机体供氧逐渐充足, 糖酵解水平下降, 氧化磷酸化作用加强, 丙酮酸激酶活力下降并维持在与对照组基本一致的水平。

这 2 种酶的变化过程与机体耗氧代谢的变化趋势基本一致, 但其峰值的出现和恢复到正常状态的时间却均有延后, 二者在变化过程中不同步。这在许多硬骨鱼类^[11-12]及甲壳类^[13]的研究中也存在相似的规律, 可能因为酶活力的提高是一个生化反应过程, 受多种因素的影响, 其对温度突变的响应没有耗氧变化那么迅速及时。

3.2 温度突变对凡纳滨对虾肌肉 HSP70 表达量的影响

外界环境变化能够导致机体在分子和生理方面做出快速的反应, 这些反应可以通过一些分子和生理指示器来进行评价^[14]。热休克蛋白 (HSPs) 是一种应激反应的指示器, 它在所有的生物体中发挥着特定的保护功能^[15]。已有文献报道, 热刺激使栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的鳃组织中出现了 HSP70 的明显表达^[16]。冷、热应激和 WSSV 刺激中国明对虾后, 用鼠抗牛 HSP70 抗体检测到诱导型 HSP70 的表达量的增加^[17]。本实验发现, 当水温从 17 °C 突变到 27 °C 后, 凡纳滨对虾稚虾肌肉中 HSP70 表达量逐渐增大, 温度突变后 1 h 时达到最高, 为温度突变前的 2.76 倍; 随后对虾 HSP70 的表达量有所降低, 但温

度突变后 72 h 时,对虾 HSP70 的表达量仍显著高于温度突变前的水平 ($P<0.05$)。这说明,在温度突变时,对虾通过提高 HSP70 的表达,以适应突变的环境,这与前人的研究结果相一致。关于热休克蛋白表达量峰值出现的时间,各种文献报道不一。在底栖动物^[18]和一些贝类^[19]的研究中发现,其峰值出现在热刺激后 1 h 到 5 h 内;而小鼠高温处理后 8 h 到 24 h 出现热休克蛋白的表达峰值^[20]。本实验中,在温度突变后 1 h 对虾 HSP70 表达量达到最高。峰值出现的时间不同,可能与刺激方式、刺激强度和动物个体及种间差异有关^[21]。

3.3 HSP70、己糖激酶及丙酮酸激酶的关系

HSP70 作为分子伴侣,其在工作过程中需要 ATP。HSP70 和 ATP 的复合物与非天然构象蛋白质结合,防止其自发折叠成不溶状态;同时 HSPs 也可利用水解 ATP 的能量,维持变性蛋白的可溶状态,并进一步使其复性,从而使动物具有抗逆性^[22-23]。热休克蛋白合成及工作中对能量的需求比有氧呼吸高出大约 50%^[23]。其对能量的需求主要来自于葡萄糖^[24]。葡萄糖作为能量代谢中的主要物质,特别是在外界刺激使机体能量需求提高的时候,热休克蛋白的合成可导致机体中葡萄糖水平下降^[25]。这样,机体中糖酵解过程暂时受到抑制。在本实验中,三者之间的关系表现为:温度突变 1 h 时,对虾 HSP70 的表达量最高,而此时丙酮酸激酶的活力最低,己糖激酶的活力有所增加。这说明为了使血糖水平达到动态平衡,糖异生作用加速补充葡萄糖,而葡萄糖一进入细胞就被己糖激酶催化发生磷酸化,己糖激酶活性有所提高。温度突变 1 h 后,对虾 HSP70 表达量下降,此时的丙酮酸激酶的活力开始增强。由于在热休克蛋白的合成过程中,葡萄糖大量消耗,其在机体中的含量水平下降,在热休克蛋白合成停止后,为了达到机体中正常葡萄糖水平,其合成继续加强,己糖激酶的酶活力也得以继续提高,这可能是机体代谢补偿的一种结果^[26]。丙酮酸激酶活力在温度突变后 72 h 恢复到对照水平,而此时己糖激酶处于一个相对稳定却比对照值高的水平,这说明此时糖酵解的水平已恢复到突变前的水平,而葡萄糖的代谢补偿尚未完成。

参考文献:

- [1] 田相利. 变温对中国对虾生长的影响及其生物能量学机制 [D]. 青岛: 青岛海洋大学, 2001.
- [2] Allert S, Ernest I, Poliszczak A, et al. Molecular cloning and analysis of two tandemly linked genes for pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei* [J]. Eur J Biochem, 1991, 200: 19-27.
- [3] 汪玉松, 邹思湘, 张玉静. 现代动物生物化学 [M]. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2005: 466-490.
- [4] Somero G N, Childress J J. Scaling of atp-supplying enzymes, myofibrillar proteins and buffering capacity in fish muscle: relationship to locomotory habit [J]. Exp Biol, 1990, 149: 319-333.
- [5] Clegg J, Jackson S A, Chert G N, et al. Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1998, 7(1): 21.
- [6] 吴任, 谢数涛, 孙勇, 等. 凡纳滨对虾热休克蛋白 70 的原核高效表达 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 305-309.
- [7] Lowry O H, Roscrough N J, Farr A, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [8] Braithwaite S S, Palazuk J R, Colca C W, et al. Reduced expression of hexokinase II in insulin-resistant diabetes [J]. Diabetes, 1995, 44: 43-48.
- [9] 左斌, 邱德文, 罗宽. 植物激活蛋白对水稻秧苗生长及相关酶活性的影响 [J]. 科学技术与工程, 2005, 5(17): 1 260-1 262.
- [10] Metón I, Fernández F, Baanante I V. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. Aquaculture, 2003, 225: 99-107.
- [11] Baldwin J, Hochachka P W. Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatization: Acetylcholinesterase from trout brain [J]. Biochem J, 1970, 116: 883-887.
- [12] Ozernyuk N D, Klyachko O S, Polosukhina E S. Acclimation temperature affects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Misgurnus fossilis*) skeletal muscles [J]. Comp Biochem Physiol, 1994, 107B: 141-145.
- [13] Vetter A A H. Ecophysiological studies on citrate-synthase: (I) enzyme regulation of selected crustaceans with regard to temperature adaptation [J]. J Comp Physiol, 1995, 165B: 46-55.
- [14] Sanchez A, Pascual C, Sanchez A, et al. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation [J]. Aquaculture, 2001, 198: 13-28.

- [15] de la Vega E, Hall M R, Bernard M, et al. Short-term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV) [J]. *Aquaculture*, 2006, 253: 82–90.
- [16] 曲凌云, 相建海, 孙修勤, 等. 温度刺激下栉孔扇贝不同组织热休克蛋白 HSP70 的表达研究 [J]. *高技术通讯*, 2005, 15(5): 97–100.
- [17] Guo Z Y, Jiao C Z, Xian J H, et al. Heat shock protein 70 expression in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during thermal and immune-challenged stress [J]. *Chin Oceanol Limnol*, 2004, 22(4): 386–391.
- [18] Tomanek L, Somero G N. Time course and magnitude of synthesis of heat-shock proteins in congeneric marine snails (*Genus Tegula*) from different tidal heights [J]. *Physiol Biochem Zool*, 2000, 73: 249–256.
- [19] Hofmann G E, Somero G N. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus* [J]. *J Exp Biol*, 1995, 198: 1 509–1 518.
- [20] 何建宏, 李玉民, 巩爱霞. 经高温处理后大鼠肝中热休克蛋白 70 的表达 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(6): 432–434.
- [21] Cara J B, Aluru N, Moyano F J, et al. Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in fry gilthead sea bream and rainbow trout [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2005, 142B: 426–431.
- [22] 肖春霞, 杜予州, 强承魁. 昆虫热休克蛋白研究概况 [J]. *广东农业科学*, 2006, 5: 110–112.
- [23] Mommsen T P. Growth and metabolism [M] // Evans D H. *The Physiology of Fishes*. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1997: 65–97.
- [24] Gravel A, Vijayan M M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs disrupt the heat shock response in rainbow trout [J]. *Aquac Toxicol*, 2007, 81: 197–206.
- [25] Boone A N, Ducouret B, Vijayan M M. Glucocorticoid-induced glucose release is abolished in trout hepatocytes with elevated hsp70 content [J]. *J Endocrinol*, 2002, 172: 1–5.
- [26] Lemos D, Salomon M, Gomes V, et al. Citrate synthase and pyruvate kinase activities during early life stages of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae): effects of development and temperature [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2003, 135B: 707–719.

Effects of acute temperature fluctuation on HK and PK activity, HSP70 relative content in *Litopenaeus vannamei*

GUO Biao¹, WANG Fang¹, HOU Chun-qiang¹, DONG Shuang-lin¹, SUN Hao²

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. National Marine Data Information Service, Tianjin 300171, China)

Abstract: Effects of acute temperature fluctuation from 17 °C to 27 °C on the enzyme activities of hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK) and the relative content of HSP70 in juvenile *Litopenaeus vannamei* were investigated. The main results were as follows: (1) The HK activity increased gradually after acute temperature fluctuation, and reached the maximum level after 3 h, which was 2.54 folds higher than that before temperature fluctuation ($P < 0.05$), then decreased to the level of the control group; (2) the PK activity decreased gradually after acute temperature fluctuation, and reached the minimum level after 1 h. After this, PK activity began to increase and reached the maximum level after 6 h. Then, the PK activity decreased to the value which was the same as the activity before temperature fluctuation; (3) The HSP70 relative content elevated rapidly after temperature fluctuation, and reached the maximum level after 1 h ($P < 0.05$), then decreased to a steady level. However, the value of the steady level was still significantly higher than the basic value of HSP70 relative content before temperature fluctuation ($P < 0.05$). These results indicate that glucose metabolism is limited firstly, then recovered, and the ability to adapt to challenging environment is enhanced in *L. Vannamei* after temperature fluctuation. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(5): 885–889]

Key words: *Litopenaeus Vannamei*; temperature fluctuation; HK; PK; HSP70

Corresponding author: WANG Fang. E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn