

DOI: 10.12264/JFSC2020-0218

## Cd 对凡纳滨对虾血细胞活性氧含量(ROS)、细胞凋亡率及应激反应基因表达的影响

李玲, 吴方舟, 梁金荣, 陈丽芬, 郭慧, 申玉春

广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524000

**摘要:** 为探讨镉(Cd)对虾类血细胞的免疫毒性, 以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象, 设置 0 mg/L 对照组和 10.5 mg/L Cd 处理组, 利用流式细胞仪检测血细胞中的活性氧含量(ROS)和细胞凋亡率, 并利用实时荧光定量 PCR 技术检测血细胞中抗氧化酶(*Cu-Zn SOD*、*CAT* 和 *GPx*)、金属硫蛋白(*MT*)、热休克蛋白(*HSP60*、*HSP70* 和 *HSP90*)以及 caspase-3 基因的表达量变化。结果显示, 与对照组相比, Cd 胁迫导致血细胞 ROS 含量在胁迫后 3~48 h 极显著升高( $P<0.01$ ), 在 24 h 达到最大值; 细胞凋亡率在 3 h 达到最大值 87.99% ( $P<0.01$ ), 在 12~48 h 显著升高( $P<0.05$ ); *Cu-Zn SOD* 和 *HSP60* 基因表达水平分别在 3~48 h 和 12~48 h 显著升高( $P<0.05$ ); *GPx* 基因表达量在 12 h 和 48 h 显著上调( $P<0.05$ ); *CAT*、*MT*、*HSP60* 和 *HSP90* 的基因表达水平在胁迫 3 h 显著下降( $P<0.05$ ), 在胁迫后期显著升高( $P<0.05$ ); *HSP70* 表达量在 3~24 h 无显著变化( $P>0.05$ ), 在 48 h 显著上升( $P<0.05$ ); caspase-3 基因表达水平在 12~24 h 显著上升( $P<0.05$ )。综上所述, Cd 诱导血细胞产生过量 ROS, 影响应激反应基因的表达水平, 最终促进细胞凋亡。

**关键词:** Cd; 凡纳滨对虾; ROS; 凋亡率; 应激; 基因表达

中图分类号: S966

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)02-0167-09

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国重要的水产经济动物, 其养殖产量占全国虾类总产量的 79.3%, 达  $1.11 \times 10^6$  t<sup>[1]</sup>, 其富含蛋白、矿物质和不饱和脂肪酸等营养物质, 深受消费者喜爱<sup>[2]</sup>。对虾养殖场通常直接使用沿岸地区的海水, 但沿岸海水易受到重金属污染。镉(Cd)是重要的工业原料, 用于制造油漆、颜料和电池等工业用途, 其广泛应用导致水环境中的 Cd 含量增多<sup>[3]</sup>。Cd 具有强毒性且随着食物链富集到高营养级<sup>[4-5]</sup>, 人类食用富含 Cd 的水产品, 会导致骨质疏松, 甚至患“痛痛病”。因此, 开展 Cd 对凡纳滨对虾毒性效应的研究具有现实意义, 可为凡纳滨对虾健康养殖提供理论基础。国内外许多研究表明, Cd 可抑制虾类免疫相关酶的活性<sup>[6]</sup>, 改变鳃和肝胰腺形态结构<sup>[7-8]</sup>, 影响个体健康<sup>[9]</sup>, 严重危害生物和生态

环境安全。

重金属通过虾的鳃进入血液, 经血液循环输送到身体各个部位<sup>[10]</sup>。在此过程中, 重金属离子与血细胞接触最密切。血细胞能识别和清除外来病原微生物, 产生和释放溶菌酶、抗菌肽等非特异性因子参与体液免疫, 是甲壳动物先天免疫系统的重要组成部分<sup>[11-12]</sup>。研究 Cd 对凡纳滨对虾血细胞的免疫毒性具有重要意义。

重金属的毒性效应主要是氧化应激反应, 表现为诱导细胞产生大量活性氧(ROS), 影响抗氧化酶活性及其基因表达, 氧化损伤脂质和核酸等生物大分子, 诱导细胞凋亡<sup>[13-15]</sup>。目前研究 Cd 对虾类血细胞的免疫毒性影响, 主要通过测试血细胞吞噬活力、细胞活性和酯酶活性等指标<sup>[16-17]</sup>。本研究通过 ROS 含量、细胞凋亡率及应激反应基

收稿日期: 2020-08-05; 修订日期: 2020-08-26.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31600321).

作者简介: 李玲(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物健康养殖. E-mail: 18476614586@163.com

通信作者: 申玉春, 教授, 研究方向为海洋环境与生物资源保护和水域生态学. E-mail: shenyuchun@163.com

因表达水平 3 个指标, 探讨 Cd 对凡纳滨对虾血细胞的免疫毒性。流式细胞仪已广泛应用到水产动物血细胞研究<sup>[18-19]</sup>。本研究使用流式细胞仪检测 Cd 胁迫下的凡纳滨对虾血细胞的 ROS 含量变化和细胞凋亡率, 应用实时荧光定量 PCR 检测抗氧化酶基因(*Cu-Zn SOD*、*CAT* 和 *GPx*)、金属硫蛋白基因(*MT*)、热休克蛋白基因(*HSP60*、*HSP70* 和 *HSP90*)和 caspase-3 基因的表达变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用虾

本实验所用的凡纳滨对虾购于湛江市某养殖场, 平均体重(10.22±0.47) g, 平均体长(11.00±0.53) cm。实验前在养殖实验室驯养 2 周后, 挑选体色健康、大小均一、无病患、活力强且处于蜕皮间期的对虾用于胁迫实验。驯养期间盐度为 24, pH 7.9~8.0, 温度(26±2) °C, 水体为经循环过滤及连续曝气的海水, 溶解氧浓度为 5.8~6.2 mg/L。每天早晚(6:00 和 18:00)投喂 2 次商业饲料。

### 1.2 Cd 胁迫实验

结合文献及预实验, 检测和计算得到本实验虾的 24 h LC<sub>50</sub> Cd 为 10.5 mg/L。以 CdCl<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O 为 Cd 源, 设置对照和 10.5 mg/L Cd 暴露组, 每个实验组设 3 个重复组, 每个养殖桶为 1 个重复组, 每桶放养 20 尾对虾, 实验期间保持曝气, 实验前停饲 24 h, 其他条件与暂养条件一致。分别在胁迫 0 h、3 h、12 h、24 h 和 48 h 进行取样。每重复组取对虾 3 尾。

### 1.3 样品制备

血细胞悬液制备参考郭慧等<sup>[20]</sup>的方法进行, 每个重复组的血淋巴混合后, 用于 ROS 和细胞凋亡率的检测。实验所用流式细胞仪为美国 BD (Becton Dickinson)公司生产的 FAC Verse, 数据获取和分析软件为 Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)。余下的血细胞在 800 g、4 °C 离心 2 min, 弃上清, 加入 Trizol 溶液, -80 °C 保存, 用于基因表达量分析。

### 1.4 血细胞活性氧(ROS)含量测定

参考郭慧等<sup>[21]</sup>的研究方法, 以 DCFH-DA 为标记探针检测活性氧(ROS)含量。结果以 DCF 荧

光量为横坐标、细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示, 分析细胞的 DCF 平均荧光量。

### 1.5 血细胞凋亡率

参考陈丹红等<sup>[22]</sup>的研究方法检测血细胞凋亡。以 Annexin V-FITC 荧光强度为横坐标, PI 荧光强度为纵坐标作双参数散点图, 设十字门划分细胞类群: 活细胞(Annexin V-FITC-/PI-)位于左下象限, 前期凋亡细胞(Annexin V-FITC+/PI-)位于右下象限, 后期凋亡细胞和死细胞(Annexin V-FITC+/PI+)位于右上象限。分析各类细胞的比例, 凋亡率为前期凋亡、后期凋亡和死亡细胞所占的比例, 即右下象限和右上象限细胞所占的比例。

### 1.6 基因表达

血细胞总 RNA 的提取参照 Trizol (Invitrogen) 说明书进行, cDNA 的合成按照 TaKaRa 公司的 Prime-Script RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒说明书进行。反转录所得 cDNA 原液稀释 10 倍后用于实时荧光定量 PCR。引物序列均来自美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物或是根据前人文献中所用到的引物, 引物名称和序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Tab. 1 Real-time quantitative PCR primers

引物 primer	登录号 GenBank no.	序列(5'-3') sequence (5'-3')
β-actin	AF300705	F: CATCAAGGAGAAACTGTGCTACG R: CATGATGGAGTTGTAGGTGGTCT
Cu-Zn SOD	HM371157	F: TTGGCAACTCTGCTGGCTG R: GGATGTGGAACCCGTGCTT
CAT	AY518322	F: TCAGCGTTGGAGAA R: GCCTGGCTCATCTTATC
GPx	AY973252	F: AGGGACTTCCACCAGATG R: CAACAACCCCCCTCGGTA
MT	KJ701600.1	F: CTGATCCATGCTGTAACGAG R: CATCTTGTTGCACACTCCTC
caspase-3	EU421939	F: GGTGGACAAAGGCGTGAGTA R: GTTCTTGAGGTTCTCGGCCA
HSP60	FJ710169	F: ATTGTCCGCAAGGCTATC R: ATCTCCAGACGCTTCCAT
HSP70	AY645906	F: CCTCCAGGACTTCTCAACG R: GGTACGTCAAACAGCAAC
HSP90	HQ008268.1	F: GCACGAAGGAGAACAGAAC R: TGAACGCAGTATTGTCGATGCGT

荧光定量 PCR 使用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix EX Taq 试剂盒, 按说明书步骤进行操作。按

下列程序进行荧光定量 PCR 扩增: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 55 °C 退火 30 s, 40 个循环。扩增结束后启动熔解曲线收集程序, 根据熔解曲线的温度判断扩增过程的特异性并对扩增曲线进行分析。所得数据以 ABI 7500 SDS 进行分析, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 根据目的基因和  $\beta$ -actin 的  $C_t$  值用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

### 1.7 统计分析

结果以平均值±标准差( $\bar{x} \pm SD$ )表示, 实验数据应用 SPSS 19.0 进行配对样本  $T$  检验,  $P < 0.05$  认为差异显著,  $P < 0.01$  认为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 Cd 对血细胞 ROS 含量的影响

Cd 对凡纳滨对虾血细胞 ROS 含量的影响如图 1 所示。与对照组相比, Cd 胁迫下的血细胞 ROS 含量在 3~48 h 极显著升高( $P < 0.01$ ), 在 24 h 达到最大值。随着胁迫时间延长, Cd 诱导血细胞产生大量 ROS。

### 2.2 Cd 对抗氧化酶基因表达影响

Cd 对血细胞 3 种抗氧化酶基因表达的影响如图 2 所示。与对照组相比, 实验组 Cu-Zn SOD 表

达水平在胁迫 3~48 h 显著上调( $P < 0.05$ ), 到 12 h 达到最大值( $P < 0.01$ )。CAT 基因表达水平在 3 h 显著下降( $P < 0.05$ ), 在 12 h 极显著升高( $P < 0.01$ ), 24~48 h 恢复到正常水平( $P > 0.05$ )。与对照组相比, GPx 基因表达水平在胁迫 3 h 没有显著变化( $P > 0.05$ ), 在 12 和 48 h 显著升高( $P < 0.05$ ), 在 24 h 显著下降( $P < 0.05$ )。

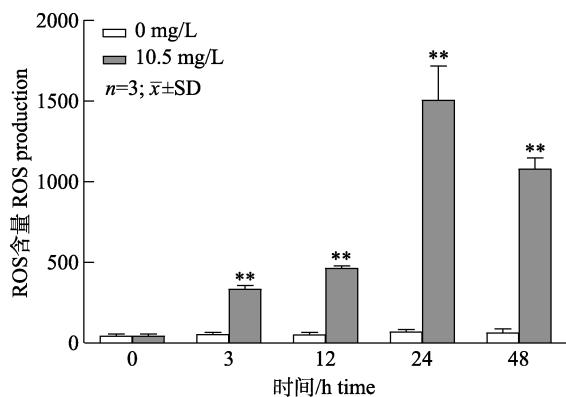


图 1 Cd 暴露对凡纳滨对虾血细胞活性氧(ROS)含量的影响

\*\*表示在各时间点 Cd 与对照组差异极显著( $P < 0.01$ )。

Fig. 1 Effect of Cd exposure on reactive oxygen species (ROS) production in hemocytes of *Litopenaeus vannamei*

\*\* indicates extremely significant difference between Cd exposure group and control group at different time ( $P < 0.01$ ).

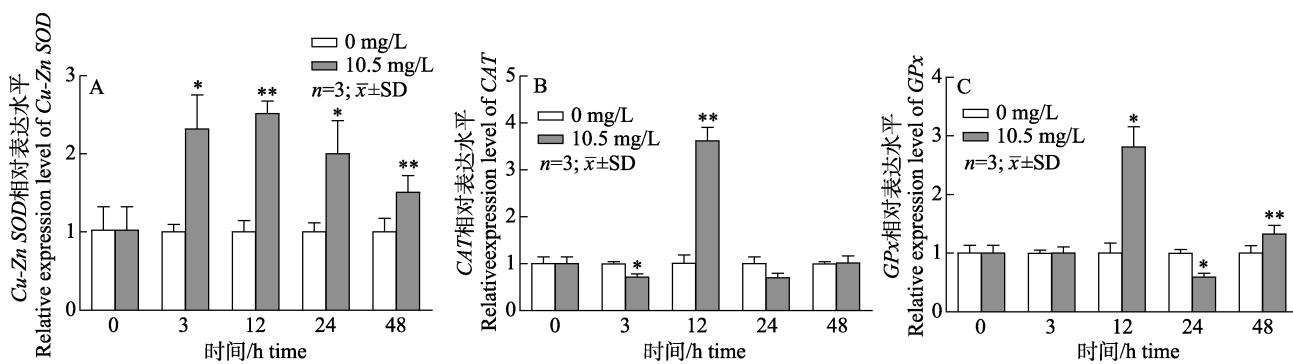


图 2 Cd 暴露对凡纳滨对虾血细胞 Cu-Zn SOD (A)、CAT (B) 和 GPx (C) 基因表达的影响

\*或\*\*分别表示在各时间点 Cd 与对照组差异显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ )。

Fig. 2 Effect of Cd exposure on relative expression levels of Cu-Zn SOD (A), CAT (B) and GPx (C) in hemocytes of *Litopenaeus vannamei*

\* or \*\* indicates significant ( $P < 0.05$ ) or extremely significant ( $P < 0.01$ ) difference between the Cd exposure group and control group at different time.

### 2.3 Cd 对金属硫蛋白 MT 基因表达的影响

Cd 对金属硫蛋白 MT 基因表达影响如图 3 所示。在胁迫 3 h, Cd 极显著地抑制了 MT 基因表达水平( $P < 0.01$ )。MT 基因表达量在 12 h 无显著变化( $P > 0.05$ ), 在 24~48 h 显著增加, 在 24 h 达到最大

值( $P < 0.01$ )。

### 2.4 Cd 对热休克蛋白基因表达的影响

Cd 对凡纳滨对虾的 3 种热休克蛋白的基因表达影响如图 4。与对照组相比, HSP60 基因相对表达水平在胁迫 3 h 极显著下降( $P < 0.01$ ), 在 12 h 达

到最大值( $P<0.01$ )，在胁迫 24~48 h 显著升高( $P<0.05$ )。*HSP70* 基因表达水平在胁迫 3~24 h 均无显著变化( $P>0.05$ )，在 48 h 显著上调( $P<0.05$ )。*HSP90* 的相对表达量在胁迫 3 h 显著下降( $P<0.05$ )，在 12 h 恢复到正常水平( $P>0.05$ )，在 24~48 h 显著升高( $P<0.05$ )，在 24 h 达到最大值( $P<0.01$ )。

## 2.5 Cd 对血细胞凋亡的影响

Cd 对血细胞凋亡的影响如图 5 所示。流式细胞仪数据显示，活细胞主要集中在左下角，在胁迫 3~48 h，早期(右下象限)和晚期(右上象限)凋亡细胞和死亡细胞明显增多。细胞凋亡是一种正常的生理现象，对照组血细胞凋亡率为 5.10%。与对照组相比，细胞凋亡率在胁迫 3 h 极显著升高( $P<0.01$ )，达到最大值 87.99%，在 12~48 h 显著升高( $P<0.05$ )。

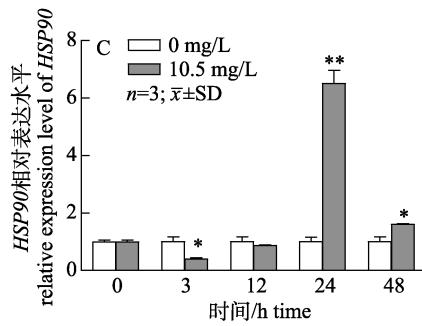
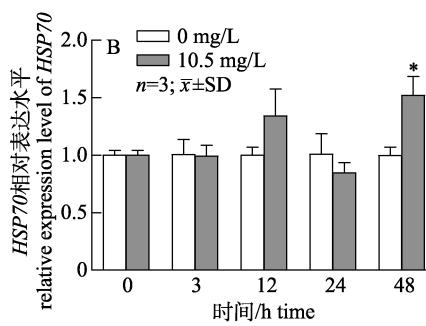
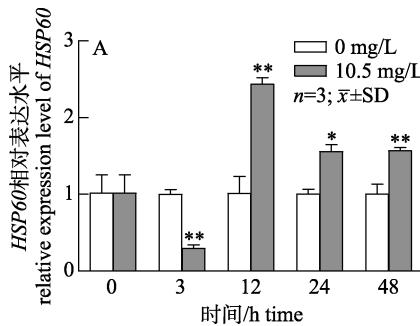


图 4 Cd 暴露对凡纳滨对虾血细胞 HSP60 (A)、HSP70 (B) 和 HSP90 (C) 基因表达的影响

\*或\*\*分别表示在各时间点 Cd 与对照组差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。

Fig. 4 Effect of Cd exposure on relative expression level of HSP60 (A), HSP70 (B) and HSP90 (C) in hemocytes of *Litopenaeus vannamei*  
\* or \*\* indicates significant ( $P<0.05$ ) or extremely significant ( $P<0.01$ ) difference between the Cd exposure group and control group at different time.

## 2.6 Cd 对凋亡基因 caspase-3 的表达影响

Cd 对凋亡基因 caspase-3 的表达影响如图 6 所示。与对照组相比，Cd 胁迫下血细胞中的 caspase-3 表达水平在胁迫 12~24 h 显著上调( $P<0.05$ )，在 12 h 达到最大值( $P<0.01$ )。说明 Cd 促进凋亡基因 caspase-3 表达。

## 3 讨论

### 3.1 Cd 对 ROS 含量及抗氧化酶基因表达的影响

ROS 是线粒体有氧呼吸的副产物<sup>[23]</sup>，是体内一类氧的单电子还原产物，主要包括超氧阴离子( $O_2^-$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )<sup>[24]</sup>。正常情况下，细胞内存在多种抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘

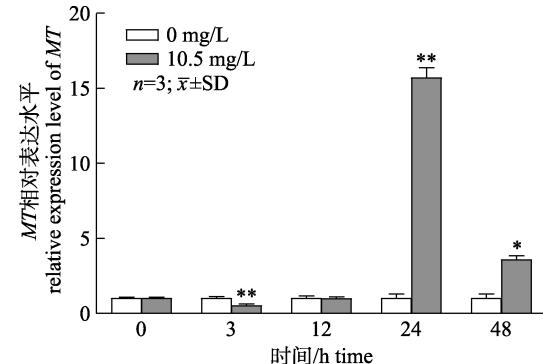


图 3 Cd 暴露对凡纳滨对虾血细胞 MT 基因表达的影响

\*或\*\*分别表示在各时间点 Cd 与对照组差异

显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。

Fig. 3 Effect of Cd exposure on relative expression level of MT gene in hemocytes of *Litopenaeus vannamei*

\* or \*\* indicates significant ( $P<0.05$ ) or extremely significant ( $P<0.01$ ) difference between the Cd exposure group and control group at different time.

肽过氧化物酶(GPx)和过氧化氢酶(CAT)<sup>[25]</sup>。Cd 对 SOD、CAT 和 GPx 这些抗氧化酶的活性先促进，后抑制，导致 ROS 含量增加<sup>[26~27]</sup>。本研究发现 Cd 显著诱导凡纳滨对虾血细胞产生大量 ROS，且随着胁迫时间延长，ROS 含量显著升高。在 2.9 mg/L Cd 胁迫下，华溪蟹(*Sinopotamon henanense*)血细胞中 ROS 含量随着胁迫时间延长显著升高<sup>[28]</sup>，与本研究凡纳滨对虾血细胞的结果一致。Cd 不仅影响抗氧化酶活性，还影响抗氧化酶基因表达。多项研究发现，重金属诱导铜锌超氧化物歧化酶(Cu-Zn SOD)、CAT 和 GPx 等抗氧化酶的基因表达变化<sup>[14~15, 29]</sup>。Cu-Zn SOD 作为抗氧化防御的第一道防线，催化  $O_2^-$  生成氧化性低的  $H_2O_2$ ，研究

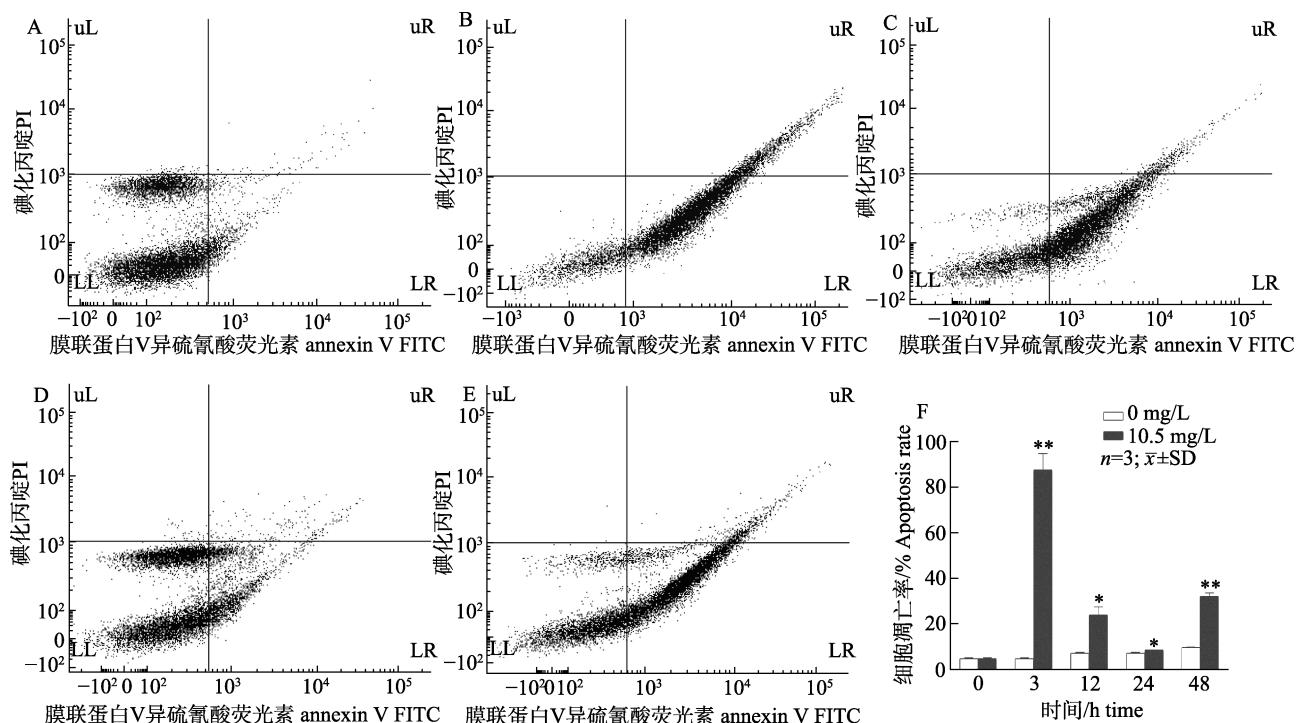


图 5 Cd 暴露对凡纳滨对虾血细胞凋亡的影响

\*或\*\*分别表示在各时间点 Cd 与对照组差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。

Fig. 5 Effect of Cd exposure on apoptosis of haemocytes in *Litopenaeus vannamei*  
\* or \*\* indicates significant ( $P<0.05$ ) or extremely significant ( $P<0.01$ ) difference  
between the Cd exposure group and control group at different time.

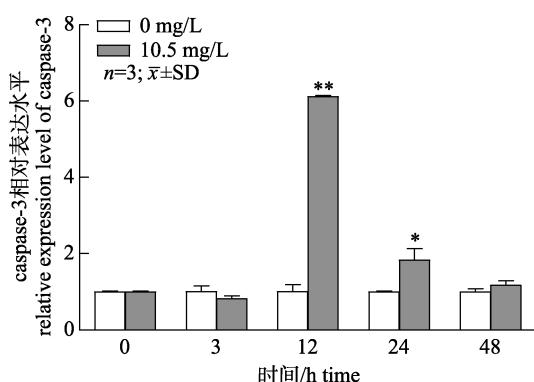


图 6 Cd 暴露对凡纳滨对虾血细胞

caspase-3 基因表达的影响

\*或\*\*分别表示在各时间点 Cd 与对照组  
差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。

Fig. 6 Effect of Cd exposure on relative expression level of caspase-3 gene in haemocytes of *Litopenaeus vannamei*  
\* or \*\* indicates significant ( $P<0.05$ ) or extremely significant  
( $P<0.01$ ) difference between the Cd exposure group and control  
group at different time.

发现促进 Cu-Zn SOD 基因表达有助于生物应对 Cd 胁迫<sup>[30]</sup>。在本研究中, Cu-Zn SOD 基因表达水平在胁迫 3~48 h 显著升高, 说明 Cu-Zn SOD 对

Cd 胁迫敏感。CAT 和 GPx 均是清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的抗氧化酶, 具有一定协同作用。本研究结果中, CAT 基因表达量在胁迫 12 h 显著上调, GPx 基因表达水平的提高出现在胁迫后期。关于 CAT 和 GPx 的协同作用在亚硝酸盐胁迫中也有相似的变化趋势<sup>[31]</sup>。本研究中 Cu-Zn SOD、CAT 和 GPx 抗氧化酶基因表达水平在胁迫后期显著升高, 然而 ROS 含量仍显著升高, 可能是抗氧化系统已不能完全消除 ROS。

### 3.2 Cd 对金属硫蛋白 MT 基因表达水平的影响

金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)是一类能与金属离子结合的蛋白质, 对 Cd 具有高亲和力, 参与重金属解毒过程<sup>[32-33]</sup>。更重要的是, 它具有很高的抗氧化潜力, 并保护细胞免受细胞毒性活性氧的影响<sup>[34]</sup>。研究发现, MT 基因表达水平的提高有助于清除过量 ROS<sup>[35-36]</sup>。Cd 胁迫显著提高华溪蟹<sup>[37]</sup>和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的 MT 基因表达量<sup>[38]</sup>。本研究中凡纳滨对虾血细胞 MT 基因表达量也在胁迫 24 h 和 48 h 显著升高, 研究结果与在 50 μg/L 和 500 μg/L Cd 胁迫日本囊

对虾 *MT* 基因表达水平<sup>[40]</sup>变化一致, 说明 *MT* 参与了抵抗 Cd 胁迫的免疫防御。此外, *MT* 是细胞凋亡的负调控因子, 研究发现抑制 *MT* 基因表达可提高凋亡基因 *p53* 表达水平<sup>[39-40]</sup>。在本研究中, *MT* 基因表达量在胁迫 3 h 显著下降, 而此时细胞凋亡率显著升高, 达到最大值 87.99%, 在胁迫后期随着 *MT* 基因表达水平的提高, 细胞凋亡率降低。本研究结果从细胞和分子水平进一步验证了 *MT* 是细胞凋亡的负调控因子。

### 3.3 Cd 对热休克蛋白基因表达的影响

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)按分子量大小分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP21 和 HSP10, 作为应激蛋白和外源性伴侣蛋白参与虾类免疫反应和多种环境应激反应<sup>[41]</sup>, 本实验主要研究 *HSP60*、*HSP70* 和 *HSP90* 基因表达对 Cd 暴露的响应。*HSP60* 响应不同的环境因素胁迫, 在虾类的先天免疫系统和应激反应中发挥重要作用<sup>[42]</sup>。*HSP70* 促进新生蛋白质的折叠和促进变性蛋白降解, 保护细胞免受环境应激, 研究发现 *HSP70* 能保护对虾免受高温、氨、亚硝酸盐和重金属胁迫影响<sup>[43-44]</sup>。对虾感染副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 后, *HSP90* 基因表达水平先上调后下降, 参与免疫反应<sup>[45]</sup>。在 10.5 mg/L Cd 胁迫下, *HSP60* 和 *HSP90* 基因的相对表达量分别在 12~48 h 和 24~48 h 内显著增加, 然而 *HSP70* 只在胁迫 48 h 显著升高。说明 *HSP60* 对 Cd 胁迫敏感, 而 *HSP70* 和 *HSP90* 可能在胁迫后期发挥作用。Qian 等<sup>[46]</sup>研究发现凡纳滨对虾 *HSP60* 对 Cd 胁迫高度敏感, 本实验也证实 *HSP60* 响应 Cd 胁迫更快速。因此, *HSP60* 可作为研究 Cd 毒性效应的重要指标。

### 3.4 Cd 对血细胞凋亡及 caspase-3 基因表达水平的影响

尽管高水平表达的抗氧化酶基因有助于清除 Cd 引起的 ROS, 但细胞凋亡仍不可避免<sup>[47]</sup>。细胞凋亡是一种正常的生理过程, 清除过度的、受损的、坏死的或潜在危险的细胞, caspase-3 是重要的执行分子<sup>[48]</sup>。本实验中, caspase-3 的基因表达量在 12~24 h 时显著上调。500 μg/L Cd 诱导日本囊对虾 caspase-3 在 24~96 h 显著提高<sup>[38]</sup>。流式细

胞仪数据显示, 活细胞主要集中在左下角, 在胁迫 3~48 h, 早期(右下象限)、晚期(右上象限)凋亡细胞和死亡细胞明显增多。与对照组相比, 血细胞的凋亡率在胁迫 3~48 h 显著增加, 证实了 Cd 促进细胞凋亡<sup>[49]</sup>。但 caspase-3 基因表达量在胁迫 3 h 和 48 h 无显著影响, 其原因有待后续研究进一步验证。胁迫 3 h 的细胞凋亡率达到最大值 87.99%, 可能是由于 *Cu-Zn SOD*、*MT*、*CAT*、*HSP60* 和 *HSP90* 的基因表达水平显著下降, 促进了细胞凋亡。抗氧化酶基因、*MT* 和热休克蛋白 *HSP70* 和 *HSP90* 基因表达水平在胁迫后期显著提高, 降低氧化损伤, 因此与胁迫 3 h 相比, 12~48 h 的细胞凋亡率明显下降。

本研究显示, 在 10.5 mg/L Cd 胁迫下, 对虾通过激活体内的抗氧化酶系统进行抗氧化防御, 随着胁迫时间延长, 抗氧化酶系统无法清除过量 ROS, 最终促进细胞凋亡。*Cu-Zn SOD* 和 *HSP60* 对镉胁迫比较敏感, *GPx*、*MT*、*HSP70* 和 *HSP90* 可能在胁迫后期发挥保护作用。Cd 可能通过抑制 *MT* 基因表达水平进而诱导细胞凋亡。

### 参考文献:

- [1] Bureau of Fishery Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook 2019[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.]
- [2] Zhang M Q, Lu Y L, Wu G H, et al. Lead enrichment and release characteristics in seawater and *Litopenaeus vannamei* feed[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 374-386. [张美琴, 卢元玲, 吴光红, 等. 海水和饲料中 Pb 在凡纳滨对虾体内的富集与释放特性[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 374-386.]
- [3] Mehinto A C, Prucha M S, Colli-Dula R C, et al. Gene networks and toxicity pathways induced by acute cadmium exposure in adult largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 152: 186-194.
- [4] Wang J, Ren T J, Wang F Q. Toxic action and mechanism of heavy metal cadmium in aquatic[J]. China Feed, 2015(17): 25-27. [王晶, 任同军, 王福强. 重金属镉对水生动物的毒性作用及其机制[J]. 中国饲料, 2015(17): 25-27.]
- [5] Wang Z H, Lin Q, Wang X N. Cadmium content in shellfish

- from the coast of the South China Sea: The risk to human health[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(6): 1406-1412. [王增煥, 林钦, 王许诺. 南海北部沿岸贝类体内镉含量及健康风险评价[J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1406-1412.]
- [6] Wu T L, Li G L, Shi S L, et al. Effects of cadmium stress on NOS and SOD activities in *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2008, 27(6): 62-65. [吴天利, 李广丽, 师尚丽, 等. 镉胁迫对凡纳滨对虾血清中一氧化氮合成酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 热带海洋学报, 2008, 27(6): 62-65.]
- [7] Wu J P, Chen H C, Huang D J. Histopathological alterations in gills of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) after acute exposure to cadmium and zinc[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2008, 82(1): 90-95.
- [8] Chiodi Boudet L N, Polizzi P, Romero M B, et al. Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium in white shrimp, *Palaemonetes argentinus*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 113: 231-240.
- [9] Ardiansyah S, Irawan B, Soegianto A. Effect of cadmium and zinc in different salinity levels on survival and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone)[J]. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 2012, 45(4): 291-302.
- [10] Li Z H, Zhang P, Yan B L, et al. Advances in studies on the toxic effects of heavy metals on crustaceans[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2017, 44(5): 255-258. [李志辉, 张培, 阎斌伦, 等. 重金属对甲壳类毒理效应的研究进展[J]. 水产科技情报, 2017, 44(5): 255-258.]
- [11] Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G, et al. Review: Immunity mechanisms in crustaceans[J]. Innate Immunity, 2009, 15(3): 179-188.
- [12] Guo H, Xian J A, Bi J Z, et al. Research progress in immune factors of shrimp[J]. Feed Industry, 2013, 34(22): 42-46. [郭慧, 洗健安, 毕建柱, 等. 虾类免疫因子的研究进展[J]. 饲料工业, 2013, 34(22): 42-46.]
- [13] Cuypers A, Plusquin M, Remans T, et al. Cadmium stress: An oxidative challenge[J]. BioMetals, 2010, 23(5): 927-940.
- [14] Guo H, Li K X, Wang W, et al. Effects of copper on hemocyte apoptosis, ROS production, and gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Biological Trace Element Research, 2017, 179(2): 318-326.
- [15] Guo H, Miao Y T, Xian J A, et al. Expression profile of antioxidant enzymes in hemocytes from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* exposed to an elevated level of copper[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2015, 95(4): 447-451.
- [16] Wang L, Zhang X X, Lu Y P, et al. Effects of heavy metals on phagocytic activity of *Litopenaeus vannamei* haemocyte[J]. Hebei Fisheries, 2019(2): 1-4, 20. [汪蕾, 张秀霞, 鲁耀鹏, 等. 重金属对凡纳滨对虾血细胞吞噬活力的影响[J]. 河北渔业, 2019(2): 1-4, 20.]
- [17] Guo H, Zhang X X, Zheng P H, et al. Effects of heavy metals on cell viability and esterase activity of hemocytes from the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1123-1130. [郭慧, 张秀霞, 郑佩华, 等. 重金属对罗氏沼虾血细胞活性和酯酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1123-1130.]
- [18] Xian J A, Zhang X X, Guo H, et al. Measurement of total haemocyte count in shrimp by flow cytometry[J]. Journal of Hydroecology, 2015, 36(3): 89-94. [洗健安, 张秀霞, 郭慧, 等. 应用流式细胞术检测虾类血细胞总数方法的建立[J]. 水生态学杂志, 2015, 36(3): 89-94.]
- [19] Xian J A, Qian K, Guo H, et al. Classification, structure, and immune functions of abalone (*Haliotis diversicolor*) hemocytes using a flow cytometric analysis[J]. Marine Sciences, 2015, 39(12): 8-14. [洗健安, 钱坤, 郭慧, 等. 杂色鲍血细胞分类、结构和免疫功能的流式细胞术分析[J]. 海洋科学, 2015, 39(12): 8-14.]
- [20] Guo H, Xian J A, Wang A L. Effects of nitrite stress on haemocyte toxicity and p53 gene expression of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Hydroecology, 2015, 36(2): 61-67. [郭慧, 洗健安, 王安利. 亚硝酸盐对凡纳滨对虾血细胞毒性及 p53 基因表达的影响[J]. 水生态学杂志, 2015, 36(2): 61-67.]
- [21] Guo H, Zhu X W, Ou R H, et al. Effects of  $Cu^{2+}$  stress on hemocytes toxicity and caspase-3,  $\alpha$ -2M gene expression in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2017, 36(3): 293-299. [郭慧, 朱晓闻, 欧荣华, 等.  $Cu^{2+}$  胁迫对罗氏沼虾血细胞毒性及 caspase-3、 $\alpha$ -2M 基因表达的影响[J]. 四川动物, 2017, 36(3): 293-299.]
- [22] Chen D H, Chen Q Q, Tian H Y, et al. Chinese herbal extract berberine on oxidative stress and apoptosis in the hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(6): 1281-1288. [陈丹红, 陈青青, 田红艳, 等. 中草药提取物黄连素对草鱼肝细胞氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. 中国水产科学, 2018, 25(6): 1281-1288.]
- [23] Zheng L F, Chen P J, Xiao W H. The regulation of reactive oxygen species on insulin resistance in skeletal muscle[J]. Chinese Journal of Diabetes, 2020, 28(2): 153-157. [郑莉芳, 陈佩杰, 肖卫华. 活性氧对骨骼肌胰岛素抵抗的调控及其

- 机制[J]. 中国糖尿病杂志, 2020, 28(2): 153-157.]
- [24] Russell E G, Cotter T G. New insight into the role of reactive oxygen species (ROS) in cellular signal-transduction processes[J]. International Review of Cell and Molecular Biology, 2015, 319: 221-254.
- [25] Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress[J]. The Biochemical Journal, 1999, 342(3): 481-496.
- [26] Xue B, Zhang P, Li Z H, et al. Toxicity effects of cadmium on the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(6): 207-213. [薛蓓, 张培, 李志辉, 等. 镉胁迫对脊尾白虾的毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(6): 207-213.]
- [27] Tan S H, Yuan Z D, Liu Y F, et al. Effects of Cd<sup>2+</sup> on antioxidant system in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(9): 2595-2601. [谭树华, 袁志栋, 刘雨芳, 等. 镉对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化系统的影响[J]. 应用生态学报, 2012, 23(9): 2595-2601.]
- [28] Zhou Y Y, Dahms H U, Dong F, et al. Immune-associated parameters and antioxidative responses to cadmium in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 129: 235-241.
- [29] Liu D Q, Ge F, Chen C Y, et al. Effects of heavy metals Cu and Cd on gene expression in liver tissue of *Carassius auratus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1243-1249. [刘迪秋, 葛峰, 陈朝银, 等. 重金属铜、镉对鲫肝脏基因表达的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1243-1249.]
- [30] Li Z. Separation and function analysis of Cu/Zn SOD gene in *Sedum alfredii*[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2014: 35-36. [李真. 东南景天铜/锌超氧化物歧化酶基因的分离与功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014: 35-36.]
- [31] Xian J A, Zhang X X, Guo H, et al. Effects of nitrite on haemocyte and antioxidant enzyme activity in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Biosafety, 2016, 25(4): 300-307. [冼健安, 张秀霞, 郭慧, 等. 亚硝酸盐胁迫对罗氏沼虾血细胞及其抗氧化酶活力的影响[J]. 生物安全学报, 2016, 25(4): 300-307.]
- [32] Peng J X, Fang Z F, Wei P Y, et al. Sequence and expression analysis of metallothionein from *Litopenaeus vannamei*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(4): 678-683. [彭金霞, 房振峰, 韦婉媛, 等. 凡纳滨对虾 MT 基因序列及其在卵巢发育和低温胁迫中的表达分析[J]. 水生生物学报, 2013, 37(4): 678-683.]
- [33] He Y J, Ma W L, Li Y J, et al. Expression of metallothionein of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) in Escherichia coli enhances tolerance and accumulation of zinc, copper and cadmium[J]. Ecotoxicology, 2014, 23(1): 56-64.
- [34] Sato M, Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1993, 14(3): 325-337.
- [35] Li R J, Zhou Y Y, Wang L, et al. Low-molecular-weight-chitosan ameliorates cadmium-induced toxicity in the freshwater crab, *Sinopotamon yangtzeense*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(5): 1164-1170.
- [36] Yu X Z, Lin Y J, Zhang Q. Metallothioneins enhance chromium detoxification through scavenging ROS and stimulating metal chelation in *Oryza sativa*[J]. Chemosphere, 2019, 220: 300-313.
- [37] Zhou Y Y, Jing W X, Dahms H U, et al. Oxidative damage, ultrastructural alterations and gene expressions of hemocytes in the freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to cadmium[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 138: 130-138.
- [38] Ren X Y, Wang X, Liu P, et al. Bioaccumulation and physiological responses in juvenile *Marsupenaeus japonicus* exposed to cadmium[J]. Aquatic Toxicology, 2019, 214: 105255.
- [39] Shimoda R, Achanzar W E, Qu W, et al. Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis[J]. Toxicological Sciences, 2003, 73(2): 294-300.
- [40] Felix-Portillo M, Martínez-Quintana J A, Arenas-Padilla M, et al. Hypoxia drives apoptosis independently of p53 and metallothionein transcript levels in hemocytes of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Chemosphere, 2016, 161: 454-462.
- [41] Shi J X. Characterization and function analysis of three HSPs gene under different acute stresses in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016. [史进选. 斑节对虾三种热休克蛋白基因在不同环境胁迫下的表达及功能分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.]
- [42] 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.
- [43] Sung Y Y, Rahman N A, Shazili N A M, et al. Non-lethal heat shock induces HSP70 synthesis and promotes tolerance against heat, ammonia and metals in post-larvae of the white leg shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)[J]. Aquaculture, 2018, 483: 21-26.
- [44] Guo H, Tan C T, You L Y, et al. Effects of nitrite stress on gene expression of antioxidant enzymes, heat shock protein and cathepsin B in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2017,

- 37(3): 117-122. [郭慧, 谭翠婷, 游林玉, 等. 亚硝酸盐胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化酶、热休克蛋白和组织蛋白酶 B 基因表达量的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(3): 117-122.]
- [45] Junprung W, Supungul P, Tassanakajon A. HSP70 and HSP90 are involved in shrimp *Penaeus vannamei* tolerance to AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* after non-lethal heat shock[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 60: 237-246.
- [46] 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.
- [47] Sun J X, Wang S C, Cao Y R, et al. Cadmium exposure induces apoptosis, inflammation and immunosuppression through CYPs activation and antioxidant dysfunction in common carp neutrophils[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 99: 284-290.
- [48] Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, et al. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: Role played by caspases and intracellular calcium ions[J]. Toxicology Letters, 2003, 139(2-3): 125-133.
- [49] Zhang Y J, Jiang N, Liu Q, et al. Role of mitochondrial damage in cadmium-induced cell apoptosis and DNA damage of hepatocytes[J]. Journal of Hygiene Research, 2020, 49(2): 290-297. [张玉静, 蒋妮, 柳强, 等. 线粒体损伤在镉诱导肝细胞凋亡和 DNA 损伤中的作用[J]. 卫生研究, 2020, 49(2): 290-297.]

## Effects of Cd on reactive oxygen species production, apoptosis rate, and expression of stress genes in hemocytes of *Litopenaeus vannamei*

LI Ling, WU Fangzhou, LIANG Jinrong, CHEN Lifen, GUO Hui, SHEN Yuchun

College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524000, China

**Abstract:** In this study, we aimed to explore the effects of Cd on the reactive oxygen species (ROS) production, apoptosis rate, and gene expression of stress responses in the hemocytes of *Litopenaeus vannamei*. *L. vannamei*, with mean weights of  $(10.22 \pm 0.47)$  g, were cultured at a salinity of 24, pH of 7.9–8.0, and temperature of  $(26 \pm 2)$  °C for 2 weeks with aeration. Shrimp of similar size and body color were then transferred into culture buckets for stress testing. Based on the results of a preliminary investigation and previous studies, two concentrations of Cd, 0 and  $10.5 \text{ mg/L}$ , were tested. Twenty shrimps were placed in each bucket and each treatment was conducted in three replicates. At 0 h, 3 h, 12 h, 24 h, and 48 h of exposure, three shrimp in each bucket were sampled. The ROS production and cell apoptosis rate in the hemocytes of the shrimp were evaluated using flow cytometry, and the expression profiles of metallothionein (*MT*); antioxidant genes including copper zinc superoxide dismutase (*Cu-Zn SOD*), glutathione peroxidase (*GPx*), and catalase (*CAT*); caspase-3; and heat shock protein genes (*HSPs*) including *HSP60*, *HSP70*, and *HSP90* were detected by quantitative reverse-transcription PCR. Compared to the control group, ROS production significantly increased at 3–48 h ( $P < 0.01$ ) and peaked at 24 h. The apoptosis rate peaked to 87.99% at 3 h ( $P < 0.01$ ) and significantly increased at 12–48 h ( $P < 0.05$ ). The expression levels of *Cu-Zn SOD* and *HSP60* significantly increased at 3–48 h and 12–48 h, respectively ( $P < 0.05$ ). The expression of *GPx* was significantly upregulated at 12 h and 48 h ( $P < 0.05$ ). The expression profiles of *CAT*, *MT*, *HSP60*, and *HSP90* significantly decreased at 3 h ( $P < 0.05$ ), while *CAT* increased significantly at 12 h ( $P < 0.05$ ), and *MT*, *HSP60* and *HSP90* increased at 24–48 h ( $P < 0.05$ ). The expression of *HSP70* showed no significant differences at 3–24 h ( $P > 0.05$ ), whereas it increased significantly at 48 h ( $P < 0.05$ ). Caspase-3 expression increased significantly at 12–24 h ( $P < 0.05$ ). This research found that Cd promoted excessive ROS production, significantly affected the expression of stress response genes, and finally triggered apoptosis.

**Key words:** Cd; *Litopenaeus vannamei*; reactive oxygen species; apoptosis rate; gene expression

**Corresponding author:** SHEN Yuchun; E-mail: shenyuchun@163.com