

DOI: 10.12264/JFSC2023-0291

## 盐度胁迫后青海湖裸鲤 *Grp78* 及其相关基因的应答表达

赵静<sup>1,2</sup>, 李长忠<sup>1,2</sup>, 王蓉<sup>1,2</sup>, 马淑兄<sup>1,2</sup>, 贾春艳<sup>1,2</sup>, 王璐<sup>1,2</sup>, 勾化宇<sup>1</sup>, 李兰英<sup>1</sup>, 陈艳霞<sup>1,2</sup>, 柳芳<sup>1,2</sup>, 祁洪芳<sup>3</sup>, 金文杰<sup>1,2</sup>

1. 青海大学生态环境工程学院, 青海 西宁 810016;
2. 农业农村部高原冷水鱼养殖与生态环境保护重点实验室(部省共建), 青海 西宁 810016;
3. 青海湖裸鲤救护中心, 青海省青海湖裸鲤繁育与保护重点实验室, 青海 西宁 810016

**摘要:** 为深入研究青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)面临盐度胁迫时的分子应答机制, 本研究克隆了青海湖裸鲤葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78 kD, *Grp78*)基因, 并采用 qPCR 法检测 5‰, 10‰和 15‰盐度胁迫后 *Grp78* 及其相关基因的应答模式。结果显示, 青海湖裸鲤 *Grp78* 的开放阅读框长度为 1962 bp, 编码 653 个氨基酸, 并包含 HSP70 超家族保守结构域。*Grp78* 在青海湖裸鲤 9 个组织中均有表达, 其中在肠道、肝脏和心脏中的表达显著高于其他组织( $n=3, P<0.05$ )。在鳃组织中, 随着盐度增加和胁迫时间的延长, *Grp78*、*Hyou1*、*Prdx1*、*Nqo1* 和 *UBC* 基因的表达先被抑制, 随后逐渐上调, 而 *DNAJC2*、*Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD* 和 *Hmox1* 基因的表达则先上调后逐渐下调, 随后又上调; 在肾脏和肝脏中, *DNAJC2*、*Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*Hmox1* 和 *Nqo1* 基因的表达也呈现类似的先上调后下调再上调的模式。以上结果表明, *Grp78* 及其相关基因对盐度胁迫具有复杂的响应, 可能参与了青海湖裸鲤适应和应对盐度胁迫的过程。此外, *Grp78* 及其相关基因 *Hyou1*、*DNAJC2*、*Hmox1*、*Nqo1*、*UBC*、*Prdx1*、*Cu/Zn-SOD* 和 *Mn-SOD* 参与了机体抗氧化应激调节, 在减少盐度损伤方面发挥重要作用。

**关键词:** 青海湖裸鲤; 盐度胁迫; *Grp78*; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)01-0070-12

青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)俗称“湟鱼”, 隶属鲤科(Cyprinidae), 裂腹鱼亚科(Schizothoracinae), 裸鲤属(*Gymnocypris*), 仅分布于青海湖及其湖周支流, 为青海湖水域特有的经济鱼类, 对青海湖水生生态系统的动态平衡发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。在 1958—2000 年间, 因过度捕捞、河道水量锐减、产卵场破坏等因素的影响, 导致青海湖裸鲤的资源量骤减, 近乎枯竭<sup>[3]</sup>。因此, 2003 年青海省人民政府全面实行封湖育鱼政策, 青海湖裸鲤救护中心协同开展人工增殖放流工作。截至 2022 年 12 月, 青海湖裸鲤的资源量已经恢复至 11.41 万 t, 约为保护初期的 44 倍。然而, 人工增殖放流对青海湖裸鲤资源恢复的贡献率仅

为 23.53%<sup>[4]</sup>, 原因可能是幼鱼进入支流和入湖后面临低温、低氧、盐度、碱度、贫营养等方面的胁迫, 导致鱼的食欲消退、摄食减少、生长停滞、行为改变、繁殖力下降以及疾病感染风险升高。截至目前, 对人工养殖的 1 龄青海湖裸鲤经放流进入青海湖支流后所面临的低温、低氧、盐度、贫营养等对其生存的威胁缺乏有效评估, 并对幼鱼应激状况和存活率缺乏全面系统的研究, 尤其是青海湖裸鲤幼鱼进入支流后对胁迫反应的响应机制尚不明确。

环境因子变化可导致鱼体产生不同程度的应激反应, 并引发机体的一系列生理变化, 进而影响机体内环境的稳定<sup>[5-6]</sup>。盐度作为一种与渗透压

收稿日期: 2023-11-08; 修订日期: 2023-12-01.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460700); 青海省科协中青年科技人才托举工程项目(2022QHSKXRCTJ34).

作者简介: 赵静(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物生态学. E-mail: zhaojing112525@126.com

通信作者: 金文杰, 副教授, 研究方向为高原动物资源的保护与利用. E-mail: kingsunny@126.com

密切相关的环境因子,可促使幼鱼的血浆皮质醇、血糖和乳酸浓度增加,并且影响鱼类的存活、生长、应激、免疫防御等<sup>[7-9]</sup>。在急性盐度胁迫下鱼类的生长速度变缓,面对高盐度环境时,鱼体内有大量盐分积累,高盐度环境会对皮肤、鳃等器官造成损伤,并扰乱体内外的渗透平衡,进而影响生理机能,甚至可能造成死亡<sup>[10-11]</sup>。此外,鱼类的生理生化 and 形态学指标会发生改变,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性改变<sup>[12]</sup>,以及细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450)和热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)水平等改变<sup>[13]</sup>。前期研究显示,在长期适应青海湖 14.13‰盐度的过程中<sup>[14]</sup>,青海湖裸鲤已进化出一系列的耐盐调节机制,如调节  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -2Cl<sup>-</sup>协同转运体和  $\text{Na}^+$ / $\text{K}^+$ -ATP 酶来维持 Cl<sup>-</sup>和  $\text{Na}^+$ 离子稳态<sup>[11]</sup>;增加超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶(alkaline Phosphatase, AKP)等酶活性进行应激调节<sup>[15]</sup>;激活一系列参与离子调节、渗透调节和抗氧化功能基因<sup>[16]</sup>,以及通过鳃组织和肾脏的形态组织学变化来实现离子和渗透压的调节<sup>[17]</sup>。然而,盐度调节机制虽已被观察到,但具体的分子机理和调节路径仍需进一步的研究探索。因此,深入研究盐度对鱼类的影响,并全面阐明鱼类在适应盐度变化过程中的生理调节机制,变得非常迫切且重要。

葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78kD, Grp78)又称免疫球蛋白重链结合蛋白(the immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip)和热休克蛋白家族 A (Hsp70)成员 5 [heat shock protein family A (Hsp70) member 5, HSPA5],包含 654 个氨基酸,由内质网信号肽、N 端核苷酸结合域、C 端底物结合域和一个 KDEL 序列组成<sup>[18-19]</sup>。当细胞遭受热性压力、氧化应激、低营养或药物处理等应激情况时,Grp78 可被释放出来,通过与 IRE1、PERK 和 ATF6 等信号蛋白相互作用,启动一系列信号通路,以解除内质网的应激状态,并促进细胞功能和稳态的恢复<sup>[20]</sup>。此外,Grp78 还可以与其他热休克蛋白、细胞色素 C 等分子结合,以促进蛋白质的正确折叠和协助修复受损的蛋白

质。有研究显示,Grp78 与 DNAJC2、UBC、Hmox1、Nqo1、Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 等蛋白质之间存在多种相互作用和调节关系,并在细胞应激和抗氧化应答中发挥重要作用,如 DNAJC2 作为 Grp78 的辅助蛋白共同参与蛋白质的折叠过程,促进异常折叠蛋白的重新折叠或清除<sup>[21]</sup>。Grp78 与泛素结合酶 E2 相互作用可调控蛋白质的稳定性和降解速度,对于细胞内废弃物的清除和调节具有重要作用<sup>[22]</sup>;Grp78 可以通过调节 Hmox1 的表达来提高细胞应对氧化应激的能力<sup>[23]</sup>;Nqo1 通过与 Grp78 的相互作用,来调节 Nqo1 的稳定性和活性,进而影响细胞对于氧化应激的响应和抗氧化能力<sup>[24]</sup>;Grp78 可以与 Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 等超氧化物歧化酶发生相互作用,清除超氧阴离子和调控细胞内氧化还原状态的平衡,从而维持细胞功能和稳定性<sup>[25]</sup>。因此,了解 Grp78 的功能和调节机制对于优化青海湖裸鲤人工增殖放流策略至关重要。为了更好地理解青海湖裸鲤对胁迫反应的分子机理,并发现具有重要功能的基因,本研究成功克隆了青海湖裸鲤体内的内质网伴侣分子 *Grp78*,并进行了与盐度梯度相关的基因响应分析,以揭示 *Grp78* 在青海湖裸鲤应对盐度胁迫时的应答机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

从青海湖裸鲤救护中心恒温养殖车间获取青海湖裸鲤 1 龄幼鱼 200 尾,平均体长(12.35±1.65) cm,体重为(17.18±1.98) g,饲养在青海湖裸鲤救护中心鱼缸(80 cm×30 cm×60 cm),适应淡水环境 7 d,水体溶解氧为(7.48±0.8) mg/L,温度为(16.6±1.2) °C,pH 为 8.0±0.2。

### 1.2 盐度胁迫

挑取健康的无伤病和规格相近的青海湖裸鲤个体 200 尾,设置 5‰、10‰和 15‰共 3 个盐度胁迫浓度,每组 3 个平行,共有 1 个对照组和 9 个处理组,每组 20 尾,分别饲养于盛有 120 L 曝气除氯的自来水的鱼缸(80 cm×30 cm×60 cm)中,并严格控制温度和溶解氧水平。待胁迫 24、48、72 和 96 h 后分别取 3 尾鱼置于含有 1.5 L 0.1%

(100 mg/L)丁香酚的 2 L 容器中麻醉,再置于冰上迅速剖取鳃、肾脏和肝脏,经液氮冷冻后于-80 °C 冰箱中保存备用。

### 1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

采用总 RNA 提取试剂盒(天根,北京)提取空白组青海湖裸鲤的肠道、鳃、肝脏、肌肉、肾脏、心脏、脑、皮肤和脾脏,以及盐度胁迫后青海湖裸鲤鳃、肾脏和肝脏组织的总 RNA,并用 Nano Drop 2000 测定 RNA 浓度和 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和质量。用反转录试剂盒 Prime Script RT reagent Kit (TaKaRa, 大连)进行反转录获得 cDNA 模板,并于-20 °C 保存备用。

### 1.4 Grp78 克隆

参考 GenBank 中草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) Grp78 基因全长序列(登录号: FJ436356.1),用

Primer Premier 6.0 设计克隆引物 T-Grp78-F 和 T-Grp78-R (表 1),以青海湖裸鲤肠道、鳃、肝脏、肌肉、肾脏、心脏、脑、皮肤和脾脏全组织混合样品 cDNA 为模板,PCR 扩增 Grp78。PCR 反应体系(40 μL): 2×Phanta Max Master Mix (P515-AA) 20 μL, ddH<sub>2</sub>O 17 μL, cDNA 模板 1 μL, 上游引物 T-Grp78-F 1 μL, 下游引物 T-Grp78-R 1 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物经浓度 1%琼脂糖凝胶电泳检后纯化回收,采用 5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行连接反应,并转化 DH5α 感受态细胞,挑取单菌落 LB 液体培养后进行 PCR 鉴定和送至北京擎科生物科技有限公司测序。

表 1 本研究所用引物参数  
Tab. 1 Primer parameters for this study

引物名称 primer name	上游引物(5'-3') forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') reverse primer (5'-3')
T-Grp78	AGAGAGACAGACACGCCCTTGA	GCTCCAAGTTCCTCAACACCT
Grp78	TCTCCGCTATGGTCTGACTA	CGTGGGCATCATTGAAATAAG
DNAJC2	CTGTCCGATCCCGTCAAGC	CCACGAGTCAAAGTTGTACCA
UBC	TGGACCCTTTGTTTTGCGCCGTT	GGACCCTTTGTTTTGCGCCGTT
Cu/Zn-SOD	CCATGGTGATCCATGAGAAAGA	TCACTGAGCGATGCCTATAAC
Mn-SOD	TTTAACGGTGGTGGCCATATTA	CCGACATCTTCTCTTCATCTTC
Hyou1	GCTGCACATATAGCAGGTCTAA	GCAGTAGAGTTGATGTCCTTCC
Hmox1	AGAGCAGCAGAAACAGGAAG	CCCTGTGATGCTCAGGATTT
Prdx1	TCTGTCATCTTGCCCTGGATAAA	TCTTCCTTCAGCACACCATAG
Nqo1	GAAGACCGCACTGATTGTTTATG	TACAGATCCGACACTAGGACTT
β-actin	ATGAAGATCCTGACCGAGAGA	CTCGAAGTCAAGAGCCACATAG

### 1.5 Grp78 的生物信息学分析

采用 NCBI ORF finder 查找开放阅读框(open reading frame, ORF), ExPASy-ProtParam 分析氨基酸序列的理化性质, ExPASy-ProtScale 分析亲疏水性, SignalP 5.0 Server 预测信号肽, TMHMM Server V. 2.0 预测跨膜结构域, NCBI CD-Search 预测蛋白结构域, SOPMA 预测二级结构, SWISS-MODEL 预测三级结构, MEGA11 软件基于近邻相接法(neighbor-joining method, NJ)自展(Bootstrap) 2000 次构建系统进化树。

### 1.6 Grp78 及其相关基因的表达分析

基于本研究克隆所得青海湖裸鲤 Grp78 全长序列及 GenBank 中鲤科鱼类序列保守区,用 Oligo 7 设计 Grp78 (OR727303), DNAJC2 (OP185143.1), UBC (NM\_001077804.2), Cu/Zn-SOD (KX826080.1), Mn-SOD (KY922773.1), Hyou1 (XM\_026273782.1), Hmox1 (XM\_043235836.1), Prdx1 (MK809319.1) 和 Nqo1 (XM\_016453144.1)基因的 qPCR 引物(表 1)。以 β-actin 为内参基因,使用 Light Cycler 96 荧光定量 PCR 检测 Grp78 在各组织的特异性表达分布,以及盐度胁迫后 Grp78, DNAJC2, UBC, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Hyou1, Hmox1, Prdx1 和

*Nqo1* mRNA 在鳃、肾脏和肝脏中的相对表达量。20  $\mu$ L qPCR 扩增体系: TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus) 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 10 min, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 10 min, 40 个循环。每个样本设置 3 个平行。

1.7 数据处理

采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>方法分析 *Grp78*, *DNAJC2*, *Hyou1*, *Hmox1*, *UBC*, *Cu/Zn-SOD*, *Nqo1*, *Mn-SOD* 和 *Prdx1* mRNA 的相对表达, 实验数据均用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm$ SD)表示, 使用 SPSS 25.0 进行单因素方差分析, 并用 TB Tools 和 GraphPad Prism 9 分别做热图和柱状图。

2 结果与分析

2.1 青海湖裸鲤 *Grp78* 的克隆及序列分析

本研究克隆的 *Grp78* 基因序列已上传至 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), 索引号 OR727303。如图 1 所示, 获得青海湖裸鲤 *Grp78* 全长 cDNA 序列 2672 bp, 其含 98 bp 的 5' 端非编码区, 612 bp 的 3'端非编码区和 1962 bp 的开放阅读框, 可编码 653 个氨基酸, 蛋白分子量为 72.23 kDa, 等电点 5.01, 不稳定系数为 32.54, 是一种亲水性蛋白, 脂肪族氨基酸指数为 86.13, 无跨膜结构域。Grp78 包含 1 个 HSP70 超家族保守结构域, 其二级结构以  $\alpha$  螺旋为主, 并存在部分无规则卷曲(图 2)。



图 1 青海湖裸鲤 *Grp78* cDNA 和编码氨基酸的序列特征

灰色阴影分别表示起始密码子和终止密码子, 横线表示 HSP70 超家族保守结构域, 方框表示内质网滞留信号。

Fig. 1 Sequence characteristics of the *Grp78* cDNA and deduced amino acid in *Gymnocypris przewalskii*

The gray shadows indicate the start codon and stop codon respectively, the horizontal lines represent the HSP70 superfamily conserved domain, and the boxes represent the endoplasmic reticulum retention signal.

2.2 Grp78 氨基酸进化同源性分析

如图 3 所示, 经 NCBI Blast 同源性分析显示,

青海湖裸鲤 *Grp78* 与鲫(*Carassius auratus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)

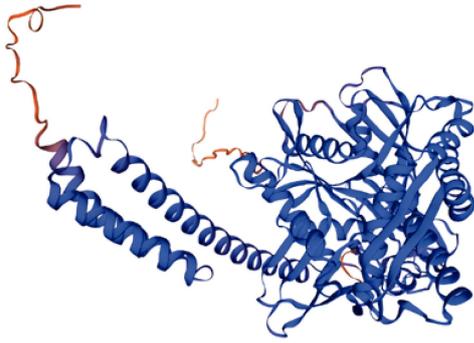


图 2 Grp78 蛋白三级结构  
Fig. 2 Tertiary structure of Grp78

和大西洋鲑(*Salmo salar*)的同源性分别为 97.24%, 97.09%, 95.87%和 93.30%, 且青海湖裸鲤与鲫和鲤聚为一支, 亲缘关系较近。其次是爬行类和哺乳类, 如与中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)和小盾响

尾蛇(*Crotalus scutulatus*)的同源性分别为 93.09% 和 91.44%; 与人(*Homo sapiens*)、马鹿(*Cervus elaphus*)、小鼠(*Mus musculus*)和苏门答腊猩猩(*Pongo abelii*)的同源性分别为 92.15%, 91.43%, 92.79%和 92.46%。与六放珊瑚纲、双壳纲、腹足纲和甲壳纲进化关系较远, 与覆瓦刺冠软珊瑚(*Capnella imbricata*)、阿玛迪芋螺(*Conus amadis*)、北极磷虾(*Thysanoessa inermis*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的同源性分别为 85.35%, 84.70%, 84.44%, 83.31%和 83.15%。基于进化树和多重序列比对分析, 显示青海湖裸鲤与硬骨鱼的 Grp78 同源性达 93%以上, 且具有 1 个高度保守 HSP70 超家族保守结构域(图 4)。

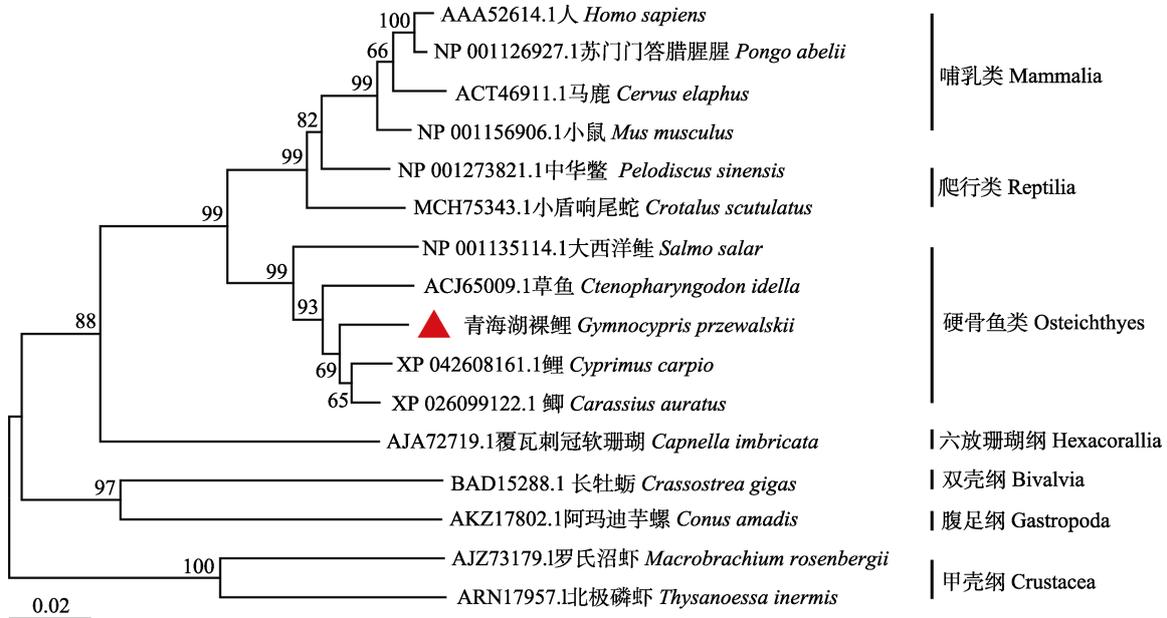


图 3 基于 NJ 法构建的 Grp78 氨基酸序列系统进化树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of Grp78 amino acid sequence based on neighbor-joining method

### 2.3 Grp78 组织特异性分析

如图 5 所示, Grp78 在青海湖裸鲤鳃、肌肉、皮肤、肠道、肝脏、肾脏、心脏、脾脏和脑中均有表达。Grp78 在各组织中的表达水平由高到低依次为: 肠道、肝脏>心脏>鳃、肾脏、脾脏、脑>皮肤>肌肉, 且 Grp78 在肠道和肝脏中的表达量最高, 但二者间无显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.4 盐度胁迫后 Grp78 及其相关基因的表达

如图 6 所示, 在青海湖裸鲤鳃、肾脏和肝脏

中 Grp78, DNAJC2, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Hyoul, Hmox1, Nqo1, Prdx1 和 UBC 均有表达, 并在不同组织中表现出特异性, 且对于盐度胁迫具有一定的浓度和时间依赖性。

在不同组织中, Grp78, Hmox1 和 Nqo1 在肾脏、肝脏中相对表达量较高, DNAJC2, Hyoul 和 Cu/Zn-SOD 在肾脏中相对表达量较高; Mn-SOD 在鳃和肾脏中的表达显著高于肝脏中的表达; UBC 在肝脏中相对表达量最高; Hyoul, Hmox1 和

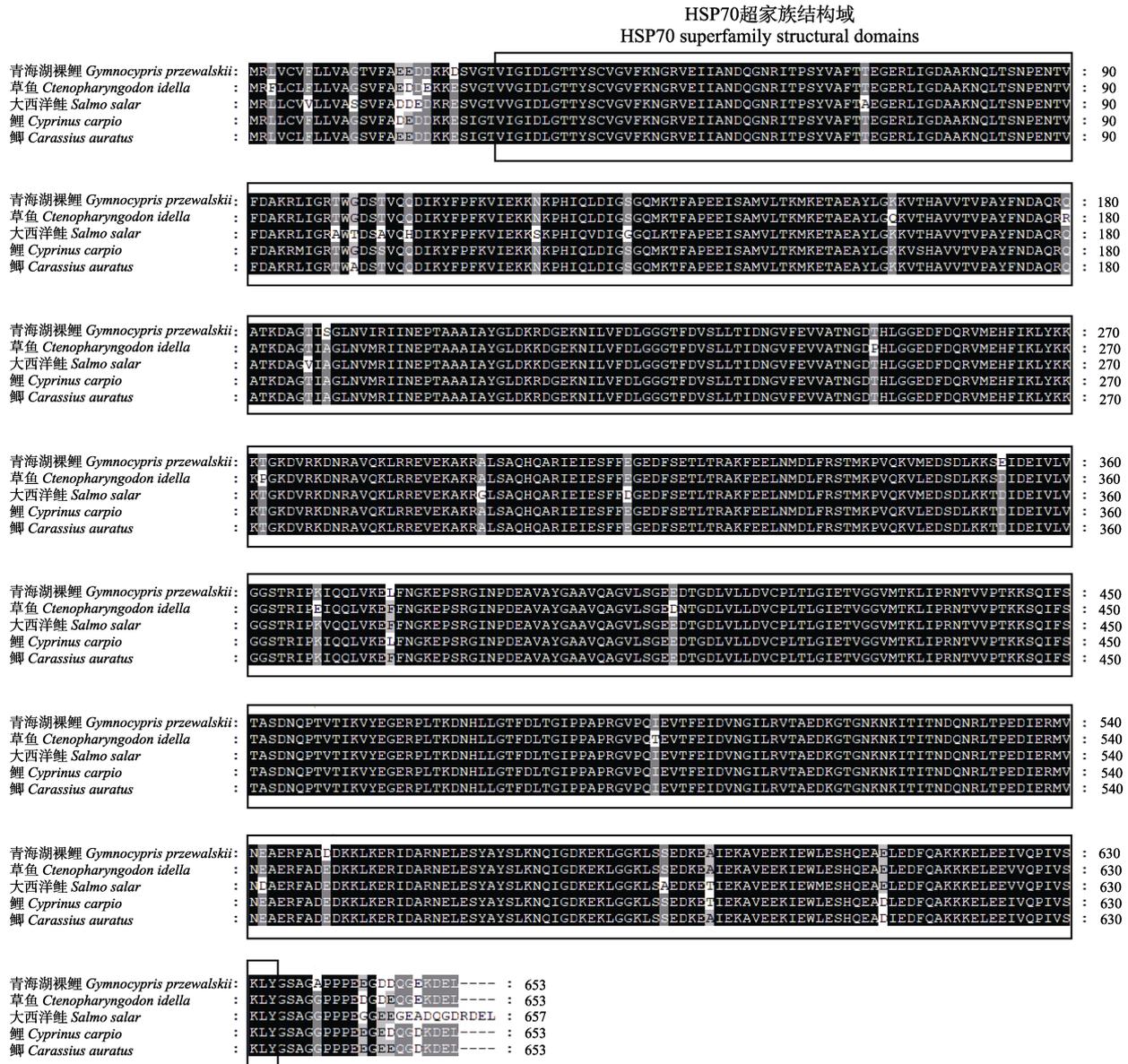


图 4 硬骨鱼类 Grp78 氨基酸序列多重比较分析  
Fig. 4 Multiple comparative analysis of the amino acid sequence of Grp78 in teleost

*Prdx1* 在肾脏、肝脏中的相对表达量均在 15‰盐度时达到最高值(图 6)。由图 7 可见, *Grp78* 和 *DNAJC2* 在肾脏、肝脏中显著上调( $P < 0.01$ ); 与对照组相比, 在 5‰盐度处理 24 h 后, *Hmox1* 在肝脏中的相对表达量达到峰值, 为对照组的 360 倍; *Mn-SOD* 在肾脏中显著上调( $P < 0.01$ ), 且相对表达量在 15‰盐度处理 48 h 时达到对照组的 517 倍。总体来看, 随着盐度的增加和胁迫时间推移, 鳃组织中 *Grp78*, *Hyou1*, *Prdx1*, *Nqo1* 和 *UBC* 以先下调后上调的方式参与应激反应, *DNAJC2*,

*Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD* 和 *Hmox1* 以上调后下调后又上调的方式参与应激反应; 肾脏中 *DNAJC2*, *Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD*, *Hyou1*, *Hmox1* 和 *Nqo1* 存在上调后下调又上调的方式参与应激反应, *UBC* 以上调后又恢复至正常水平后又上调的方式参与应激反应; 肝脏中 *DNAJC2*, *Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD*, *Hmox1*, *Nqo1* 和 *UBC* 以上调后下调又上调的方式参与应激反应, *Prdx1* 以下调的方式参与应激反应。值得注意的是, 在肝脏中 *Cu/Zn-SOD* 和 *Mn-SOD* 存在即时应激(图 6)。

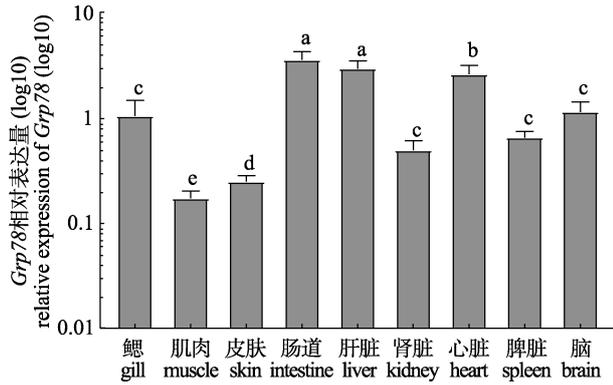


图 5 *Grp78* 在青海湖裸鲤不同组织中的表达  
不同字母表示组间存在差异显著 ( $P < 0.05$ ),  
相同字母表示组间差异不显著 ( $P > 0.05$ ).

Fig. 5 Expression of *Grp78* in different tissues  
of *Gymnocypris przewalskii*

Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ), and the same letters indicate no significant differences between groups ( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 青海湖裸鲤 *Grp78* mRNA 组织分布特点

*Grp78* 作为主要的内质网应激蛋白, 主要参与蛋白质的折叠组装以及错误折叠蛋白结构的校正。有研究显示, 增强 *Grp78* 的活性可以减轻氧

化应激诱导的细胞损伤和细胞死亡。因此, *Grp78* 在保护细胞免受氧化应激方面起着至关重要的作用。作为肿瘤细胞的中央应激传感器, *Grp78* 广泛参与癌症病理, 呈现出高表达趋势, 以帮助肿瘤细胞应对因供血不足而导致的毒素积累、营养缺乏等压力<sup>[26-27]</sup>。此外, 一系列的体内和体外诱因, 如内质网  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剂、细胞毒性免疫反应、生化环境变化、缺氧、重金属胁迫、葡萄糖缺乏等压力都能诱导压力感受器 *Grp78* 的表达上调<sup>[28-30]</sup>。朱玉娇<sup>[31]</sup>的研究结果显示, 经热激和冷激诱导后, 草鱼体内的 *Grp78* 表达水平呈现出广泛的组织分布, 其中以肝脏和肾脏中的表达最为显著。拟穴青蟹 (*Charybdis japonica*) 中 *Grp78* 在胃、心脏和鳃中高表达, 且在高温和盐度处理后其表达显著上调<sup>[32]</sup>。与之类似, 在本研究发现 *Grp78* 在青海湖裸鲤的各组织中均有表达, 尤其是在肠道、肝脏和心脏中表现较高的表达水平。表明 *Grp78* 在不同物种和组织中都具有广泛的表达, 以及作为一种重要的分子伴侣蛋白, 参与了多种生理和病理过程, 并在应对细胞压力方面发挥着关键作用。因此, 进一步研究 *Grp78* 的调控机制和功能, 有助

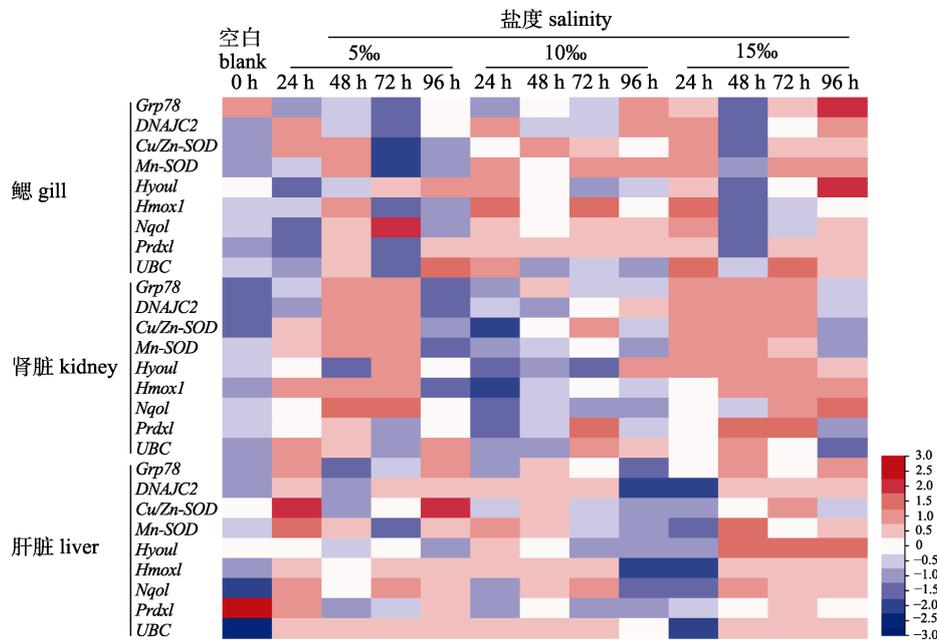


图 6 不同盐度胁迫后青海湖裸鲤鳃、肾脏和肝脏中 *Grp78* 及相关基因的表达

Fig. 6 Expression of *Grp78*-related genes in gills, kidney, and liver of *Gymnocypris przewalskii* after salinity stress of different concentrations

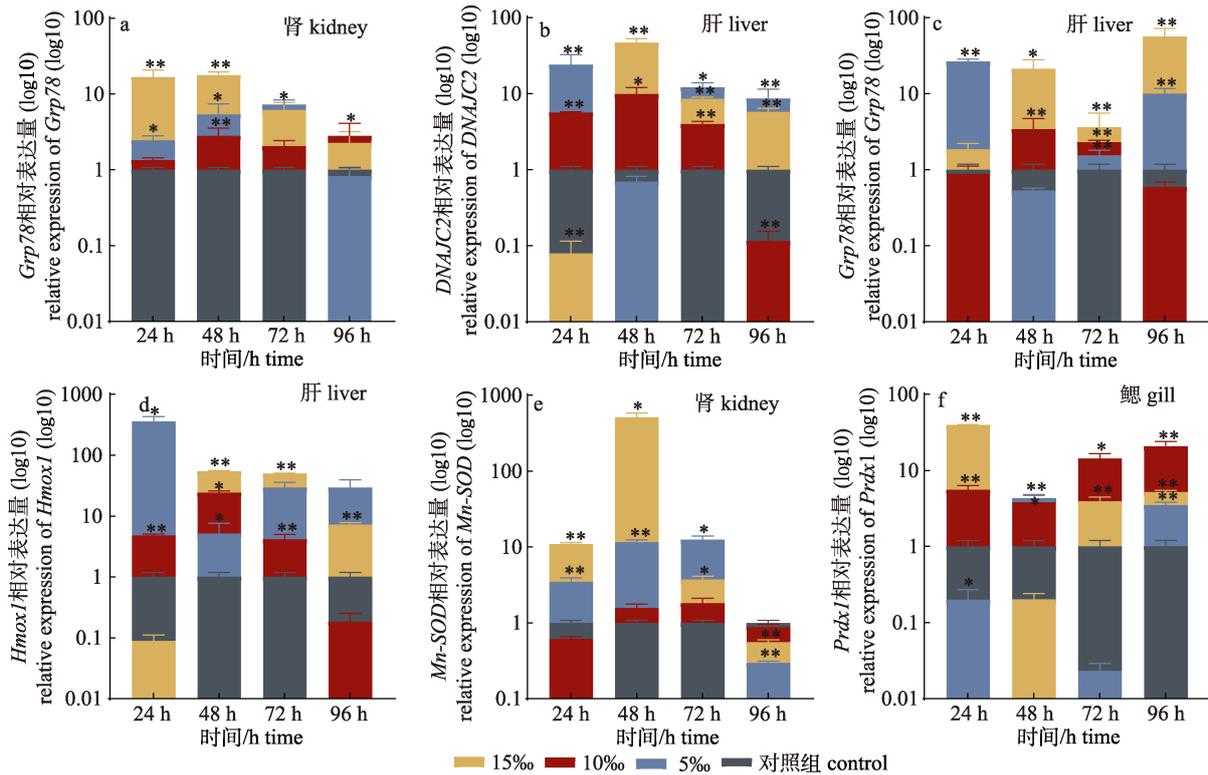


图 7 不同盐度胁迫后青海湖裸鲤鳃、肝脏和肾脏中主要胁迫应答基因的表达

a. *Grp78* 在肾脏中的相对表达量; b. *DNAJC2* 在肝脏中的相对表达量; c. *Grp78* 在肝脏中的相对表达量; d. *Hmox1* 在肝脏中的相对表达量; e. *Mn-SOD* 在肾脏中的相对表达量; f. *Prdx1* 在鳃组织中相对表达量。

\*表示实验组与对照组有统计学差异( $P < 0.05$ ); \*\*表示实验组与对照组有极显著差异( $P < 0.01$ )。

Fig. 7 Expression of major stress-responsive genes in gills, liver, and kidney *Gymnocypris przewalskii* after salinity stress of different concentrations

a. Relative expression of *Grp78* in kidney. b. Relative expression of *DNAJC2* in liver. c. Relative expression of *Grp78* in liver. d. Relative expression of *Hmox1* in liver. e. Relative expression of *Mn-SOD* in kidney. f. Relative expression of *Prdx1* in gill.

\* indicates significant differences between experimental group and control group ( $P < 0.05$ ); \*\* indicates extremely significant differences between experimental group and control group ( $P < 0.01$ ).

于更好地理解其在细胞生命活动中的作用, 并为动物的环境适应能力提升和相关疾病的治疗方面提供新的思路和靶点。

### 3.2 青海湖裸鲤 *Grp78* 及其相关基因在盐度胁迫下的应答表达

鱼类的渗透压胁迫是促使 *Grp78* 上调的一个重要因素。水体中离子浓度的变化直接影响了由核糖体合成的线性蛋白质的活性, 从而可能导致蛋白质的变性或对新生肽链的正确折叠产生影响<sup>[32]</sup>。在鱼类中, 渗透压的调节是由鳃、肾脏、肠道、肝脏协同完成的<sup>[33]</sup>。作为与水直接接触的组织, 鳃起着主要的渗透压调节作用, 并且鳃上富含线粒体的泌氯细胞是负责离子吸收和分泌的主要场所。肾脏则是重要的过滤排泄器官, 在

水体盐度变化时, 其发达的肾单位负责水分的吸水、重吸收和排泄, 以便在高浓度环境下保持体内渗透压平衡<sup>[34]</sup>。此外, 在应对盐度胁迫时, 肝脏作为主要的代谢解毒器官也发挥着重要的作用<sup>[35]</sup>。

有研究显示, 在热休克、冷应激和  $Pb^{2+}$  胁迫下, 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) *Grp78* 在各个组织中上调<sup>[36]</sup>, 高浓度  $H_2O_2$  暴露也可导致鲤(*Cyprinus carpio*)的鳃、肌肉和心脏中 *Grp78* 表达上调, 从而介导未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)的信号转导, 以维持内质网的稳态和正常功能<sup>[37]</sup>。本研究中, 在盐度胁迫后的肝脏、肾脏中 *Grp78* 表达显著上调。由此表明, *Grp78* 作为内质网应激反应中的重要分子, 可通过介导 UPR 来帮助由渗透压力引起的蛋白质错误折叠,

并将其重新折叠成正常的结构,以保护机体免受应激的损伤<sup>[38-39]</sup>。本研究发现,在 15‰盐度胁迫下肾脏和肝脏中的 *Hyou1* 表达上调,这与高温胁迫下虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肾脏中的表达一致<sup>[40]</sup>,*Hyou1* 作为细胞应激标志物表达量持续升高,表明其作为内质网伴侣蛋白,在机体受到盐度压力刺激时,会与 *Grp78* 的表达趋势一致,并启动内质网应激响应,揭示了 *Hyou1* 在维持机体正常功能方面的关键保护作用。Hughes 等<sup>[41]</sup>研究发现,在热应激条件下,*DNAJC2* 表达显著上调。先前研究也证实  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫后青海湖裸鲤 *DNAJC2* 的表达量显著上调<sup>[42]</sup>。与之相似,本研究在盐度胁迫后 *DNAJC2* 的表达显著升高。由此看来,外源胁迫诱导了机体内的氧化应激反应,并激活 *DNAJC2* 辅助 *Grp78* 参与内质网应激,有助于维持细胞的正常功能,保障生命活动正常进行。在亚砷酸盐胁迫的情况下,HeLa 细胞内 *UBC* mRNA 表达量上调,并呈现出时间依赖性趋势。本研究结果与之类似,是由于错误折叠蛋白质的积累增加了对泛素的需求<sup>[43]</sup>,推测 *UBC* 参与渗透压调节,在不同组织中 *UBC* 对盐度胁迫引起的氧化应激和损伤产生了正常的应答反应,并且各组织的应答模式有所不同。在经  $\text{Cd}^{+}$  处理的 HeLa 细胞中,*Hmox1* mRNA 和蛋白质表达水平均显著上调<sup>[44]</sup>。本研究中,盐度胁迫后肝脏、肾脏中 *Hmox1* 也呈上升趋势。这可能是由于 *Hmox1* 近端启动子区特定结合位点的转录因子直接相互作用所致,显示 *Hmox1* 在机体内发挥抗氧化、抗炎和金属解毒的重要作用<sup>[45]</sup>。随着盐浓度的增加,*Prdx1* 的表达也呈现剂量依赖性的上调趋势,并且 *Prdx1* 在应对盐度引起的氧化应激和损伤中发挥着正常的应答功能,以及参与渗透压调节以及维持机体正常生长,表明 *Prdx1* 作为一种抗氧化信号蛋白,具备抗氧化作用<sup>[46]</sup>。董晨帆<sup>[47]</sup>对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)进行 AZA2 毒素胁迫发现,胁迫 24 h 内 *Nqo1* 呈现出高度诱导性。本研究中,盐度胁迫后 *Nqo1* 的表达也呈上调趋势,表明 *Nqo1* 在外源胁迫引起的应激反应中具有减轻过氧化损伤的作用,从而维持了机体的正常生命活动。与低氧胁迫下鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)<sup>[48]</sup>的研究结果一

致,盐度胁迫后青海湖裸鲤的 *Cu/Zn-SOD* 和 *Mn-SOD* 的表达也显著上调,表明 *Cu/Zn-SOD* 和 *Mn-SOD* 作为生物体内最具代表性的抗氧化酶,能够有效清除多余的活性氧自由基,从而保护鱼类细胞和组织免受氧化损伤的影响。综上所述,盐度胁迫对生物体来说是一种复杂的挑战,而 *Grp78* 及其相关基因可能在青海湖裸鲤适应和对抗盐度胁迫的过程中发挥了重要作用。此外,*Grp78*,*Hyou1*,*DNAJC2*,*Hmox1*,*Nqo1*,*UBC*,*Prdx1*,*Cu/Zn-SOD* 和 *Mn-SOD* 在应对盐度胁迫时发挥抗氧化损伤作用。

#### 4 结论

本研究获取了青海湖裸鲤 *Grp78* 全长序列,长度为 2672 bp,可编码 653 个氨基酸;*Grp78* 在各组织中均表达,且在肠道、肝脏、心脏组织中高表达。此外,随着胁迫盐浓度的升高和胁迫时间的延长,*Grp78* 及其相关基因 *DNAJC2*,*UBC*,*Cu/Zn-SOD*,*Mn-SOD*,*Hyou1*,*Hmox1*,*Nqo1* 和 *Prdx1* 可能参与了青海湖裸鲤组织细胞水平氧化应激,以调节机体的渗透压,且基因的调控水平与盐度、胁迫时间和组织类型呈现出明显的特异性。

#### 参考文献:

- [1] Yang Y Q, Yi X F, Li N. Analysis on trophic structure of main waterbirds in Qinghai Lake based on stable isotopic technology[J]. Zoological Research, 2009, 30(4): 418-422. [杨月琴, 易现峰, 李宁. 利用稳定同位素技术分析青海湖优势水鸟的营养级结构[J]. 动物学研究, 2009, 30(4): 418-422.]
- [2] Liu S J, Qi D L, Qi H F, et al. Selection and validation of reference genes in *Gymnocypris przewalskii* by quantitative real-time PCR[J]. Fisheries Science, 2023, 42(3): 413-423. [刘思嘉, 祁得林, 祁洪芳, 等. 青海湖裸鲤实时荧光定量 PCR 内参基因筛选与验证[J]. 水产科学, 2023, 42(3): 413-423.]
- [3] Rong Y F. The habitat characteristics and scale assessment of the natural spawning grounds of *Gymnocypris przewalskii* in Quanji River[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023. [荣义峰. 泉吉河青海湖裸鲤自然产卵场的生境特征及规模评估[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.]
- [4] Shi J Q, Qi H F, Yang J X, et al. Evaluation on the effect of proliferation and release of naked carp in Qinghai Lake[J]. Agricultural Technology Service, 2016, 33(12): 128-129. [史

- 健全, 祁洪芳, 杨建新, 等. 青海湖裸鲤增殖放流效果评估[J]. 农技服务, 2016, 33(12): 128-129.]
- [5] Ju C X. Morphological observation of embryonic development and effects of salinity on growth of False clownfish *Amphiprion ocellaris*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [鞠晨曦. 公子小丑鱼(*Amphiprion ocellaris*)胚胎发育的形态学观察及盐度对幼鱼生长的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [6] Li W. Mechanisms of salinity effects on growth performance and isosmotic point calculation in anadromous fish, Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014. [李伟. 盐度对中华鲟生长的影响机制及中华鲟的等渗点分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.]
- [7] Saoud I P, Kreydiyyeh S, Chalfoun A, et al. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2007, 348(1-2): 183-190.
- [8] Wang H L, Wen H S, Zhang X Y. Effects of salinity stress on antioxidant enzyme and non-specific immunity activities in the intestine of juvenile *Lateolabrax maculatus*[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2016(4): 261-263, 269. [王海亮, 温海深, 张晓燕. 盐度胁迫对花鲈幼鱼肠道抗氧化和非特异性免疫能力的影响[J]. 现代农业科技, 2016(4): 261-263, 269.]
- [9] Cui Q J, Chen B, Qiu L H, et al. Influence of low salinity stress on the gill  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ , liver antioxidant and non-specific immune enzyme in juvenile *Pleuronectes yokohama*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2017, 37(6): 26-32. [崔前进, 陈冰, 邱丽华, 等. 低盐胁迫对钝吻黄盖鲈幼鱼鳃  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$  酶、肝脏抗氧化酶和非特异性免疫酶的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(6): 26-32.]
- [10] Abdel-Tawwab M, Monier M N. Stimulatory effect of dietary taurine on growth performance, digestive enzymes activity, antioxidant capacity, and tolerance of common carp, *Cyprinus carpio* L., fry to salinity stress[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2018, 44(2): 639-649.
- [11] Huang S, Li C Z, Li Z X, et al. Effects of different salinities on growth and osmotic regulation gene expression of *Gymnocypris przewalskii*[J]. Fisheries Science, 2022, 41(4): 527-536. [黄岫, 李长忠, 李梓瑄, 等. 盐度对青海湖裸鲤生长及渗透调节基因的影响[J]. 水产科学, 2022, 41(4): 527-536.]
- [12] Moniruzzaman M, Mukherjee J, Jacquin L, et al. Physiological and behavioural responses to acid and osmotic stress and effects of Mucuna extract in Guppies[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 163: 37-46.
- [13] Tine M, de Lorgeteril J, Panfili J, et al. Growth hormone and Prolactin-1 gene transcription in natural populations of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* acclimatised to different salinities[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 147(3): 541-549.
- [14] Zhu Y L, Han K, Wang F. Climate change and responses of hydro-ecology in Qinghai Lake Watershed[J]. Journal of China Institute of Water Resources and Hydropower Research, 2012, 10(4): 260-266. [朱延龙, 韩昆, 王芳. 青海湖流域气候变化特点及水文生态响应[J]. 中国水利水电科学研究院学报, 2012, 10(4): 260-266.]
- [15] Wang Z, Me Z L, Lin T T, et al. Effects of carbonate alkalinity stress on SOD, ACP, and AKP activities in the liver and kidney of juvenile *Gymnocypris przewalskii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1212-1218. [王卓, 么宗利, 林听听, 等. 碳酸盐碱度对青海湖裸鲤幼鱼肝和肾 SOD、ACP 和 AKP 酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1212-1218.]
- [16] Zhang H C, Ma Q H, Xu B K, et al. Screening and analysis of the osmotic, immune, metabolic related genes of *Gymnocypris przewalskii* in saline-alkali tolerance[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(12): 17-36. [张海琛, 马清花, 许保可, 等. 青海湖裸鲤盐碱耐受过程中的渗透、免疫、代谢相关基因筛选和分析[J]. 水产学报, 2023, 47(12): 17-36.]
- [17] Liu J Y. Effect of saline-alkali stress on oxygen consumption, osmoregulation and ionic regulation of Przewalski's naked carp, *Gymnocypris przewalskii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [刘济源. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤呼吸耗氧、渗透和离子调节的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [18] Ibrahim I M, Abdelmalek D H, Elfiky A A. GRP78: A cell's response to stress[J]. Life Sciences, 2019, 226: 156-163.
- [19] Jin R B, Zhao A R, Han S Y, et al. The interaction of S100A16 and GRP78 activates endoplasmic reticulum stress-mediated through the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway in renal tubulointerstitial fibrosis[J]. Cell Death & Disease, 2021, 12(10): Article No.942.
- [20] Li J Z, Lee A S. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer[J]. Current Molecular Medicine, 2006, 6(1): 45-54.
- [21] Shen Y, Hendershot L M. ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates[J]. Molecular Biology of the Cell, 2005, 16(1): 40-50.
- [22] Wang F, Zhang H, Luan L, et al. Grp78 suppresses apoptosis induced by glucose starvation through activating unfolded protein response signaling pathway and ubiquitin-proteasome system[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 23194.
- [23] Li M, Li C, Yu H, et al. The role of glucose-regulated protein 78 in relation to Hmox1 in the pathogenesis of preeclampsia[J]. Placenta, 2020, 92: 24-32.
- [24] Li S, Yang Y, Zhang Y, et al. NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 attenuates thrombosis by specifically inhibiting oxidative activation of platelet-derived TGF- $\beta$ 1 signaling[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8164.

- [25] Zhu G, Yang J, McCarthy T J, et al. Free radicals and antioxidants in oxidation-reduction reactions of proteins[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, 14(1): 21-33.
- [26] Luan W. Identification and characterization of chaperone protein genes in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2009. [栾伟. 中国明对虾重要分子伴侣蛋白基因的克隆及表达研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009.]
- [27] Xia S K, Duan W Z, Liu W W, et al. GRP78 in lung cancer[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2021, 19(1): Article No.118.
- [28] Liu F, Inageda K, Nishitai G, et al. Cadmium induces the expression of Grp78, an endoplasmic reticulum molecular chaperone, in LLC-PK1 renal epithelial cells[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114(6): 859-864.
- [29] Guo M M, Qu S B, Lu H L, et al. Biochanin A alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and p38MAPK signaling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 646720.
- [30] Li Z H, Huang Z Y, Zhang H, et al. IRE1-mTOR-PERK axis coordinates autophagy and ER stress-apoptosis induced by P2X7-mediated  $Ca^{2+}$  influx in osteoarthritis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 695041.
- [31] Zhu Y J. The functional effect of GRP78 and antioxidantase from grass carp on the stress of heat and lead[D]. Nanchang: Nanchang University, 2012. [朱玉娇. 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) GRP78 和抗氧化酶在抵抗温度、 $Pb^{2+}$ 胁迫中的功能[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.]
- [32] Gong J, Ye H H, Yu K, et al. Cloning and stress expression analysis of glucose regulated protein 78 ku (GRP78) in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(10): 1479-1486. [巩杰, 叶海辉, 于坤, 等. 拟穴青蟹 GRP78 基因的克隆与应激表达[J]. *水产学报*, 2013, 37(10): 1479-1486.]
- [33] Liu L L, Luo M, Chen F X, et al. Effects of low salinity on osmoregulation,  $Na^+/K^+$ -ATPase activity and related gene expression of juvenile *Epinephelus fuscoguttatus*[J]. *Marine Fisheries*, 2022, 44(3): 315-327. [刘龙龙, 罗鸣, 陈傅晓, 等. 低盐对棕点石斑鱼幼鱼渗透压调节、 $Na^+/K^+$ -ATPase 活性及相关基因表达的影响[J]. *海洋渔业*, 2022, 44(3): 315-327.]
- [34] Liu Z H, Lan X R, Li Y W. Short-term exposure of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) impaired the osmo-regulation of zebrafish female adults[J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2019, 36(4): 44-48. [刘智皓, 兰雪溶, 李英文. 乙炔基雌二醇短期暴露损伤斑马鱼雌性成鱼渗透压调节[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 36(4): 44-48.]
- [35] Zhang X Y, Wen H S, Wang H L, et al. RNA-Seq analysis of salinity stress-responsive transcriptome in the liver of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*)[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173238.
- [36] Zhu Y J, Fan Q D, Mao H L, et al. GRP78 from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) provides cytoplasm protection against thermal and  $Pb^{2+}$  stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 617-622.
- [37] Jia R, Du J L, Cao L P, et al. Chronic exposure of hydrogen peroxide alters redox state, apoptosis and endoplasmic reticulum stress in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2020, 229(1): 105657.
- [38] Lee A S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress[J]. *Methods*, 2005, 35(4): 373-381.
- [39] Han L S, Quan Z J, Wu Y L, et al. Expression regulation mechanisms of sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) under the high temperature: New evidence for the miRNA-mRNA interaction involvement[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 876308.
- [40] Pandey A, Rajesh M, Baral P, et al. Concurrent changes in thermal tolerance thresholds and cellular heat stress response reveals novel molecular signatures and markers of high temperature acclimation in rainbow trout[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2021, 102: 103124.
- [41] Hughes S, Vrinds I, de Roo J, et al. DnaJ chaperones contribute to canalization[J]. *Journal of Experimental Zoology Part A, Ecological and Integrative Physiology*, 2019, 331(3): 201-212.
- [42] Liu F, Li C Z, Qi H F, et al. Expression analysis of DNAJC2 and related genes in *Gymnocypris przewalskii* under  $Cu^{2+}$  stress[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2023, 42(9): 962-972. [柳芳, 李长忠, 祁洪芳, 等.  $Cu^{2+}$ 胁迫后青海湖裸鲤 DNAJC2 及其相关基因的表达分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2023, 42(9): 962-972.]
- [43] Bianchi M, Crinelli R, Arbore V, et al. Induction of *ubiquitin C (UBC)* gene transcription is mediated by HSF1: Role of proteotoxic and oxidative stress[J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(9): 1471-1485.
- [44] Shi H J, Xue J, Shi Z K, et al. Identification of promoter activated regions related to up regulation of HMOX1 expression by cadmium exposure[J]. *Journal of Chifeng University (Natural Science Edition)*, 2018, 34(7): 93-95. [时红杰, 薛洁, 时志康, 等. 镉暴露上调 HMOX1 表达的启动子相关活化区域鉴定[J]. *赤峰学院学报(自然科学版)*, 2018, 34(7): 93-95.]
- [45] Gracey A Y, Troll J V, Somero G N. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(4): 1993-1998.
- [46] Tang C L, Yin G B, Huang C X, et al. Peroxiredoxin-1 ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 129: 110357.

- [47] Dong C F. Stress response and regulation mechanism of *Chlamys farreri* against azaspiracids[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021. [董晨帆. 栉孔扇贝对氮杂螺环酸毒素胁迫的应激响应及调控机制[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.]
- [48] Zhang M D, Ling C, Sha H, et al. Hypoxia-reoxygenation stress on antioxidant enzyme activities and expression of *Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD* genes in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(4): 498-506. [张美东, 凌晨, 沙航, 等. 低氧-复氧胁迫对鲢抗氧化酶活性及 *Cu/Zn-SOD* 和 *Mn-SOD* 基因表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2022, 46(4): 498-506.]

## Response expression of *Grp78* and its related genes in *Gymnocypris przewalskii* after salinity stress

ZHAO Jing<sup>1,2</sup>, LI Changzhong<sup>1,2</sup>, WANG Rong<sup>1,2</sup>, MA Shuxiong<sup>1,2</sup>, JIA Chunyan<sup>1,2</sup>, WANG Lu<sup>1,2</sup>, GOU Huayu<sup>1</sup>, LI Lanying<sup>1</sup>, CHEN Yanxia<sup>1,2</sup>, LIU Fang<sup>1,2</sup>, QI Hongfang<sup>3</sup>, JIN Wenjie<sup>1,2</sup>

1. College of Eco-environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China;
2. Key Laboratory of Highland Cold-water Fish Culture and Ecological Environment Protection of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Ministry-Province Joint Construction), Xining 810016, China;
3. Key Laboratory of Breeding and Protection of *Gymnocypris przewalskii*, Rescue Center of *Gymnocypris przewalskii*, Xining 810016, China

**Abstract:** Glucose-regulated protein 78 kDa (*Grp78*) alleviates endoplasmic reticulum stress induced by external stimuli and enhances cell viability. We studied the molecular response mechanisms of *Gymnocypris przewalskii* to salinity stress. In this study, *Grp78* was cloned from *G. przewalskii* and the response patterns of *Grp78* and related genes were analyzed after 5‰, 10‰, and 15‰ salinity stress using qPCR. The results showed that the open reading frame length of *Grp78* was 1962 bp, encoding 653 amino acids and containing the conserved domain of the HSP70 superfamily. *Grp78* was expressed in nine tissues of *G. przewalskii*, and its expression in the intestinal tract, liver, and heart was significantly higher than that in the other tissues ( $n=3$ ,  $P < 0.05$ ). In gills, with the increase in salinity and the extension of stress time, compared with the blank control group, the expressions of *Grp78*, *Hyou1*, *Prdx1*, *Nqo1*, and *UBC* were first inhibited and then gradually upregulated, while the expression of *DNAJC2*, *Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD*, and *Hmox1* was first upregulated and then gradually downregulated and then upregulated again. In the kidney and liver, the expression of *DNAJC2*, *Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD*, *Hmox1*, and *Nqo1* showed similar patterns of upregulation, downregulation, and upregulation, respectively. These results indicated that *Grp78* and its related genes have complex responses to salinity stress and may be involved in adaptation and coping with salinity stress in *G. przewalskii*. In addition, *Grp78* and its related genes—*Hyou1*, *DNAJC2*, *Hmox1*, *Nqo1*, *UBC*, *Prdx1*, *Cu/Zn-SOD*, and *Mn-SOD*—participate in the regulation of antioxidant stress in the body and play important roles in reducing salinity damage.

**Key words:** *Gymnocypris przewalskii*; salinity stress; *Grp78*; gene cloning; gene expression

**Corresponding author:** JIN Wenjie. E-mail: kingsunny@126.com