

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00500

近江牡蛎 *HSC70* 基因对溶藻弧菌感染的反应

刘志刚, 张其中, 张占会, 崔淼

暨南大学水生生物研究所, 热带亚热带水生态工程教育部工程研究中心, 广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室, 广东 广州 510632

摘要: 人工注射溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)感染近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*), 通过实时荧光定量 RT-PCR 方法检测了近江牡蛎 6 种不同组织器官(外套膜、鳃、消化腺、闭壳肌、心脏和血细胞)中 *HSC70* 基因表达量的变化; 同时采用平板活菌计数法测定了近江牡蛎不同组织器官中溶藻弧菌菌量的变化。结果显示, 人工注射感染溶藻弧菌后, 近江牡蛎 6 种组织器官中 *HSC70* 基因表达量均显著性升高($P < 0.05$), 且随时间变化均呈现出先升高后恢复至对照水平的趋势; 其中鳃组织中 *HSC70* 基因分别在第 6 小时和第 72 小时出现 2 次显著性高表达, 且在第 72 小时的表达量高于第 6 小时($P < 0.05$)。在多数组织器官中, *HSC70* 基因出现显著高表达后便急剧下降至对照水平, 而在消化腺中高表达持续的时间长达 18 h(第 6–24 小时)。在注射感染溶藻弧菌后第 6 小时, 血细胞中 *HSC70* 基因的表达量达到峰值, 接近于对照水平的 15 倍; 而在其他组织器官中, 该基因表达峰值仅为对照水平的 2.5 倍左右。人工注射感染溶藻弧菌后 3 h, 3 种组织(消化腺、闭壳肌和血淋巴)中均能检测到溶藻弧菌的积累, 其中闭壳肌中含菌量最高, 6 h 时闭壳肌中含菌量急剧下降, 随后又增加并维持在一定水平直至 72 h; 消化腺中菌量随着时间推移而增加, 到达峰值后又逐步下降; 血淋巴中, 溶藻弧菌含量整体上随时间不断增加, 到 48 h 稳定在较高水平。各组织中 *HSC70* 表达量与溶藻弧菌含量之间存在一定的关联性, 尤其在溶藻弧菌攻击的靶器官(消化腺)中最为明显。由此可见, 病原菌感染可以诱导近江牡蛎 *HSC70* 基因高表达, 并且 *HSC70* 可能参与了机体抗病原菌感染的相关作用, 这为进一步研究近江牡蛎 *HSC70* 基因在抗病免疫中的作用机制奠定了基础。

关键词: 近江牡蛎; *HSC70* 基因; 溶藻弧菌; 基因表达; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S944

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)03-0500-09

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是生物细胞(包括原核细胞及真核细胞)在各种应激(包括外界环境应激和体内病理生理应激)条件下所产生的一类由热休克基因所编码的伴随细胞蛋白^[1]。HSP70 家族作为 HSPs 中重要成员之一, 它主要可以分为两类: 一种是诱导型 HSP70, 通常在细胞中不表达或表达量极少, 但是在热应激或其他应激原的作用下, 则表达迅速增加; 另一种为组成型 HSC70 (heat shock cognate 70), 通常在细胞内有组成型表达, 并且能被外界刺激所诱导^[2]。

HSP70 家族具有重要的生物学功能, 在细胞中主要充当分子伴侣, 介导新合成多肽的正确折叠和装配, 帮助错误折叠蛋白恢复原始结构以及协助蛋白质的定向运输^[3–4]。最新研究表明, HSC70 除了作为分子伴侣之外, 在免疫调节、炎症反应以及抗病原菌感染中也起重要作用, 从而被认为是生物体免疫系统中的重要成分^[5–7]。

近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)是中国南方沿海人工养殖的主要经济贝类, 其肉鲜味美, 营养丰富, 具有很高的经济价值。随着养殖规模

收稿日期: 2011-07-20; 修订日期: 2011-11-21.

基金项目: 国家自然科学基金项目(40576056, 40976066, 31170474); 广东省自然科学基金项目(07300378); 中国博士后科学基金一等资助金(2007042144).

作者简介: 刘志刚(1988–), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子免疫与水产品质量安全. E-mail: wenliugang@163.com

通信作者: 张其中, 教授, 博士生导师. Tel: 020-85225808; E-mail: zhangqzdr@126.com

扩大, 集约化程度提高, 养殖环境急剧恶化, 近江牡蛎大规模死亡事件时有发生, 给牡蛎养殖业造成巨大损失^[8]。引起近江牡蛎大规模死亡的原因主要有环境污染胁迫和病原感染^[9-10]。溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是近江牡蛎的致病菌之一^[9], 其感染能够引起近江牡蛎诱导型*HSP70* 基因高表达, 推测该分子可能参与了抗溶藻弧菌感染过程^[7]。然而, 近江牡蛎组成型表达的*HSC70* 是否也在抗菌感染中发挥作用, 还待深入研究。本研究用致病溶藻弧菌人工注射感染近江牡蛎, 检测不同组织中溶藻弧菌含量以及*HSC70* 基因表达量的变化规律, 旨在揭示近江牡蛎*HSC70* 在抗病原菌感染中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

近江牡蛎购于广东省阳西县程村养殖场, 系人工吊养的 2 龄贝, 平均壳长(9.0±2.0) cm, 平均壳宽(4.0±1.0) cm, 平均体质量(140±25) g。冲洗干净后, 立即放入盛有 60 L 沙滤海水的养殖箱中驯养 2 周, 每天检查牡蛎生活状态。如果贝壳适度张开, 遇刺激快速闭合, 表明贝是活的, 否则视为死贝, 捞出弃之。实验过程中投喂人工养殖扁藻, 隔日换水 1/3。实验期间水温(23±1)℃, pH6.0~6.4, 盐度 18~20。溶藻弧菌菌株为本实验室分离鉴定后保存的近江牡蛎致病菌。

1.2 实验方法

1.2.1 溶藻弧菌菌悬液制备 将冻存的溶藻弧菌在牛肉膏蛋白胨固体培养基(蛋白胨 0.5 g、牛肉膏 0.3 g、酵母粉 0.1 g、NaCl 2 g、琼脂粉 1.3 g、去离子水 100 mL 调PH至 7.2)上划线分离活化 2 次。将活化的溶藻弧菌接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 在 28℃下 200 r/min振荡培养 18 h后, 1 600

r/min离心 10 min弃上清, 用 2% 生理盐水反复洗涤沉淀 2 次后将溶藻弧菌稀释成 2×10⁶ CFU/mL (平板活菌计数法)的菌悬液, 4℃保存备用。

1.2.2 近江牡蛎人工感染溶藻弧菌及取样 取驯养 2 周的 70 只近江牡蛎, 随机分为处理和对照两组, 每组各 35 只。用制备好的菌悬液对实验组牡蛎进行闭壳肌注射感染, 每只注射 50 μL, 含菌量为 10⁵ CFU。对照组注射 2%无菌生理盐水 50 μL, 注射后按驯养条件养殖。在注射后 3、6、12、24、48 和 72 h分别从两组中随机各取 5 只牡蛎, 在超净工作台中用一次性无菌注射器从闭壳肌中抽取约 1 mL血液。血液分成 2 份, 一部分置于无菌离心管中, 4℃保存, 用于涂板后溶藻弧菌计数; 剩下的置于无RNA酶的冻存管中, 4℃下 4 000 g离心 5 min后弃上清, 将沉淀的血细胞置于液氮中冻存, 用于RNA提取。然后撬开牡蛎外壳, 用无菌剪刀和镊子剪取小块外套膜、鳃、消化腺、闭壳肌和心脏组织(消化腺和闭壳肌都取组织中间部位, 避免体腔液中细菌的影响), 一部分放入冻存管中置液氮中冻存, 用于RNA提取; 另一部分置于无菌离心管中, 4℃暂存, 用于匀浆后涂板计数溶藻弧菌。

1.2.3 各组织中*HSC70* 基因表达水平检测 取冻存的不同组织 50~100 mg, 用Trizol (Invitrogen)试剂盒提取总RNA, 提取步骤参照该试剂说明书。1%琼脂糖电泳检测提取RNA质量, 同时用核酸蛋白定量仪测定RNA浓度, -80℃保存备用。取 2 μg 总 RNA 用 M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)试剂盒逆转录为单链cDNA, -20℃保存, 反应体系按照试剂盒说明书操作。参照李春勇^[11]的方法设计合成内参基因β-actin特异性引物和跨内含子的*HSC70* 基因特异引物, 引物序列见表 1。

荧光定量 PCR 反应体系(20 μL)包括: SYBR

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Tab. 1 Primers for real-time PCR

引物名称 primer	类型 type	序列(5'-3') sequence (5'-3')	长度/bp length	产物/bp product
β-actin701	正义 sense	CTGTGCTACGTTGCCCTGGACTT	23	129
β-actin829	反义 antisense	TGGGCACCTGAATCGCTCGTT	21	
HSC1076	正义 sense	GGACAAGGCCCGAGATCCACGACA	23	163
HSC1238	反义 antisense	CAGAATGGCGGCCTGGACAGCT	22	

Green Real time PCR Supermix (TOYOBO) 10 μL , 上游引物和下游引物各 0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), cDNA 模板 0.4 μL (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 无菌双蒸水 8.8 μL 。利用 iCycler iQ System (Bio-Rad) 进行实时荧光定量 PCR 反应, 反应程序如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环; 在 72 $^{\circ}\text{C}$ 采集荧光信号。内参基因 β -actin 与 *HSC70* 基因分不同管同时进行 PCR 反应, 设置阴性对照 (不加 cDNA 模板), 每个样品设置 3 个重复, C_t 值取其平均值。

1.2.4 溶藻弧菌在组织中的分布检测 除血液外的其他组织块 (外套膜、鳃、消化腺、闭壳肌和心脏) 用高压灭菌并烘干的滤纸吸干组织表面液体后称重, 以 5 mL (生理盐水)/g (组织) 的比例对这些组织进行充分匀浆。各组织匀浆液及血液分别用生理盐水梯度稀释 (10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4}) 后取 100 μL 涂 TCBS (陆桥) 平板, 每个稀释浓度涂 3 块板, 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h 后进行平板活菌计数。各组织和血细胞中细菌的数目分别以 $\lg(\text{CFU/g})$ 和 $\lg(\text{CFU/mL})$ 来表示。

1.2.5 数据处理与分析 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[12] 对 *HSC70* 基因的相对表达量进行分析, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t(\text{处理组})} - \Delta C_{t(\text{对照组})}$, 其中 $\Delta C_{t(\text{处理组})} = C_{t(\text{目的基因(处理组)})} - C_{t(\text{内参基因(处理组)})}$; $\Delta C_{t(\text{对照组})} = C_{t(\text{目的基因(对照组)})} - C_{t(\text{内参基因(对照组)})}$ 。分别应用 SPSS17.0 统计软件中单因素方差分析中的 Dunnett 和 Duncan 检验方法对表达量数据和菌量数据进行统计学分析。显著性检验水平 $P < 0.05$ 为显著, $P < 0.01$ 为极显著。

2 结果与分析

2.1 近江牡蛎外套膜中 *HSC70* 基因对溶藻弧菌注射感染的反应

在注射感染溶藻弧菌后第 3 小时, 近江牡蛎外套膜中 *HSC70* 基因表达水平与对照组无显著差异 ($P > 0.05$); 第 6 小时 *HSC70* 基因表达水平与对照差异极显著 ($P < 0.01$), 并达到峰值, 与 β -actin 比值为 1.63 ± 0.34 ; 第 12 小时表达量下降到对照水平, 随后在对照水平上下波动 (图 1)。

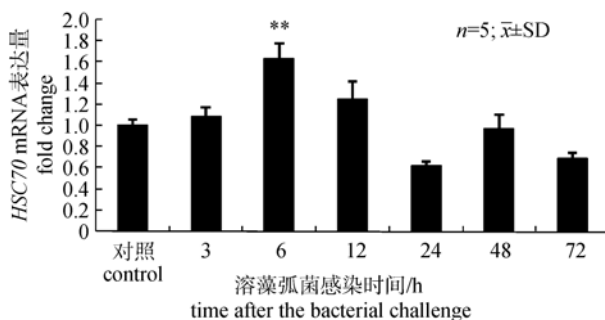


图 1 注射感染溶藻弧菌后不同时间近江牡蛎外套膜中 *HSC70* mRNA 的相对表达量变化

**表示与对照差异极显著 ($P < 0.01$)。

Fig. 1 *HSC70* mRNA expression detected with real-time PCR technique in mantle of *Crassostrea hongkongensis* injected with live *Vibrio alginolyticus*

** indicates that the values are significantly different from the control at 0.01 level.

2.2 近江牡蛎鳃中 *HSC70* 基因对溶藻弧菌注射感染的反应

近江牡蛎鳃中 *HSC70* 基因在注射感染溶藻弧菌后出现 2 次显著性高表达。注射溶藻弧菌后 6 h 出现第 1 次显著性高表达 ($P < 0.05$), 与 β -actin 比值为 1.96 ± 0.43 , 之后回落至正常水平; 至 72 h 时再一次出现极显著性高表达 ($P < 0.01$), 与 β -actin 比值为 2.80 ± 0.64 (图 2)。

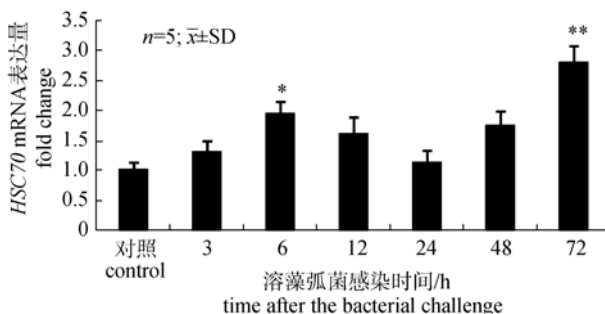


图 2 注射感染溶藻弧菌后不同时间近江牡蛎鳃中 *HSC70* mRNA 的相对表达量变化

*表示与对照差异显著 ($P < 0.05$); **表示与对照差异极显著 ($P < 0.01$)。

Fig. 2 *HSC70* mRNA expression detected with real-time PCR technique in gill of *Crassostrea hongkongensis* injected with live *Vibrio alginolyticus*

*and** indicate that the values are significantly different from the control at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.3 近江牡蛎消化腺中 *HSC70* 基因对溶藻弧菌注射感染的反应

近江牡蛎消化腺中 *HSC70* 基因在注射感染溶

藻弧菌后第3小时表达水平与对照组无显著差异($P>0.05$), 第6小时 *HSC70* 基因表达水平与对照差异极显著($P<0.01$), 达到峰值, 并维持高表达水平至24 h, 与 β -actin 比值分别为 2.10 ± 0.31 、 1.97 ± 0.35 、 2.08 ± 0.65 , 48 h 时恢复至对照水平(图3)。

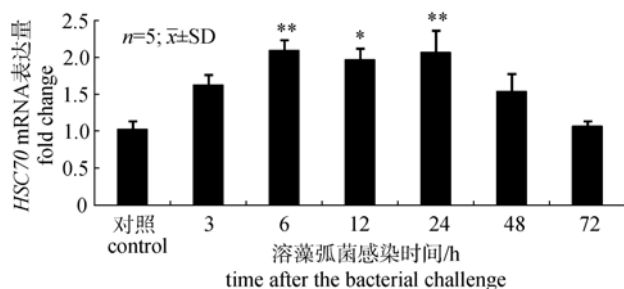


图3 注射感染溶藻弧菌后不同时间近江牡蛎消化腺中 *HSC70* mRNA 的相对表达量变化

*表示与对照差异显著($P<0.05$); **表示与对照差异极显著($P<0.01$).

Fig. 3 *HSC70* mRNA expression detected with real-time PCR technique in digestive gland of *Crassostrea hongkongensis* injected with live *Vibrio alginolyticus*

*and** indicate that the values are significantly different from the control at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.4 近江牡蛎闭壳肌 *HSC70* 基因对溶藻弧菌注射感染的反应

在注射感染溶藻弧菌后第3h, 近江牡蛎闭壳肌中 *HSC70* 基因表达量急剧上升并达到峰值, 极显著高于对照水平($P<0.01$), 与 β -actin 比值为 2.50 ± 0.66 , 但第6小时便恢复至接近对照水平(图4)。

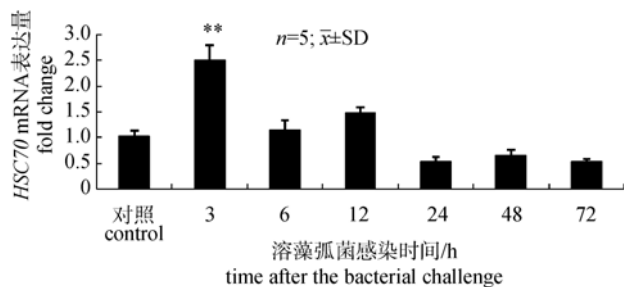


图4 注射感染溶藻弧菌后不同时间近江牡蛎闭壳肌中 *HSC70* mRNA 的相对表达量变化

**表示与对照差异极显著($P<0.01$).

Fig. 4 The *HSC70* mRNA expression detected with real-time PCR technique in muscle of *Crassostrea hongkongensis* injected with live *Vibrio alginolyticus*

** indicates that the value is significantly different from the control at 0.01 level.

2.5 近江牡蛎心脏 *HSC70* 基因对溶藻弧菌注射感染的反应

注射溶藻弧菌后, 近江牡蛎心脏中 *HSC70* 基因表达量变化与闭壳肌中类似, 也是在第3小时便急剧上升至峰值, 极显著高于对照($P<0.01$), 与 β -actin 的比值分别为 2.71 ± 0.48 ; 在第6小时 *HSC70* 基因表达量恢复至对照水平, 与对照无显著差异($P>0.05$, 图5)。

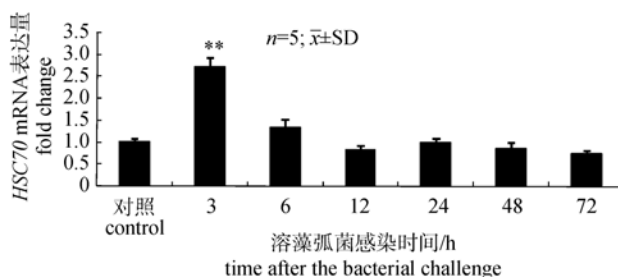


图5 注射感染溶藻弧菌后不同时间近江牡蛎心脏中 *HSC70* mRNA 的相对表达量变化

**表示与对照差异极显著($P<0.01$).

Fig. 5 *HSC70* mRNA expression detected with real-time PCR technique in heart of *Crassostrea hongkongensis* injected with live *Vibrio alginolyticus*

** indicates that the value is significantly different from the control at 0.01 level.

2.6 近江牡蛎血细胞中 *HSC70* 基因对溶藻弧菌注射感染的反应

在注射溶藻弧菌后第3小时和6小时, 近江牡蛎血细胞中 *HSC70* 基因表达水平都极显著高于对照($P<0.01$), 与 β -actin 比值分别为 11.76 ± 2.45 和 13.90 ± 3.61 , 但到第12小时便迅速恢复至对照水平(图6)。

2.7 溶藻弧菌在人工感染近江牡蛎各组织中的动态分布规律

由于双壳贝类的鳃和外套膜与外界水环境直接接触, 无法排除组织外菌体的干扰, 所以这两种组织中溶藻弧菌菌量数据不用于统计分析。同样, 由于不能排除心脏中残留血淋巴中所含细菌的干扰, 所以心脏组织中菌量数据也不用于统计分析。这里仅对消化腺、闭壳肌和血淋巴中溶藻弧菌菌量变化数据进行统计分析(图7)。

在对照组中, 近江牡蛎相关组织中未检测到

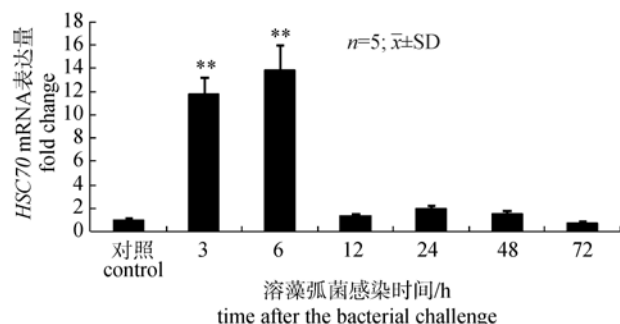


图 6 注射感染溶藻弧菌后不同时间近江牡蛎血细胞中 *HSC70* 基因 mRNA 的相对表达量变化

**表示与对照差异极显著 ($P < 0.01$).

Fig. 6 *HSC70* mRNA expression detected with real-time PCR technique in haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* injected with live *Vibrio alginolyticus*

** indicates that the value is significantly different from the control at 0.01 level.

溶藻弧菌。在处理组中, 近江牡蛎注射感染溶藻弧菌后 3 h, 3 种组织中均能检测到溶藻弧菌的积累, 其中闭壳肌中含菌量最高, 为 $5.08 \pm 0.25 \lg(\text{CFU/g})$ 。在感染 6 h 后闭壳肌中含菌量急剧下降至 $3.84 \pm 0.20 \lg(\text{CFU/g})$, 随后又增加并维持在一定水平直至 72 h; 而感染 6 h 后消化腺中菌量从 3 h 的 $4.17 \pm 0.34 \lg(\text{CFU/g})$ 迅速上升至 $6.32 \pm 0.24 \lg(\text{CFU/g})$, 在 12 h 达到峰值并且维持较高溶藻弧菌浓度直至 48 h, 在 72 h 时菌量开始下降。在血淋巴中, 溶藻

弧菌含量从 3 h 至 48 h 逐渐增加, 到 48 h 含菌量稳定在较高水平直至 72 h。

3 讨论

3.1 细菌感染可以诱导近江牡蛎各组织中 *HSC70* 基因的高表达

生物体受到体内外胁迫因子(包括病原菌感染)刺激后, 细胞内 HSP70s 会迅速升高^[13]。文蛤 (*Meretrix meretrix*) 在感染副溶血弧菌 (*V. Parahaemolyticus*) 后, 消化腺以及鳃中 *HSC70* 基因 (*MmeHsc71*) 表达量显著高于对照水平^[14]; 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 被哈维氏弧菌感染后, 肝和脾组织中 *HSC70* mRNA 表达水平分别在 24 h 和 12 h 出现上调 (2.5 倍和 1.6 倍)^[15]。本研究结果表明, 近江牡蛎在感染溶藻弧菌后, 外套膜、鳃、消化腺、闭壳肌、心脏和血细胞 6 种不同组织中 *HSC70* mRNA 均先后出现了显著性高表达, 这与以上结果类似。

在近江牡蛎中, *HSC70* 基因可以被细菌感染诱导高表达, 推测它在抗病原菌感染中发挥了重要作用。近江牡蛎在注射感染溶藻弧菌后, 溶藻弧菌通过粘附、侵袭、体内增殖以及产生毒素这一系列过程对机体造成损伤^[16], 必然会干扰和破

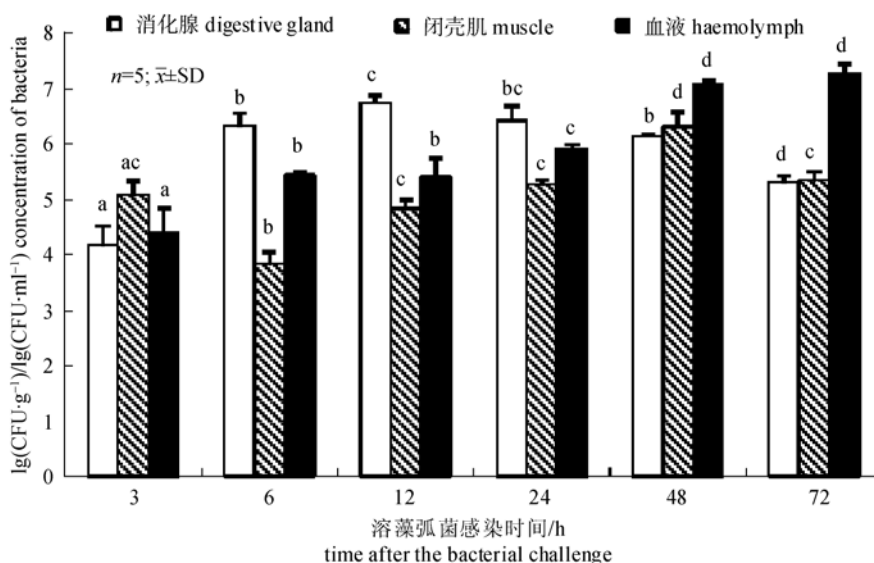


图 7 溶藻弧菌注射感染近江牡蛎后不同时间点各组织中该菌含量变化

同一组织的柱形图上方的不同字母表示各时间点之间差异显著 ($P < 0.05$), 字母相同则表明无显著差异 ($P > 0.05$).

Fig. 7 The concentration of *Vibrio alginolyticus* in different tissues of *Crassostrea hongkongensis* injected with live *V. alginolyticus*. Different letters above the bars indicate significant difference between groups in the same tissue ($P < 0.05$).

坏细胞内蛋白代谢的正常进行,引起蛋白的错误折叠和变性蛋白的积累。*HSC70* 的主要功能是作为分子伴侣,它的表达上调可以帮助错误折叠蛋白恢复正常结构以及解离聚集的蛋白质,减少产生不溶性聚集物的危险性,对调节蛋白内环境的稳定具有重要作用^[1]。贝类血细胞对细菌具有吞噬作用,且吞噬过程通常伴随着呼吸爆发的产生,大量氧自由基或活性氧分子(ROS)释放到细胞内外形成了强有力的杀菌系统^[17-18]。ROS在杀死病原菌的同时也对宿主细胞造成损伤,可以引起蛋白变性,上调表达的*HSC70* 可能在修复这些变性蛋白中发挥重要作用。*HSC70* 除了在维持细胞内蛋白代谢内稳态方面发挥重要作用外,同时也会被释放到细胞外,作为一种“危险信号”使机体提高免疫系统的防御功能,有利于机体清除入侵病原^[19]。*HSC70* 还具有细胞因子功能,可以通过诱导免疫细胞产生促炎性细胞因子参与免疫反应^[5]。

3.2 细菌感染诱导近江牡蛎各组织中 *HSC70* 基因的高表达表现为先增加后减少的时间依赖性

近江牡蛎在感染溶藻弧菌后,鳃、外套膜和血细胞中诱导型*HSP70* 基因表达量的变化趋势都是先增加,然后恢复至正常水平^[7]。皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)在鳃弧菌(*V. anguillarum*)感染后肌肉中*HSC70* mRNA表达量显著升高,到96 h时恢复到正常水平^[20]。海湾扇贝(*Argopecten irradians*)在感染鳃弧菌后,血细胞*HSP70* mRNA表达量在8 h达到最大值并持续至16 h,随后便逐渐下降^[21]。本研究结果表明,近江牡蛎在感染溶藻弧菌后,各组织中(除鳃组织外)*HSC70* 基因的诱导表达都是先增高然后降低至对照水平,表现为明显的时间依赖性(图1-6),与以上研究结果类似。这可能与*HSC70* 在转录水平的反馈调节方式有关,在无胁迫条件下,细胞质中*HSC70* 蛋白与热休克转录因子(HSF)结合为无活性复合物;热胁迫或其他环境胁迫后,大量*HSC70* 与变性蛋白结合,导致HSF从*HSC70*-HSF复合物中释放,游离的HSF在蛋白激酶或其他丝氨酸/苏氨酸激酶的作用下磷酸化,形成活性三聚体并转入细胞核内^[22],与热休克原件(HSE)序列结合,并进一步被激酶磷酸

化,然后启动热休克蛋白基因(包括*HSC70*)的表达,导致机体中*HSC70* 表达水平上升;当*HSC70* 累积到一定程度时又与HSF结合,引起HSF与HSE分离,转录停止,从而实现反馈抑制*HSC70* 的表达,机体中*HSC70* 表达水平逐渐下降至诱导前水平^[23]。

3.3 细菌感染后近江牡蛎 *HSC70* 基因的诱导高表达具有组织特异性

近江牡蛎鳃组织中*HSC70* 基因在注射溶藻弧菌后分别在第6小时和72小时出现两次表达峰,且在72 h处表达量要高于6 h(图2),这与其他组织不同。这可能由于鳃是近江牡蛎的呼吸和滤食器官,其长期与水体中各种病原菌接触导致其对病原菌刺激的敏感性降低、耐受性增强。当病原菌刚侵入鳃时,*HSC70* 基因被诱导高表达,可以修复细菌感染引起的受损蛋白;同时诱导产生的*HSC70* 可以作为一种“危险信号”使机体提高免疫系统的防御功能^[19]。当机体损伤得到修复后,*HSC70* 基因表达量又回落至正常水平,但是当病原菌在体内继续增加到一定水平时,*HSC70* 基因又会再次被诱导高表达,并且达到更高水平。

在注射感染溶藻弧菌后,近江牡蛎6种组织中*HSC70* 基因均在3~6 h范围内出现显著性高表达。在大部分组织中,*HSC70* 基因诱导高表达后很快便恢复至对照水平,但在消化腺中该基因高表达持续的时间较长(第6~24小时)(图3)。在人工感染副溶血弧菌的文蛤中也存在类似情况,胰腺腺中*HSC70* 基因(*MmeHsc71*)表达量从感染后第6~24小时一直高于对照水平^[14]。本研究,近江牡蛎消化腺中*HSC70* 基因的持续高表达可能与溶藻弧菌主要攻击其消化腺,损伤消化盲囊^[24]有关。受攻击的消化腺细胞中*HSC70* 基因被诱导长时间高表达有利于修复细胞中受损蛋白,维持正常生命活动。

在近江牡蛎血细胞中,病原菌感染后*HSC70* 基因的表达量在第3小时便急剧上升至对照水平的10倍以上,在第6小时达到峰值,接近对照水平的15倍(图6);但在其他组织中,*HSC70* 的表达峰值仅为对照水平的2.5倍左右。海湾扇贝

(*Argopecten irradians*)在感染鳃弧菌后,血细胞HSP70 mRNA表达量在8 h达到最大值,为对照的10倍左右^[21];合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)在注射溶藻弧菌后,其血细胞HSP70基因表达量在第4小时到达峰值,为对照的6倍左右^[25],这些研究结果与本研究HSC70的表达时间和规律类似。由此可见,贝类血细胞中HSP70家族在细菌感染后具有上升快、表达量高的特点。推测HSC70可能作为重要角色与参与了贝类血细胞抗病原菌的免疫反应。贝类体内没有特异性免疫淋巴细胞和抗体,对进入体内的病原微生物的防御主要是通过血细胞的吞噬和其分泌的免疫因子介导的非特异性免疫,血细胞既是细胞免疫的承担者,又是体液免疫的提供者,是贝类体内抵御外来病原生物侵害的主要“屏障”^[26]。贝类血细胞吞噬异物时伴随着呼吸爆发(respiratory burst),激活位于质膜上的NADPH氧化酶,催化氧还原1个电子形成超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$),此过程中产生多种活性氧中间体(reactive oxygen intermediates, ROIs),形成了强有力的杀菌系统^[17-18]。呼吸爆发产生的活性氧也会对自身造成一定损伤,引起蛋白变性和酶失活,这时HSC70诱导高表达可以作为分子伴侣帮助修复由呼吸爆发引起的自身氧化损伤,还能激活巨噬细胞使其对 H_2O_2 引起的损伤具有获得性抵抗性^[27],因此细菌感染后近江牡蛎血细胞中HSC70表现为上升快,表达量高的特点。

3.4 近江牡蛎各组织中溶藻弧菌的动态分布规律与HSC70基因表达量之间的关系

近江牡蛎人工注射感染溶藻弧菌后,消化腺中溶藻弧菌含量和HSC70基因表达量都表现为明显的时间依赖性,且两者有明显的相关性(图3、7)。从而推测HSC70可能参与了细菌感染引起的免疫反应。消化腺为溶藻弧菌攻击的主要靶器官^[24],在感染后6 h消化腺中溶藻弧菌积累量便显著高于闭壳肌和血淋巴,受攻击的消化腺细胞中HSC70基因被诱导长时间高达与该组织中长时间维持高浓度菌量相一致,可能与HSC70参与修复病原菌引起的细胞损伤,维持正常生命活动有关。

近江牡蛎人工注射感染溶藻弧菌后,血细胞

中HSC70基因在感染后3~6 h显著高表达,到12小时时便恢复至对照水平(图6),而陈晨等^[7]发现近江牡蛎在注射溶藻弧菌后第12小时,血细胞中诱导型HSP70才开始显著高表达并持续至48 h,72 h时恢复至对照水平。同样,在感染溶藻弧菌的紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)血细胞中HSP70基因也在12~48 h内显著高表达^[28]。可见,HSC70和HSP70基因在病原菌感染的贝类血细胞中先后出现高表达(HSC70: 3~6 h; HSP70: 12~48 h),前者高表达刚结束,后者立即开始高表达,推测两者在细菌感染的不同时段起作用,HSC70主要在细菌感染初期起作用。本研究结果表明近江牡蛎血淋巴中溶藻弧菌含量从3 h至48 h逐渐增加,到48 h含菌量稳定在较高水平直至72 h。表面上看,血细胞中HSC70基因表达量与血淋巴中菌量并不吻合,但是结合HSC70和HSP70在病原菌感染的贝类血细胞中先后高表达的特点来看,HSC70高表达与血淋巴中菌量明显相关的。进一步表明HSC70可能参与了细菌感染引起的免疫反应。

近江牡蛎人工注射感染溶藻弧菌后闭壳肌中含菌量与HSC70表达量也存在潜在相关性。近江牡蛎闭壳肌中注射溶藻弧菌3 h后,在该组织中仍检测到高浓度溶藻弧菌,这可能是由于从闭壳肌中注射该菌,且高浓度的初始菌量有利于该菌在闭壳肌中定植和扩增。同时高浓度的溶藻弧菌通过粘附、侵袭、体内增殖以及产生毒素这一系列过程对该组织造成损伤^[16],引起蛋白变性。而闭壳肌中HSC70基因在感染3 h显著高表达,可能与HSC70可以作为分子伴侣参与病原菌引起的变性蛋白的修复和降解有关。感染6 h后闭壳肌中含菌量急剧下降,可能是肌肉中血淋巴将注入及增殖的细菌从闭壳肌转移至血液和消化腺等其他组织器官的结果,随着闭壳肌中附着细菌的增殖,该组织中细菌浓度又增加,但HSC70表达量在6 h时已经恢复到对照水平,没有随着菌量的再次爆发出高表达,这可能与HSC70基因表达的反馈调节机制有关,HSC70 mRNA的诱导表达通过高浓度的HSC70来进行反馈调节^[23]。感染后6 h时闭壳肌中HSC70 mRNA高表达已经受到抑制并恢

复至对照水平,说明该组织细胞中可能已经积累了大量的HSC70 蛋白,足以用于修复细菌感染引起的蛋白变性,维持细胞的正常功能。所以当菌量再次上升至 3 h水平时,没有引起HSC70 再次高表达。

综上所述,溶藻弧菌感染可以诱导近江牡蛎各组织中 *HSC70* 基因的上调表达,且具有组织特异性。各组织 *HSC70* 表达量与溶藻弧菌含量之间具有一定的关联性,在溶藻弧菌攻击的靶器官消化腺中最为明显。推测近江牡蛎中 HSC70 可能参与了抗病原菌感染的过程,在抗逆抗病中起着重要作用。

参考文献:

- [1] 林钟婷,朱静,翁银标,等. 热休克蛋白 70 的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(3): 67–69.
- [2] Sato S, Abe K, Kawagoe J, et al. Isolation of complementary DNAs for heat shock protein (HSP) 70 and heat shock cognate protein (HSC) 70 genes and the expressions in post-ischaemic gerbil brain[J]. Neurologic Res, 1992, 14(5): 375–380.
- [3] Hendrick J P, Hartl F U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins[J]. Annu Rev Biochem, 1993, 62: 349–384.
- [4] Bukau B, Horwich A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines[J]. Cell, 1998, 92(3): 351–366.
- [5] Tsan M F, Gao B C. Heat shock protein and innate immunity[J]. Cell Mol Immunol, 2004, 1(4): 274–279.
- [6] Roberts R J, Agius C, Saliba C, et al. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: A review[J]. J Fish Dis, 2010, 33: 789–801.
- [7] 陈晨,张其中,张占会,等. 近江牡蛎HSP70 基因对溶藻弧菌感染的反应[J]. 生态科学, 2011, 30(3): 295–300.
- [8] 吴信忠. 海洋养殖贝类病害的流行及其控制[J]. 鱼类病害研究, 1998, 20(1): 670–679.
- [9] 李春勇,张其中,张占会. 三种水产药物对近江牡蛎的影响[J]. 四川动物, 2006, 25(1): 153–154.
- [10] 张占会,张其中,李春勇,等. 养殖近江牡蛎致病弧菌的分离与鉴定[J]. 热带海洋学报, 2008, 27(6): 49–56.
- [11] 李春勇. 敌百虫诱导近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)HSC70 基因表达的定量研究[D]. 广州:暨南大学, 2007: 26.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T) (-Delta Delta C) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [13] Sorensen J G, Kristensen T N, Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins[J]. Ecol Lett, 2003, 6(11): 1025–1037.
- [14] Yue X, Liu B Z, Li S, et al. Cloning and characterization of a hsp70 gene from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* which is involved in the immune response against bacterial infection[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(3): 791–799.
- [15] 贾爱荣,王传娟,张晓华. 大菱鲆组成型热休克蛋白 70 的全长 cDNA 克隆及表达分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(3): 547–552.
- [16] 陈强,鄢庆彬,马牲. 溶藻弧菌致病性研究进展[J]. 海洋科学, 2006, 30(8): 83–89.
- [17] Tiscar P G, Mosca F. Defense mechanisms in farmed marine molluscs[J]. Vet Res Commun, 2004, 28 (1): 57–62.
- [18] Dikkeboom R, Tijnagel J M G H, Mulder E C, et al. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen[J]. J Invert Pathol, 1987, 49(3): 321–331.
- [19] Campisi J, Leem T H, Fleshner M. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system[J]. Cell Stress Chaperones, 2003, 8(3): 272–286.
- [20] Cheng P Z, Liu X, Zhang G F, et al. Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 22(1–2): 77–87.
- [21] Song L S, Wu L T, Ni D J, et al. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21(4): 335–345.
- [22] Kroeger P E, Sarge K D, Morimoto R I. Mouse heat shock transcription factors 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the HSP70 heat shock element[J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(6): 3370–3383.
- [23] Iwama G K, Thomas P T, Forsyth R B, et al. Heat-shock protein expression in fish[J]. Rev Fish Biol Fish, 1998, 8(1): 35–36.
- [24] 张占会. 近江牡蛎致病微生物的筛查和鉴定[D]. 广州:暨南大学, 2006: 45–48.
- [25] Wang Z L, Wu Z H, Jian J C, et al. Cloning and expression

- of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(4): 639–645.
- [26] 周永灿, 潘金培. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展[J]. 水产学报, 1997, 21(4): 449–453.
- [27] Teshima S, Rokutan K, Takahashi M, et al. Induction of heat shock proteins and their possible roles in macrophages during activation by macrophage colony-stimulating factor[J]. Biochem J, 1996, 315(2): 497–504.
- [28] Cellura C, Toubiana M, Parrinello N, et al. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*[J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(11): 984–997.

mRNA expression of heat-shock cognate protein 70 gene (*HSC70*) in the oyster (*Crassostrea hongkongensis*) in response to *Vibrio alginolyticus* challenge

LIU Zhigang, ZHANG Qizhong, ZHANG Zhanhui, CUI Miao

Institute of Hydrobiology, Jinan University, Engineering Research Center of Tropical and Subtropical Aquatic Ecological Engineering Ministry of Education, Key Laboratory of Aquatic Eutrophication and Control of Harmful Algal Blooms of Guangdong Higher Education Institutes, Guangzhou 510632, China

Abstract: We developed a fluorescent real-time quantitative RT-PCR method to evaluate the pattern of *HSC70* mRNA expression in response to the bacterial infection in the oyster (*Crassostrea hongkongensis*). We injected oysters with live *Vibrio alginolyticus*, and measured *HSC70* gene expression in six tissues (mantle, gills, digestive gland, muscle, heart and hemocytes). We measured the accumulation and distribution of *V. alginolyticus* using the plate counting method. *HSC70* mRNA expression was significantly up-regulated in all the six tissues following injection with *V. alginolyticus*, and the expression was time-dependent. *HSC70* gene expression increased significantly at 6 and 72 h in the gill. Similarly, levels peaked at 6 h in the digestive gland then remained high until 24 h, after which they decreased rapidly to control levels. *HSC70* mRNA expression was ~10 fold higher in the haemocytes than the control after 3 h, and the expression levels peaked at 6 h (~15 fold higher than the control). The expression of *HSC70* was ~2.5 fold higher in the remaining tissues than in the control. The bacterial concentration was higher in the muscle than that in other tissues (digestive gland and hemolymph) at 3 h after the oysters were injected with *V. alginolyticus*, though levels had declined by 6 h. The accumulation of bacteria in the muscle increased at 12 h and remained high up to 72 h. The change in *V. alginolyticus* concentration was time-dependent in the digestive gland whereas the bacteria increased with time and peaked at 48 h in the hemolymph. We observed a positive correlation between *HSC70* mRNA expression and the concentration of bacteria, most obvious in the digestive gland. Our results suggest that bacterial challenge induces the up-regulation of *HSC70* mRNA expression and suggests that *HSC70* plays an important role in protecting the oyster against the bacterial pathogen.

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; *HSC70*; *Vibrio alginolyticus*; gene expression; quantitative real-time PCR

Corresponding author: ZHANG Qizhong. Tel: +86 20-85225808; E-mail: zhangqzdr@126.com