

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16110

急性低盐胁迫下红鳍东方鲀幼鱼 *IgM*、*NKCC1* 和 *Hsp70* 基因的表达

孙梦蕾, 吕绘倩, 暴宁, 司滨, 陈飞, 王莉苹, 蒋洁兰

大连海洋大学 辽宁省北方鱼类应用生物学与增养殖重点实验室, 农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 为探讨红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)耐低盐的分子机制, 以自然海水组为对照, 利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术, 分析红鳍东方鲀幼鱼在盐度 16、12、8 和 4 胁迫下, 鳃和肾中免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, *IgM*)、钠钾氯协同转运蛋白 1(Na-K-Cl cotransporter 1, *NKCC1*)和热休克蛋白 70(heat shock protein 70, *Hsp70*)3 个基因的表达情况。结果表明, 3 个基因在鳃和肾中均有表达, *IgM* 和 *Hsp70* 基因在鳃和肾中的表达量均无显著性差异($P>0.05$), 而 *NKCC1* 基因在鳃中的表达量显著高于肾($P<0.05$)。同一盐度下, 随着时间的增加, 鳃中 *IgM* 基因的表达量大致呈现先降低后升高的趋势, 肾中则呈现先降低后升高再趋于平稳的趋势; 同一时间内, 鳃中低盐度组与对照组的 *IgM* 基因表达量差异比肾中差异更为明显。在鳃中, 相同时间内 *NKCC1* 基因在各低盐度组的表达量低于对照组, 尤其在 6 h 和 72 h 两个时间点时显著低于对照组($P<0.05$); 肾中各时间点的表达量基本都高于 0 h 表达量。在相同时间内, 3 h、6 h、24 h、72 h 的各低盐度组, 在鳃中, *Hsp70* 基因的表达量均与同一时间对照组之间差异明显($P<0.05$); 在肾中, 从 6 h 开始, 各低盐组与对照组之间差异性显著($P<0.05$)。以上结果表明, 红鳍东方鲀幼鱼 *IgM*、*NKCC1*、*Hsp70* 3 个基因的表达量在不同盐度不同时间下存在差异, 由此推测这 3 个基因对红鳍东方鲀幼鱼的渗透压调节起重要作用。

关键词: 红鳍东方鲀; 实时荧光定量 PCR; *IgM*; *NKCC1*; *Hsp70*; 急性低盐胁迫

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)01-0065-08

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)属鲀形目(Tetraodontiformes), 鲀亚目(Tetraodontoidei), 鲀科(Tetraodontidae), 东方鲀属, 主要分布在中国的沿海、朝鲜半岛和日本的东海岸^[1], 因其肉质鲜美, 营养价值高, 深受人们喜爱, 在中国的北方地区、日本等地的养殖规模也逐渐扩大。红鳍东方鲀生活于近海底层, 为暖温性、广盐性底栖鱼类, 其适盐范围为 5~45, 最适盐度为 15~35^[2]。

广盐性鱼类能够适应广泛的盐度变化, 这种适应性主要通过机体的渗透压调节来实现^[3-4]。鳃和肾是鱼类渗透压调节的重要器官^[5-6]。研究表明, 许多基因参与了鱼类的渗透压调节过程, 比如, 囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)基因参与广盐性硬骨鱼舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)机体对水环境盐度变化

的应激反应和调节^[6]; 热休克蛋白 70(*Hsp70*)和 Na/K-ATPase 基因对不同盐度下的大西洋鳕(*Gadus morhua*)的渗透压调节起重要作用^[7]; 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)免疫球蛋白(*IgM*)基因在盐度变化时的表达差异情况表明, 该基因与盐度相关联^[8]; 钠钾氯协同转运蛋白(*NKCC*)基因在黑点青鲈鱼(*Oryzias dancena*)鳃中对盐度变化的响应表明, 该基因参与黑点青鲈鱼的渗透压调节^[9]。已有对红鳍东方鲀的抗盐胁迫相关基因的研究, 但仅局限于激素调节的基因^[5,10-11], 而对红鳍东方鲀应激、免疫和离子通道蛋白基因的研究却未见报道。本研究分别选取红鳍东方鲀幼鱼与应激(*Hsp70*)、免疫(*IgM*)和离子转运(*NKCC1*)相关的 3 个基因, 通过 qRT-PCR 技术研究 3 个基因在不同

收稿日期: 2016-04-01; 修订日期: 2016-06-09.

基金项目: 辽宁省教育厅一般项目(L2015076); 国家海洋局公益性行业科研专项(201405003); 大连海洋大学引进人才启动项目(HDYJ201501); 农业部北方海水养殖重点实验室开放课题(2015-MSENC-KF-04).

作者简介: 孙梦蕾(1992-), 女, 硕士生, 研究方向为鱼类生物学. E-mail: sunmenglei512@163.com

通信作者: 蒋洁兰(1984-), 女, 实验师, 研究方向为鱼类抗逆性的分子基础. E-mail: jielanjiang@dlou.edu.cn

组织和不同盐度处理条件下的表达情况,探讨 3 个基因的表达与盐度变化的关系。此结果可丰富红鳍东方鲀的生理生态学理论,以期为揭示红鳍东方鲀的渗透压调节的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设计

实验所用红鳍东方鲀幼鱼购自大连天正实业有限公司,平均体长为 (7.18 ± 0.34) cm,平均体重为 (11.34 ± 2.13) g,于大连海洋大学北方海水增殖重点实验室暂养 7 d。实验用水为净化处理的天然海水(盐度平均为 32)和与曝气后自来水配制成的低盐度海水,容器为 200 L 的方形水槽,水温 $(25.03 \pm 0.42)^\circ\text{C}$,24 h 连续充气。

设计 5 个盐度梯度,分别为 32(对照组)、16、12、8、4,每个盐度设置 3 个平行,从暂养的红鳍东方鲀幼鱼中选取大小相似、体格健康的个体进行实验,每个盐度组 30 尾鱼,即每个方形槽中放入 10 尾幼鱼,放入后立即开始计时,分别在 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 取样,每个时间点每个盐度组取 6 尾幼鱼,麻醉后取其鳃和肾,液氮速冻,之后保存于 -80°C 冰箱中备用。

1.2 主要试剂

动物组织总 RNA 提取试剂盒(DP431)购于天根生化科技有限公司;DNA 酶 I(无 RNA 酶)、反转录试剂盒(PrimerScriptTM RT Reagent kit)购于大连宝生物工程有限公司;Marker (DL2000)、FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)购自大连万泽有限公司;荧光定量 PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

根据天根生物公司的动物组织总 RNA 提取试剂盒说明,提取不同盐度处理下的红鳍东方鲀幼鱼的组织总 RNA,取 4 μL 进行 1.0%(W/V)的琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 的完整性;取 2 μL 用于微量分光光度计(上海光谱仪器有限公司 754 型)测定浓度, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.9~2.1 区间内的 RNA 可进行反转录反应。根据 PrimerScriptTM RT Reagent kit(大连宝生物工程有限公司)试剂盒说明,以 20 μL 体系对 1 μg 总 RNA 进行反转录反应

合成 cDNA 第一条链,反转录体系:5 $\times$ PrimeScript Buffer (for Real Time) 4 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL , Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Random 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 总 RNA 1 μg , RNase Free dH_2O 定容至 20 μL 。条件为 37°C 、15 min, 85°C 、5 s,反应结束后分装并于 -20°C 保存。

1.4 荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达差异

根据 NCBI 中已报道的红鳍东方鲀的 *IgM* (AB125609.1)、*NKCC1* (XM_003965043.2)、*Hsp70* (XM_011603752.1)和 β -actin (XM_003964421) 的基因序列,应用 Primer Premier 5.0 设计荧光定量引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,用普通 PCR 筛选出条带单一且无二聚体的引物,然后通过荧光定量 PCR 检测引物的特异性,挑选条带单一且特异性好的引物(表 1)进行荧光定量 PCR 实验。以不同盐度下红鳍东方鲀幼鱼鳃和肾的 cDNA 为未知样品模板,以 β -actin 为内参基因,检测 *Hsp70*、*IgM* 和 *NKCC1* 基因的相对表达量。荧光定量 PCR 反应体系:SYBR Green Master (Rox) 10 μL , 上、下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μL , cDNA 模板 1 μL , 阴性对照以等量的 RNase Free dH_2O 代替,最后补充 RNase Free dH_2O 至 20 μL ,每个样品设 3 个平行。反应程序如下: 95°C 、10 min; 95°C 、15 s, 60°C 、1 min,共 40 个循环,在最后一个循环结束后作熔解曲线。基因的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算^[12],结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示,运用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行单因素方差分析,差异显著的进行多重比较分析,当 $P < 0.05$ 时认为实验结果差异显著。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列
Tab. 1 The sequences of primers for real-time PCR

引物 primer	序列 (5'-3') sequence (5'-3')	片段长度/bp fragment length
qIgM-F	GTCATCATCAATCCCAAGC	112
qIgM-R	CCTCGTCCTCCCAACCAAT	
qNKCC1-F	TGACTGGAGGGATGTTGA	134
qNKCC1-R	CTTGTCCTTGGATGTGGG	
qHsp70-F	AGAGCCATCCAAATCAACC	157
qHsp70-R	GGACCTCCTTCAGCATTG	
β -actin-F	ATCCGTAAGGACCTGTATGC	148
β -actin-R	AGTATTTACGCTCAGGTGGG	

2 实验结果

2.1 *IgM*、*NKCC1*、*Hsp70* 基因在红鳍东方鲀幼鱼不同组织中的表达

3 个盐度相关基因(*IgM*、*NKCC1*、*Hsp70*)在红鳍东方鲀幼鱼的肾和鳃中均有表达(图 1)。以肾中的表达量作为基准 1, 由图 1 可看出, *IgM* 基因在两个组织中的表达量无显著差异($P>0.05$), 但可明显看出鳃中 *IgM* 的表达量相对较少; *NKCC1* 基因在鳃中的表达量大, 显著高于肾中的表达量, 是肾中表达量的 13.80 倍($P<0.05$); *Hsp70* 基因在肾和鳃中的表达差异亦不显著($P>0.05$)。

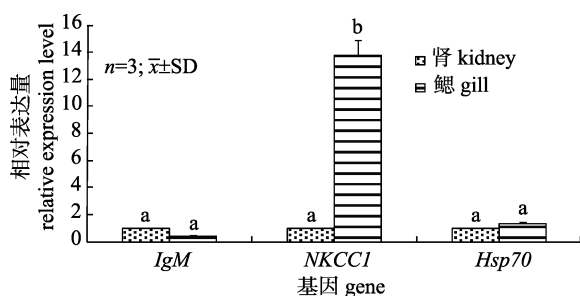


图 1 红鳍东方鲀幼鱼 3 个盐度相关基因在鳃和肾中相对表达量

不同字母表示鳃和肾两组组织间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 1 Expression of three salinity related genes in gill and kidney of *Takifugu rubripes*

Different letters denote significant differences between gill and kidney ($P<0.05$).

2.2 低盐胁迫后红鳍东方鲀幼鱼中 *IgM* 基因的表达

利用荧光定量 PCR 方法分析不同盐度胁迫下红鳍东方鲀鳃和肾中 *IgM* 基因的表达情况, 结果如图 2 所示。在鳃中(图 2a), 随着时间的增加, 不同盐度下的 *IgM* 基因表达量的增减趋势不同, 盐度 16 和盐度 8 的表达量先降低后升高, 在 12 h 的表达量显著低于 0 h, 达到最低值($P<0.05$), 盐度 8 在 48 h 的表达量显著高于 0 h($P<0.05$), 盐度 12 和盐度 4 的表达量变化幅度不大。在同一时间点, 3 h 时盐度 8 的表达量与对照组差异显著, 是对照组的 2.39 倍($P<0.05$); 12 h 开始, 同一时间点内各低盐度组的表达量与对照组差异显著性增强, 尤其盐度 16 和盐度 8 两组与对照组的差异更为显著($P<0.05$)。

在肾中(图 2b), 同一盐度下, 随着时间的增加, *IgM* 基因除了在盐度 8 的 6 h 的表达量略高于 0 h 外, 其余低盐度组的表达量均低于 0 h 的表达水平。3 h 时各盐度组的表达量骤然下降, 之后有所回升, 但各低盐度组表达量与在鳃中相比变化幅度不大。在同一时间点内, 仅在 6 h 和 12 h 两个时间点内盐度 8 的表达量显著高于对照组($P<0.05$), 分别是对照组的 1.99 倍和 1.67 倍。

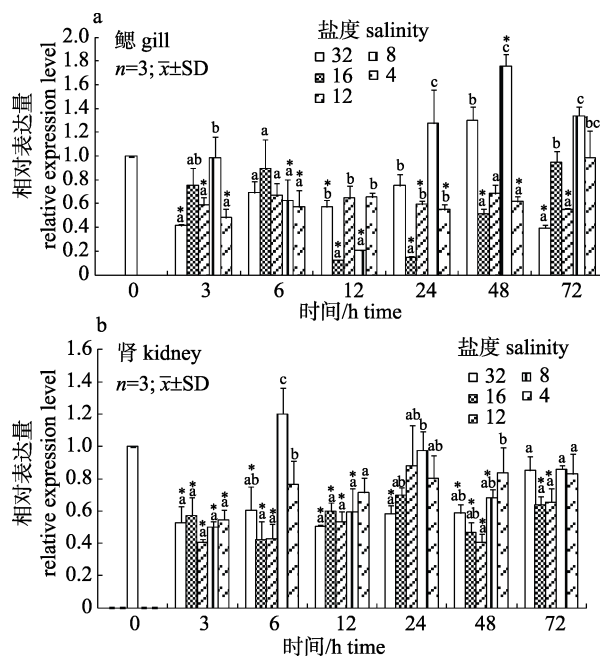


图 2 不同盐度胁迫下红鳍东方鲀幼鱼 *IgM* 基因在鳃(a)和肾(b)中相对表达量

*表示同一盐度不同时间与 0 h 间的差异显著($P<0.05$); 不同字母表示同一时间不同处理组之间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 2 Relative expression level of *IgM* gene in gill (a) and kidney (b) of *Takifugu rubripes* under different salinity

* denotes significant differences between different experiment time and 0 hour within the same salinity ($P<0.05$). Different letters denote significant differences between different treatment groups at the same time ($P<0.05$).

2.3 低盐胁迫后红鳍东方鲀幼鱼中 *NKCC1* 基因的表达

不同低盐胁迫下红鳍东方鲀幼鱼鳃和肾中 *NKCC1* 基因的表达情况见图 3。在鳃中(图 3a), 盐度 16、8 两组的表达量呈升高-降低-升高-降低趋势, 均在 48 h 达到最大值, 是 0 h 表达量的 1.89 倍($P<0.05$)和 1.57 倍($P<0.05$); 盐度 12 的 *NKCC1* 基因表达量逐渐升高; 而盐度 4 的表达量呈降低-升高-降低趋势, 在 72 h 达到最低, 比 0 h 低 4.67

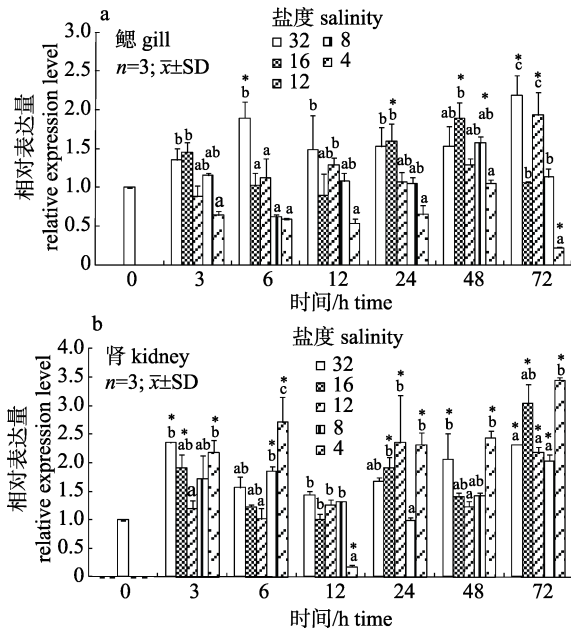


图 3 不同盐度胁迫下红鳍东方鲀幼鱼 *NKCC1* 基因在鳃(a)和肾(b)中的相对表达量

* 表示同一盐度不同时间与 0 h 间的差异显著 ($P<0.05$); 不同字母表示同一时间不同处理组之间差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 3 Relative expression level of *NKCC1* gene in gill (a) and kidney (b) of *Takifugu rubripes* under different salinity * denotes significant differences between different experiment time and 0 hour within the same salinity ($P<0.05$). Different letters denote significant differences between different treatment groups at the same time ($P<0.05$).

倍 ($P<0.05$). 在同一时间点内, 与对照组相比各低盐度组的 *NKCC1* 基因的表达量减少, 48 h 无显著差异 ($P>0.05$), 其余时间点内低盐度组与对照组出现差异性, 尤其 6 h 和 72 h 差异性较为显著 ($P<0.05$).

由图 3b 可看出, 在肾中, 同一盐度下, 随着时间的增加, *NKCC1* 基因表达量与 0 h 相比大都显著升高 ($P<0.05$), 大致呈现升高-降低-升高的趋势, 72 h 时 5 个盐度组的表达量显著高于 0 h 表达量 ($P<0.05$), 达到最大值。在同一个时间点内, 24 h 各低盐度组的表达量与对照组相比无显著性差异 ($P>0.05$), 其余时间点内均有不同程度的差异, 例如, 3 h 和 48 h 盐度 12 组的表达量明显低于对照组 ($P<0.05$), 6 h 和 72 h 盐度 4 组的表达量显著高于对照组 ($P<0.05$), 12 h 盐度 4 组的表达量显著低于对照组 ($P<0.05$), 比对照组低 8.25 倍。

2.4 低盐胁迫后红鳍东方鲀幼鱼中 *Hsp70* 基因的表达

利用荧光定量 PCR 方法分析不同低盐胁迫下

的红鳍东方鲀鳃和肾中 *Hsp70* 基因的表达情况, 结果如图 4 所示。在鳃中(图 4a), 盐度 16 组在 3 h 的表达量急剧增加, 是 0 h 的 2.55 倍 ($P<0.05$), 盐度 12、8、4 组的表达量在 12 h 之前趋于平缓, 之后开始减少, 其中盐度 8 组在 48 h 和盐度 4 在 72 h 的表达量显著低于 0 h ($P<0.05$)。同一时间点内, 与对照组相比, 不同低盐度组 *Hsp70* 基因的表达量均有不同程度的增加, 增加程度在不同时间点有所差异, 3 h、6 h、24 h、72 h 各低盐度组的表达量均与同一时间对照组之间差异明显, 24 h 差异最大。

在肾中(图 4b), 同一盐度下, 随着时间的增加, *Hsp70* 基因的表达量增加趋势较鳃中明显。盐度 12 组在 24 h 时达到最大值, 是 0 h 的表达量的 1.88 倍 ($P<0.05$); 盐度 8 组和盐度 4 组分别在 6 h 和 24 h 的表达量显著高于 0 h ($P<0.05$)。在同一时间点内, 3 h 各低盐度组 *Hsp70* 基因的表达量与对

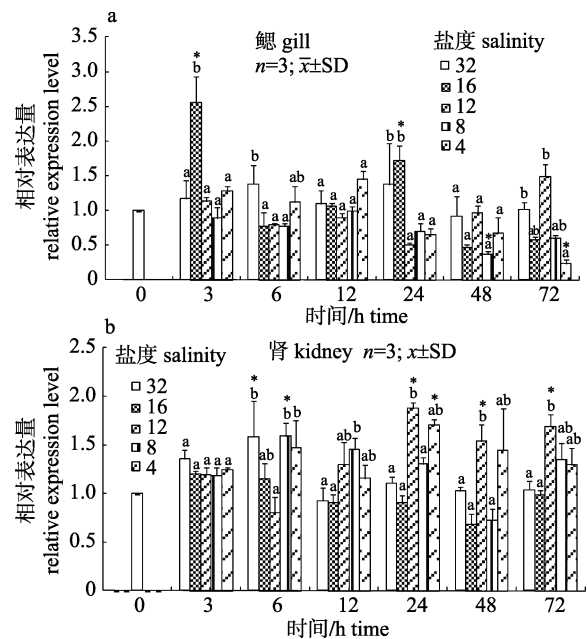


图 4 不同盐度胁迫下红鳍东方鲀幼鱼 *Hsp70* 基因在鳃(a)和肾(b)中的相对表达量

*表示同一盐度不同时间与 0 h 间的差异显著 ($P<0.05$); 不同字母表示同一时间不同处理组之间差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 4 Relative expression level of *Hsp70* gene in gill (a) and kidney (b) of *Takifugu rubripes* under different salinity * denotes significant differences between different experiment time and 0 hour within the same salinity ($P<0.05$). Different letters denote significant differences between different treatment groups at the same time ($P<0.05$).

照组无显著性差异($P>0.05$), 6 h 后差异明显, 其中 6 h 盐度 12 组的表达量显著低于对照组($P<0.05$), 12 h 之后, 相同时间点内不同低盐组的表达量大都高于对照组, 12 h 盐度 8 组的表达量显著高于对照组($P<0.05$), 24 h, 盐度 4 明显高于所对应时间内的对照组的表达量($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 低盐胁迫对红鳍东方鲀幼鱼 *IgM* 基因的影响

免疫球蛋白是免疫系统的重要组成部分, 免疫球蛋白 *IgM* 是鱼类重要的抗体分子成员之一, 在抵抗致病菌、调节病理方面起重要作用, *IgM* 被认为是免疫系统发育的重要标记基因^[13-14]。本研究结果显示, 在红鳍东方鲀幼鱼的鳃中, 盐度胁迫实验开始后, 包括对照组在内的各盐度组的 *IgM* 基因的表达量均有下降的趋势, 尤其在 12 h 时, 盐度 16 组和盐度 8 组两组的表达量降到最低, 在肾组织中同样是实验开始后各盐度组幼鱼的 *IgM* 基因表达量骤然下降, 这与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的研究结果一致^[8], 推测是幼鱼进入新环境后, 无法快速适应, 因此其免疫能力有所降低。12 h 后鳃中 *IgM* 基因的表达量有所上调, 体现出幼鱼机体正逐渐增强自身的免疫力以适应新的环境。在相同时间内, 自 12 h 开始不同低盐度组的 *IgM* 基因表达量与对照组呈现不同程度的差异, 表明不同低盐胁迫下幼鱼体内的免疫应答能力不尽相同。在肾中, 低盐度组 *IgM* 基因的表达量从 6 h 开始有所上升, 24 h 后盐度 4 组的表达量比较平稳, 其余 3 个低盐组 *IgM* 基因表达量先降低后上升, 但变化幅度不大, 表明幼鱼慢慢适应周围的低盐度水环境, 免疫力趋于稳定。鳃和肾中的 *IgM* 基因表达量的变化不同, 肾组织中较平缓, 而鳃中的变化幅度较大, 且肾中同一时间内低盐度组与对照组的差异也小于鳃组织。红鳍东方鲀幼鱼鳃和肾中 *IgM* 基因表达量的差异说明不同组织对盐度的响应不同, 鳃和肾都是渗透压调节的重要器官, 但鳃与周围水环境直接接触, 能在第一时间感知水环境的改变^[15], 也就导致鳃中基因的表达量变化幅度高于肾。

3.2 低盐胁迫对红鳍东方鲀幼鱼 *NKCC1* 基因的影响

NKCC 是溶质载体家族 12(SLC12A)的成员之一, 是一类存在于上皮细胞的电中性跨膜转运蛋白, 可同时转运 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- , 包括分泌型(NKCC1)和吸收型(NKCC2)两种亚型^[9, 16-17]。低盐度情况下, 鱼类体内的 Na^+ 、 Cl^- 含量低于水体, 高盐度情况下, 鱼类体内的 Na^+ 、 Cl^- 含量高于水体, 因此机体运用主动运输的方式通过氯细胞基底膜上的 NKCC 蛋白和 Na^+/K^+ -ATP 酶调节机体内部离子浓度, 从而平衡鱼类体内外的渗透压^[18]。已有研究报道, 莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)的 *NKCC1a* 基因在不同组织中有差异表达, 尤其在鳃中表达量最高^[19]。本研究中, 相同时间内低盐胁迫下的红鳍东方鲀幼鱼鳃中的 *NKCC1* 基因的相对表达量与对照组相比减少, 这与‘吉丽’罗非鱼[尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, ♀)×萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*, ♂)]、欧洲鳗鱼(*Anguilla anguilla*)、条纹鲈(*Morone saxatilis*)的结果一致^[20-22], 主要原因是红鳍东方鲀属广盐性硬骨鱼类, 在正常海水中通过大量吞饮海水并由鳃和肾排出大量的离子来维持体内的低渗透压, 而到了低盐情况下, 鱼类体内渗透压与水环境的渗透压差距缩小, 因此无需饮入大量海水来维持体内渗透压, 也就无需排出大量的离子, 从而使得鱼类鳃中的氯细胞在低盐度环境中数量减少, 上皮细胞的 NKCC1 转运蛋白减少, 调控 NKCC1 蛋白的基因表达量降低。3 h 后, 不同低盐度组的幼鱼 *NKCC1* 基因的表达量呈现不同程度的上调趋势, 说明幼鱼逐渐开始对低盐刺激做出应答, *NKCC1* 基因的表达量增加。在肾中, 除盐度 4 组在 12 h 时显著低于初始 0 h 的表达量外, 各个盐度下各个时间点的表达量基本都高于 0 h 表达量, 且无一定的规律性, 因此 *NKCC1* 基因的表达量与时间长短无关。在相同时间内, 与对照组相比, 除了盐度 12 组在 3 h 的表达量显著低于对照组外($P<0.05$), 盐度 16、盐度 12 和盐度 8 组与对照组无显著性差别($P>0.05$), 而盐度 4 组则基本都有高量的表达, 这种表达量的变化可能因为肾中基因表达的调控机制与鳃不同, 也有可能蛋白酪

氨酸激酶或环嘌呤核苷酸依赖的激酶降低了 NKCC1 对渗透压的敏感性有关^[19]。

3.3 低盐胁迫对红鳍东方鲀幼鱼 *Hsp70* 基因的影响

在环境胁迫如缺氧、重金属离子、盐度变化、温度变化下,生物体自身会做出一定的响应^[23]。*Hsp* 家族常作为重要的标志物,在环境胁迫下其表达会发生显著变化。研究发现,在急性盐度胁迫下, *Hsp70* 和 *Hsp90* 基因呈上调表达^[24-27]。而 *Hsp70* 作为 *Hsp* 家族的重要成员之一,在调节环境影响下生物机体的动态平衡上发挥重要的作用^[14, 28-29], *Hsp70* 基因编码的蛋白不仅能防止未折叠的蛋白变性,还可与变性蛋白和异常蛋白结合,减少对细胞的损害^[23]。本实验中,低盐胁迫后,相对于同一时间的对照组来说, *Hsp70* 基因的表达量在不同低盐胁迫组均有不同程度的增加,增加程度在不同时间点有所差异,有可能是在不同低盐度下,红鳍东方鲀幼鱼对盐度的响应时间不同,同时也说明 *Hsp70* 基因参与红鳍东方鲀幼鱼的盐度调节适应机制,进而增强幼鱼对低盐的适应性。随着时间的增加,盐度 16 组的红鳍东方鲀幼鱼鳃中 *Hsp70* 基因的表达量在盐度胁迫后 3 h 时骤然增加,而其他低盐度组却未有显著变化,说明在盐度 16 胁迫下红鳍东方鲀幼鱼鳃的响应较强烈。在肾中,盐度胁迫后 3 h 各低盐度组 *Hsp70* 基因的表达量都有所升高,说明在肾组织中, *Hsp70* 基因对盐度的响应更为明显,从而提高红鳍东方鲀幼鱼对盐度胁迫的适应能力。6 h 开始,不同低盐度组的 *Hsp70* 基因表达量升高降低趋势不同;12 h 之后,相同时间点内不同低盐组的表达量大都高于对照组,推测在不同的低盐胁迫下,幼鱼对盐度的适应能力不同,有可能因为调节机制的不同,此机制有待进一步的研究。

以上结果表明,红鳍东方鲀幼鱼 *IgM*、*NKCC1* 和 *Hsp70* 基因的表达对盐度变化的响应不同,说明这 3 个基因参与红鳍东方鲀幼鱼的渗透压调节过程并发挥重要作用,本实验结果可为进一步研究红鳍东方鲀的渗透压调节机制提供基础材料。

参考文献:

[1] Wang K Q, Chen M, Gao T X. Study on taxonomy and fauna

of *Takifugu*[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, 31(6): 855-860. [王奎旗, 陈梅, 高天翔. 东方鲀属鱼类的分类与区系分布研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(6): 855-860.]

- [2] Ma A J, Li W Y, Wang X A. Research progress and outlook of *Takifugu rubripes* culture techniques[J]. Marine Sciences, 2014, 38(2): 116-121. [马爱军, 李伟业, 王新安. 红鳍东方鲀养殖技术研究现状及展望[J]. 海洋科学, 2014, 38(2): 116-121.]
- [3] Shi Z H, Huang X X, Fu R B, et al. Salinity stress on embryos and early larval stages of the pomfret *Pampus punctatissimus*[J]. Aquaculture, 2008, 275(1-4): 306-310.
- [4] Tong Y, Chen L Q, Zhuang P, et al. Cortisol, metabolism response and osmoregulation of juvenile *Acipenser schrenckii* to ambient salinity stress[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(z1): 38-44. [童燕, 陈立侨, 庄平, 等. 急性盐度胁迫对施氏鲟的皮质醇、代谢反应及渗透调节的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(z1): 38-44.]
- [5] Lee K M, Kaneko T, Kato F, et al. Prolactin gene expression and gill chloride cell activity in fugu *Takifugu rubripes* exposed to a hypoosmotic environment[J]. Gen Comp Endocrinol, 2006, 149(3): 285-293.
- [6] Bodinier C, Nebel C L, Charmantier G, et al. Influence of salinity on the localization and expression of the CFTR chloride channel in the ionocytes of juvenile *Dicentrarchus labrax* exposed to seawater and freshwater[J]. Comp Biochem Physiol, 2009, 153(3): 345-351.
- [7] Larsen P F, Nielsen E E, Meier K, et al. Differences in salinity tolerance and gene expression between two populations of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) in response to salinity stress[J]. Biochem Genet, 2012, 50(5-6): 454-466.
- [8] Huang Z H, Ma A J, Wang X A, et al. Interaction of temperature and salinity on the expression of immunity factors in different tissues of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* based on response surface methodology[J]. Chin J Oceanol Limnol, 2015, 33(1): 28-36.
- [9] Kang C K, Tsai H J, Liu C C, et al. Salinity-dependent expression of a Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter in gills of the brackish medaka *Oryzias dancena*: A molecular correlate for hyposmoregulatory endurance[J]. Comp Biochem Physiol, 2010, 157(1): 7-18.
- [10] Lee K M, Kaneko T, Aida K. Prolactin and prolactin receptor expressions in a marine teleost, pufferfish *Takifugu rubripes*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2006, 146(3): 318-328.
- [11] Motohashi E, Hasegawa S, Mishiro K, et al. Osmoregulatory responses of expression of vasotocin, isotocin, prolactin and growth hormone genes following hypoosmotic challenge in a

- stenohaline marine teleost, tiger puffer (*Takifugu rubripes*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2009, 154(3): 353–359.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [13] Su B, Wang D, Liu H B. Research advances in immunoglobulin classification and diversity mechanism in fish[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2013, 26(1): 60–64. [宿斌, 王荻, 刘红柏. 硬骨鱼类免疫球蛋白分类及多样性产生机制研究进展[J]. *水产学杂志*, 2013, 26(1): 60–64.]
- [14] Lü A J, Hu X C, Zhang Y H, et al. Several new immunoglobulins in fish[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(7): 425–428. [吕爱军, 胡秀彩, 张艳华. 鱼类中新发现的免疫球蛋白[J]. *水产科学*, 2011, 30(7): 425–428.]
- [15] Yu N, Li J E, Ou Y J, et al. Structural changes in gill and kidney of juvenile grey mullet under different salinity[J]. *Ecological Science*, 2012, 31(4): 424–428. [于娜, 李加儿, 区又军, 等. 不同盐度下鲮鱼幼鱼鳃和肾组织结构变化[J]. *生态科学*, 2012, 31(4): 424–428.]
- [16] Gamba G. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation chloride cotransporters[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(2): 423–493.
- [17] Hebert S C, Mount D B, Gamba G. Molecular physiology of cationcoupled Cl^- cotransport: the SLC12 family[J]. *Pflügers Arch*, 2004, 447(5): 580–593.
- [18] Marshall W S, Grosell M. Ion transport, osmoregulation, and acidbase balance[M]//Evans D H, Claiborne J B. *The Physiology of Fishes*. Boca Raton: CRC Taylor and Franis, 2006: 177–230.
- [19] Inokuchi M, Hiroi J, Watanabe S, et al. Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1a in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2008, 151(2): 151–158.
- [20] Wang B, Fan W J, Li S F. Tissue-specific changes of *NKCC1a* mRNA expression by salinity in “GILI” tilapia[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 515–522. [王兵, 范武江, 李思发. 不同盐度下“吉丽”罗非鱼(尼罗罗非鱼♀×萨罗罗非鱼♂) *NKCC1a* mRNA 的组织特异性表达[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(3): 515–522.]
- [21] Cutler C P, Cramb G. Two isoforms of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1566(1–2): 92–103.
- [22] Tipsmark C K, Madsen S S, Borski R J. Effect of salinity on expression of branchial ion transporters in striped bass (*Morone saxatilis*) [J]. *J Exp Zool A: Comp Exp Biol*, 2004, 301(12): 979–991.
- [23] Wang Y N, Wang H, Luo M M, et al. Effects of simultaneous variation in temperature and salinity on the expression of mantle *Hsp70* gene in *Pinctada fucata* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2012, 32(3): 35–41. [王亚男, 王辉, 罗明明, 等. 温度、盐度对马氏珠母贝外套膜 *Hsp70* 基因表达量的联合影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2012, 32(3): 35–41.]
- [24] Deane E E, Kelly S P, Luk J C Y, et al. Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream [J]. *Mar Biotechnol*, 2002, 4(2): 193–205.
- [25] Fangue N A, Myriam H, Schulte P M. Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus* [J]. *J Exp Biol*, 2006, 209(15): 2859–2872.
- [26] Pan F, Zarate J M, Tremblay G C, et al. Cloning and characterization of salmon *hsp90* cDNA upregulation by thermal and hyperosmotic stress [J]. *J Exp Zool*, 2000, 287(3): 199–212.
- [27] Yang M W, Huang W T, Tsai M J, et al. Transient response of brain heat shock proteins 70 and 90 to acute osmotic stress in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. *Zool Stud*, 2009, 48(6): 723–736.
- [28] Feder M, Hofmann G. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology [J]. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61: 243–282.
- [29] Geething M J, Sambrook J. Protein folding in the cell [J]. *Nature*, 1992, 355(6355): 33–45.

***IgM*, *NKCC1*, and *Hsp70* gene expression in juvenile *Takifugu rubripes* under acute low-salinity stress**

SUN Menglei, Lü Huiqian, BAO Ning, SI Bin, CHEN Fei, WANG Liping, JIANG Jielan

Key Laboratory of Fish Applied Biology and Aquaculture in North China, Liaoning Province; Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture; Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: *Takifugu rubripes* is a popular food in China, Japan, and Korea because of its fresh meat and high nutritional value. In recent years, desalination marine fish farming has aroused interest, and *T. rubripes* is a marine model organism for studying low-salinity aquaculture because of its ability to tolerate a wide range of environmental salinities. This fish species has been used to explore the molecular mechanisms of osmoregulation in marine teleosts due to its small genome, and >95% of the genome has been sequenced. Studies have shown that *T. rubripes* can survive in hypo-osmotic conditions such as 10%–25% saltwater, but the fish does not survive in freshwater. Therefore, to investigate the molecular mechanism of low-salinity tolerance in *T. rubripes*, the expression of three genes, including immunoglobulin M (*IgM*), Na-K-Cl cotransporter 1 (*NKCC1*), and heat shock protein 70 (*Hsp70*) was analyzed using real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of the gill and kidney from juvenile *T. rubripes* under low-salinity stress. *T. rubripes* juveniles were divided randomly into five groups and maintained in water with salinities of 32 (control) 16, 12, 8, and 4 for 72 h. The results show that all three genes were expressed in gill and kidney. *IgM* and *Hsp70* expression levels were not different between the two tissues ($P>0.05$), but *NKCC1* expression level in the gill was significantly higher than that in the kidney ($P<0.05$). *IgM* expression decreased initially and then increased in the gill, whereas it decreased initially, increased, and finally tended to stabilize in the kidney in fish under acute low-salinity stress. More notable differences were detected in the gill between the low-salinity and control groups compared with those in the kidney at the same time points. *NKCC1* expression decreased in the gill but increased in the kidney under low-salinity stress, and *NKCC1* expression levels in the gill were higher at all time points than that at 0 h. *NKCC1* expression levels in the gill of fish in the low-salinity groups were significantly lower than those in the control group at 6 and 72 h ($P<0.05$). Significant differences in gill *Hsp70* expression levels were observed in the low-salinity groups at 3 h, 6 h, 24 h, and 72 h compared with those in the control. Changes in kidney *Hsp70* expression began at 6 h. Taken together, these results reveal that *IgM*, *NKCC1*, and *Hsp70* expression levels in the gill and kidney changed when juvenile *T. rubripes* were maintained in different salinities and for various durations. These results suggest that these three genes play an important role in the low-salinity tolerance of *T. rubripes* and provide basic data for clarifying the molecular mechanisms of osmoregulation in *T. rubripes*.

Key words: *Takifugu rubripes*; qRT-PCR; *IgM*; *NKCC1*; *Hsp70*; acute low-salinity stress

Corresponding author: JIANG Jielan. E-mail: jielanjiang@dlou.edu.cn