

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18392

急性拥挤胁迫对草鱼肌肉泛素-蛋白酶体系统活性的影响

熊梅¹, Kommaly Onxayvieng^{1,2}, 李大鹏¹, 王海珊¹, 梁骁¹, 汤蓉¹, 李莉¹, 张曦¹, 迟巍¹

1. 华中农业大学水产学院, 池塘健康养殖湖北省工程实验室, 水产养殖国家级实验教学示范中心, 湖北 武汉 430070;

2. Department of Livestock and Fisheries, Ministry of Agriculture and Forestry, Vientiane, Lao PDR

摘要: 泛素-蛋白酶体系统(the ubiquitin-proteasome system, UPS)是细胞内调节蛋白质代谢的重要系统。在水温(17.0±0.5)℃下, 将草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)暴露于 100 kg/m² 的养殖密度条件进行急性拥挤胁迫。在胁迫 0 h、1 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 以及取消胁迫后(养殖密度 10 kg/m²)的 6 h 和 168 h 采集血清和背部肌肉样品, 检测血清皮质醇水平、肌肉质构特性以及 *nrf2*、*hsp70* 和 UPS 相关基因表达, 并定量测定了肌肉组织泛素化蛋白水平。结果表明, 拥挤胁迫导致血清皮质醇含量显著上升, 肌肉硬度和凝聚性显著性下降, 以上各指标在取消胁迫后 168 h 恢复到对照水平, 弹性、胶黏性、咀嚼性和回复性在恢复 168 h 时反而高于对照组水平; *hsp70* 和 *nrf2* 的表达量在胁迫 48 h 时显著高于对照组, 后期恢复到对照水平; 肌肉 *ub*、*psma2*、*psmc1*、*mafbx* 和 *chip* 的 mRNA 表达量在胁迫过程中显著性上升, 胁迫后恢复 168 h, 还是表现出较高的表达量; 处理组泛素化蛋白水平在胁迫 6 h 和 12 h 时显著升高, 在恢复 168 h 时显著降低。研究表明, 急性拥挤胁迫使草鱼产生明显的应激反应, 对肌肉质构特性产生了显著性影响, 同时提高了肌肉 UPS 的活性。经过 168 h 的恢复, 鱼体逐渐恢复到正常生理水平, 但机体 UPS 活性仍呈现出被激活状态。急性拥挤胁迫对草鱼生理功能和肌肉质构特性的有害影响是可逆的, 建议恢复时间大于 168 h 以帮助鱼体重新建立 UPS 的稳态。

关键词: 草鱼; 拥挤胁迫; 应激; 肌肉品质; 泛素-蛋白酶体系统

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)03-0427-09

高密度养殖以及活鱼运输造成的拥挤胁迫是水产养殖中常见的应激因素^[1-2]。它通常会对鱼类的生长性能产生负面影响, 损害鱼类福利^[3-4]。蛋白质作为鱼体重要的营养物质, 同时是机体生命功能维持的必需物质基础, 其代谢受环境应激影响巨大^[5]。骨骼肌的发育生长决定了鱼类生长速度和肌肉品质^[6]。而肌肉的生长主要取决于其蛋白质代谢效率, 蛋白质合成和降解之间的平衡稳态是维持肌肉生长的重要基础^[7]。

泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome

system, UPS)是真核细胞内调节蛋白质降解的重要系统^[8]。该系统由泛素(Ub)、泛素活化酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素连接酶(E3)和 26S 蛋白酶体等组成^[9]。UPS 降解蛋白质是一个高度规范和具有时效性的过程, 其通过 E3 连接酶(carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein, CHIP)特异性地识别和降解细胞内受损的或错误折叠的蛋白质, 以调节细胞周期、凋亡、信号传递、应激应答、DNA 修复等生物学过程^[10]。泛素化是一个 ATP 依赖型的需能过程, 首先通过不同的 Ub 分

收稿日期: 2018-11-22; 修订日期: 2018-12-25.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670521); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-45); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2662015PY119).

作者简介: 熊梅(1993-), 硕士研究生, 从事鱼类环境生理学研究. E-mail: 1227191337@qq.com

通信作者: 李大鹏, 教授. E-mail: ldp@mail.hzau.edu.cn

子标记目标蛋白质,然后通过由 19S 和 20S 亚基共同组成的 26S 蛋白酶体复合物降解标记蛋白质为小肽或氨基酸^[11]。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)家族作为分子伴侣,参与受损蛋白质的修复过程,维持细胞内蛋白质代谢稳态^[12]。当受损蛋白质量超过了细胞修复能力,这些蛋白则通过 CHIP 被 UPS 降解。UPS 也调节着蛋白质的周转效率,进而对鱼类肌肉的生长起到一定的调控作用^[13]。以往的研究发现,鱼类的生长速度可能与 UPS 的活性存在相关性。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的特定生长率与肝 20S 蛋白酶体活性呈负相关^[14]。花狼鱼(*Anarhichas minor*)在低温条件下其肌肉 20S 蛋白酶体活性与机体生长速度存在负相关^[15]。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是中国淡水养殖规模最大和养殖产量最高的鱼类。慢性拥挤胁迫可引起草鱼的应激反应,造成非特异性免疫功能的降低^[16-17]。草鱼在慢性拥挤环境中也可做出 UPS 的适应性调整,低养殖密度环境中的草鱼具有更高的 UPS 活性和蛋白质周转率,以保障其较高的生长速度^[13]。面对急性拥挤环境,草鱼 UPS 是否也会如慢性应激一样,或是表现出不同的反应特性?而这种急性拥挤胁迫引起的 UPS 变化是否会影响草鱼肌肉质构特征的改变?本研究以草鱼幼鱼为实验对象,通过急性拥挤胁迫的暴露实验,研究急性拥挤胁迫对草鱼肌肉泛素-蛋白酶体系统活性以及对肌肉品质的影响。

1 材料与方法

1.1 实验鱼与实验设计

实验用草鱼,体重(56.88 ± 10.54) g,购自湖北省黄冈市团风县百容良种场,实验前暂养 1 周,24 h 持续充氧。草鱼养殖在玻璃水族缸(长 200 cm,宽 100 cm,水深 55 cm)中,养殖密度为 10 kg/m^2 。通过网栏将实验鱼区隔在一定的养殖空间内,形成高养殖密度,造成急性拥挤胁迫,胁迫密度为 100 kg/m^2 ;胁迫后撤掉网栏,恢复到初始养殖密度(10 kg/m^2);并设立非胁迫对照组。胁迫处理组和对对照组各设 3 个平行组。分别在胁迫 0 h、1 h、6 h、12 h、24 h、48 h 以及取消胁迫后恢复 6 h

和 168 h,采集实验鱼,用 MS-222 (200 mg/L)进行麻醉,每个时间点采集 9 尾。实验期间水温(17.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, pH 为 7.5 ± 0.3 , 24 h 连续曝气,溶氧保持在 7.0 mg/L 以上。

1.2 实验方法

1.2.1 血清皮质醇含量测定 血清皮质醇含量测定使用皮质醇放射性免疫试剂盒(北京北方生物技术有限公司)。通过 γ 放射免疫计数器(GC-911 型,科大创新股份有限公司)进行放射性测定,通过标准曲线求出各个样品的皮质醇含量,测定的批内变异系数小于 10%,批间变异系数小于 15%。

1.2.2 肌肉质构特性指标测定 为了反映肌肉品质的变化,胁迫期间和恢复期内的肌肉样品的硬度、弹性、凝聚力、胶黏性、咀嚼性和回复性得到检测。采集草鱼侧线与背鳍之间的背部肌肉组织,修剪成 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ 的方块,每尾鱼取 3 个平行样品进行测定。利用 TA.XT Plus 型物性测定仪(英国 Stable Micro Systems 公司),在 TPA 模式下对肌肉进行 2 次压缩,选用的探头是平底柱形探头 P/36。测试条件如下:样品压缩程度为 65%,测试前速率为 3 mm/s,测试速率 2 mm/s,测试后速率为 3 mm/s,负重探头为 Auto-5g,数据收集率为 200 pps,所有样品均在室温下测试。

1.2.3 UPS 相关基因表达水平检测 总 RNA 提取及 cDNA 合成:使用 Trizol(Vazyme)提取背部肌肉总 RNA,1.1%琼脂糖凝胶电泳中检测样品 RNA 完整性,并通过分光光度计法测定浓度。使用 gDNA Eraser (Perfect Real Time) PrimeScript RT (TaKaRa)试剂盒,根据说明书进行逆转录。

基因的引物设计:根据 GenBank 中相关基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,见表 1。选用 β -actin 为实时荧光定量 PCR 内参基因,引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。选取 *psma2*(20S proteasome subunit alpha type 2)和 *psmc1*(20S proteasome subunit ATPase 1)分别代表 26S 蛋白酶体的 20S 亚基和 19S 亚基。

实时定量 PCR:反应体系包括 $10 \mu\text{L}$ HieffTM qPCR SYBR[®] Green Master Mix(No Rox Plus)(YEASEN),上、下游引物各 $0.4 \mu\text{L}$, $7.2 \mu\text{L}$ 双蒸水, $2 \mu\text{L}$ cDNA 模板,在 Quant Studio 6 Flex

Real-Time PCR Detection System(Applied Biosystems, USA)上进行荧光定量反应。反应程序: 首先 95℃预变性 5 min, 再进行 95℃变性 10 s, 58℃退火 20 s, 72℃延伸 20 s, 循环 40 次。

表 1 实验所用引物序列
Tab. 1 Primers used in the study

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	产物大小/bp product size
β -actin	F: TGAAATTGCCGCACTGGTTG R: CTGAGCCTCGTCACCAACAT	169
nrf2	F: CGCTAACGCAAACCAACACA R: GGAGCTGCATGCATTCATCG	102
hsp70	F: CGTGGTGTTCCTCCAGATTGA R: CGCTGCACATCATCTTCAGC	194
chip	F: ACTGTAACACGCCCTCGAG R: CGTCTCCAAAATTCAGCCGC	156
ub	F: GCCAAGCGACACCATTGAG R: GGATGTTGTAGTCGGACAG	150
psma2	F: CAGGCCAGCTTGTTTCAGAGA R: TCCCAGCCAGCAATCAGAAG	100
psmc1	F: CGGCTGCTCTGTGTTACTGA R: ACTCTGGATGTGTGAGGGGA	191
mafbx	F: CGGACGAGATCTGGTTAGCC R: GCTTGCGGATCTGTCTGTCT	119
murfl	F:TGTCTATGGACTACAGAGGAA R:GGATTTCAAAAGGAGGTTCAAG	103

1.2.4 Dot-blot 测定泛素化蛋白含量 背部肌肉总蛋白提取使用 RIPA 裂解缓冲液(广州捷倍斯生物科技有限公司), 浓度由 BCA 蛋白试剂盒测定(广州捷倍斯生物科技有限公司)。使用 Dot-Blot 方法测定肌肉组织内泛素化蛋白含量。蛋白样品在 Bio-Dot[®] (Bio-Rad)中通过抽滤装置转移到硝化纤维素膜(NC 膜) (Millipore)。NC 膜首先在封闭液中孵育 1 h 以阻断非特异性结合, 然后由多聚泛素化蛋白抗体(FK1) (Biomol, BML-PW8805-0500) 4℃孵育过夜, 最后进行 FITC 标记的二抗(抗小鼠, BOSTER, BA1101)孵育。将 NC 膜通过 Odyssey CLx(LI-COR, CLx-0813)显影分析, 使用 Image J 读取各斑点灰度值, 进行相对定量分析。

1.3 数据统计及分析

基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, SPSS 19.0 统计分析软件对数据进行独立样本 t 检验和单因素方差分析(One-way ANOVA), 当 $P<0.05$ 时, 差异显著。使用 Graphpad PrismV 5.0 作图。

2 结果与分析

2.1 血清皮质醇水平

急性拥挤胁迫后, 草鱼的血清皮质醇水平发生了显著变化($P<0.05$, 图 1)。皮质醇含量在拥挤胁迫过程中逐渐升高, 在胁迫 12 h 达到最高峰(44.79 ng/mL), 在取消胁迫后的 168 h 恢复到对照组水平。

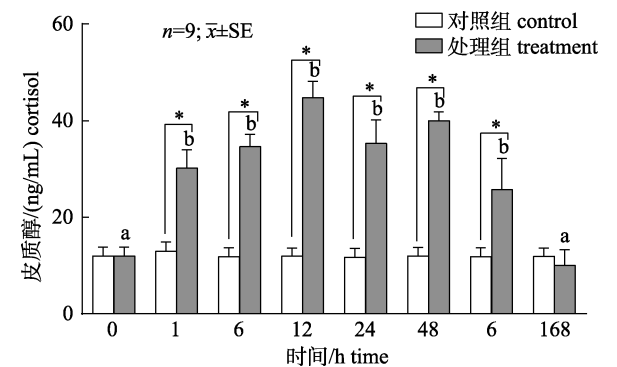


图 1 在急性拥挤胁迫以及恢复过程中草鱼血清皮质醇水平的变化

图中横坐标最后两个时间点 6 h 和 168 h 为胁迫后恢复时间。*表示同一时间内处理组与对照组比较有显著差异($P<0.05$); 不同字母表示同一处理组不同时间点之间有显著差异($P<0.05$)。

Fig. 1 Change in serum concentration of cortisol in *Ctenopharyngodon idellus* suffering from crowding stress and recovering from stress

The last two time-points, 6 h and 168 h, at the horizontal axis indicate the recovery time after acute crowding stress. The asterisk indicates significant differences between control and treatment group ($P<0.05$) at the same time. Different letters indicate significant differences at different time points in the same treatment group ($P<0.05$).

2.2 肌肉质构指标

急性拥挤胁迫后, 草鱼肌肉质构分析指标发生显著性变化($P<0.05$, 图 2)。与对照组相比, 拥挤胁迫后的草鱼肌肉硬度、凝聚力和咀嚼性显著降低。经过 168 h 的恢复, 各指标均有显著性回升, 硬度、凝聚力恢复到对照组水平, 弹性、胶黏性、咀嚼性和回复性均显著高于对照组水平($P<0.05$)。

2.3 Nrf2 和 hsp70 的表达

Nrf2 的表达量在胁迫 48 h 时显著高于对照组水平($P<0.05$, 图 3A), hsp70 含量在拥挤胁迫 12 h、

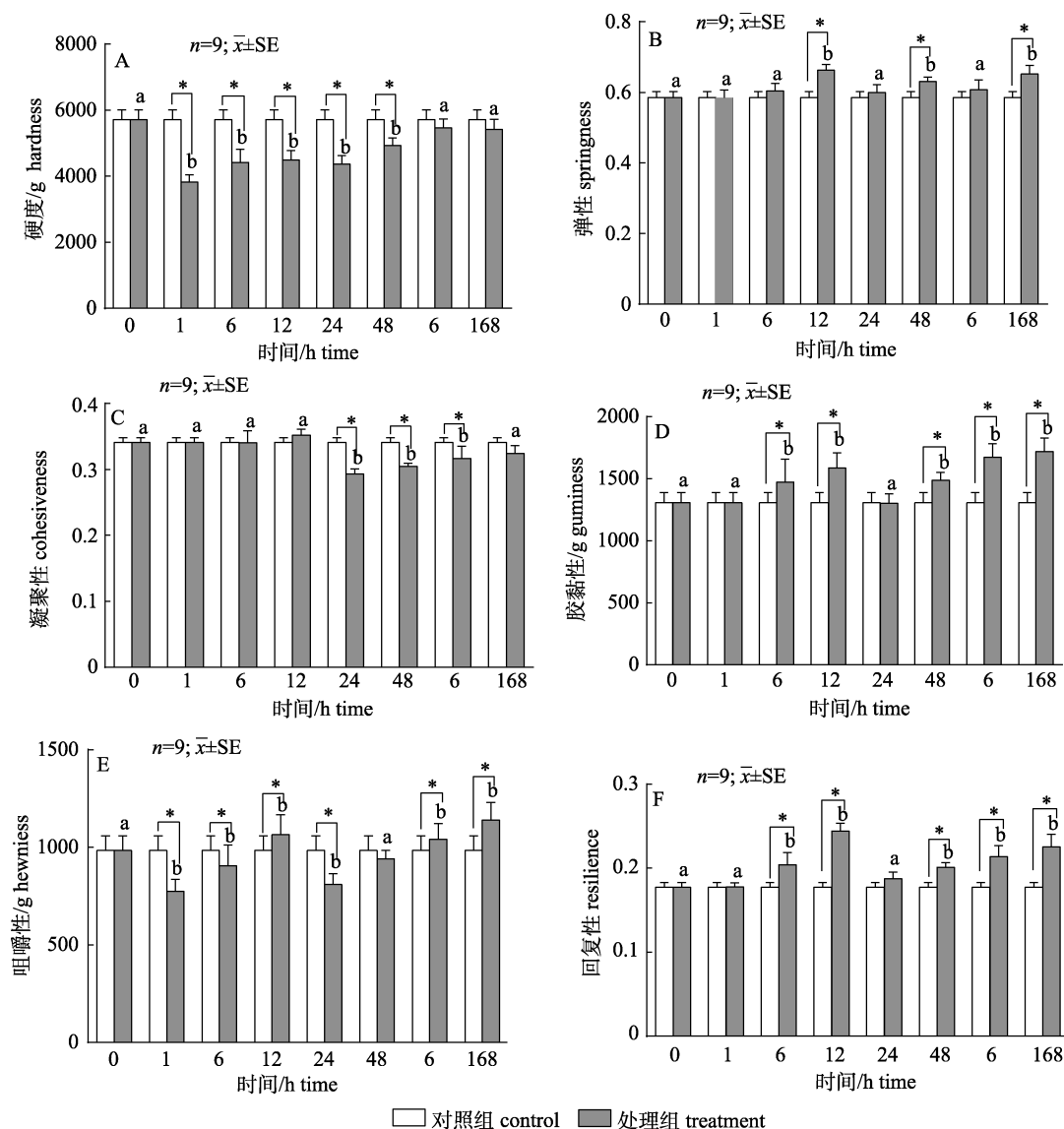


图 2 在急性拥挤胁迫以及恢复过程中草鱼肌肉质地特性指标的变化

图中横坐标最后两个时间点 6 h 和 168 h 为胁迫后恢复时间. *表示同一时间内处理组与对照组比较有显著差异 ($P < 0.05$); 不同字母表示同一处理组不同时间点之间有显著差异 ($P < 0.05$).

Fig. 2 Changes in the texture profiles of muscle in *Ctenopharyngodon idellus* suffering from crowding stress and recovering from stress

The last two time-points, 6 h and 168 h, at horizontal axis indicate the recovery time after acute crowding stress.

The asterisk indicates significant differences between control and treatment group ($P < 0.05$) at the same time.

Different letters indicate significant differences at different time points in the same treatment group ($P < 0.05$).

24 h 和 48 h 均显著高于对照组水平 ($P < 0.05$, 图 3B)。Nrf2 和 hsp70 表达量在取消胁迫后 6 h 时均恢复到对照组水平。

2.4 泛素蛋白酶体系统活性的检测

急性拥挤胁迫引起 UPS 相关基因表达量的改变。与对照组相比, 处理组 ub、psma2、psmc1、mafbox 和 chip 的表达量显著上调 ($P < 0.05$, 图 4),

在恢复期内也并未恢复到对照水平, 仍然表现出较高的表达量, murf1 在恢复 168 h 时显著低于对照组水平。拥挤胁迫 6 h 和 12 h, 草鱼肌肉泛素化蛋白含量显著升高 ($P < 0.05$, 图 5), 随后泛素蛋白水平与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), 在恢复 168 h 时, 处理组泛素蛋白含量反而显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

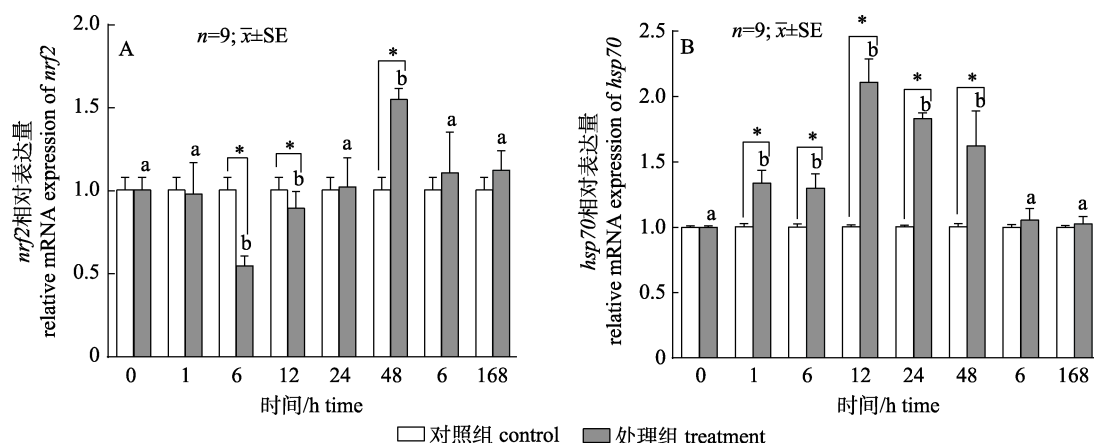


图3 在急性拥挤胁迫以及恢复过程中草鱼肌肉 *nrf2*、*hsp70* 相对表达量的变化
图中横坐标最后时间点 6 h 和 168 h 为胁迫后恢复时间. *表示同一时间内处理组与对照组比较有显著差异 ($P<0.05$); 不同字母表示同一处理组不同时间点比较有显著性差异 ($P<0.05$).

Fig. 3 Relative expressions of *nrf2* and *hsp70* in the muscle of *Ctenopharyngodon idellus* suffering from crowding stress and recovering from stress

The last two time-points, 6 h and 168 h, at horizontal axis indicate the recovery time after acute crowding stress.

The asterisk indicates significant differences between control and treatment group ($P<0.05$) at the same time.

Different letters indicate significant differences at different time points in the same treatment group ($P<0.05$).

3 讨论

鱼体暴露于应激因子时,会通过下丘脑-垂体-肾间组织轴调控生理机能,使肾间组织大量分泌皮质醇。血清皮质醇水平的升高被看作是鱼类应激的灵敏信号^[18]。草鱼受急性拥挤胁迫后,血清皮质醇浓度剧增,说明鱼体产生了强烈的应激反应。热休克蛋白通常被认为是细胞应激反应的生物标志物,参与细胞信号的传导^[19-20]。其中, HSP70 在几乎所有生物的应激细胞中都能够被高度诱导表达。虹鳟受拥挤胁迫后,机体通过 *hsp70* 的高表达量来传导应激信号^[21]。在该研究中,急性拥挤胁迫造成草鱼肌肉 *hsp70* mRNA 表达显著上调,表明鱼体受到胁迫后也诱导了细胞应激反应。此外, Nrf2 可与抗氧化反应元件(ARE)结合,激活氧化应激通路,启动下游蛋白酶体/分子伴侣(热休克蛋白泛素化系统)基因的转录和表达,拥挤胁迫后 *nrf2* 表达量的升高,表明草鱼正处于应激的“备战”状态^[22]。

细胞应激常常引起胞内蛋白质发生错误折叠,若受损蛋白质在体内聚集,这些非原生态的蛋白质会积累为对细胞有潜在危害的聚集体,干扰细胞正常功能^[23]。泛素-蛋白酶体系统作为真核生物中调节蛋白质降解和功能的重要系统,可以通

过降解或清除损伤严重的大分子蛋白来维持细胞的完整性^[24]。例如,南极绵鲷(*Pachycara brachycephalum*)在温度变化条件下,通过提高 UPS 活性来调节蛋白质稳态以适应新环境,维持细胞正常功能^[25]。当应激引起细胞蛋白质发生错误折叠时, HSP70 能够作为分子伴侣,参与细胞内受损蛋白质的修复,它的上调标志着应激状态下受损蛋白的积累^[12]。拥挤胁迫后,处理组 *hsp70* 表达量的显著性上升,表明拥挤引起的鱼类应激加剧了细胞蛋白质受损。当这些受损蛋白的量超过机体修复能力,重新折叠不成功时, Hsp70-底物复合物可以被 CHIP 识别,进而诱导该底物被多聚泛素化,使其被 UPS 降解。急性拥挤胁迫引起草鱼肌肉 *ub* 等表达量上升以及泛素化蛋白质的高表达,表明 UPS 活性在拥挤应激条件下得到增强。同时, MuRF1 和 MAFbx 作为两种 E3 连接酶^[26],被认为是骨骼肌蛋白质降解过程中的重要标记物,它们的高表达激活了多耙牙鲆(*Paralichthys adspersus*)骨骼肌中蛋白质的分解^[27]。因此, *mafxb* 和 *murfl* 在处理组中上升也表明拥挤胁迫使鱼体骨骼肌蛋白质降解加快。由此可以推测,急性拥挤应激使鱼体 UPS 被激活以维持细胞蛋白质稳态,调节机体蛋白质合成和降解的动态平衡以适应新环境变化。

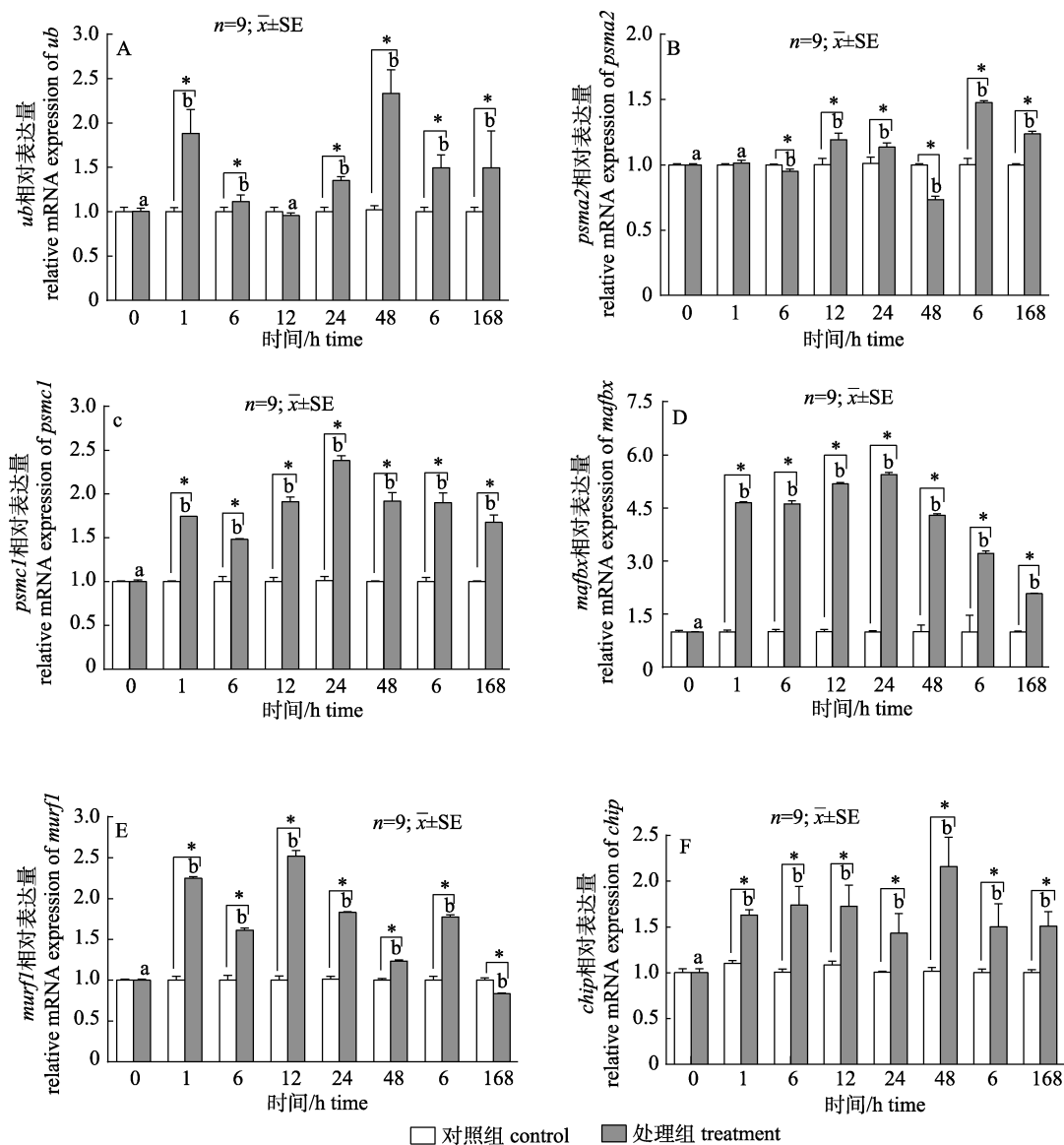


图 4 在急性拥挤胁迫以及恢复过程中草鱼肌肉 UPS 相关基因相对表达量的变化
图中横坐标最后时间点 6 h 和 168 h 为胁迫后恢复时间。*表示同一时间内处理组与对照组比较有显著差异($P<0.05$)；
不同字母表示同一处理组不同时间点比较有显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 4 Relative expressions of genes related to UPS in the muscle of *Ctenopharyngodon idellus* suffering from crowding stress and recovering from stress

The last two time-points, 6 h and 168 h, at horizontal axis indicate the recovery time after acute crowding stress.

The asterisk indicates significant differences between control and treatment group ($P<0.05$) at the same time.

Differen letters indicate significant differences at different time points in the same treatment group ($P<0.05$).

不同的泛素分子特异性地标记目标蛋白质，肌细胞骨架蛋白(如 actin, myosin 等)被 Ub 标记后，通过 26S 蛋白酶体降解成小肽段，这一过程破坏了肌细胞骨架天然结构^[28]。肌细胞骨架是肌细胞重要组成成分，维持着肌细胞的形态和功能，其改变往往会引起肌细胞的形态变化，进而影响肌肉组织的组成结构^[29]。研究表明，鲤(*Cyprinus*

carpio)在氧化应激条件下肌肉组织中肌纤维数量和结构的完整性的下降引起肌肉硬度的降低^[30]，说明肌肉组织的改变会影响肌肉的质构特性，从而影响肌肉品质。拥挤胁迫后，草鱼背肌硬度明显降低，肉质变软，这可能是由于胁迫应激使机体 UPS 活性升高，将较多泛素化细胞骨架蛋白降解为小肽，破坏了肌细胞结构和功能的完整性，

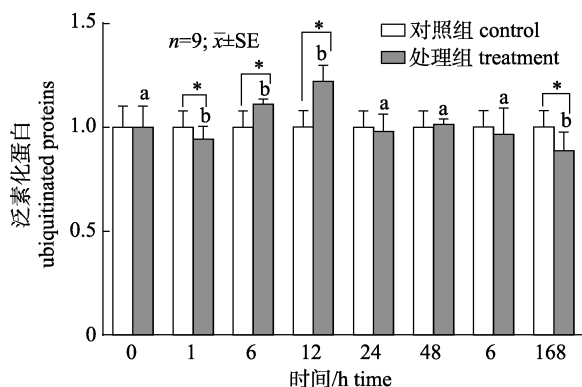


图 5 在急性拥挤胁迫以及恢复过程中

草鱼肌肉泛素化蛋白相对含量的变化

图中横坐标最后时间点 6 h 和 168 h 为胁迫后恢复时间。*表示同一时间内处理组与对照组比较有显著差异($P<0.05$); 不同字母表示同一处理组不同时间点比较有显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 5 Change in the relative content of ubiquitinated protein in the muscle of *Ctenopharyngodon idellus* suffering from crowding stress and recovering from stress

The last two time-points, 6 h and 168 h, at horizontal axis indicate the recovery time after acute crowding stress. The asterisk indicates significant differences between control and treatment group ($P<0.05$) at the same time. Different letters indicate significant differences at different time points in the same treatment group ($P<0.05$).

引起肌肉组织肌纤维数量和结构完整性的改变, 导致肌肉质构特性发生变化。恢复后期, 处理组草鱼背肌弹性和胶黏性等质构指标相比对照组反而上升, 可能是由于后期 UPS 还呈现活跃状态, 将更多被标记的泛素化蛋白质降解为小肽, 使肌肉弹性加强。此前 Van Hekken 等^[31]也证实, 小肽的出现导致干酪更软, 更具有弹性, 符合本研究的推测。胶黏性等上升则是肌肉细胞间凝聚力和弹性恢复的综合表现。

鱼体受到胁迫之后会调动一系列生理反应来重新建立稳态^[32]。恢复期间皮质醇水平的下降, 表明鱼体逐渐恢复到正常的生理状态。处理组泛素化蛋白质含量在恢复 168 h 时反而下降, 这可能是因为处理组 UPS 活性依然维持较高水平降解了更多的泛素化蛋白质, 也可能是胁迫处理组的蛋白质周转率降低, 蛋白质降解速度大于合成速度所致。

综上所述, 急性拥挤胁迫导致草鱼产生应激反应, 对其肌肉的质构特性产生了显著影响, 激活了泛素-蛋白酶系统清除损伤蛋白以降低细

胞应激的危害。解除胁迫因子后的短期时间内, 鱼体可以恢复到正常对照组水平, 但机体 UPS 生理机能依然呈现出活跃状态。

参考文献:

- [1] Refaey M M, Tian X, Tang R, et al. Changes in physiological responses, muscular composition and flesh quality of channel catfish *Ictalurus punctatus* suffering from transport stress[J]. Aquaculture, 2017, 478: 9-15.
- [2] Refaey M M, Li D P, Tian X, et al. High stocking density alters growth performance, blood biochemistry, intestinal histology, and muscle quality of channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. Aquaculture, 2018, 492: 73-81.
- [3] Li D P, Liu Z D, Xie C X. Effect of stocking density on growth and serum concentrations of thyroid hormones and cortisol in Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2012, 38(2): 511-520.
- [4] Lupatsch I, Santos G A, Schrama J W, et al. Effect of stocking density and feeding level on energy expenditure and stress responsiveness in European sea bass *Dicentrarchus labrax*[J]. Aquaculture, 2010, 298(3-4): 245-250.
- [5] Flick K, Kaiser P. Protein degradation and the stress response[J]. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2012, 23(5): 515-522.
- [6] Johnston I A, Bower N I, Macqueen D J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish[J]. Journal of Experimental Biology, 2011, 214: 1617-1628.
- [7] Valenzuela C A, Zuloaga R, Mercado L, et al. Chronic stress inhibits growth and induces proteolytic mechanisms through two different non-overlapping pathways in the skeletal muscle of a teleost fish[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2018, 314: 102-113.
- [8] Amm I, Sommer T, Wolf D H. Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2014, 1843(1): 182-196.
- [9] Rom O, Reznick A Z. The role of E3 ubiquitin-ligases MuRF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2016, 98: 218-230.
- [10] Arndt V, Rogon C, Höhfeld J. To be, or not to be—molecular chaperones in protein degradation[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007, 64: 2525.
- [11] Pickart C, Eddins M. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2004, 1695(1-3): 55-72.

- [12] Todgham A E, Crombie T A, Hofmann G E. The effect of temperature adaptation on the ubiquitin-proteasome pathway in notothenioid fishes[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2016, 220(3): 369-378.
- [13] Sun Y Q, Liang X, Chen J, et al. Change in ubiquitin proteasome system of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* reared in the different stocking densities[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 837.
- [14] Dobly A, Martin S A M, Blaney S C, et al. Protein growth rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is negatively correlated to liver 20S proteasome activity[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology*, 2004, 137(1): 75-85.
- [15] Lamarre S G, Blier P U, Driedzic W R, et al. White muscle 20S proteasome activity is negatively correlated to growth rate at low temperature in the spotted wolffish *Anarhichas minor*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76(7): 1565-1575.
- [16] Wang W B, Li A H, Wang J G, et al. Effects of crowding stress on non-specific immune function of grass carp[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(2): 139-144. [王文博, 李爱华, 汪建国, 等. 拥挤胁迫对草鱼非特异性免疫功能的影响[J]. *水产学报*, 2004, 28(2): 139-144.]
- [17] Li A H. Effects of crowding stress on plasma cortisol, blood glucose and ascorbic acid in liver of grass carp[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, 21(4): 384-386. [李爱华. 拥挤胁迫对草鱼血浆皮质醇、血糖及肝脏中抗坏血酸含量的影响[J]. *水生生物学报*, 1997, 21(4): 384-386.]
- [18] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 13-30.
- [19] Benarroch E E. Heat shock proteins: multiple neuroprotective functions and implications for neurologic disease[J]. *Neurology*, 2011, 76(7): 660-667.
- [20] Kirschke E, Goswami D, Southworth D, et al. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles[J]. *Cell*, 2014, 157(7): 1685-1697.
- [21] Yarahmadi P, Miandare H K, Fayaz S, et al. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress-and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 48: 43-53.
- [22] Dodson M, Redmann M, Rajasekaran N S, et al. Correction: KEAP1-NRF2 signalling and autophagy in protection against oxidative and reductive proteotoxicity[J]. *Biochemical Journal*, 2015, 469(3): 347-355.
- [23] Sherman M Y, Goldberg A L. Cellular defenses against unfolded proteins[J]. *Neuron*, 2001, 29(1): 15-32.
- [24] Cassidy A A, Saulnier R J, Lamarre S G. Adjustments of protein metabolism in fasting Arctic charr, *Salvelinus alpinus*[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0153364.
- [25] Todgham A E, Crombie T A, Hofmann G E. The effect of temperature adaptation on the ubiquitin-proteasome pathway in notothenioid fishes[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2017, 220(3): 369-378.
- [26] Bodine S C, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy[J]. *Science*, 2001, 294(5547): 1704-1708.
- [27] Fuentes E N, Ruiz P, Valdes J A, et al. Catabolic signaling pathways, atrogenes, and ubiquitinated proteins are regulated by the nutritional status in the muscle of the fine flounder[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(9): e44256.
- [28] Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy[J]. *EMBO Journal*, 2008, 27(8): 1266-1276.
- [29] Gao Q J, Li Z Z, Ma X D, et al. A review of skeletal muscle cytoskeletal proteins[J]. *Journal of Beijing Sport University*, 2005, 28(10): 1382-1385. [高前进, 李壮志, 马新东, 等. 骨骼肌细胞骨架蛋白研究综述[J]. *北京体育大学学报*, 2005, 28(10): 1382-1385.]
- [30] Li Y Q, Kong B H, Xia X F, et al. Effect of hydroxyl radical oxidation on emulsifying and gelation properties of myofibrillar protein[J]. *Food Science*, 2012, 33(9): 31-35. [李艳青, 孔保华, 夏秀芳, 等. 羟自由基氧化对鲤鱼肌原纤维蛋白乳化性及凝胶性的影响[J]. *食品科学*, 2012, 33(9): 31-35.]
- [31] Van Hekken D L, Tunick M H, Park Y W. Rheological and proteolytic properties of monterey jack goat's milk cheese during aging[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(17): 5372-5377.
- [32] Ramsay J M, Feist G W, Varga Z M, et al. Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress[J]. *Aquaculture*, 2009, 297(1-4): 157-162.

Effect of acute crowding stress on the ubiquitin-proteasome system in the muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

XIONG Mei¹, Kommaly Onxayvieng^{1,2}, LI Dapeng¹, WANG Haishan¹, LIANG Xiao¹, TANG Rong¹, LI Li¹, ZHANG Xi¹, CHI Wei¹

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education, Wuhan 430070, China;
2. Department of Livestock and Fisheries, Ministry of Agriculture and Forestry, Vientiane, Lao PDR

Abstract: The ubiquitin-proteasome system (UPS) is an important system for regulating protein degradation and function. In order to evaluate the effects of acute crowding stress on flesh quality and UPS in fish, we randomly distributed *Ctenopharyngodon idellus* (initial body weight: $56.88 \text{ g} \pm 10.54 \text{ g}$) into 6 aquarium tanks (length: 200 cm, wide: 100 cm, depth of water: 55 cm) at two stocking density (three replicates for each group). Water temperature (17.0 ± 0.5)°C, pH (7.5 ± 0.3) and dissolved oxygen (7.0 mg/L) were maintained at the same level in each group. Fish serum and muscle samples were collected at 0 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h after crowding stress as well as at 6 h and 168 h after the crowding stress was removed (treatment group stocking density changed from 100 kg/m^2 to 10 kg/m^2). The serum cortisol, muscle texture, the mRNA expressions of *nrf2* and *hsp70*, and genes related to UPS as well as the content of ubiquitinated protein in fish muscle were investigated. The results showed that the serum cortisol level significantly increased after acute crowding stress, suggesting the crowding environment led to fish stress. The serum concentration of cortisol recovered to the control level after 168 h of recovery. Crowding stress also exerted an influence on muscular texture characteristics of cultured grass carp. Muscular hardness and cohesiveness decreased significantly in grass carp suffering from acute crowding stress, and the two flesh quality indexes recovered to the level of the control group after 168 h of post-stress recovery. However, muscular adhesiveness, chewiness and resilience were significantly higher than those in the control group at the end of the experiment. Compared with the control group, the mRNA expressions of *hsp70* and *nrf2* in muscle of fish stocked at the treatment group were significantly increased after 48 h of crowding stress, and then returned to the control level after 168 h of post-stress recovery. It is implied that the acute crowding environment might cause cellular stress in fish. In the UPS pathway, the mRNA levels of *ubiquitin (ub)*, *psma2*, *psmc1*, *mafbx*, and *chip* were significantly increased after crowding stress. The transcriptional levels of these genes did not returned to the control level after 168 h of post-stress recovery. Moreover, a significant higher content of ubiquitinated proteins occurred in the dorsal muscle of fish in the treatment group at 6 h and 12 h after crowding stress. Subsequently, there were no significant difference in ubiquitinated proteins of fish stocked at two densities, while ubiquitinated proteins in the treatment group significantly declined compared to the control group at 168 h of recovery. It was concluded that the acute crowding environment induced the stress response and altered the muscular texture as well as improved muscle UPS activity. The deleterious effects of acute crowding stress on fish physiological function and muscular texture were reversible. Post-stress recovery time should be extended more than 168 h so that the stressed fish reestablish the homeostasis on UPS.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; crowding stress; flesh quality; the ubiquitin-proteasome system

Corresponding author: LI Dapeng. E-mail: ldp@mail.hzau.edu.cn