

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19263

低盐胁迫下松江鲈 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因的表达变化规律

邝杰华¹, 马骞^{1,2}, 毛非凡¹, 李昂², 刘新富², 周启苓¹, 庄志猛²

1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 为了探究小分子热休克蛋白基因 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 在松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)应对低盐胁迫过程中的调节作用, 本研究基于前期转录组数据, 获取 3 个目标基因的序列信息并进行了系统进化分析, 利用实时荧光定量 PCR 技术检测了 3 个基因在两种低盐胁迫处理下不同时间点(0 h、12 h、24 h 和 48 h)在鳃、肠、肾和肝组织中的表达水平。系统进化分析结果表明, *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因分别聚类形成独立分支; 在各基因分支中, 松江鲈与已报道的鲈形目、鲤形目和鲷形目等鱼种共同聚为硬骨鱼类分支。在两种低盐胁迫处理下, 3 个基因在鳃组织中的表达量均在 12 h 显著升高, 而在肠、肾和肝组织中的表达量则呈现不同的变化趋势。肠组织中, *HSPB7* 和 *HSPB11* 在盐度渐变低盐胁迫(盐度变化速率 1.1/h)下表达量均显著升高, *HSPB1* 表达量在 48 h 显著降低; 盐度骤变低盐胁迫(盐度变化速率 27/h)下 *HSPB1* 和 *HSPB7* 表达量在 24 h 显著升高, *HSPB11* 表达量显著降低。肾组织中, *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 表达量均仅在盐度渐变低盐胁迫 24 h 显著升高; 盐度骤变低盐胁迫下 *HSPB1* 表达量显著降低, *HSPB7* 和 *HSPB11* 表达量则显著升高。肝组织中, *HSPB7* 无表达; *HSPB1* 表达量在盐度渐变低盐胁迫下无显著变化, 但在盐度骤变低盐胁迫下则显著升高; *HSPB11* 表达量在两种处理下均显著升高。本研究比较分析了 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因在松江鲈应对不同低盐胁迫时表达变化规律的异同, 相关结果为探讨小分子热休克蛋白在鱼类应激调节过程中的作用及洄游性鱼类适应盐度变化的分子调控机制提供了理论依据。

关键词: 松江鲈; 小分子热休克蛋白; 盐度胁迫; 基因表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)05-0494-10

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是广泛分布于动物体内的一类功能性蛋白, 当动物体处于比正常生长温度高 8~12 °C 的环境或遭受其他各种胁迫时, 可通过产生应激反应, 促进机体分泌热休克蛋白^[1], 进而在恶劣的环境中继续生存。热休克蛋白按分子量大小可分为 5 个家族: HSP100 家族、HSP90 家族、HSP70 家族、HSP60 家族和小分子热休克蛋白(small heat shock proteins, HSPBs)家族^[2], 其中, HSPBs 是动物体分泌的一系列高度保守的小分子应激蛋白(分子量 15~30 kD)^[3]。该蛋白作为重要的分子伴侣, 能促进变性蛋白的再折叠, 帮助新合成蛋白的折叠,

阻止刺激条件下蛋白的不可逆性聚集, 从而有效降低多种应激原对机体造成的影响^[4-5]。

目前, 国内外对 HSPBs 的研究主要集中在该家族基因的生物学功能及其在临床疾病发生的作用机理等方面, 实验对象以人和家鼠等哺乳动物为主, 在其他低等脊椎动物如鱼类中的研究报道较少。已有研究表明, 不同物种间 HSPBs 的数量存在较大差异, 如秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的基因组编码 16 种 HSPBs 蛋白^[6], 而黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)有 12 种 HSPBs 基因^[7]。目前, 脊椎动物中已证实存在 10 种以上 HSPBs 基因^[8]。HSPB1 是 HSPBs 家族中最重要的

收稿日期: 2019-09-18; 修订日期: 2019-10-27.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772828); 青岛市应用基础研究计划项目(14-2-4-15-jch).

作者简介: 邝杰华(1995-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类生物学与遗传育种研究. E-mail: 3242864479@qq.com

通信作者: 马骞, 副研究员, 从事海水鱼类发育学、生理学与遗传育种研究. E-mail: maq@gdou.edu.cn

成员之一, 其在小鼠成纤维细胞的应激反应中能通过磷酸化的形式激活 p38 MAPK 蛋白激酶, 以响应外界的刺激, 抑制细胞的凋亡^[9-10]。Mercer 等^[11]发现斑马鱼(*Danio rerio*) *HSPB7* 突变体会出现轻度局灶性心脏纤维化和肌节异常, 据此推测心肌细胞中 *HSPB7* 基因的缺失将刺激自噬通路, 使自噬过程受抑制并导致胚胎发育性心肌病的发生。Bartelt-Kirbach 等^[12]发现, *HSPBs* 基因能共同作用于胁迫处理下机体的应激调节, 但各基因在不同胁迫条件下的表达模式并不相同。例如: 在亚砷酸钠胁迫、氧化胁迫和高渗胁迫下, 大鼠海马体 *HSPB1*、*HSPB5*、*HSPB6*、*HSPB7* 和 *HSPB8* 的表达量均被上调, 但各基因的表达变化趋势在时间进程和调节强度上存在一定差异; 在相同胁迫条件下, 并未检测到 *HSPB11* 表达水平的显著变化, 表明该蛋白在神经元应激调节中的作用尚不明确。Heikkilä^[13]通过对非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)进行细胞组织培养, 发现 *HSPB11* 重组蛋白均能抑制由热休克、亚砷酸盐、镉或蛋白酶抑制剂等因素所诱导的未折叠蛋白聚集。

鱼类生存的环境复杂多变, 即使在人工控制的水环境中也可能受到各种胁迫的影响。其中, 水质逐渐恶化和高密度放养会对鱼体造成慢性胁迫; 而温度或盐度骤变、人为惊扰等则会引起急性胁迫^[14]。鱼体可通过一般的适应性反应来缓解慢性胁迫产生的弱刺激; 但对于急性胁迫所造成的强刺激, 还需通过应激反应来减轻机体损伤^[15]。由此可见, 应激反应作为鱼体应对急性环境胁迫的调节机制, 在鱼类适应多变的外界环境中起到关键作用。洄游性鱼类除了凭借高效的渗透压调节机制, 还能通过体内一系列的应激调节机制来应对盐度的急性变化, 以保障鱼体生理生化过程的正常进行^[16-17]。据报道, 热休克蛋白家族成员(*HSP60*、*HSP70* 和 *HSP90* 等)在水生生物应对盐度胁迫的应激调控过程中发挥关键作用, 研究对象包括三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[18]、美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)^[19]、刺参(*Apostichopus japonicus*)^[20]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[21]、近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)^[22]等, 然而目前有关 *HSPBs* 在水生动物应对

盐度胁迫过程中作用机制的研究鲜有报道。因此, 研究 *HSPBs* 基因在鱼体应对盐度胁迫中的作用, 对于认识鱼类盐度适应性的分子调节机制具有重要意义。

松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)隶属于鲈形总目(Percomorpha)、鲈形目(Scorpaeniformes)、杜父鱼科(Cottidae)、松江鲈鱼属, 是近海的一种小型、肉食性、降海洄游鱼类^[23]。作为洄游性鱼类, 松江鲈对盐度具有极强的适应性, Ma 等^[24]在前期开展了松江鲈应对盐度变化的分子调控机制研究, 并发现肾组织中 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 等小分子热休克蛋白基因在低盐胁迫下均存在表达量的显著变化。为进一步探究 *HSPBs* 在松江鲈应对盐度胁迫过程中的作用, 本研究从前期获得的转录组数据中提取了 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因的序列信息, 基于这 3 个基因的氨基酸序列进行系统进化分析, 随后利用实时荧光定量 PCR 技术检测了松江鲈在两种低盐胁迫处理下, 渗透压调控相关组织(鳃、肠、肾)及代谢相关组织(肝)中 3 个基因的表达水平变化情况, 为揭示 *HSPBs* 基因在松江鲈应对盐度胁迫的调节作用、探明洄游性鱼类盐度适应性的分子调节机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料及处理

实验用松江鲈成鱼共计 216 尾[1 龄, 体长(12.22±0.91) cm, 体重(19.54±5.17) g]采集于东营裕海孵化场, 随后运至青岛通用水产养殖公司进行实验。实验用鱼平均分布于 12 个有效容积为 100 L 的平底 FRP (纤维增强塑料)水箱中, 暂养两周, 每天更换约 600 L 经过沙滤的天然海水(盐度 30, 水温 10~12 °C), 光周期条件为 12 h : 12 h。

本研究设置两个低盐胁迫实验组, 每个实验组设置 6 个平行: (1)盐度渐变低盐胁迫(gradually-reduced group, GG), 盐度变化速率相对缓慢, 由 30 降至 3 的时间约为 24 h(盐度变化率为 1.1/h), 盐度降至 3 后维持不变; (2)盐度骤变低盐胁迫(sharply-reduced group, SG), 盐度由 30 降至 3 用时为 1 h(盐度变化速率为 27/h), 盐度降至 3 后维

持不变。低盐胁迫处理开始时记为 0 h, 每个平行取 3 尾鱼作为对照; 随后分别在盐度胁迫处理开始后 12 h、24 h 和 48 h 3 个时间点, 每个平行随机选取 3 尾鱼进行解剖, 并分别取其鳃、肠、肾和肝组织, 立即将样品投入液氮中速冻后, 在低温状态下转移至-80 ℃超低温冰箱中保存待用。

1.2 HSPB1、HSPB7 和 HSPB11 基因的系统进化分析

从前期获得的转录组数据(NCBI SRA 数据库登录号: SRP103494)中提取 HSPB1、HSPB7 和 HSPB11 基因的序列信息, 利用 EditSeq 软件预测松江鲈 HSPB1、HSPB7 和 HSPB11 基因的开放阅

读框并将其翻译成对应的氨基酸序列; 在 NCBI 搜索其他鱼类及高等脊椎动物的 HSPB1、HSPB7 和 HSPB11 氨基酸序列, 通过 DNAMAN 软件进行多重序列比对, 利用 MEGA 5.0 软件, 以邻接法(Neighbour-Joining, NJ)构建系统进化树, 针对进化树各分支结点均进行 1000 次重复抽样检验^[25]。

1.3 引物设计

基于松江鲈 HSPB1、HSPB7 和 HSPB11 的 cDNA 序列, 遵循引物设计原则, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物 HSPB1-F/R、HSPB7-F/R、HSPB11-F/R (表 1), 用于实时荧光定量 PCR 检测。

表 1 本实验所用引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence	用途 usage
18S-F	TTTCGAGGCCCTGTAATTGGAA	18S 内参基因引物 expression of 18S rRNA
18S-R	CCGAGATCCAACACTACGAGCTTT	
HSPB1-F	TCCTCTGTGGAAACGACAGC	HSPB1 的荧光定量 PCR 检测 expression of HSPB1
HSPB1-R	GGAATGTGGCGAAGTCCTCA	
HSPB7-F	AACAGGTAGTTCCTCACTGCG	HSPB7 的荧光定量 PCR 检测 expression of HSPB7
HSPB7-R	GCTGTGTGTGTCAGTTGCTG	
HSPB11-F	GGTTGGCAGGAGCAGTAACT	HSPB11 的荧光定量 PCR 检测 expression of HSPB11
HSPB11-R	TGTGGTTGTGATCTCCGGTG	

1.4 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

将松江鲈各组织样品在液氮中研磨后, 采用 Trizol 法(Invitrogen)提取总 RNA。通过核酸测定仪检测浓度和纯度后, 以提取的总 RNA 为模板, 根据 PrimeScript Rtase 试剂盒(TaKaRa)说明书进行反转录, 合成第一链 cDNA。

1.5 HSPB1、HSPB7 和 HSPB11 实时荧光定量 PCR

根据松江鲈 HSPB1、HSPB7 和 HSPB11 的 cDNA 序列分别设计相应的特异性引物, 以核糖体 18S rRNA 基因作为内参, 检测两种低盐胁迫处理下, 鳃、肠、肾和肝组织中 HSPB1、HSPB7 和 HSPB11 基因在不同时间点的相对表达量。实时荧光定 PCR 实验流程按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒(TaKaRa)说明进行操作, 在 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪上进行, 实验中每个

样品设置 3 个重复。所有引物均经过扩增效率检测($E>90\%$; $R^2>0.990$), 实时荧光定量 PCR 产物经测序验证。

1.6 数据分析

根据实时荧光定量 PCR 测得的 C_t 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[26]计算 HSPB1、HSPB7 和 HSPB11 基因的相对表达量。所得数据结果均以平均值±标准差 ($\bar{x}\pm SD$)表示, 利用统计学软件 SPSS 19.0 中的单因素方差(one-way ANOVA)法, 并进行 Duncan's 多重比较, 分析各基因表达量在盐度胁迫处理不同时间点的差异水平, 若 $P<0.05$, 表示有显著差异; 若 $P<0.01$, 则差异极显著。同时, 通过 Pearson 相关性分析计算两种低盐胁迫处理下相同组织同一基因表达量间的相关系数(R), 当 $|R|>0.80$ 时, 两者具有显著相关性; 而当 $0.50<|R|<0.80$ 时, 两者呈一般相关性。

2 结果与分析

2.1 松江鲈 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因序列比对及系统进化分析

从转录组数据 (NCBI SRA 数据库登录号: SRP103494) 获取松江鲈 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 的序列信息, 其中开放阅读框分别为 618 bp、465 bp 和 414 bp (图 1), 利用 DNAMAN 软件对 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 氨基酸序列进行比对分析, 结果显示 *HSPB1* 与 *HSPB7* 的一致性为 20.49%, *HSPB1* 与 *HSPB11* 的一致性为 11.71%, *HSPB7* 与 *HSPB11* 的一致性只有 5.16%。种间序列比对结果表明, 松江鲈与黄河鲈 (*Perca flavescens*) 物种间 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 氨基酸序列的一致性最高, 分别达 84.21%、96.15% 和 84.33%。

基于已报道的硬骨鱼类及其他高等脊椎动物

HSPBs 氨基酸序列进行的系统进化分析结果如图 2 所示, *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因分别聚类形成独立的分支。在各基因的聚类中硬骨鱼类均聚为一支, 两栖类、鸟类和哺乳类等高等脊椎动物则聚为另一支。在 *HSPB1* 基因分支中, 松江鲈首先与大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 和黄河鲈聚为一支, 再与鲈形目、鲤形目和鲱形目的种类形成的另一分支进行聚类; 在 *HSPB7* 基因分支中, 松江鲈先与黄河鲈聚为一支, 然后再与鲤形目、鲈形目、鲱形目及合鳃鱼目的种类形成的分支进行聚类; 在 *HSPB11* 基因分支中, 松江鲈作为一独立分支先与鲈形目的大黄鱼、黄河鲈、南极岩斑 (*Notothenia coriiceps*) 聚为一支, 再与尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 进行聚类, 最后与大刺鲃 (*Mastacembelus armatus*)、斑马鱼、深裂眶锯雀鲷 (*Stegastes partitus*) 等聚为硬骨鱼类的分支。

HSPB1

```

1  ATGACCGAGAGACGTATTCCCTTACCCCTGCTCCGACCCGAGCTGGGACCCATTCGCGATTGGCAGCAGACCGCATCTTCGATCAGACCTTCGGCATGCCCGCCCTGCATGAGGAC 120
1  M T E R R I P F T L L R T P S W D P F R D W Q H S R I F D Q T F G M P A L H E D 40
121 TTGCCCACATTCCCAGCACCCACTGGCTGGGTACCTGCGGCACTCTCTCATGACCCGGAATGGCTCCATGGGCACCATGATGCCCAAGCCCCCATGATGTACCCGGCCCCCATG 240
41  F A T F P S T H W P G Y L R H S L M T P E M A S M G T M M P Q A P M M Y P A P M 80
241 ATGCCCCAGCAGGCTCGTGCCCTTACCCGCCAGATGAGCACCGCATGTCAGAGATCAAGCAGACCCAAGACAGCTGGAAGGTTTCTTGGATGTCAACCACTTCTCACCCGAGGAGCTG 360
81  M A Q Q A R A L T R Q M S T G M S E I K Q T Q D S W K V S L D V N H F S P E E L 120
361 GTGGTGAAGACCAAGGACGGCTGGTGAATCTCTGGCAACACGAAGAGAGGAAGGACGAGCAGCGGCTTTGTTCCAGAAGCTTACCAGGAATATACCTCCCTCTTCTGCTAAC 480
121 V V K T K D G V V E I S G K H E E R K D E H G F V S R S F T R K Y T L P S S A N 160
481 GTTGAGAAGGTGGCTCCTCCTCTGCCCGAGGGGTTCTGACCGTGGAGGCTCCCATCTCCGACCGGCCATCGAGTCCTCAGAGACCACAATACCTGTCAACGTGAGAACAGGGT 600
161 V E K V A S S L S P E G V L T V E A P I I R P A I E S S E T T I P V N V E N K G 200
601 GCGTGGTGAAGAAGTAG 618
201 G V V K K * 205
  
```

HSPB7

```

1  ATGAGTGGGACCAACTCCTCTGCCTATCGATCGGAGCGTACTTTTACCAGACCTCGTCTCGTCTGTTAACCATACATGGAGAAGAGCCGGGACTGTTGCGAGAGGACTTTGGC 120
1  M S G T N S S A Y R S E R T F H Q T S S S S S G N P Y M E K S R G L F A E D F G 40
121 TCCTTCATCGCTCTGGGAGCGACGCTTGGGCTTACCAGTGGATCTGGAATATCAAAATCTTGGGGACTCGTACCAGTTCACAGTTGACGTGCAAGACTTCTCCCTGAAGATGTC 240
41  S F M R P G S D A L G F T S G S G N I K N L G D S Y Q F T V D V Q D F S P E D V 80
241 ATCGTCACCACATCCAACAACAGATTGAAGTTCGTGCTGAAAAGTTGGCCAGGATGCTCGGTCATGAACAATTTACGCACAAGTGCCAGCTACCGGACGACGTGGACCCACCTCG 360
81  I V T T S N N Q I E V R A E K L A Q D G S V M N N F T H K C Q L P D D V D P T S 120
361 GTGACATCATCGTGGGCGCGACGGGACCTAACAGTCACAGCGCGGACACCCGGCCAAGCAGAGCTCGCACAGACCTTTGCGACCGAGATCAAGATCTAG 465
121 V T S S L G A D G T L T V T A R R H P A K H E L A Q T F R T E I K I * 154
  
```

HSPB11

```

1  ATGGTCGATTCTCTCAGGTTGCGCGGCGGCCAGTGGTCGTCGCTTCATCTCGGATAGTAATCACCTCCAGAAAACATCGCCGACGAAACACGAACACGTTTGGATGTCAACC 120
1  M V D S S S G C A A A T V V V A S S C D S N H P P E N I A D G N T N T F W M S T 40
121 GGGATGTTTCTCAAGAGATCATCATTCGCTTCGCTGAGTCCACGACGAGTGTCCGCTGTGACCGTGGACAGCTATAATGTCAAGCATCTAAGATAGAAAAGAACATCAGAGATGCC 240
41  G M F P Q E I I I R F A E S T Q V S A V T V D S Y N V K H L K I E K N T S Q N A 80
241 TCTCAATTTGAGTCTGTACAGAGCAAGATTTAAACAAACGGAGGGTCATCTTCAGTCAAATACTATTTCGTTAAATGGAGGCAATGCAACCCACCTTCGTTTATCATCACTGCGGGT 360
81  S Q F E S V T E Q E F K Q T E G H L Q S N T I S L N G G N A T H L R F I I T A G 120
361 TATGATCTCTTTGTCTCAGTGCACAGAGTCAGTGTACAAAATGTACACACTTGA 414
121 Y D L F V S V H R V S V Q N V H T * 137
  
```

图 1 松江鲈 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因编码的氨基酸序列

Fig. 1 Deduced amino acid sequences of *HSPB1*, *HSPB7* and *HSPB11* genes in *Trachidermus fasciatus*

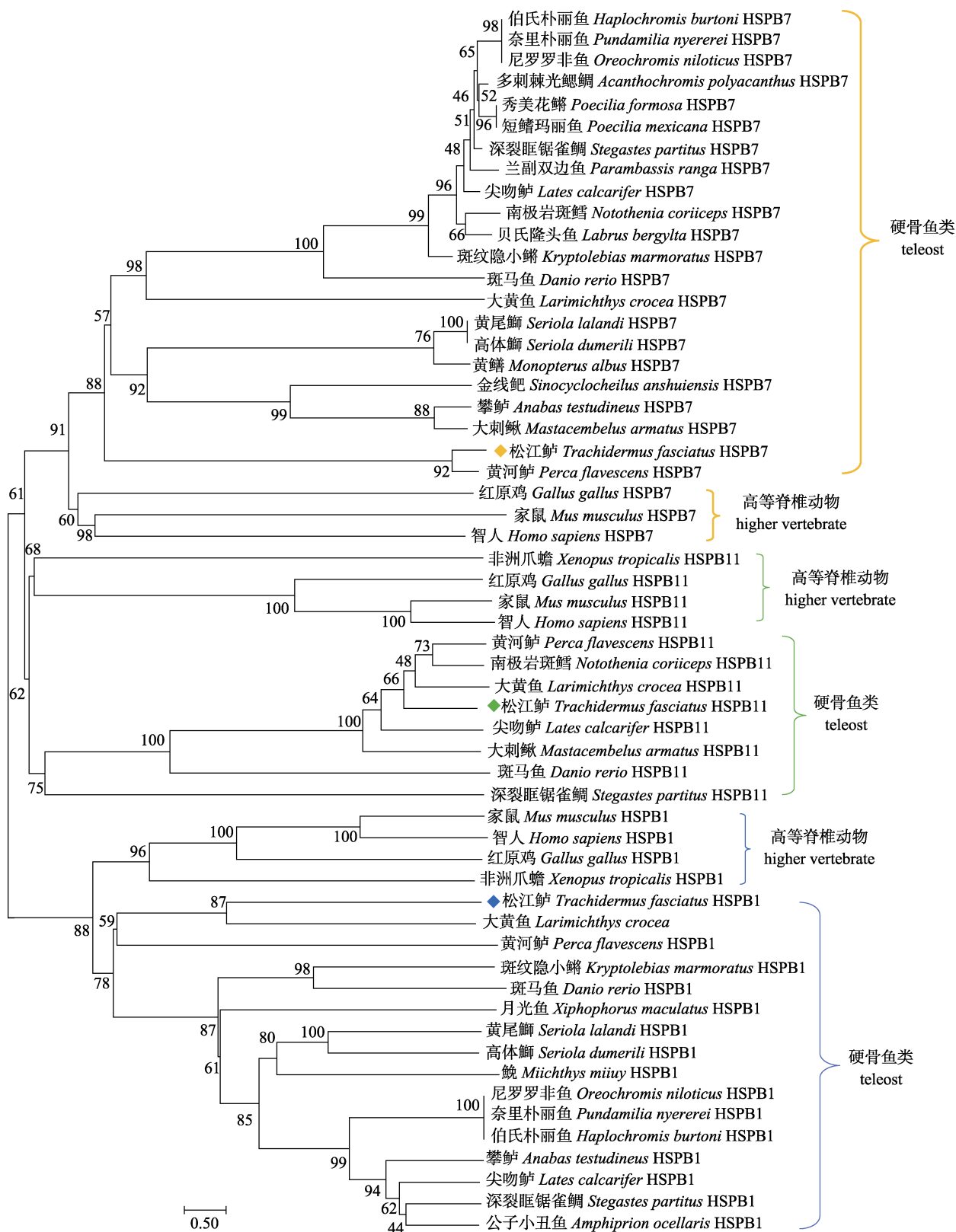


图 2 基于 HSPB1、HSPB7 和 HSPB11 氨基酸序列构建的系统进化树(NJ 树)

Bootstrap 检验的重复次数为 1000 次, 标尺 0.50 为进化距离。

Fig. 2 Phylogenetic tree based on HSPB1, HSPB7 and HSPB11 amino acid sequences by Neighbor-Joining (NJ) method. The tree is based on a 1000 bootstrap procedure., The scale bar 0.50 in terms of genetic distance is indicated below the tree.

2.2 低盐胁迫下松江鲈 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 的组织表达分析

2.2.1 鳃组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 的表达情况 松江鲈鳃组织 *HSPB1* 和 *HSPB7* 表达量的变化趋势在两种低盐胁迫处理下存在一定差异, 而 *HSPB11* 的表达模式基本一致且表达量间呈显著正相关($R=0.98$)。盐度渐变低盐胁迫下, *HSPB1* 表达量呈先升高后下降的变化趋势, 12 h 显著升高, 48 h 则显著降低至 0 h 的 50%; *HSPB7* 表达量在 12 h 和 48 h 显著升高, 12 h 的表达量最高, 为 0 h 的 3.5 倍; *HSPB11* 在各时间点的表达量均显著升高。盐度骤变低盐胁迫下, 3 个目标基因在各时间点的表达量均显著升高, 其中, *HSPB1* 和 *HSPB11* 表达量变化较为稳定, 而 *HSPB7* 表达量在 24 h 达到峰值后降低(图 3)。

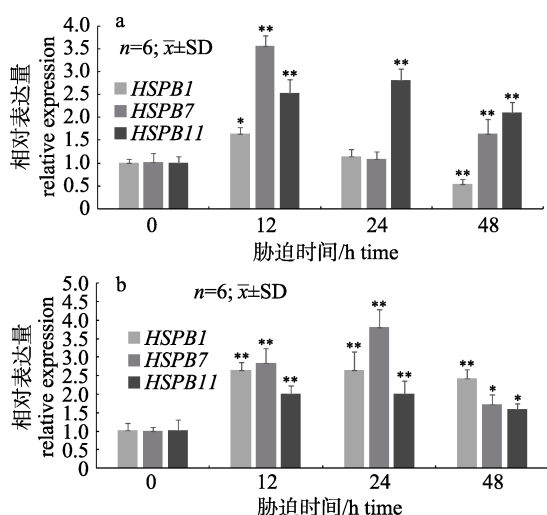


图3 盐度渐变低盐胁迫(a)和骤变低盐胁迫(b)下松江鲈鳃组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因的相对表达量 *代表不同时间点处理组与空白对照间差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。0 h 为空白对照。

Fig. 3 Relative expression levels of *Trachidermus fasciatus* *HSPB1*, *HSPB7* and *HSPB11* mRNA in gill under salinity gradually-reduced group (a) and sharply-reduced group (b) * denotes significant differences from the control at different time ($P<0.05$); ** means extremely significant difference ($P<0.01$). The untreated (0 h) group was used as the control.

2.2.2 肠组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 的表达情况 松江鲈肠组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 表达量的变化趋势在两种低盐胁迫处理下差异较大, 且表达量间均无显著相关性($R<0.80$)。盐度渐

变低盐胁迫下, 3 个目标基因表达量的变化幅度较小, *HSPB1* 表达量仅在 48 h 时显著降低; 而 *HSPB7* 和 *HSPB11* 各时间点的表达量均显著升高。盐度骤变低盐胁迫下, *HSPB1* 表达量仅在 24 h 显著升高, 其在 12 h 和 48 h 的表达量均无显著变化; *HSPB7* 表达量 24 h 后显著升高; *HSPB11* 表达量在 12 h 显著降低至 0 h 的 40%, 随后于 48 h 恢复至正常水平(图 4)。

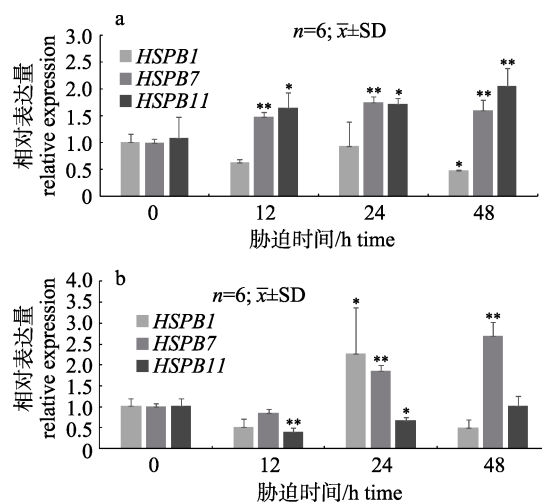


图4 盐度渐变低盐胁迫(a)和骤变低盐胁迫(b)下松江鲈肠组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因的相对表达量 *代表不同时间点处理组与空白对照间差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。0 h 为空白对照。

Fig. 4 Relative expression levels of *Trachidermus fasciatus* *HSPB1*, *HSPB7* and *HSPB11* mRNA in intestine under salinity gradually-reduced group (a) and sharply-reduced group (b) * denotes significant differences from the control at different time ($P<0.05$); ** means extremely significant difference ($P<0.01$). The untreated (0 h) group was used as the control.

2.2.3 肾组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 的表达情况 松江鲈肾组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 表达量的变化趋势在两种低盐胁迫处理下各不相同, 且表达量间不具显著相关性($R<0.80$)。盐度渐变低盐胁迫下, 3 个目标基因表达量的变化趋势基本一致, 均在 24 h 显著升高并达到最大值, 分别为 0 h 表达量的 2.9、2.6 和 3.8 倍。盐度骤变低盐胁迫下, *HSPB1* 在各时间点的表达量均显著降低, 48 h 时表达量仅为 0 h 的 20%; 而 *HSPB7* 和 *HSPB11* 表达量呈显著升高趋势, 两个基因在 24 h 后的表达量分别维持在 0 h 的 2.4 和 1.8 倍(图 5)。

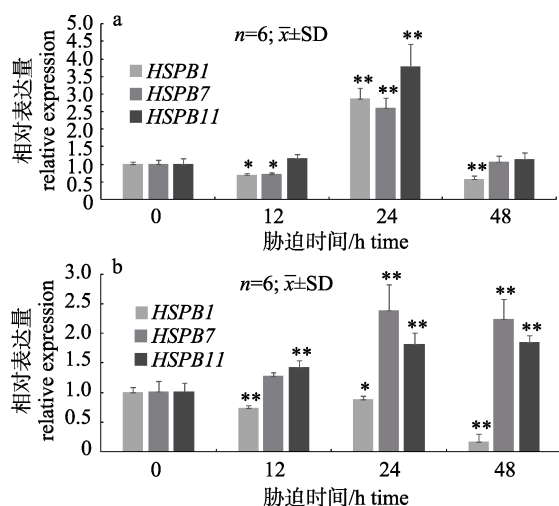


图 5 盐度渐变低盐胁迫(a)和骤变低盐胁迫(b)下松江鲈肾组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因的相对表达量 *代表不同时间点处理组与空白对照组间差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$). 0 h 为空白对照。

Fig. 5 Relative expression levels of *Trachidermus fasciatus* *HSPB1*, *HSPB7* and *HSPB11* mRNA in kidney under salinity gradually-reduced group (a) and sharply-reduced group (b) * denotes significant differences from the control at different time ($P<0.05$); ** means extremely significant difference ($P<0.01$). The untreated (0 h) group was used as the control.

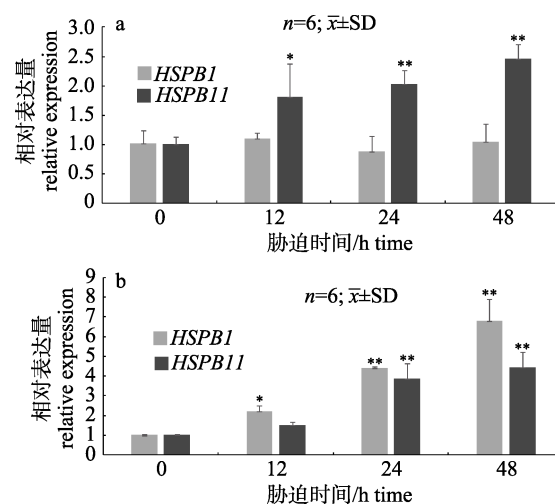


图 6 盐度渐变低盐胁迫(a)和骤变低盐胁迫(b)下松江鲈肝组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因的相对表达量 *代表不同时间点处理组与空白对照组间差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$). 0 h 为空白对照。

Fig. 6 Relative expression levels of *Trachidermus fasciatus* *HSPB1*, *HSPB7* and *HSPB11* mRNA in liver under salinity gradually-reduced group (a) and sharply-reduced group (b) * denotes significant differences from the control at different time ($P<0.05$); ** means extremely significant difference ($P<0.01$). The untreated (0 h) group was used as the control.

2.2.4 肝组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 的表达情况 两种低盐胁迫处理下, 松江鲈肝组织中 *HSPB1* 表达量呈不同的变化趋势, *HSPB11* 表达量均呈上升趋势且具有显著相关性($R=0.89$), 然而并未检测到 *HSPB7* 基因的表达。盐度渐变低盐胁迫下, *HSPB1* 各时间点的表达量均无显著变化($P>0.05$), *HSPB11* 表达量呈逐渐上升趋势, 且各时间点的表达量均显著升高。盐度骤变低盐胁迫下, *HSPB1* 表达量显著升高($P<0.05$), 在 48 h 升高至正常水平的 6.8 倍; 而 *HSPB11* 表达量在 24 h 显著升高, 同样在 48 h 达到最大值(图 6)。

3 讨论

为了揭示 *HSPBs* 基因在鱼类应对盐度胁迫过程中的作用, 本研究比较分析了两种低盐胁迫处理下, 松江鲈不同组织 *HSPB1*、*HSPB7* 与 *HSPB11* 表达量的变化情况。在两种低盐胁迫处理下, 松江鲈鳃组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 表达量均在 12 h 显著升高, 而这 3 个目标基因在肠、肾和肝组织中的表达量则呈现不同的变化趋势, 推测其原因, 可能是组织器官的功能特性导致其对盐

度胁迫的响应机制不同。鳃作为鱼类的呼吸器官, 与环境介质的接触面积大, 对水环境的变化最为敏感^[27], 当处于低盐低渗的环境时, 鳃组织在应激反应过程中通过调用不同基因以应对盐度胁迫, 因此松江鲈鳃组织中 3 个目标基因的表达水平均在短时间内呈现显著升高的趋势。此外, 盐度骤变低盐胁迫下, 鳃组织 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 在各时间点的表达量均显著升高, 而盐度渐变低盐胁迫鳃组织 *HSPB1* 和 *HSPB7* 的表达量先显著升高, 24 h 后出现不同程度的降低, 说明骤变性低盐胁迫对鳃中 3 个目标基因表达水平的影响更为显著。

肠道作为鱼类渗透压调节的另一重要场所, 对水环境变化的响应也较为灵敏, 在鱼体应对外界刺激过程中起到关键作用^[28]。本研究中, 盐度渐变低盐胁迫下松江鲈肠组织 *HSPB7* 和 *HSPB11* 表达量均显著升高, *HSPB1* 表达量仅在 48 h 显著降低, 而盐度骤变低盐胁迫下 *HSPB1* 和 *HSPB7* 表达量直到 24 h 才显著升高, *HSPB11* 表达量则显著降低, 造成这一现象的原因可能是盐度骤降导致肠组织的应激调节机制受到影响^[28], 延缓或抑

制了相应 *HSPBs* 基因的表达。

已有研究结果显示, 不同低盐胁迫下红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)肾组织 *HSP70* 表达量的变化趋势不同^[29], 在盐度为 4 和 8 时 *HSP70* 表达量先显著升高后降低, 而盐度为 12 时则呈显著上升趋势。与此相似, 松江鲈肾组织中 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 表达量在盐度渐变低盐胁迫下均先显著升高后降低; 而盐度骤变低盐胁迫下 *HSPB7* 和 *HSPB11* 表达量显著升高, *HSPB1* 表达量则显著降低。由此可见, 肾组织在应对不同低盐胁迫时各 *HSPBs* 基因表达变化规律并不完全一致, 暗示其分子调控机制可能存在差异。本研究, 松江鲈肾组织 *HSPB7* 和 *HSPB11* 在两种低盐胁迫下的表达量变化均呈正相关, 由此推测这两个基因可能在应对盐度胁迫的应激反应中发挥协同作用。

肝脏作为主要的代谢器官, 广泛参与鱼类的应激与免疫调节, 同时也是鱼类进行渗透压调节的关键能量来源^[30], 但肝脏在鱼体应对盐度变化过程中发挥的作用尚不明确。分析结果显示, 松江鲈肝组织 *HSPB1* 表达量在盐度渐变低盐胁迫下无显著变化, 在盐度骤变低盐胁迫下则显著升高; 两种低盐胁迫处理下, 肝组织 *HSPB11* 的表达水平均呈显著上升趋势, 其中盐度骤变低盐胁迫下, *HSPB11* 表达量的上升幅度更大。由此表明, 骤变性低盐胁迫能更显著地促进肝组织 *HSPB1* 和 *HSPB11* 的表达, 且其表达量在一定时间内随着胁迫时间的延长而升高。Taylor 等^[31]证实哺乳动物中 *HSPB7* 仅在心肌和骨骼肌中特异表达, 本研究在松江鲈肝组织中并未检测到 *HSPB7* 的表达, 据此推测鱼类 *HSPB7* 可能同样存在组织表达特异性。

本研究通过低盐胁迫实验发现, 松江鲈鳃、肠、肾和肝组织中 *HSPB1*、*HSPB7* 和 *HSPB11* 基因在盐度渐变和骤变低盐胁迫处理下呈不同的表达变化规律, 且不同时间点间的表达水平存在显著差异, 可见, 这 3 个目标基因在松江鲈应对盐度变化的应激调节过程中发挥着重要作用, 为进一步探究鱼类盐度适应性的分子调控机制提供理论基础。

参考文献:

- [1] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology[J]. Annual Review of Physiology, 1999, 61(1): 243-282.
- [2] Nover L, Scharf K D. Heat stress proteins and transcription factors[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1997, 53(1): 80-103.
- [3] Hendrick J P, Hartl F U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins[J]. Annual Review of Biochemistry, 1993, 62(1): 349-384.
- [4] Zhang D L, Ke L, MacKovicova K, et al. Effects of different small HSPB members on contractile dysfunction and structural changes in a *Drosophila melanogaster* model for Atrial Fibrillation[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2011, 51(3): 381-389.
- [5] Vos M J, Zijlstra M P, Kanon B, et al. HSPB7 is the most potent polyQ aggregation suppressor within the HSPB family of molecular chaperones[J]. Human Molecular Genetics, 2010, 19(23): 4677-4693.
- [6] Strayer A, Wu Z X, Christen Y, et al. Expression of the small heat-shock protein Hsp-16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGb 761[J]. The FASEB Journal, 2003, 17(15): 2305-2307.
- [7] Hao X M. Taking a knockout approach to study the functions of small heat shock protein family in *Drosophila melanogaster*[D]. Storrs: University of Connecticut, 2009: 131-132.
- [8] Van Montfort R, Slingsby C, Vierling E. Structure and function of the small heat shock protein/ α -crystallin family of molecular chaperones[J]. Advances in Protein Chemistry, 2001, 59: 105-156.
- [9] Hoffman L, Jensen C C, Yoshigi M, et al. Mechanical signals activate p38 MAPK pathway-dependent reinforcement of actin via mechanosensitive HspB1[J]. Molecular Biology of the Cell, 2017, 28(20): 2661-2675.
- [10] Niswander J M, Dokas L A. Phosphorylation of HSP27 and synthesis of 14-3-3 ϵ are parallel responses to hyperosmotic stress in the hippocampus[J]. Brain Research, 2006, 1116(1): 19-30.
- [11] Mercer E J, Lin Y F, Cohen-Gould L, et al. HspB7 is a cardioprotective chaperone facilitating sarcomeric proteostasis[J]. Developmental Biology, 2018, 435(1): 41-55.
- [12] Bartelt-Kirbach B, Golenhofen N. Reaction of small heat-shock proteins to different kinds of cellular stress in cultured rat hippocampal neurons[J]. Cell Stress and Chaperones, 2014, 19(1): 145-153.
- [13] Heikkilä J J. The expression and function of hsp30-like small

- heat shock protein genes in amphibians, birds, fish, and reptiles[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2017, 203: 179-192.
- [14] Polverino G, Cigliano C, Nakayama S, et al. Emergence and development of personality over the ontogeny of fish in absence of environmental stress factors[J]. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2016, 70(12): 2027-2037.
- [15] Kong S B, Jiang D Z, Zu X Q, et al. Research avances in stress biology in fish[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2015(16): 255-256. [孔淑碧, 江德中, 祖学勤, 等. 鱼类应激生物学研究进展[J]. *现代农业科技*, 2015(16): 255-256.]
- [16] Sundström L F, Löhmus M, Devlin R H. Migratory fish[J]. *Bulletin of the Ecological Society of America*, 2010, 91(2): 220-223.
- [17] Ma A J, Cui W X, Liu Z F, et al. Study on mechanisms of osmotic oressure adaptability and physiological plasticity on euryhaline[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(6): 1308-1317. [马爱军, 崔文晓, 刘志峰, 等. 广盐性鱼类渗透压适应性与其生理可塑性机制研究[J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49(6): 1308-1317.]
- [18] Xu Q H, Qin Y. Molecular cloning of heat shock protein 60 (PtHSP60) from *Portunus trituberculatus* and its expression response to salinity stress[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2012, 17(5): 589-601.
- [19] Spees J L, Chang S A, Snyder M J, et al. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*[J]. *The Biological Bulletin*, 2002, 203(3): 331-337.
- [20] Dong Y W, Dong S L, Meng X L. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka)[J]. *Aquaculture*, 2008, 276(1-4): 179-186.
- [21] Niu C J, Rummer J L, Brauner C J, et al. Heat shock protein (HSP 70) induced by mild heat shock inhibits sharp plasma osmolality increases upon seawater transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 148(4): 460-461.
- [22] Fu D K, Chen J H, Zhang Y, et al. Cloning and expression of a heat shock protein (HSP) 90 gene in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under osmotic stress and bacterial challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(1): 118-125.
- [23] Wang J Q. Advances in studies on the ecology and reproductive biology of *Trachidermus fasciatus* Heckel[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(6): 729-734. [王金秋. 松江鲈的生态学和繁殖生物学的研究进展[J]. *水生生物学报*, 1999, 23(6): 729-734.]
- [24] Ma Q, Liu X F, Feng W R, et al. Analyses of the molecular mechanisms associated with salinity adaption of *Trachidermus fasciatus* through combined iTRAQ-based proteomics and RNA sequencing-based transcriptomics[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2018, 136: 40-53.
- [25] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [26] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [27] Suresh N, Jayaraman J. The adaptation to salinity: Response of fish gill mitochondria to salinity stress[J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1983, 15(6): 363-377.
- [28] Sun Y X, Dong H B, Duan Y F, et al. Progresses in stress damage and protection studies on fish intestine[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2019(3): 174-183. [孙永旭, 董宏标, 段亚飞, 等. 鱼类肠道应激及其损伤防护研究进展[J]. *海洋湖沼通报*, 2019(3): 174-183.]
- [29] Sun M L, Lü H Q, Bao N, et al. *IgM*, *NKCC1* and *HSP70* gene expression in juvenile *Takifugu rubripes* under acute low-salinity stress[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(1): 65-72. [孙梦蕾, 吕绘倩, 暴宁, 等. 急性低盐胁迫下红鳍东方鲀幼鱼 *IgM*、*NKCC1* 和 *HSP70* 基因的表达[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(1): 65-72.]
- [30] Tseng Y C, Hwang P P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 148(4): 419-429.
- [31] Taylor R P, Benjamin I J. Small heat shock proteins: A new classification scheme in mammals[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2005, 38(3): 433-444.

Effects of low salinity stress on the expression profiling of *HSPB1*, *HSPB7*, and *HSPB11* in the roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*)

KUANG Jiehua¹, MA Qian^{1,2}, MAO Feifan¹, LI Ang², LIU Xinfu², ZHOU Qiling¹, ZHUANG Zhimeng²

1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: The aim of this study was to explore the role of *HSPB1*, *HSPB7*, and *HSPB11* in stress-responsive regulation of roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*) under low salinity stress. Firstly, sequences of these genes were obtained from transcriptome data of *T. fasciatus*, and phylogenetic analysis was performed. In this study, fish were subjected to two different acute osmotic treatments (salinity changing rate at 27 and 1.1 ppt/h), expression patterns of the three *HSPB* genes in the four target tissues (gills, intestines, kidney, and liver) were examined using qRT-PCR. Phylogenetic analysis revealed that *HSPB1*, *HSPB7*, and *HSPB11* genes respectively formed an independent cluster, in which *T. fasciatus HSPB1*, *HSPB7*, and *HSPB11* protein shared high identity with those of Perciformes, Cypriniformes, and Cyprinodontiformes species, teleost *HSPB1*, *HSPB7*, and *HSPB11* proteins formed a single lineage distinct from those of other vertebrates. Tissue-specific gene expression patterns in all three target genes showed that each tissue had a specific gene expression pattern in response to salinity changes. In the gills, the expression of *HSPB1*, *HSPB7*, and *HSPB11* increased significantly at 12 h, but different expression patterns were identified in the other tissues. In the intestines, the expression of *HSPB1* decreased significantly at 48 h under the relative chronic salinity stress, while the expression of *HSPB7* and *HSPB11* significantly increased; under the acute salinity stress, mRNA levels of *HSPB1* and *HSPB7* increased significantly at 24 h, and the expression of *HSPB1* significantly decreased. In the kidney, expression of *HSPB1*, *HSPB7*, and *HSPB11* was significantly upregulated at 24 h in response to the relative chronic salinity stress; under the acute salinity stress, the expression of *HSPB1* decreased significantly, but the expression of *HSPB7* and *HSPB11* were significantly upregulated. The expression of *HSPB7* was not detected in the liver; no significant difference in *HSPB1* expression was detected under chronic salinity stress, but a significantly upregulated *HSPB1* expression was found under the acute low salinity stress; the expression of *HSPB11* was significantly upregulated under both treatments. These results demonstrate the differences among *HSPB1*, *HSPB7*, and *HSPB11* expression profiling in the stress-responsive regulation activity of *T. fasciatus*, these findings could provide a theoretical foundation for revealing the role of small heat shock proteins in fish stress-responsive regulation and the molecular mechanism of migratory fish salinity adaptation.

Key words: *Trachidermus fasciatus*; small heat shock protein; salinity stress; gene expression

Corresponding author: MA Qian. E-mail: maq@gdou.edu.cn