

高温胁迫对南移仿刺参热休克蛋白基因和免疫酶活力的影响

杨福元, 杨求华, 肖益群, 王丽莉, 吴建绍, 周宸, 林琪

Effects of high temperature stress on heat shock protein gene and immune enzyme activity of *Apostichopus japonicus* moved southward

YANG Fuyuan, YANG Qiuhua, XIAO Yiqun, WANG Lili, WU Jianshao, ZHOU Chen, LIN Qi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210603482>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

镉和低pH胁迫对中华绒螯蟹免疫应答及相关基因表达的影响

Effects of cadmium and low pH stress on immune response and expression of related genes in the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*)

上海海洋大学学报. 2022, (2): 373 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210303330>

水解单宁对副溶血弧菌感染凡纳滨对虾血液及血细胞免疫指标的影响

Effect of Hydrolyzable Tannins on Hemolymph and Cellular Immunological Responses of *Litopenaeus vannamei* Challenged by *Vibrio parahaemolyticus*

上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 12 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.002>

缢蛏在急性温度胁迫下的氧化应激响应及生理代谢变化

Study on oxidative stress response and physiological metabolism of *Sinonovacula constricta* under acute temperature stress

上海海洋大学学报. 2021, 30(2): 214 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191102847>

饲料中胆汁酸对红鳍东方脂肪组成及抗氧化能力的影响

Effect of dietary bile acid supplementation on fatty acid composition and anti-oxidative capacity of tiger puffer *Takifugu rubripes*

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 829 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191002833>

饲料中添加黄藤素对吉富罗非鱼生长性能、抗氧化能力和非特异性免疫的影响

Effects of dietary palmatine on growth performance, antioxidant capacity and non-specific immunity of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

上海海洋大学学报. 2021, 30(5): 812 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200703106>

文章编号: 1674-5566(2022)06-1361-12

DOI:10.12024/jsou.20210603482

高温胁迫对南移仿刺参热休克蛋白基因和免疫酶活力的影响

杨福元^{1,2}, 杨求华², 肖益群², 王丽莉^{2,3}, 吴建绍², 周 宸², 林 琪^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 福建省水产研究所 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361023)

摘要: 为了探究南移养殖仿刺参在高温胁迫下的应答特征, 测定南移仿刺参在不同温度下热休克蛋白基因 *hsp10*、*hsp60*、*hsp70* 和 *hsp90* 的表达变化, 以及不同温度下超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和溶菌酶(LSZ)的活性变化。结果发现, 实验组(20、24、28、32 °C)相比于对照组(16 °C), 仿刺参热休克蛋白基因的表达量有不同程度的变化, 尤其在 28 和 32 °C 高温组中, 各基因的表达量显著提高。其中, *hsp70* 相比与其他基因对热胁迫更为敏感, 在 28 °C 胁迫下, 南移仿刺参群体(S组)和北方群体(N组)肠道组织的对比中, N组表达量随时间增加的变化呈现逐步降低的趋势, S组呈现先升高后降低的趋势, 且除 *hsp70* 外, S组其他基因在各个时间点的表达量都低于N组。S组和N组体壁中 SOD 和 LSZ 活性随着温度升高呈先升高后降低的趋势, 而 T-AOC、CAT、ACP 和 AKP 的活性随温度升高呈下降趋势; 除 28 °C 下 S组 T-AOC 和 CAT 的活性低于 N组外, 在其他温度下, S组各个酶的活性都高于 N组。结果表明, 仿刺参南移养殖群体在福建地区经历了一周年的养殖后, 表现出了更高的温度耐受能力。

关键词: 仿刺参; 高温胁迫; 热休克蛋白; 免疫酶活力

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)隶属于海参纲(Holothuroidea)辛那参目(Synallactida)刺参科(Stichopodidae)仿刺参属(*Apostichopus*), 温带种, 主要分布在北太平洋浅海, 包括日本、朝鲜、俄罗斯远东沿海和中国北部沿海, 主要栖息地为岩礁或细沙泥底质的潮间带, 主要摄食沉积于海底表层的藻类碎屑、浮游动植物尸体、微生物以及夹杂其中的泥沙等颗粒^[1-2]。仿刺参是食用海参中品质最好、分布最广、产量最大的品种, 仿刺参养殖是我国水产养殖的重要产业之一。

温度是影响仿刺参生存、生长、繁殖的重要因子之一, 一般适宜的温度为 10 ~ 25 °C^[3]。温度过高或过低都会抑制仿刺参生长, 增加发病率。另外, 在夏季水温升高时, 仿刺参为适应高温环境会进入夏眠, 停止摄食、体质量减轻。在温度升高过程中, 仿刺参在生理生化水平上随之发生改变来适应高温带来的影响。目前关于仿

刺参受温度影响的研究比较广泛。徐冬雪^[4]研究了仿刺参热胁迫响应机制; 赵欢^[5]研究了仿刺参温度胁迫下热休克蛋白的表达变化; 臧元奇^[6]探究了仿刺参在不同环境胁迫下的生理生态学响应机制。WANG 等^[7]和王方雨^[8]研究了夏眠期间仿刺参体腔液内免疫酶活性变化; JI 等^[9]研究了升温与夏眠过程中仿刺参的免疫生理反应; DONG 等^[10]研究了在不同温度变化下仿刺参体内过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性变化, 探讨了高温驯化下仿刺参的热耐受性。本研究以南移养殖仿刺参和北方养殖仿刺参为实验材料, 在室内不同温度环境条件, 比较研究南移养殖仿刺参群体和北方养殖仿刺参群体热休克蛋白基因 *hsp10*、*hsp60*、*hsp70* 和 *hsp90* 在不同温度下的变化情况, 以及两个仿刺参群体抗氧化酶、磷酸酶和溶菌酶活力的变化情况, 以期以南移仿刺参的良种选育和幼苗培育提供参

收稿日期: 2021-06-15 修回日期: 2021-08-09

基金项目: 福建省渔业结构调整专项(2020HYJG02, 2021HYJG17, 2021HYJG18); 福建省海洋经济发展补助专项(FJHJF-L-2020-4)

作者简介: 杨福元(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为南移仿刺参良种选育。E-mail: yangfyandx@163.com

通信作者: 林 琪, E-mail: xmqlin@sina.com

考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用南移仿刺参来自福建省水产研究所东山基地(福建漳州)培育的1龄仿刺参,北方群体来自山东烟台地区培育的1龄仿刺参。每组各随机选取100只健康仿刺参,其中,南移仿刺参平均体质量为 (30.8 ± 3.6) g,北方仿刺参平均体质量为 (27.8 ± 1.9) g。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

仿刺参暂养在实验室的水槽中,水温控制在 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。2021年1月8日开始试验,根据南方仿刺参养殖环境的温度变化设置5个温度梯度:16(对照组)、20、24、28和 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。将南移仿刺参标记为S组,北方仿刺参标记为N组。S组和N组两组各设置5个平行,每个平行20只仿刺参,对应5个温度梯度。试验采用急性温度胁迫的方法,提前将海水用控温设备严格控制在相应温度,温度差控制在 $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。试验持续48 h,分别在0、3、6、12、24和48 h时,每组随机取3只仿刺参解剖采样,采集仿刺参的体壁和肠道,每组3

个重复。在12 h时取体壁组织测定酶活。将样本组织存放在2 mL的RNase free离心管中,放入液氮冷冻后转移到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.2.2 总RNA的提取

取混合的组织样品10~20 mg用FastPure[®] Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)提取RNA,用超微分光光度计(NanoDrop 2000)检测RNA的纯度和含量。

1.2.3 cDNA的制备

用TransScript[®] All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal,北京全式金生物技术有限公司)试剂盒进行逆转录,反应体系(共20 μL):5 \times TransScript[®] All-in-One SuperMix for qPCR 4 μL , gDNA去除剂1 μL ,总RNA 200 ng, RNase-free Water补足20 μL 。样品混合均匀后在PCR仪上进行逆转录反应,反应条件为 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应5 s。

1.2.4 引物的选择与合成

查找文献选择相应基因的引物序列(表1),引物由铂尚生物技术有限公司(上海)合成。

表1 仿刺参实时荧光定量PCR引物

Tab. 1 Quantitative real-time PCR primer for *A. japonicus*

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>β-actin</i> ^[4]	GGGCCAGCATTCCACTAATA	TGCCACGGGAGGTACTAAAC
<i>hsp10</i> ^[4]	GTGTAGGTGATAGGGTCTCCTT	GTGTAGGTGATAGGGTCTCCTT
<i>hsp60</i> ^[4]	TGTTGCAGGGAGTTGATCTCT	CCAACATTCTGCCATCTGTCT
<i>hsp70</i> ^[4]	GTCTCTGGTCTTTGAAACAGC	CTATCTTAGGAACGCCTCGTG
<i>hsp90</i> ^[5]	CTGAACAAAACCAAGCCATCTG	CAAGAGTGCACGGAACCTCAACT

1.2.5 实时荧光定量PCR

用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),在LightCycler 96上进行荧光定量PCR。反应体系(共20 μL):2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL ,上、下游引物各0.5 μL ,cDNA模板4 μL ,用ddH₂O补足20 μL 的反应体系。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 下变性10 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 下30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 下退火30 s,共进行45个循环;溶解曲线阶段95 $^{\circ}\text{C}$ 下变性10 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 下退火1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸15 s。每个样品3个平行试验

以减小误差。

1.2.6 免疫指标测定

利用南京建成生物工程研究所试剂盒测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、总抗氧化能力(T-AOC)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和溶菌酶(LSZ)。

1.2.7 数据处理

以 β -actin为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算出各候选基因的相对表达量,用Excel软件统计仿刺参南移群体(S组)和北方群体(N组)在不同温度下的SOD、CAT、T-AOC、ACP、AKP和

LSZ 酶活力的平均值和标准差 (Mean \pm SD), 所得结果用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 在单因素 ANOVA 方差分析达到显著水平 ($P < 0.05$) 时, 采用 Duncan 氏法进行多重比较。

2 结果

2.1 高温胁迫下仿刺参的状态变化

在试验过程中发现温度在 28 $^{\circ}\text{C}$ 以下时, N 组和 S 组仿刺参无明显差异, 而在 32 $^{\circ}\text{C}$ 的高温组中, N 组从实验开始时仿刺参表现出无附着力的状态, S 组在胁迫开始 3 h 前无异常现象; 温度胁迫 12 h 后, N 组出现化皮死亡; 胁迫 24 h 后, N 组仿刺参全部死亡; 而 S 组仿刺参仅出现吐脏现象; 胁迫 48 h 后, S 组仍有 3 只存活; 见图 1。结果表明, 南移仿刺参养殖群体较北方养殖群体具有更强的温度耐受特性。

2.2 高温胁迫下南移仿刺参热休克蛋白基因的表达变化

2.2.1 高温胁迫下南移仿刺参 *hsp10* 基因的表达变化

利用 qRT-PCR 技术检测仿刺参 *hsp10* 的 mRNA 在肠道组织中的表达量。结果显示 (图 2), 随着温度的升高, *hsp10* 的 mRNA 表达量在肠道中有不同程度的提高, 和对照组相比, 32 $^{\circ}\text{C}$ 组的热休克蛋白基因表达量有极显著性上调 ($P < 0.05$), 而在其他温度组中热休克蛋白基因的表达量都有不同程度的上调。在 32 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 随着胁迫时间的增长, 仿刺参肠道组织中的 *hsp10* mRNA 表达量呈上升趋势, 其中 6 h 前无显著差异 ($P > 0.05$), 而在 12 h 后呈显著升高 ($P < 0.05$)。

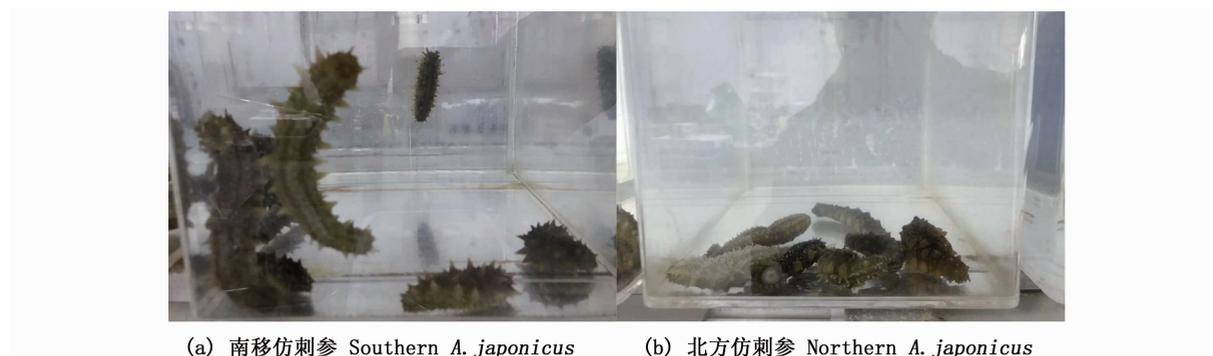


图 1 32 $^{\circ}\text{C}$ 胁迫条件下南移养殖仿刺参和北方养殖仿刺参的行为变化

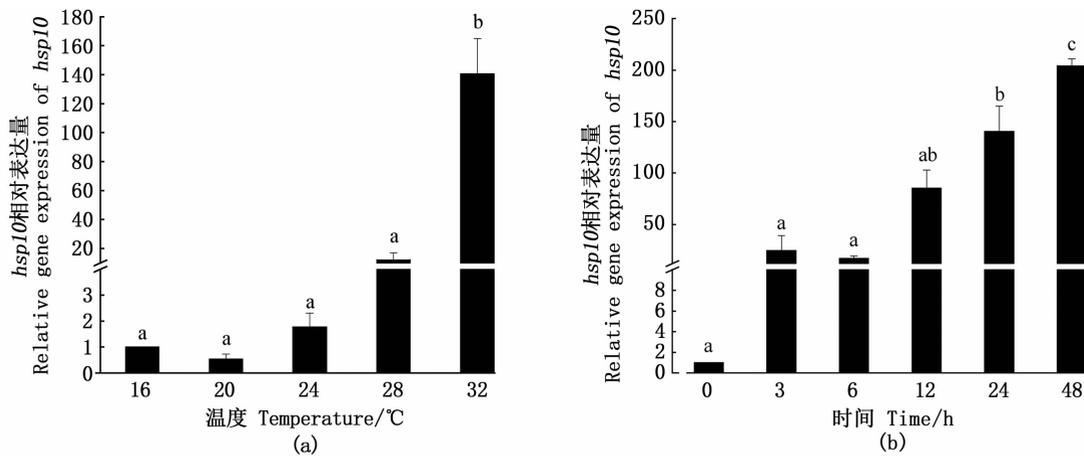
Fig. 1 Behavior changes at 32 $^{\circ}\text{C}$ of *A. japonicus* cultured in south and north of China

2.2.2 高温胁迫下南移仿刺参 *hsp60* 基因的表达变化

仿刺参肠道组织中 *hsp60* 基因的表达情况与 *hsp10* 基本类似。如图 3 所示, *hsp60* 的 mRNA 在高温下的表达量有大幅度的上调。其中, 32 $^{\circ}\text{C}$ 温度组 *hsp60* 基因的 mRNA 在肠道中的表达量随着时间的延长都呈逐步上升趋势, 对照组中 *hsp60* 基因的 mRNA 表达量最低。其中, 3 h 和 6 h 组, 12 h 和 24 h 组之间, *hsp60* 的表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 而在 24 h 和 48 h 组之间, *hsp60* 的表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2.3 高温胁迫下南移仿刺参 *hsp70* 的表达变化

如图 4 所示, 仿刺参 *hsp70* 基因对温度刺激更加敏感, 在 32 $^{\circ}\text{C}$ 刺激下, 仿刺参肠道组织中的 *hsp70* 的 mRNA 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中在 3 h 时 *hsp70* mRNA 的表达量是对照组的 6 908.82 倍, 在 24 h 内, 随着时间的延长, 其表达量呈现先升高再降低的趋势, 但在 48 h 时, *hsp70* mRNA 的表达量急剧上升, 显著高于其他时间组 ($P < 0.05$), 是对照组的 8 969.81 倍。

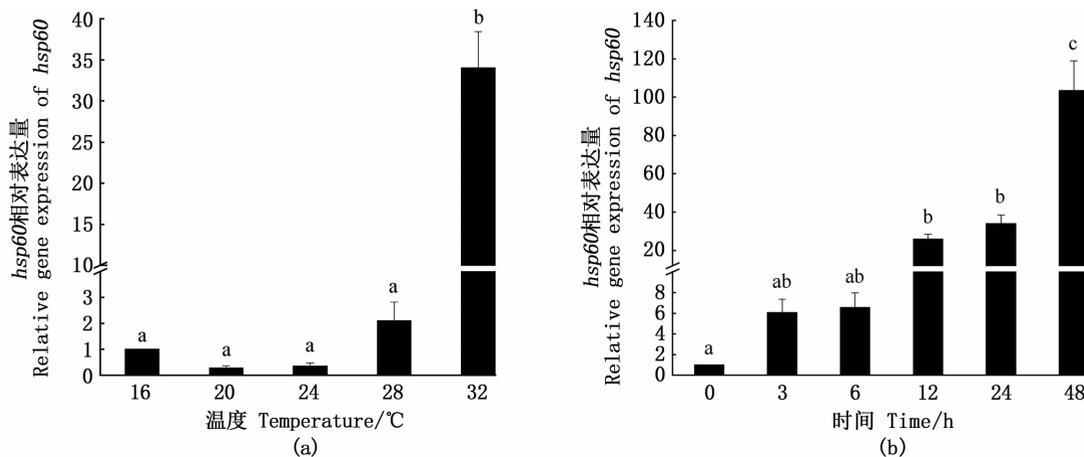


标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 标有相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letter means no significant difference ($P > 0.05$).

图2 不同温度 (a) 和同一温度 (32 °C) 不同时间 (b) 胁迫条件下仿刺参肠道 *hsp10* 基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression of *hsp10* gene in intestinal tract of sea cucumber *A. japonicus* at different temperature (a) and the same temperature (32 °C) and under different time (b) stress conditions



标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 标有相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letter means no significant difference ($P > 0.05$).

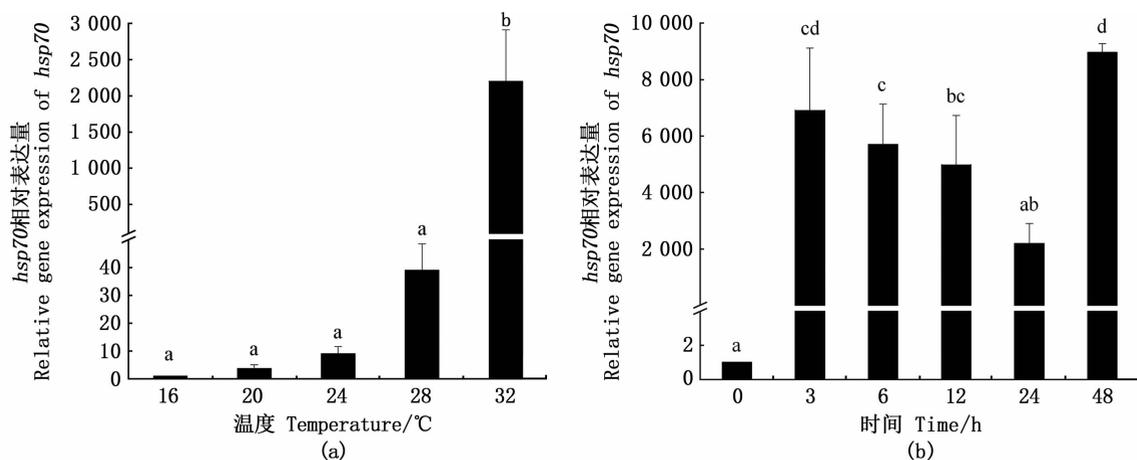
图3 不同温度 (a) 和同一温度 (32 °C) 不同时间 (b) 胁迫条件下仿刺参肠道 *hsp60* 基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *hsp60* gene in intestinal tract of sea cucumber *A. japonicus* at different temperature (a) and the same temperature (32 °C) and under different time (b) stress conditions

2.2.4 高温胁迫下南移仿刺参 *hsp90* 基因的表达变化

由图5可以看出,随着温度的升高,热休克蛋白基因 *hsp90* mRNA 的表达量呈逐渐升高趋势,在温度达到 32 °C 后,表达量相比于 16、20、24

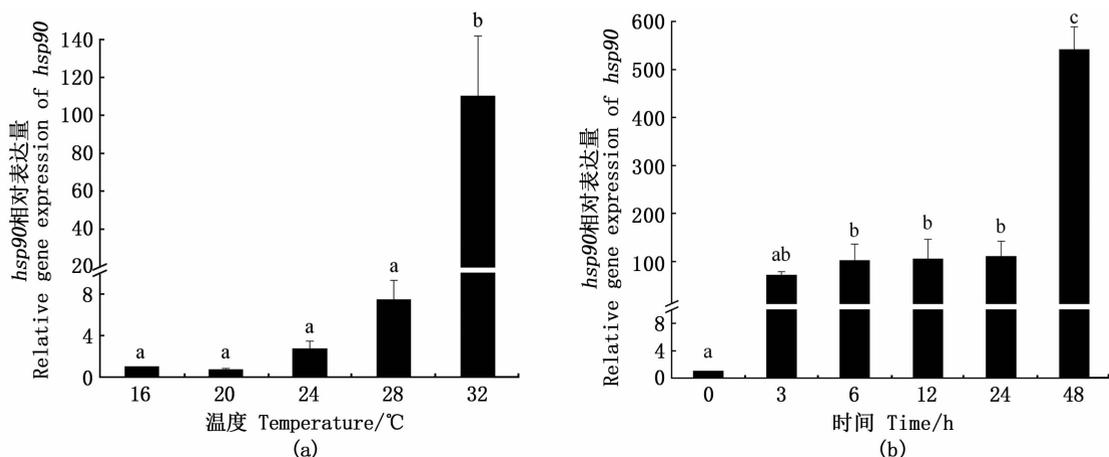
和 28 °C 温度组显著上升。在 32 °C 胁迫下,在 48 h 时的表达量达到峰值,而在胁迫 6、12 和 24 h 时, *hsp90* mRNA 的表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。



标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 标有相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letter means no significant difference ($P > 0.05$).

图4 不同温度 (a) 和同一温度 (32 °C) 不同时间 (b) 胁迫条件下仿刺参肠道 *hsp70* 基因的相对表达量
Fig. 4 Relative expression of *hsp70* gene in intestinal tract of sea cucumber *A. japonicus* at different temperature (a) and the same temperature (32 °C) and under different time (b) stress conditions



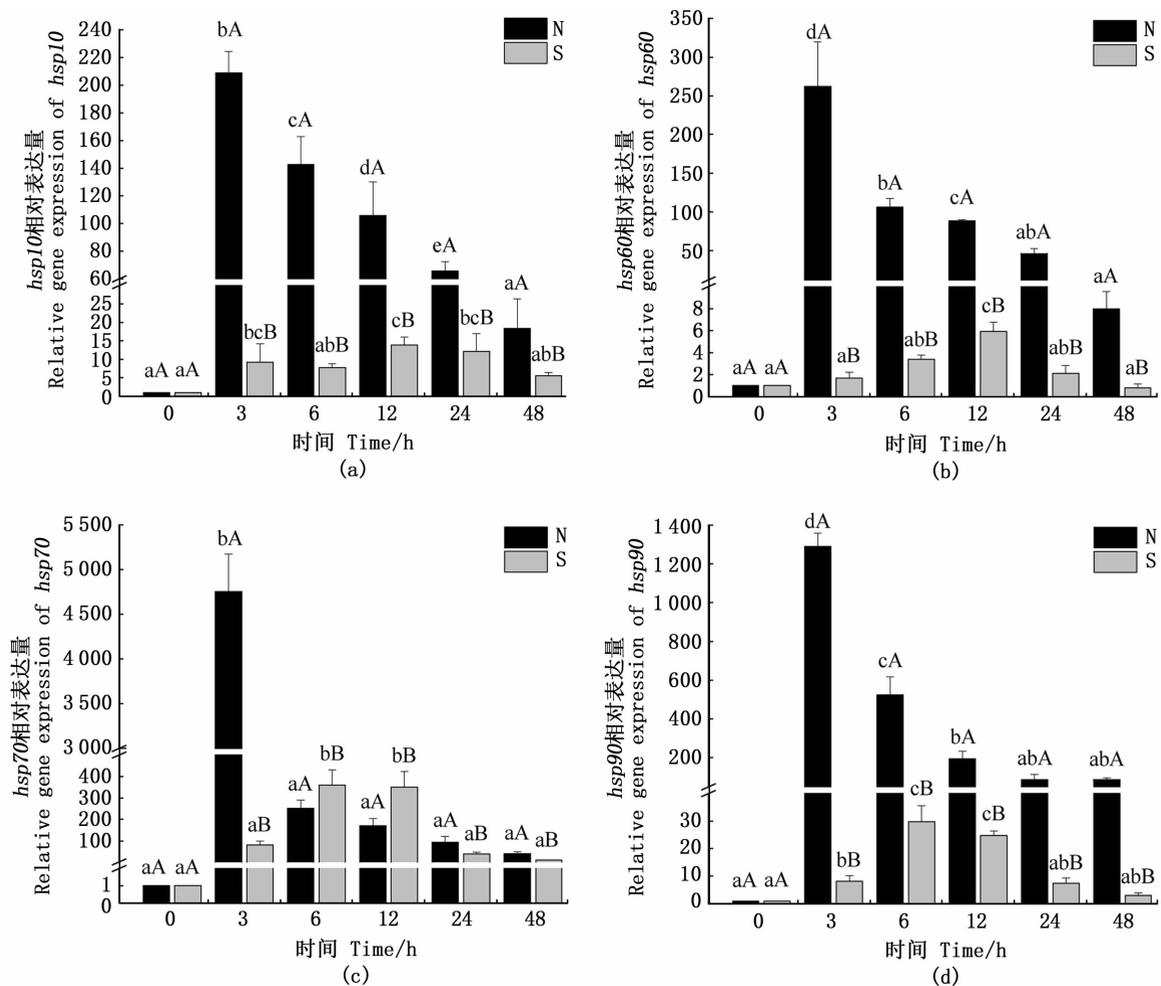
标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 标有相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letter means no significant difference ($P > 0.05$).

图5 不同温度 (a) 和同一温度 (32 °C) 不同时间 (b) 胁迫条件下仿刺参肠道 *hsp90* 基因的相对表达量
Fig. 5 Relative expression of *hsp90* gene in intestinal tract of sea cucumber *A. japonicus* at different temperature (a) and the same temperature (32 °C) and under different time (b) stress conditions

2.2.5 南、北方养殖仿刺参群体在高温胁迫下热休克蛋白基因的表达变化

由图6所示,在28 °C的急性胁迫下,N组群体的热休克蛋白基因表达都呈现逐渐降低的趋势,S组则呈现先升高后降低的趋势。热休克蛋白基因 *hsp10*、*hsp60* 和 *hsp90* 的 mRNA 表达量在

肠道中呈现出相似的变化情况,N组热休克蛋白基因的 mRNA 表达量在各个时间点都高于S组。在胁迫3 h后N组热休克蛋白基因的表达量达到峰值,并随着时间延长而逐步降低,而S组基因峰值出现的时间晚于N组。



不同小写字母表示同一群体内不同处理时间热休克蛋白基因的相对表达量差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示相同处理时间下 N 组和 S 组热休克蛋白基因的相对表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicated that the relative expression level of heat shock protein gene in the same population was significantly different at different treatment times ($P < 0.05$), and different capital letters indicated that the relative expression level of heat shock protein gene in the same group was significantly different between the N group and the S group at the same treatment time ($P < 0.05$).

图 6 28 °C 下仿刺参肠道中 *hsp10* (a)、*hsp60* (b)、*hsp70* (c) 和 *hsp90* (d) 基因相对表达量

Fig. 6 Relative expression of *hsp10* (a), *hsp60* (b), *hsp70* (c) and *hsp90* (d) genes in intestinal tract of *A. japonicus* at 28 °C

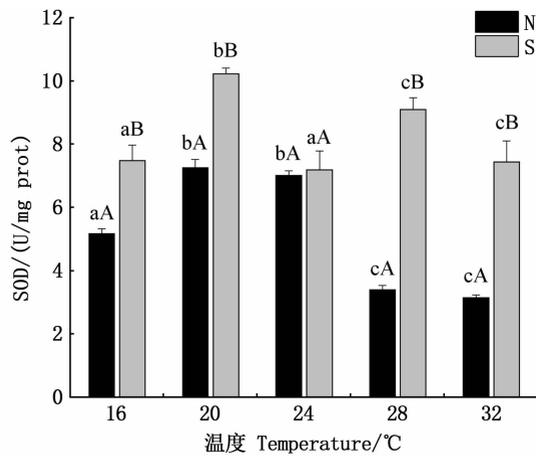
2.3 高温胁迫下仿刺参主要免疫酶活性测定

2.3.1 超氧化物歧化酶(SOD)

由图 7 可知, 仿刺参体壁 SOD 酶活力受温度的影响显著 ($P < 0.05$), 在 N 组和 S 组均呈现先升高后降低的趋势, 在 16、20、28 和 32 °C 刺激下, S 组的 SOD 酶活力均显著高于 N 组, 而在 24 °C 时两组差异不显著 ($P > 0.05$)。N 组: 20 °C 时 SOD 酶活力最高, 显著高于 16、28 和 32 °C 时的 SOD 酶活力。S 组: 20 °C 时 SOD 酶活力最高, 且显著高于其他温度组 ($P < 0.05$)。

2.3.2 过氧化氢酶(CAT)

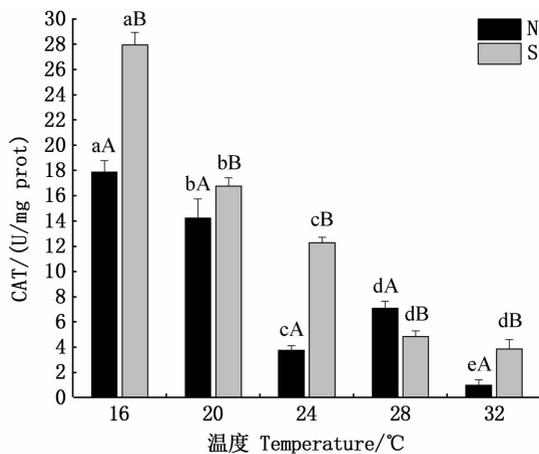
仿刺参体壁 CAT 酶活力变化见图 8, 随着温度的升高, N 组和 S 组的 CAT 酶活力逐渐降低。除在 28 °C 外, 其余温度组中 S 组仿刺参体壁的 CAT 酶活力显著高于 N 组 ($P < 0.05$)。N 组: 随着温度升高, 仿刺参体壁的 CAT 酶活力呈下降趋势, 各个温度组之间差异显著 ($P < 0.05$)。S 组: 在 28 和 32 °C 胁迫条件下的仿刺参 CAT 酶活力差异不显著 ($P > 0.05$)。



不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一温度下 N 组和 S 组免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P < 0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group N and S at the same temperature ($P < 0.05$).

图7 不同温度胁迫下仿刺参体壁 SOD 酶活力变化
Fig.7 SOD activity of *A. japonicus* at different temperature



不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一温度下 N 组和 S 组免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$)。

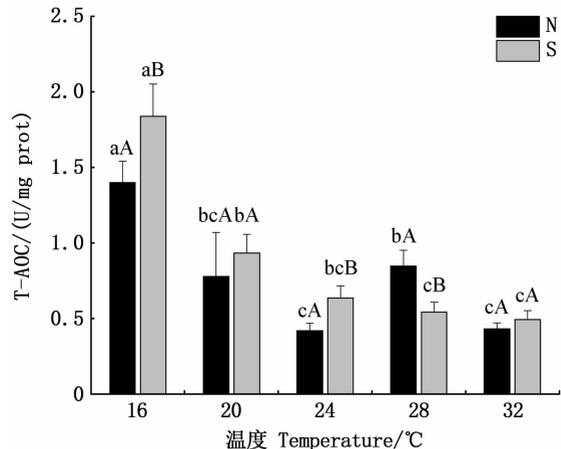
Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P < 0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group N and S at the same temperature ($P < 0.05$).

图8 不同温度胁迫下仿刺参体壁 CAT 酶活力变化
Fig.8 CAT activity of *A. japonicus* at different temperature

2.3.3 总抗氧化能力(T-AOC)

由图9所示,随着温度的升高,N组和S组仿刺参体壁组织的T-AOC酶活力呈下降趋势。N组:在16℃时T-AOC酶活力最高,且显著高于

20、24、28和32℃温度组 ($P < 0.05$),而在24、28和32℃温度组之间没有显著性差异 ($P > 0.05$)。S组:16℃下T-AOC酶活力显著高于其他温度组 ($P < 0.05$),28和32℃之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。N组和S组在16、24和28℃下的T-AOC酶活力具有显著性差异 ($P < 0.05$),且除24℃外,S组的T-AOC酶活力都高于N组。



不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一温度下 N 组和 S 组免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P < 0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group N and S at the same temperature ($P < 0.05$).

图9 不同温度胁迫下仿刺参体壁 T-AOC 酶活力变化
Fig.9 T-AOC activity of *A. japonicus* at different temperature

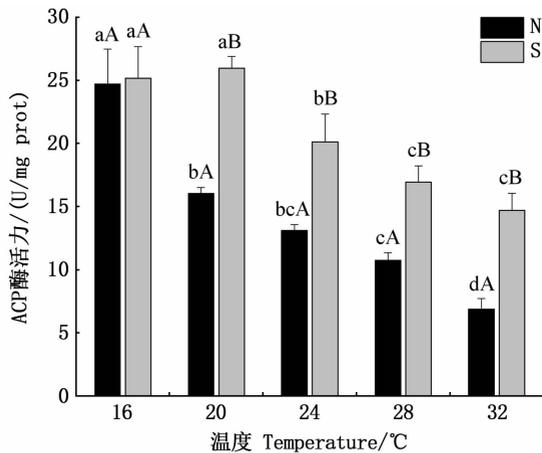
2.3.4 酸性磷酸酶(ACP)

由图10可以看出,随着温度的升高,N组和S组的ACP酶活力均呈下降趋势,且温度对两组仿刺参体壁ACP酶活力影响显著 ($P < 0.05$)。S组在各个温度下ACP酶活力均高于N组,S组和N组在16℃下的ACP酶活力差异不显著 ($P > 0.05$),在其他温度下两组具有显著性差异 ($P < 0.05$)。N组:在16~32℃各温度下的ACP酶活力有显著性差异 ($P < 0.05$),16℃时的ACP酶活力最高。S组:在16℃和20℃之间ACP酶活力无显著性差异 ($P > 0.05$),均显著高于24、28和32℃下的ACP酶活力 ($P < 0.05$)。

2.3.5 碱性磷酸酶(AKP)

由图11所示,随着温度升高,N组和S组的AKP酶活力均呈下降趋势,且两组在16℃和20℃的ACP酶活力与其他组之间存在显著差异 ($P < 0.05$),而在24、28和32℃组之间差异不显

著 ($P > 0.05$), N 组和 S 组在 16 和 20 °C 温度下的 ACP 酶活力有显著性差异 ($P < 0.05$), 在其他温度下差异不显著 ($P > 0.05$)。

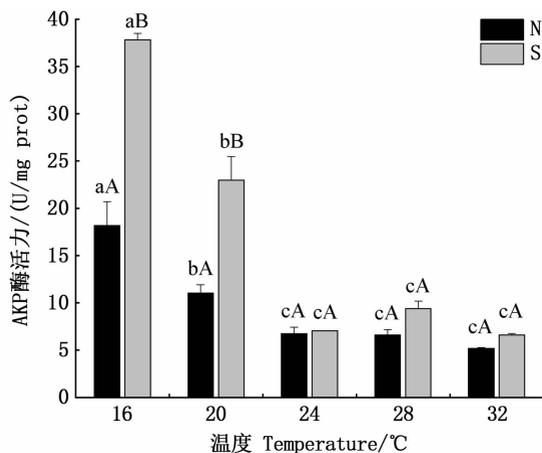


不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一温度下 N 组和 S 组免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P < 0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group N and S at the same temperature ($P < 0.05$).

图 10 不同温度胁迫下仿刺参体壁 ACP 酶活力变化

Fig. 10 ACP activity of *A. japonicus* at different temperature



不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一温度下 N 组和 S 组免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$)。

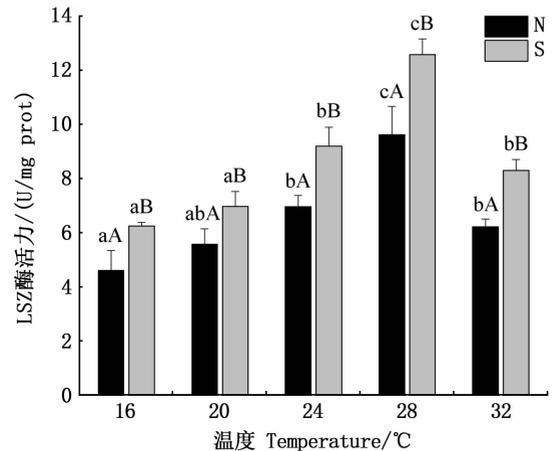
Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P < 0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group N and S at the same temperature ($P < 0.05$).

图 11 不同温度胁迫下仿刺参体壁 AKP 酶活力变化

Fig. 11 AKP activity of *A. japonicus* at different temperature

2.3.6 溶菌酶(LSZ)

由图 12 可以看出,随着温度的升高,N 组和 S 组的 LSZ 酶活力呈现先升高后降低的趋势,温度对 LSZ 酶活力变化影响显著。N 组:28 °C 时 LSZ 酶活力最高,显著高于其他温度下的 LSZ 酶活力 ($P < 0.05$),除 24 和 32 °C 之间差异不显著 ($P > 0.05$)外,其他各组间均具有显著差异 ($P < 0.05$)。S 组:28 °C 下的 LSZ 酶活力最高,显著高于其他温度下的 LSZ 酶活力,且每个温度下 S 组的 LSZ 酶活力均显著高于 N 组 ($P < 0.05$)。



不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一温度下 N 组和 S 组免疫酶活力差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P < 0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group N and S at the same temperature ($P < 0.05$).

图 12 不同温度胁迫下仿刺参体壁 LSZ 酶活力变化

Fig. 12 LSZ activity of *A. japonicus* at different temperature

3 讨论

3.1 热休克蛋白基因

热休克蛋白基因是一种在受到热刺激后被激活表达,产生一组特殊蛋白并抑制合成其他蛋白,所产生的蛋白质称为热休克蛋白。热休克蛋白是一类结构和功能非常保守的蛋白家族。热休克蛋白可以加速热胁迫下非正常折叠的蛋白降解,或者使这些错误构象的蛋白进行重新折叠,为细胞提供有效保护^[11]。本研究中,高温诱导仿刺参的 *hsp10*、*hsp60*、*hsp70*、*hsp90* 基因表达量显著上调。随着温度的升高,4 种热休克蛋白基因的表达均呈上升趋势,尤其在 32 °C 下,*hsp* 基因的表达量相比于 16 °C 时有极显著的升高。

在对其他物种的研究中, HUANG 等^[12]发现凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的 *hsp60* 基因表达上升。在斑节对虾(*Penaeus monodon*)和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的研究中发现, *hsp70* 和 *hsp90* 的表达被显著诱导上升^[13-15]。在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[16]及三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[17]的研究中也有相似的结果。其次,在 32 °C 刺激下,随着胁迫时间的延长,热休克蛋白基因的表达量呈上升趋势。在徐冬雪^[4]的研究中,26 °C 胁迫下, HSPs 的表达呈现先升高再下降的变化,在 4~8 h 内达到峰值。这一点与本研究结果有所区别,热休克反应的衰减说明之前 *hsps* 的累积已减轻了细胞内的蛋白损伤,细胞将更多能量用于其他细胞活动。而在本研究中,胁迫温度相对较高,对于仿刺参造成了更为严重的损伤,仿刺参体内的 HSPs 不足以修复或减缓细胞内的蛋白损伤,导致随着胁迫时间的延长, *hsps* 基因的表达进一步升高。在 32 °C 刺激的 24 h 内, *hsp70* 的表达呈先升高再降低的趋势,然后在 48 h 时其表达量又急剧上升,并且 *hsp70* 的表达量比 *hsp10*、*hsp60* 和 *hsp90* 更高。推测其主要原因是不同 *hsps* 在高温刺激下发挥的作用不同。例如: *hsp10* 在细胞受到高温等刺激下大量表达,是调节细胞凋亡的关键信号通路,通过抑制细胞凋亡的发生,发挥保护细胞作用; *hsp60* 可参与蛋白折叠、蛋白转运和复杂蛋白的组装等; *hsp90* 主要参与某些转录因子和蛋白激酶的构象调节; *hsp70* 在热胁迫下的功能更为广泛,可以帮助细胞质、线粒体、内质网内的蛋白正确折叠等^[11, 18-19]。本研究结果发现,南移养殖仿刺参在高温胁迫下受损伤程度更低,且其热休克蛋白基因的表达量显著低于北方养殖仿刺参群体,这种变化表明,南移仿刺参具有更好的耐高温能力。

3.2 高温胁迫对南移仿刺参抗氧化能力的影响

环境温度的变化会引起仿刺参机体的生理免疫等反应发生变化;随着温度升高,会引起仿刺参代谢水平的变化,增加活性氧的形成,导致仿刺参体内氧化过程和抗氧化防御系统之间的失衡,从而引起氧化胁迫,造成机体组织损伤^[20]。SOD 是第一个对抗活性氧自由基的抗氧化酶,参与清除体内超氧阴离子自由基,可以防止机体损伤和衰老;CAT 是生物体内过氧化物酶体的标志

酶,能够催化过氧化氢分解;T-AOC 是生物体对外来刺激的应激能力,是衡量机体抗氧化系统功能状态的综合性指标^[21-22]。在本研究中,随着温度的升高,S 组与 N 组体壁中的 SOD 活性均呈先升高后降低的趋势,且在 28 °C 和 32 °C 的高温胁迫组中,S 组体壁的 SOD 酶活力均显著高于 N 组。南、北方两个群体的仿刺参体壁 CAT 和 T-AOC 酶活力均随温度的升高而降低,这一变化趋势与刘石林等^[23]研究的高温胁迫下仿刺参耐高温群体与普通群体抗氧化酶活性变化趋势相似,这表明在急性高温胁迫下,随着温度的提高,仿刺参体内的活性氧急剧上升抑制了抗氧化酶的活性,进而导致仿刺参组织受损而死亡,但 S 组由于长时间生活在较高温度的自然环境中,相对于 N 组,S 组的抗氧化酶活性显著高于 N 组。因此,南移仿刺参在高温胁迫时仍具有较强的保护机体免受氧化损伤的能力。

3.3 高温胁迫对南移仿刺参磷酸酶活力的影响

酸性磷酸酶,广泛分布于生物界,一般认为其位于溶酶体内,是溶酶体的标志酶。与碱性磷酸酶相对应,酸性磷酸酶可以在酸性环境下催化各种醇和酚的磷酸酯进行水解反应。碱性磷酸酶在碱性环境下,既可催化各种醇和酚的磷酸酯进行水解反应,又有磷酸的转移作用,因此在细胞膜上较为活跃^[6, 24]。本研究中,随着温度的升高,S 组和 N 组的 ACP 和 AKP 呈下降趋势,这与仿刺参在干露^[25]、饥饿和夏眠^[26]等胁迫条件下酶活力随时间的变化趋势基本一致;杨东敏等^[27]研究发现菲律宾蛤仔在高温胁迫条件下 AKP 同样出现了降低的趋势。S 组在不同温度下的 ACP 和 AKP 活力高于 N 组,尤其在 20~32 °C, S 组的 ACP 活力显著高于 N 组。这表明,相对于 N 组,S 组常年处于较高的温度下,对高温具有较强的适应力,在高温胁迫下具有较强的免疫防御能力。

3.4 高温胁迫对南移仿刺参溶菌酶活力的影响

溶菌酶(LSZ)是一种碱性蛋白酶,广泛存在于生物体许多组织和体液中,是专门作用于微生物细胞壁的水解酶,在抵抗外来病原生物入侵中起重要的作用^[28-29]。本研究发现,随着温度升高,S 组和 N 组体壁的 LSZ 酶活力呈先升高后降低的趋势。相关研究表明,温度对溶菌酶活力变化影响显著。曹学顺等^[20]对仿刺参的研究发现,升温过程中仿刺参体腔液 LSZ 酶活性先升高后

降低又升高;刘石林等^[23]对仿刺参研究发现,随着海水温度的上升,LSZ 酶活力也呈先升高后降低的变化趋势;秦艺铭等^[21]研究发现在急剧升温方式下,23、27 °C 处理组毛蚶肝胰腺中 LSZ 酶活性随时间的变化趋势为先升后降。这与本研究中 LSZ 酶活力变化趋势相一致。以上结果表明,一定程度范围内的温度胁迫可以增强 LSZ 酶活力,但超过机体的耐受范围就会破坏机体的免疫系统,导致 LSZ 酶活力降低,最后危及生物的生命。

参考文献:

- [1] 崔龙波,董志宁,陆瑶华. 仿刺参消化系统的组织学和组织化学研究[J]. 动物学杂志, 2000, 35(6): 2-4.
CUI L B, DONG Z N, LU Y H. Histological and histochemical studies on the digestive system of *Apostichopus japonicus* [J]. Chinese Journal of Zoology, 2000, 35(6): 2-4.
- [2] 廖玉麟. 中国动物志-棘皮动物门. 海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
LIAO Y L. Zoology of China-Echinodermata. Holothuroidea [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [3] 董云伟,董双林,田相利,等. 不同水温对刺参幼参生长、呼吸及体组成的影响[J]. 中国水产科学, 2005, 12(1): 33-37.
DONG Y W, DONG S L, TIAN X L, et al. Effects of water temperature on growth, respiration and body composition of young sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(1): 33-37.
- [4] 徐冬雪. 仿刺参热胁迫响应的分子调控特征研究与 SNP 标记筛选[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2016.
XU D X. Research of molecular mechanisms of heat shock response and heat-resistance SNP in sea cucumbers *Apostichopus japonicus* [D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016.
- [5] 赵欢. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 对温度胁迫响应分子机理的基础研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2011.
ZHAO H. Fundamental research on the molecular mechanism in response to heat stress in *Apostichopus japonicus* (Selenka) [D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2011.
- [6] 臧元奇. 刺参 (*Apostichopus japonicus* Selenka) 对典型环境胁迫的生理生态学响应及其机制研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
ZANG Y Q. Ecological and physiological mechanisms on typical environmental factors in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [7] WANG F Y, YANG H S, GABR H R, et al. Immune condition of *Apostichopus japonicus* during aestivation [J]. Aquaculture, 2008, 285(1/4): 238-243.
- [8] 王方雨. 刺参 *Apostichopus japonicus* 生态免疫与夏眠的基础研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2008.
WANG F Y. Mechanism of ecological immunity and aestivation of *Apostichopus japonicus* [D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008.
- [9] JI T T, DONG Y W, DONG S L. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: aestivation and temperature [J]. Aquaculture, 2008, 283(1/4): 180-187.
- [10] 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.
- [11] PARSELL D A, LINDQUIST S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins [J]. Annual Review of Genetics, 1993, 27: 437-496.
- [12] HUANG W J, LEU J H, TSAU M T, et al. Differential expression of *Lhsp60* in shrimp in response to environmental stress [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(2): 576-582.
- [13] RUNGRASSAMEE W, LEELATANAWIT R, JIRAVANICHPAISAL P, et al. Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(10): 1082-1089.
- [14] LI F H, LUAN W, ZHANG C S, et al. Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (Fehsp90) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia [J]. Cell Stress and Chaperones, 2009, 14(2): 161-172.
- [15] LUAN W, LI F H, ZHANG J Q, et al. Identification of a novel inducible cytosolic *hsp70* gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and comparison of its expression with the cognate *Hsc70* under different stresses [J]. Cell Stress and Chaperones, 2010, 15(1): 83.
- [16] LIU J, YANG W J, ZHU X J, et al. Molecular cloning and expression of two *hsp70* genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Cell Stress & Chaperones, 2004, 9(3): 313-323.
- [17] ZHANG X Y, ZHANG M Z, ZHENG C J, et al. Identification of two *hsp90* genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(4): 465-473.

- [18] 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.
- [19] GEORGOPOULOS C, WELCH W J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones[J]. *Annual Review of Cell Biology*, 1993, 9(1): 601-634.
- [20] 曹学顺, 丁君, 白雪秋, 等. 升温对“水院1号”和大连养殖刺参非特异性免疫影响的研究[J]. *农学学报*, 2015, 5(1): 80-85.
CAO X S, DING J, BAI X Q, et al. The study of rising temperature on serum non-specific immune in Shuiyuan No. 1 sea cucumber populations and the cultured sea cucumber populations[J]. *Journal of Agriculture*, 2015, 5(1): 80-85.
- [21] 秦艺铭, 陈丽梅, 李莉, 等. 2种升温方式对毛蚶呼吸代谢及免疫相关酶活性的影响[J]. *水产科学*, 2021, 40(1): 29-36.
QIN Y M, CHEN L M, LI L, et al. Effects of two warming patterns on respiratory metabolism and immune-related enzyme activities of ark shell *Scapharca subcrenata* [J]. *Fisheries Science*, 2021, 40(1): 29-36.
- [22] 贲月, 郝振林, 丁君, 等. 高温对虾夷扇贝体腔液免疫酶活力的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(6): 858-863.
BEN Y, HAO Z L, DING J, et al. Effects of high temperature on the immuno-enzymetic activity in coelomic fluid of *Mizuhopecten yessoensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 858-863.
- [23] 刘石林, 茹小尚, 徐勤增, 等. 高温胁迫对刺参耐高温群体和普通群体主要免疫酶活力的影响[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(2): 344-351.
LIU S L, RU X S, XU Q Z, et al. Effects of high-temperature stress on several immune enzyme activities of *Apostichopus japonicus* thermotolerant and normal species[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(2): 344-351.
- [24] 王天神, 周鑫, 赵朝阳, 等. 不同温度条件下克氏原螯虾免疫酶活性变化[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(12): 239-241.
WANG T S, ZHOU X, ZHAO C Y, et al. Immunoenzymatic activity changes of *Procambarus clarkii* different temperature conditions [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 40(12): 239-241.
- [25] 田相利, 何瑞鹏, 钱圆, 等. 干露胁迫对刺参体壁非特异性免疫的影响[J]. *河北渔业*, 2014(7): 21-26, 35.
TIAN X L, HE R P, QIAN Y, et al. Effects of desiccation on non-specific immune indices in sea cucumber *Apostichopus japonicus* under different temperatures [J]. *Hebei Fisheries*, 2014(7): 21-26, 35.
- [26] DU R B, ZANG Y Q, TIAN X L, et al. Growth, metabolism and physiological response of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka during periods of inactivity[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2013, 12(1): 146-154.
- [27] 杨东敏, 张艳丽, 丁鉴锋, 等. 高温、低盐对菲律宾蛤仔免疫能力的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2017, 32(3): 302-309.
YANG D M, ZHANG Y L, DING J F, et al. Synergistic effects of high temperature and low salinity on immunity of Manila clam *Ruditapes philippinarum* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(3): 302-309.
- [28] 李文龙, 梁兴明, 梁萌青, 等. 温度对大菱鲆幼鱼生长及免疫相关酶活性的影响[J]. *水产科学*, 2017, 36(3): 311-316.
LI W L, LIANG X M, LIANG M Q, et al. Effects of temperature on growth and enzyme activity related to immunity in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(3): 311-316.
- [29] 程操. 不同品系虾夷扇贝应对高温变化的比较研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2019.
CHENG C. Comparative study on the different strains of *Mizuhopecten yessoensis* response to high temperature [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2019.

Effects of high temperature stress on heat shock protein gene and immune enzyme activity of *Apostichopus japonicus* moved southward

YANG Fuyuan^{1,2}, YANG Qihua², XIAO Yiqun², WANG Lili^{2,3}, WU Jianshao², ZHOU Chen², LIN Qi^{1,2}
(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361021, Fujian, China; 3. Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361023, Fujian, China)

Abstract: In order to explore the response characteristics of *Apostichopus japonicus* transplanted to the south under high temperature stress, and to determine the expression changes of heat shock protein genes *hsp10*, *hsp60*, *hsp70* and *hsp90* at different temperatures, we studied the activity changes of superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC), catalase (CAT), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP) and lysozyme (LSZ) at different temperature. The results showed that the expressions of heat shock protein genes in the experimental group (20, 24, 28, 32 °C) were different from those in the control group (16 °C), especially in the high temperature groups of 28 and 32 °C. The expression of each gene increased significantly. *Hsp70* is more sensitive to heat stress than other genes. Under 28 °C stress, in the comparison of intestinal tissues of southern population (group S) and northern population (group N), the expression of group N decreased gradually with the increase of time, while that of group S increased at first and then decreased. Except for *hsp70*, the expression of other genes in group S was lower than that in group N at each time point. The activities of SOD and LSZ in S and N groups increased at first and then decreased with the increase of temperature, while the activities of T-AOC, CAT, ACP and AKP decreased with the increase of temperature. Except that the activities of T-AOC and CAT in group S were lower than those in group N at 28 °C, the activities of all enzymes in group S were higher than those in group N at other temperature. The results showed that the *A. japonicus* population that moved south showed higher temperature tolerance after a long period of annual culture in Fujian.

Key words: *Apostichopus japonicus*; high temperature stress; heat shock protein; immune enzyme activity