

pH、氨氮胁迫对中国对虾 *HSP90* 基因表达的影响

王芸^{1,2} 李健^{1*} 张喆² 何玉英¹ 常志强¹
陈萍¹ 李吉涛¹ 刘德月¹

(¹ 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(² 农业部水产品加工重点实验室 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

摘要 研究了 pH、氨氮胁迫对中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 血细胞、肝胰腺、鳃和肌肉组织 *HSP90* 基因时空表达的影响。分别将中国对虾暴露于 pH 7.0、9.0 的水体中 148h 和不同氨氮浓度的水体中 96h, 结果表明, pH(7.0, 9.0) 胁迫条件下中国对虾鳃、肌肉和血细胞 *HSP90* 基因表达均上调, 肝胰腺 *HSP90* 基因表达对两种 pH 胁迫差异明显; pH 7.0 胁迫条件下, *HSP90* 基因表达 3h 达峰值后明显降低; pH 9.0 胁迫时, *HSP90* 基因表达水平逐渐升高, 整个胁迫过程中均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 说明中国对虾肝胰腺组织是高 pH 胁迫的响应器官。6mg/L 氨氮浓度组鳃和肌肉组织 *HSP90* 基因表达水平 24h 达最高值, 分别为对照组的 5.46 和 1.55 倍; 各胁迫组肝胰腺和血细胞 *HSP90* 基因表达水平分别于 6h 和 48h 达到最高值, 为对照组的 1.33~2.08 倍和 2.20~5.45 倍。肝胰腺组织对氨氮胁迫表现敏感, 短时间内(6h)通过上调 *HSP90* 基因表达水平保护细胞; 鳃组织 *HSP90* 基因表达波动范围最大, 说明鳃组织需要更高表达量的 *HSP90* 保护细胞。当氨氮浓度持续 48~96h 维持在 2~6mg/L, 各组织 *HSP90* 基因表达水平显著降低。

关键词 中国对虾 *HSP90* 基因 pH 胁迫 氨氮胁迫

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)05-0043-08

Effects of pH and ammonia-N stresses on *HSP90* gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*

WANG Yun^{1,2} LI Jian^{1*} ZHANG Zhe² HE Yu-ying¹
CHANG Zhi-qiang¹ CHEN Ping¹ LI Ji-tao¹ LIU De-yue¹

(¹ Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300)

ABSTRACT Heat shock protein 90 (*HSP90*) is a highly conserved molecular chaperone contributing to the folding, maintenance of structural integrity and proper regulation of a subset of

国家虾产业技术体系项目(CARS-47)、国家自然科学基金面上项目(31172401)、公益性行业(农业)科研专项(201103034)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)共同资助

* 通讯作者。E-mail: lijian@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830183

收稿日期: 2012-05-30; 接受日期: 2012-07-03

作者简介: 王芸(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事水产动物健康养殖研究。E-mail: wangyun088@tom.com, Tel: (020)89221832

cytosolic proteins. *HSP90* is identified in some crustaceans, however, few studies on the transcript of *HSP90* gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in response to environmental pH and ammonia-N stresses have been reported. In the pH stress experiment, *F. chinensis* were exposed to marine water with the pH value of 7.0 and 9.0 for 148h. During the ammonia-N stress experiment, *F. chinensis* were exposed to marine water with different concentration of ammonia-N for 96h. The gene expression profiling of *HSP90* in different tissues (gill, hepatopancreas, muscle and haemocytes) after pH and ammonia-N stresses were analyzed by quantitative RT-PCR. The *HSP90* gene expression in gill, muscle and haemocytes of Chinese shrimp increased when exposed to pH 7.0 and 9.0, but the time of the highest gene expression level was different. Obvious different expression of *HSP90* gene in hepatopancreas exposed to pH 7.0 and 9.0 stress was observed. *HSP90* transcripts increased to its highest level post-stress at 3h and then decreased in the pH 7.0 treatment, while in the pH 9.0 treatment the *HSP90* gene expression was always higher than that in the control, which indicated the hepatopancreas of Chinese shrimp was the responsive organ to the high pH stress. When the concentration of ammonia-N in marine water was 6 mg/L, the gene *HSP90* expression in gill and muscle reached its highest level about 5.46-fold and 1.55-fold respectively post-stress at 24h. *HSP90* expression in hepatopancreas and haemocytes in all treatments increased to the maximum value in the range of 1.33~2.08 times and 2.20~5.45 times post-stress at 6h and 48h respectively. The results indicated that the hepatopancreas of Chinese shrimp is more sensitive to ammonia-N stress than other tissues, in which *HSP90* expression was up regulated drastically at 6h. It is also illustrated that gill needs higher expression of *HSP90* gene than other tissues for cell protection based on the results of the large fluctuation range of *HSP90* gene expression in gill. When the concentration of ammonia-N was continuously higher than 2~6 mg/L, the *HSP90* expression in all tested tissues was significantly decreased.

KEY WORDS *Fenneropenaeus chinensis* Heat shock protein 90 (*HSP90*)
pH stress Ammonia-N stress

对虾的病害问题直接影响对虾养殖业的可持续性发展,其中主要原因之一是对虾高密度集约化养殖带来的养殖环境的剧烈恶化,降低了对虾的适应性(Capy *et al.* 2000)。养殖水环境的剧烈变化对养殖对虾造成了环境胁迫,降低了对虾的免疫反应功能(Le Moullac *et al.* 2000)。目前的研究结果表明,pH和氨氮胁迫影响对虾的免疫系统功能,导致对虾的氧化系统损伤,甚至诱导细胞的凋亡(赵先银等 2011;王芸等 2011;Wang *et al.* 2011)。热应激蛋白(Heat shock protein, HSP)是自然界普遍存在的高度保守性抗胁迫蛋白家族,作为分子伴侣保护变性蛋白、促进受损伤蛋白质的复性或者水解不能复性的受损伤蛋白质(Hartl 1996)。目前在多种甲壳动物中已经克隆了 *HSP90* 基因(Li *et al.* 2012),且该基因对于环境胁迫如温度和缺氧非常敏感,所以研究者认为中国对虾在应对环境胁迫过程中,*HSP90* 基因发挥着重要的作用(Li *et al.* 2009)。有关多种无脊椎动物的 *HSP90* 研究表明,各种环境胁迫因子如热应激、重金属、渗透压和细菌感染等都能够诱导 *HSP90* 基因的表达(Gao *et al.* 2007,2008;Pan *et al.* 2000),因此 *HSP90* 作为环境胁迫的生物标志物之一(Venn *et al.* 2009)。

pH 是养殖水体中化学性状和生命活动的综合反应。研究表明,pH 值升高或者降低会直接影响水生动物存活、生长和免疫活性(文春根等 2009)。氨氮是水产动物的主要代谢产物,随着养殖水体氨氮浓度的升高,

水产动物血淋巴和其他组织的氨浓度升高(Cavalli *et al.* 2000)。分子氨能够以自由扩散的方式通过细胞膜,影响细胞膜的稳定性及酶的活性,甚至导致细胞的死亡(Kaminsky *et al.* 2007)。然而有关 pH 和氨氮胁迫对中国对虾 HSP90 基因表达变化的影响还未见报道。本研究旨在通过分析 pH、氨氮胁迫前后中国对虾各组织 HSP90 基因的表达情况,探讨不同时间段内 HSP90 基因表达与应对 pH 和氨氮胁迫反应的关联机制,为中国对虾的环境适应性调控机制提供重要的数据支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康中国对虾“黄海1号”(山东青岛宝荣水产科技发展有限公司),pH胁迫实验从2010年7月30日~8月11日,实验用对虾体重 17.6 ± 1.9 g,体长 11.2 ± 0.4 cm;氨氮胁迫实验从2010年8月28日~9月7日,实验用对虾体重 5.0 ± 1.2 g,体长 7.8 ± 0.6 cm,均饲养于PVC桶(容积200L)中,养殖水体盐度 18 ± 1 、温度 30.0 ± 1.1 °C,连续充气,每日投喂配合饲料,7d后开始正式实验。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计

pH胁迫实验共设3组,分别为对照组(pH 8.2)、低pH胁迫组(pH 7.0)、高pH胁迫组(pH 9.0),每组8个平行,每个平行1个PVC桶,每个桶放养中国对虾10尾。分别使用1.0mol/L HCl和1.0mol/L NaOH调整pH值至7.0和9.0(METTLER TOLEDO SG2型pH计测定),并每隔3h调整一次各胁迫组的pH值,1d调整4次(从07:00到19:00)。pH胁迫后0、3、12、24、48、72、96、120和148h分别从每个实验组随机挑选6尾对虾取样。

氨氮胁迫实验共设4组,每组6个平行,每个平行1个PVC桶(200L),每个桶放养中国对虾20尾,分别为对照组(0mg/L)、低浓度氨氮胁迫组(2mg/L)、中浓度氨氮胁迫组(4mg/L)、中高浓度氨氮胁迫组(6mg/L),氨氮胁迫组的氨氮浓度使用10g/L的 NH_4Cl 进行调整。氨氮胁迫后的0、6、24、48、72、96h分别从每个实验组随机挑取8尾对虾取样(每个平行取1尾对虾,剩余两尾从每个平行随机选取),并同时取各PVC桶中的水样,用于水体氨氮浓度的测定。

1.2.2 养殖水体氨氮浓度的测定

氨氮胁迫6h各组养殖水体的氨氮浓度测定使用奈氏试剂法(陈佳蓉 1996),并做相应改进。将获得的水样使用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后贮存于聚乙烯瓶中,每个样品平行测定3次。将滤过水样于25ml比色管中,分别加入酒石酸钾钠溶液(50%)1ml,摇匀;加入0.75ml酒石酸钾钠(50%),摇匀;加入0.5ml NaOH(50%),摇匀;加入0.25ml酒石酸钾钠(50%);最后加入0.75ml奈氏试剂,摇匀后室温放置10min显色,利用分光光度计420nm波长处进行比色。该方法测得的氨氮是指以游离态的氨(NH_3)和铵盐(NH_4^+)形式存在的氮,记为TAN。结果见表1。各组氨氮试剂测定值与理论值基本一致,其中2mg/L胁迫组的实际测定氨氮浓度略高于理论值,4mg/L和6mg/L胁迫组的实际测定氨氮浓度值略低于对照组。对照组的氨氮浓度为0.3mg/L,符合低于0.6mg/L的养殖标准(王克行 1997)。

表1 氨氮胁迫6h各组水体的氨氮浓度(mg/L)

Table 1 Ammonia-N concentration in each treatment after ammonia-N stress for 6h (mg/L)

理论氨氮浓度 Theoretical Ammonia-N concentration	0	2	4	6
实际测定氨氮浓度 Actual Ammonia-N concentration	0.30 ± 0.02	2.99 ± 0.39	3.50 ± 0.99	5.86 ± 1.44

1.2.3 样品处理

用 1 ml 一次性注射器吸取 0.5 ml 预冷(4 °C)的抗凝剂(Bachère *et al.* 1988),从对虾的围心腔抽取 0.5 ml 的血淋巴液,混合均匀后加入 1 ml 无 RNA 酶的 1.5 ml 离心管中,离心(4 °C, 800g, 15 min),取上清液(抗氧化酶活性测定)置-80 °C 冰箱保存;血细胞(总 RNA 提取)加入 0.5 ml 的 TRIzol(Invitrogen),置-80 °C 冰箱保存。鳃、肝胰腺、肌肉加液氮研磨成粉末,取 50 mg 样品迅速转至 1.5 ml 离心管(内含 1 ml TRIzol 液),置-80 °C 冰箱保存用于总 RNA 提取。

1.2.4 HSP90 基因的表达分析

1.2.4.1 引物设计

根据中国对虾 HSP90 cDNA 序列(GenBank accession No. EF032650),以 Primer premier 5.0 设计 Real-time PCR 扩增特异性引物,内参基因选用 18S rRNA,引物序列详见表 1。引物合成和 cDNA 扩增产物序列测定委托上海生工生物工程有限公司完成。

表 2 Real-time PCR 扩增的特异性引物
Table 2 Primers used for real-time PCR amplification

基因名称 cDNA	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')	产物大小 Size of product(bp)
HSP90	GACCGCACGCTCACCATCAT	AGAAGCCCACGCCGAAGTGA	125
18S rRNA	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGAC	TTCTCCATGTCGTCCCAGT	218

1.2.4.2 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

将保存于-80 °C 冰箱的样品取出后于冰上融化,并按照 TRIzol(Invitrogen)试剂说明书提取总 RNA, RNA 沉淀用 DEPC 水溶解,用核酸定量仪(Thermo Scientific)测定 260 nm 和 280 nm 处的吸收值,检测 RNA 的产量和纯度,并使用 1% 琼脂糖凝胶进行 RNA 非变性电泳检测 RNA 的完整性。取等量(2 μg)的 RNA,按照 M-MLV(Promega)说明书反转录各组织的总 RNA,合成 cDNA 第一链。

1.2.4.3 Real-time PCR 扩增

采用 Real-time PCR(SYBR Green) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量方法,按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa)试剂盒说明书进行操作,反应体系如下:反应总体积共 20 μl,SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (2×) 10.0 μl,Rox reference Dye II (50×) 0.4 μl,Forward primer (10 μmol/L) 0.8 μl,Reverse primer (10 μmol/L) 0.8 μl,cDNA 1.0 μl,dd H₂O 7 μl。将样品在 PCR 管内混匀后分装入 96 孔 PCR 板(Axygen)中,瞬时离心后放入 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪中进行 PCR 扩增,反应程序为 95 °C 预变性 30 s;循环条件为 95 °C 5 s,60 °C 34 s,共 40 个循环;溶解曲线条件为 95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,60 °C 15 s。反应完成后,用 ABI 7500 system 分析软件分析结果。

1.3 统计分析

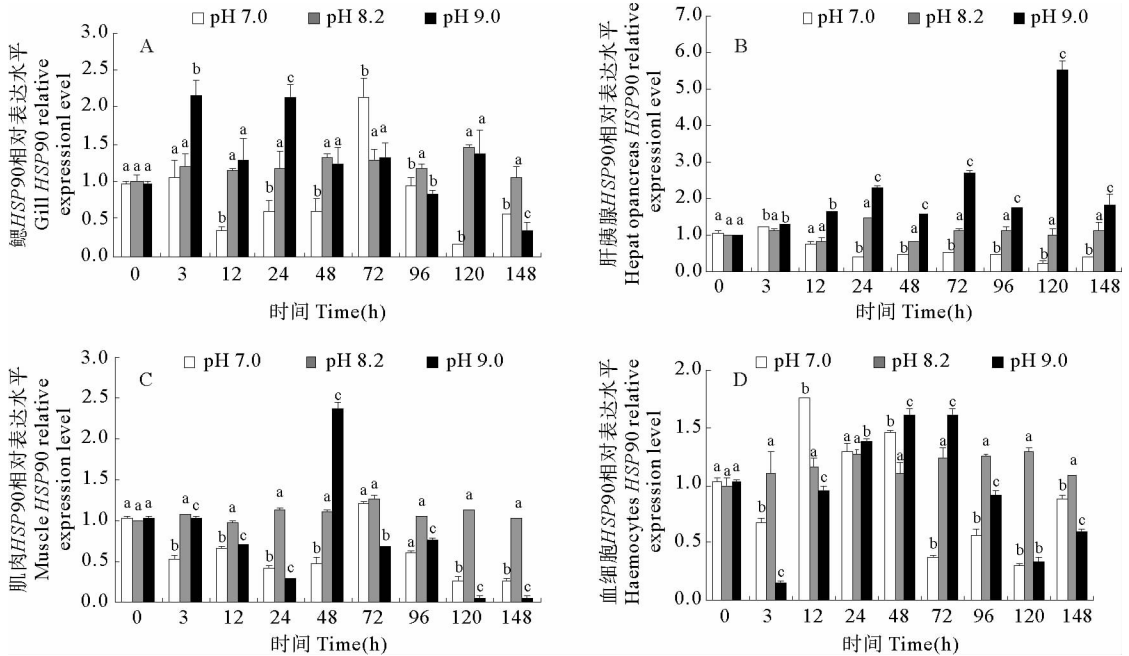
所得数据均以平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示,用 SPSS 16.0 统计分析软件 Duncan's 法进行多重比较, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 pH 胁迫对中国对虾 HSP90 基因表达的影响

pH 7.0 胁迫组中国对虾鳃、肌肉和血细胞 HSP90 基因表达呈现先降低后升高再降低的变化趋势,分别于 72、72 和 12h 达最大值($P<0.05$),为对照组的 2.1、1.2 和 1.7 倍,随后基因表达下降,且显著低于对照组($P<0.05$)(图 1-A、图 1-C 和图 1-D);肝胰腺 HSP90 基因表达水平则先升高后降低,3h 达峰值且显著高于对

对照组 ($P < 0.05$), 24~148h 显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 1-B)。pH 9.0 胁迫组中国对虾肌肉和血淋巴 *HSP90* 基因表达水平呈现先降低后升高再降低的变化趋势, 均于 48h 达峰值, 分别为对照组的 1.6 和 2.4 倍 ($P < 0.05$) (图 1-C、图 1-D); 肝胰腺 *HSP90* 基因表达水平逐渐上升, 3~148h 显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 1-B); 鳃组织 *HSP90* 基因表达水平呈现先升高后下降的变化趋势, 3h 达峰值 ($P < 0.05$), 为对照组的 2.2 倍, 96~148h 低于对照组 (图 1-A)。



A. 鳃; B. 肝胰腺; C. 肌肉; D. 血细胞. 注: 同时间点各组没有相同字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)

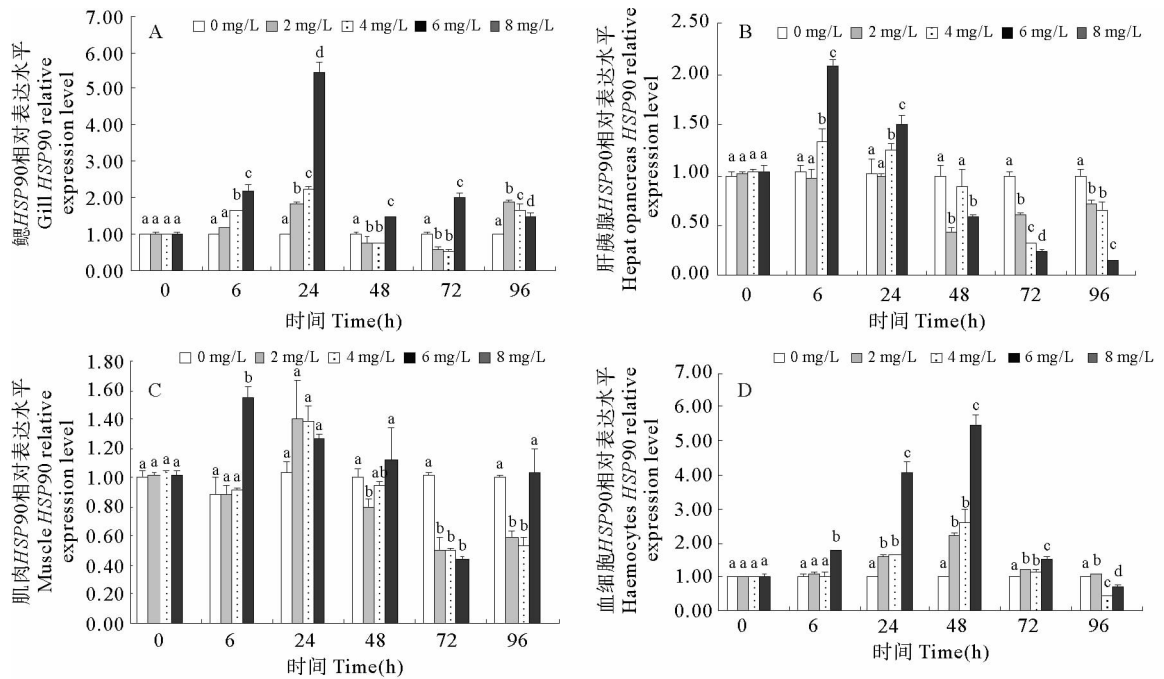
A. Gill; B. Hepatopancreas; C. Muscle; D. Haemocyte. Data in the same time without same letters are significantly different ($P < 0.05$)

图 1 中国对虾不同组织 *HSP90* 基因相对表达水平随 pH 胁迫时间的变化情况

Fig. 1 Relative expression of *HSP90* gene in different tissues of *F. chinensis* after exposure to pH stress

2.2 氨氮胁迫对中国对虾 *HSP90* 基因表达的影响

氨氮对中国对虾各组织 *HSP90* 基因表达水平随胁迫时间呈现先升高后降低的变化过程。6mg/L 氨氮浓度组鳃组织 *HSP90* 基因表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且在 24h 达最高值 ($P < 0.05$), 为对照组的 5.46 倍; 但当氨氮浓度连续 48~72h 维持在 2~4mg/L 时, 鳃组织 *HSP90* 基因表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 2-A)。2mg/L 氨氮胁迫中国对虾 6~24h, 肝胰腺 *HSP90* 基因表达水平与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$); 4mg/L 和 6mg/L 氨氮浓度组肝胰腺 *HSP90* 基因表达水平 6~24h 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且 6h 达最高值, 为对照组的 1.33~2.08 倍; 氨氮胁迫中国对虾 48~96h, 各组肝胰腺 *HSP90* 基因表达水平均明显降低, 甚至显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 2-B)。6mg/L 氨氮胁迫组肌肉 *HSP90* 基因表达水平 6h 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 为对照组的 1.55 倍, 48h 后各胁迫组肌肉 *HSP90* 基因表达水平明显降低。各氨氮浓度组中国对虾血细胞 *HSP90* 基因表达水平呈现先升高后降低的变化过程 (图 2-C)。2mg/L 和 4mg/L 胁迫组对虾血细胞 *HSP90* 基因表达水平 6h 略有上升, 但与对照组无显著差异 ($P > 0.05$); 当氨氮胁迫中国对虾 24~72h, 各胁迫组血细胞 *HSP90* 基因表达水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且于 48h 达最高值, 为对照组的 2.20~5.45 倍 (图 2-D)。



A. 鳃; B. 肝胰腺; C. 肌肉; D. 血细胞。注: 同时间点各组没有相同字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)

A. Gill; B. Hepatopancreas; C. Muscle; D. Haemocyte. Data in same time without same letters are significantly different ($P < 0.05$)

图2 中国对虾不同组织 *HSP90* 基因表达水平随氨氮胁迫时间的变化情况

Fig. 2 Relative expression of *HSP90* gene in different tissues of *F. chinensis* after exposure to ammonia stress

3 讨论

3.1 pH 胁迫对中国对虾 *HSP90* 基因表达的影响

HSP90 蛋白在正常生理状态下占到组织总蛋白的 1%~2% (Pratt 1997), 是一个高度保守的分子伴侣, 在环境胁迫条件下可维持细胞的蛋白质空间构象、保护细胞和对于应激源的耐受性 (Kregel 2002)。所以 *HSP90* 基因表达水平的升高是有机体抗抵环境胁迫的重要保护机制。当中国对虾暴露于 pH 9.0 的环境下, 各组织 *HSP90* 基因表达水平显著升高, 这与高温、缺氧及重金属污染表现的变化相吻合 (Schill *et al.* 2003)。其中 pH 9.0 组鳃组织 *HSP90* 基因表达水平最先达峰值 (3h), 所以作者认为鳃组织作为对虾的呼吸器官直接与养殖水体接触是响应 pH 胁迫的敏感器官; 而肝胰腺组织 *HSP90* 基因表达在 pH 9.0 胁迫过程中均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 肝胰腺作为对虾蛋白质、脂类等营养物质的代谢中心, 能够通过诱导 *HSP90* 基因表达的升高而增加体内 *HSP90* 蛋白的合成, 从而起到保护肝胰腺组织的作用。当中国对虾暴露于 pH 7.0 的水体中, 各组织 *HSP90* 基因表达水平显著降低, 其中肝胰腺组织 *HSP90* 基因表达的变化尤其明显, 3h 略有升高之后显著降低, 直到实验结束时仍显著低于对照组, 此结果与盐度胁迫下三疣梭子蟹肝胰腺组织 *ptHSP90-1* 基因的表达变化相一致 (Zhang *et al.* 2009), 可能是低 pH 值超出了这些组织能够承受的极限从而诱导了细胞的凋亡或者坏死。低 pH (7.0) 和高 pH (9.0) 胁迫组对虾血细胞 *HSP90* 基因表达变化相似, 当 pH 突然变化时, 血细胞 *HSP90* 基因表达量下降 (3h)。Lin 等 (2010) 的研究结果表明, 当水环境从 pH 8.2 突然降低至 pH 6.8 时, 凡纳滨对虾的血细胞总数较对照组显著降低, 所以作者推测对虾血细胞总数减少可能是导致 *HSP90* 基因表达量降低的原因之一。低 pH (7.0) 和高 pH (9.0) 胁迫组对虾血细胞 *HSP90* 基因表达从 24~48h 显著的高于对照组, 说明中国对虾为了适应环境 pH 的改变而增加血细胞 *HSP90* 基因的表达水平保

护细胞,对抗 pH 胁迫,增强细胞的修复功能并提高细胞对应激的耐受程度(雷 蕾等 2008),这与鲤鱼 *Cyprinus carpio* 及三疣梭子蟹暴露于高浓度重金属 Cd 和 Cu 的条件下 HSP90 基因表达变化相一致(Hermesz *et al.* 2001;Zhang *et al.* 2009)。随着胁迫时间的延长对虾 HSP90 基因表达水平下降,推测可能是长时间的胁迫造成了对虾各组织代谢过程加剧,HSP90 消耗增多,所以 HSP90 基因表达量下降。

3.2 氨氮胁迫对中国对虾 HSP90 基因表达的影响

氨氮是蛋白质代谢过程中的终产物,也是池塘养殖水体的主要有毒因子之一。环境氨氮浓度的升高对于水生动物具有明显的毒性作用,甚至对生物体造成组织损伤,能够引发甲壳动物的急性中毒(孙舰军等 1999)。本研究中氨氮胁迫中国对虾后,各组织 HSP90 基因表达水平显著升高,这是对虾受到氨氮胁迫后的应激反应,通过增加机体 HSP90 基因的表达水平而达到保护细胞的作用。当氨氮浓度为 4~6mg/L 时,且在短时间胁迫(6h)时,肝胰腺 HSP90 基因表达水平达最高值,可见中国对虾肝胰腺组织对氨氮胁迫表现最为敏感;鳃组织 HSP90 基因最高表达水平均高于其他组织,其次为血细胞,这说明对虾不同组织对氨氮胁迫响应的敏感程度存在差异,也充分体现了对虾对氨氮胁迫产生主动调节的机制。甲壳动物 40%~90% 的含氮分泌物以氨氮形式通过鳃排出(Weihrach *et al.* 1998),当养殖水体氨氮浓度升高,促使 NH_4^+ 向毒性更强的 NH_3 转化, NH_3 可直接进入鳃上皮细胞,为了降低分子氨对鳃组织的损伤,需要更高表达量的 HSP90 保护细胞。这可能是中国对虾鳃组织 HSP90 基因表达水平最高的原因之一。研究表明,中国对虾 HSP90 基因在高温、缺氧和重金属污染胁迫下诱导表达上调,但是一定时间后 HSP90 基因表达则下调(Li *et al.* 2009),这与本研究结果相一致,当水体氨氮浓度 4~6mg/L 持续 48h 后,各组织 HSP90 基因表达水平显著降低,这说明中国对虾对于氨氮胁迫的调节能力有限,当氨氮胁迫持续一定时间,对中国对虾的机体造成了氧化损伤和组织损伤,从而破坏了细胞的功能,导致 HSP90 基因表达水平的降低。一些研究证实,甲壳动物在高浓度氨氮胁迫条件下机体的免疫功能受到抑制,如日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus* 和凡纳滨对虾(Chen *et al.* 1992; Liu *et al.* 2004),这可能也是导致 HSP90 基因表达下调的原因之一。由此可见,当水环境氨氮浓度升高时,中国对虾的肝胰腺是响应氨氮胁迫的敏感器官,同时鳃组织 HSP90 基因表达量升高是对虾机体对呼吸器官的一种保护机制,从而适应环境氨氮浓度的变化。

综上所述,pH 和氨氮胁迫后显著影响 HSP90 基因的表达水平,并表现出一定的时间浓度效应。当中国对虾暴露于 pH 和氨氮胁迫条件下,机体 HSP90 基因表达显著升高,这说明中国对虾对于环境胁迫表现敏感,通过上调 HSP90 的表达水平以增加 HSP90 蛋白水平,HSP90 作为分子伴侣保护细胞免受氨氮胁迫的毒性损伤(Ovelgonne *et al.* 1995),并参与修复变性蛋白维持细胞内代谢的动态平衡(Ackerman *et al.* 2001);但随着胁迫时间的延长,各组织 HSP90 基因表达水平降低,且 pH 7.0 组中国对虾各组织 HSP90 基因表达水平显著降低,其中肝胰腺组织表现尤为明显,这可能是 pH 和氨氮胁迫超出了机体能够承受的极限而诱导了细胞的凋亡或者坏死。

参 考 文 献

- 文春根,张丽红,胡宝庆,饶玉才,陈绍萍,王 芳. 2009. pH 对背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)5 种免疫因子的影响. 南昌大学学报(理科版), 33(2): 172-176
- 王克行. 1997. 虾蟹增养殖学. 北京:中国农业出版社,172
- 王 芸,李 健,李吉涛,何玉英,常志强,刘德月. 2011. pH 胁迫对中国明对虾抗氧化系统酶活力及基因表达的影响. 中国水产科学,18(3): 556-564
- 孙舰军,丁美丽. 1999. 氨氮对中国对虾抗病力的影响. 海洋与湖沼,30(3): 267-272
- 陈佳蓉. 1996. 水化学实验指导书. 北京:中国农业出版社,136-139
- 赵先银,李 健,李吉涛,何玉英,张 喆,常志强. 2011. pH 胁迫对日本对虾非特异性免疫因子及 RNA/DNA 比值的影响. 渔业科学进展, 32(1): 60-66
- 雷 蕾,鲍恩东. 2008. 急性热应激肉鸡组织中 HSP90 的表达与应激损伤. 中国农业科学,41(11):3816-3821
- Ackerman PA, Iwama GK. 2001. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. J Aquat Anim Health 13(2):

174-180

- Bachère E, Chagot D, Grizel H. 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev Comp Immunol* 12(2): 549-559
- Capy P, Gasperi G, Biemont C, Bazin C. 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites. *Heredity* 85(2): 101-106
- Cavalli RO, Berghe EV, Lavens P and 3 others. 2000. Ammonia toxicity as a criterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Phys C* 125(3): 333-343
- Chen JC, Kou YZ. 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture* 104(3-4): 249-260
- Gao Q, Song LS, Ni DJ and 3 others. 2007. cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Comp Biochem Phys B* 147(4): 704-715
- Gao Q, Zhao J, Song LS and 4 others. 2008. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians*. *Fish Shellfish Immun* 24(4): 379-385
- Hartl FU. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381(6583): 571-579
- Hermesz E, ábrahám M, Nemesók J. 2001. Identification of two *HSP90* genes in carp. *Comp Biochem Phys C* 129(4):397-407
- Kaminsky YG, Kosenko EA, Venediktova NI and 2 others. 2007. Apoptotic markers in the mitochondria, cytosol, and nuclei of brain cells during ammonia toxicity. *Neurochemical Journal* 1(1): 78-85
- Kregel KC. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Apple Physiol* 92(5): 2177-2186
- Le Moullac G, Haffner P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191(1-3): 121-131
- Li FH, Luan W, Zhang CS and 5 others. 2009. Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (FcHSP90) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia. *Cell Stress Chaperon* 14(2): 161-172
- Li JT, Han JY, Chen P and 5 others. 2012. Cloning of a heat shock protein 90 (*HSP90*) gene and expression analysis in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Fish Shellfish Immun* 32(6): 1191-1197
- Lin YC, Tayag CM, Huang CL and 2 others. 2010. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. *Fish Shellfish Immun* 29(6): 1092-1098
- Liu CH, Chen JC. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* 16(3): 321-334
- Ovelgonne JH, Souren JE, Wiegant FA, VanWijk R. 1995. Relationship between cadmium- induced expression of heatshock genes, inhibition of protein synthesis and cell death. *Toxicology* 99(1-2):19-30
- Pan F, Zarate JM, Tremblay GC, Bradley TM. 2000. Cloning and characterization of salmon *HSP90* cDNA: upregulation by thermal and hyperosmotic stress. *J Exp Zool Part A* 287(3): 199-212
- Pratt WB. 1997. The role of the *HSP90*-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via map kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 297-326
- Schill RO, Görlitz H, Köhler HR. 2003. Laboratory simulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp70 response, and recovery from stress in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. *BioMetals* 16(3):391-401
- Venn AA, Quinn J, Jones R, Bodnar A. 2009. P-glycoprotein (multi-xenobiotic resistance) and heat shock protein gene expression in the reef coral *Montastraea franksi* in response to environmental toxicants. *Aquat Toxicol* 93(4): 188-195
- Wang Y, Li J, Liu P and 5 others. 2011. The responsive expression of a caspase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* against pH stress. *Aquac Res* 42(8): 1214-1230
- Wehrauch D, Becker W, Postel U and 2 others. 1998. Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. *J Comp Physiol B* 168(5):364-376
- Zhang XY, Zhang MZ, Zheng CJ and 2 others. 2009. Identification of two *HSP90* genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions. *Comp Biochem Phys C* 150(4):465-473