

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20150619001

陈晔, 陈荣, 莫正平. 重金属 Cd、Pb 对褐菖鲉肝脏组织中 HSPs 基因表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(3): 124-130

Chen Y, Chen R, Mo Z P. The effects of Cd and Pb on the levels of hepatic HSPs mRNA in *Sebastes marmoratus* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(3): 124-130 (in Chinese)

重金属 Cd、Pb 对褐菖鲉肝脏组织中 HSPs 基因表达的影响

陈晔¹, 陈荣^{1,*}, 莫正平¹

厦门大学环境与生态学院 近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门 361102

收稿日期: 2015-06-19 录用日期: 2015-09-17

摘要: 为了解重金属污染对海洋鱼类热休克蛋白(HSPs)基因表达的影响,将褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)分别暴露于1.6、8、40、200、500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd、Pb 溶液中,用环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)定量检测褐菖鲉肝脏 HSP60、HSP70、HSP90、HSC70 mRNA 表达量。结果表明:Pb 仅在40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著抑制 HSP60、HSP90、HSC70 mRNA 表达量,8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即可显著抑制 HSP70 mRNA 表达量,并在40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最小值;Cd 对 HSP60、HSP90、HSC70 的诱导不明显,但能显著诱导 HSP70,并在500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大值。相比之下,褐菖鲉肝 HSP70 基因对重金属 Cd、Pb 污染较为敏感,有潜力成为监测海洋重金属污染的预警分子。

关键词: Cd; Pb; 褐菖鲉; 肝脏; 热休克蛋白; HSPs; 环介导等温扩增

文章编号: 1673-5897(2016)3-124-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

The Effects of Cd and Pb on the Levels of Hepatic HSPs mRNA in *Sebastes marmoratus*

Chen Ye¹, Chen Rong^{1,*}, Mo Zhengping¹

State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of the Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102, China

Received 19 June 2015 accepted 17 September 2015

Abstract: In order to understand the effects of heavy metal pollution on the gene expression of heat shock proteins (HSPs) in marine fish, *Sebastes marmoratus* were exposed to different concentrations (i. e., 1.6, 8, 40, 200, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) of Cd or Pb for 5 days. A quantitative loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was used to analyze the hepatic mRNA levels of HSP60, HSP70, HSP90, and HSC70. Under the Pb exposure, the mRNA levels of hepatic HSP60, HSP90, HSC70 were not significantly reduced except in the 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ treatment, whereas the mRNA levels of HSP70 were significantly decreased by 8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb, and reached the minimum when Pb was 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Under the Cd exposure, the mRNA levels of hepatic HSP60, HSP90, HSC70 were not significantly affected; in contrast, mRNA levels of HSP70 were significantly increased and peaked at 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd. In conclusion, the hepatic HSP70 was relatively more sensitive to heavy metal exposure than the other HSPs, and thus

基金项目:海洋公益性项目"海洋污染生物效应快速监测与评价技术应用示范"子任务-海洋污染效应生物标志物技术集成与研发 II (201005016)

作者简介:陈晔(1991-)女,硕士,研究方向为生态毒理学, E-mail: 360321490@qq.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: chenrong@xmu.edu.cn

had the potential to be the early warning for heavy metal pollution in marine environment.

Keywords: Cd; Pb; *Sebastes marmoratus*; liver; heat shock proteins; HSPs; loop-mediated isothermal amplification

近些年来,我国海洋经济发展迅速,海洋环境问题凸显,其中海洋重金属污染问题已经引起各界的高度关注。国家环保部的一项调查显示,我国近岸海域的海水采集样品中,铅的超标率高达62.9%,最大值超第一类海水标准49倍,镉的超标率为25.9%。并且,我国重金属排海量较大且呈逐年上升趋势^[1]。污染物的危害主要体现在对生物体的毒害作用,因此,利用生物体内毒性伤害状况监测其所处的环境,可对污染总体效应进行直观、综合的评价^[2]。

研究表明,在嗅觉器官中,鳃的蓄积比其他器官要高得多,并且抑制了血浆皮质醇浓度的升高。显然,水环境中的镉破坏了鱼群对示警物质的正常行为和生理反应,改变了鱼群的回避策略^[3]。镉离子也可以直接进入脑组织而发生影响,造成脑机能障碍,特别造成小脑机能障碍,使中毒鱼失去平衡,引起侧翻,甚至沉入水底^[4]。铅是一种神经毒性物质,能通过各种途径进入水生生态系统中,造成许多生物体包括鱼类的行为产生改变。在铅的毒性作用下,鱼类活动过度兴奋,游泳行为出现异常或出现环绕游动的不稳定反应^[5]。但也有研究发现,铅中毒后鱼类的活动下降。铅也会影响鱼类的摄食行为,使鱼类的捕食能力下降,主要影响的方面是降低捕食的时间,增加捕食失误的次数^[6]。铅还会干扰鱼类对有害刺激的反应能力,如降低其对电击的躲避行为^[7]。

1962年,Ritossa^[8]首先在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中发现HSPs,进一步的研究发现,从原核细胞到高等真核细胞的整个生物界中,都普遍存在着HSPs,热休克基因家族是迄今为止发现的最为保守的家族^[9]。后来Tisseres证实,热休克反应中合成的是一组特殊蛋白质,命名为热休克蛋白^[10]。热休克蛋白分为4个家族:HSP90家族(分子量为83~90 kDa)、HSP70家族(分子量为66~78 kDa)、HSP60家族以及小分子量的HSPs家族(12~43 kDa)。HSC70是HSP70家族中组成型的基因,主要参与蛋白质的折叠、解折叠和组配^[11],并且能被外界刺激所诱导^[12]。

目前对鱼类HSPs的研究主要集中在分子克隆、组织表达方面,而涉及功能基因组学和HSPs表

达变化的研究相对较少^[13]。Airaksinen等^[14]比较了斑马鱼(*Danio rerio*)在热胁迫下的表达差异,发现在热胁迫条件下,HSP70呈显著升高。此外,国外一些科学家还进行了水域热污染的研究,而我国对鱼类HSPs的研究起步较晚,有关污染胁迫对鱼体HSPs的影响研究较少。盛连喜等^[15]发现鲤鱼(*Cyprinus carpio*)HSP70的合成和温度总体呈正相关关系。周鑫等^[16]的研究表明,高浓度的亚硝酸盐暴露后,草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)HSP90的表达显著上调。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)技术是Notomi等^[17]建立的一种新颖的核酸扩增技术,具有高特异性、高效率、便捷等特点,在等温条件下即可高效、快速地完成扩增反应,可用于现场的快速检测。自2000年开发以来,LAMP技术已广泛应用于细菌、病毒、寄生虫等病原体的定性检测及动物胚胎性别的鉴定^[18-20]。本文将LAMP技术引入海洋环境监测领域,研究不同浓度的重金属Cd、Pb污染后褐菖鲉肝HSPs mRNA的表达量,从而为探索HSPs基因的生物功能以及其作为生物标志物监测海洋重金属污染的可行性研究提供依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

主要仪器:净化工作台(SW-CJ-1FD,苏州净化设备工程有限公司),恒温金属浴(CHB-A4-9602,杭州博日科技有限公司),NanoDrop 2000 Spectrophotometer(Thermo Fisher公司),LA-320C实时浊度仪(北京蓝谱生物科技有限公司,精度 $\pm 2\%$),PCR仪(Bioer Serves Life公司),5415R型冷冻离心机(Eppendorf公司)。

主要试剂:Bst DNA聚合酶(NEB公司),琼脂糖(西班牙Biowest公司),MgCl₂(Sigma公司),betaine(Bio Basic公司),SYBR Green qPCR Mix(厦门鹭隆生物科技有限公司),dNTP和DS2000 DNA Marker(东盛生物公司),Tris和EDTA(上海生物工程公司),CdCl₂和PbCl₂均为国产分析纯(Alfaesar公司)。

1.2 实验动物

褐菖鲉购自厦门市第八市场,平均体长(11.7 \pm 1.2)cm,平均体重(24.79 \pm 5.8)g,雌雄不拘,先

在清洁沙滤海水中暂养 7 d, 选取活力好的个体进行污染实验。实验过程中如有个体死亡, 减少缸内水量确保每只个体占据水体积 2 L。

1.3 实验方法

1.3.1 暴露实验

实验前, 褐菖鲉先在清洁沙滤海水中暂养, 驯养期间水温严格控制在 17 ~ 20 °C, 盐度 22‰ ~ 27‰, 选取活力好的个体进行污染实验。将褐菖鲉暴露于不同浓度重金属 (Cd、Pb) 溶液中 (实验浓度见表 1)。每浓度组 10 条鱼, 每组设 2 个平行, 对照组 50 L 沙滤海水不含 Cd、Pb。用充气机连续进行充气, 并喂以人工饵料, 每天采用静态半置换法更新相应浓度的含 Cd、Pb 海水溶液的 50%。暴露 5 d 后取样, 将鱼击昏, 迅速剖取肝脏, 冰上采集后置于 -80 °C 冰箱中保存至使用。

表 1 污染物种类与浓度

Table 1 Contaminant type and concentration

| 污染物 Pollutants | 浓度组 / ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) Concentration group / ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | | | | | |
|-------------------|--|-----|---|----|-----|-----|
| | Control | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Cd | 0 | 1.6 | 8 | 40 | 200 | 500 |
| Pb | 0 | 1.6 | 8 | 40 | 200 | 500 |

1.3.2 RNA 提取及反转录

总 RNA 提取参照 TaKaRa 公司所提供的 RNAiso Plus 说明书进行, 得到的 RNA 加入适量 DEPC 水使其浓度均为 $1000 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 反转录按照 Thermo 公司提供的 ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明书进行, 产物 cDNA 稀释 5 倍, 保存于 -20 °C 冰箱待用。

1.3.3 LAMP 引物设计

根据褐菖鲉 HSP60 基因 (GeneBank 序列号 JX185808)、HSP70 基因 (GeneBank 序列号 JX185809)、HSP90 基因 (GeneBank 序列号 JX255674) 和 HSC70 基因 (GeneBank 序列号 JX255673) 序列, 利用在线引物设计软件 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) 设计 LAMP 特异引物: FIP、BIP、F3 和 B3 (表 2)。

1.3.4 LAMP 测定

LAMP 反应体系的设定参照 Notomi 等^[17]的方法。总体积 25 μL , 经优化后体系内各试剂含量为: $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Betaine, $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , $1.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, $2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内引物, $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外引物, $1 \times$ ThermoPol Reaction Buffer, 8 U Bst DNA 聚合酶, $2 \mu\text{L}$ 模板 DNA, $5 \mu\text{L}$ dd H_2O 。反应的温度为 64 °C。反应过程产生焦磷酸镁乳白色沉淀的含量与 DNA 含量成正比, 可利用浊度仪进行定量检测。

表 2 LAMP 引物序列

Table 2 Primers sequence of LAMP

| 基因 Gene | 引物名称 Primer name | 引物序列 (5' → 3') Primer sequence (5' → 3') |
|------------|---------------------|---|
| HSP60 | HSP60-F3 | AACACTGCCAAAGGTCAGAA |
| | HSP60-B3 | CCGAATCCTGGAGCTTTTCAC |
| | HSP60-FIP | ACCGCTGTTATTTGTGGCTGAAGACCGACCTTCAGTCTGTT |
| | HSP60-BIP | ACCGCTGTTATTTGTGGCTGAAGACCGACCTTCAGTCTGTT |
| HSP70 | HSP70-F3 | GATTGCAGAGGCGTACCTC |
| | HSP70-B3 | TGGAGACATCAAATGTGCCA |
| | HSP70-FIP | TGGTCCCTGCATCTTTGCTGGTGTAAACAACGCAGTCTGTA |
| | HSP70-BIP | GAGCCGACTGCTGCTGTATAGGACGTTTCTCTCCGCTC |
| HSP90 | HSP90-F3 | GAGCCTCTGCAAGCTCATG |
| | HSP90-B3 | GGGTTGATCTCCAGGTGT |
| | HSP90-FIP | GCTCGTCACGATACAGCAGGGAGAAGTGGAGAAGGTGACCG |
| | HSP90-BIP | ACGCCAACATGGAGCGTATTTGGCCATCATGTAACCCAT |
| HSC70 | HSC70-F3 | ACCCAGGCTAGCATTGA |
| | HSC70-B3 | TCTTGGGATACGGGTGA |
| | HSC70-FIP | AGCGTTGAGTCTCTCAAACGATTGACTCTCTGTACGAGGGC |
| | HSC70-BIP | ACCTTAGACCCCGTGGAGAAGTCCGACCAACACCGATGTCAT |

LAMP 标准曲线的测定:以 F3 和 B3 (表 2) 为引物进行 PCR 反应,利用琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物,即可得到 LAMP 反应的 DNA 标准品,利用 NanoDrop 2000 分光光度计测定其 DNA 浓度,根据公式计算拷贝数:

$$\text{DNA 拷贝数}/\mu\text{L} = \frac{\text{质量}}{\text{分子量}} \times \text{阿伏伽德罗常数} = A \times 10^3 \text{ 拷贝数}$$

其中质量 DNA 标准品的质量浓度 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;分子量 DNA 标准品的平均分子量 = 碱基数 $\times 660$ 道尔顿/碱基 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$;阿伏伽德罗常数 $\mu\text{copies}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

10 倍稀释标准品,配制 25 μL 体系标准系列。利用 LA-320C 实时浊度仪测定。实时浊度仪每 6 s 自动测定一次浊度,以浊度达到 0.1 时作为阳性判定标准,记录反应所需时间。制作标准曲线。

Cd、Pb 暴露 5 d 后,每个浓度组取 6 尾鱼,解剖后取肝脏约 0.1 g,提取总 RNA,反转录得到样品 cDNA。采用优化后的 LAMP 反应体系与反应时间,用 LA-320C 实时浊度仪实时检测。根据定量 LAMP 标准曲线换算得出样品中 HSPs (HSP60、HSP70、HSC70、HSP90) mRNA 扩增拷贝数。

1.4 数据统计分析

LAMP 检测结果采用 Microsoft Excel 和 SPSS 17.0 软件处理,采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),并用 Origin 8.0 软件绘图。所有结果均用 6 个平行样的平均值 \pm 标准误差表示,实验组与对照组间数据的比较采用单尾 t 检验分析显著性差异。 $P < 0.05$ 为显著差异; $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果 (Results)

2.1 重金属 Cd、Pb 影响 HSP60 基因表达的剂量-效应关系

由图 1 可见 Cd 污染对褐菟鲈肝 HSP60 mRNA 含量基本无影响,虽然随着 Cd 浓度的升高 HSP60 mRNA 含量有缓慢上升趋势,但各组与对照组均无显著性差异。Pb 污染下褐菟鲈肝 HSP60 mRNA 含量仅在 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组时有显著性抑制,约为对照组的 0.05 倍。其他浓度组与对照组之间无显著性差异。

2.2 重金属 Cd、Pb 影响 HSP70 基因表达的剂量-效应关系

由图 2 可见 8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 即可显著诱导褐菟鲈肝 HSP70 mRNA 的表达,随污染浓度增加,HSP70 mRNA 含量也持续增加,在 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大值,为对照组的 210.65 倍。而 8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 显著抑制

褐菟鲈肝 HSP70 mRNA 的表达,并在 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最小值,为对照组的 0.02 倍,随后逐渐恢复到对照水平。

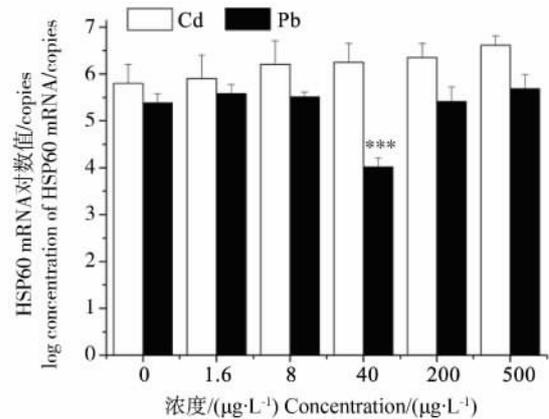


图 1 Cd、Pb 污染对褐菟鲈肝 HSP60 mRNA 表达量的影响
注:n=6;* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

Fig. 1 The effects of Cd and Pb on the levels of hepatic HSP60 mRNA in *S. marmoratus*

Note: n=6; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

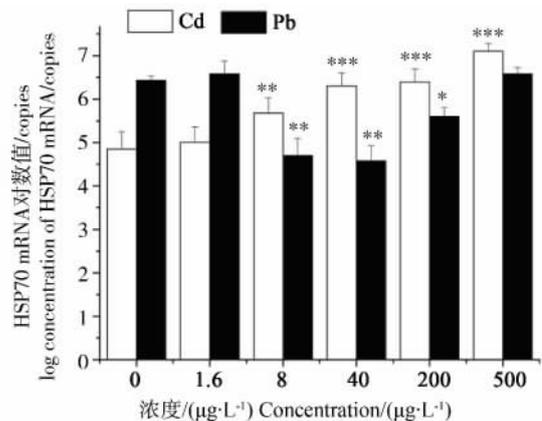


图 2 Cd、Pb 污染对褐菟鲈肝 HSP70 mRNA 表达量的影响
注:n=6;* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

Fig. 2 The effects of Cd and Pb on the levels of hepatic HSP70 mRNA in *S. marmoratus*

Note: n=6; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

2.3 重金属 Cd、Pb 影响 HSP90 基因表达的剂量-效应关系

由图 3 可见,Cd 污染对褐菟鲈肝 HSP90 mRNA 含量基本无影响,虽然随着 Cd 浓度的升高 HSP60 mRNA 含量有缓慢上升趋势,但各组与对照组均无显著性差异。Pb 污染下褐菟鲈肝 HSP90 mRNA 含量仅在 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组时有显著性抑制,为对照组

的0.12倍,其他浓度组与对照组之间无显著性差异。

2.4 重金属 Cd、Pb 影响 HSC70 基因表达的剂量-效应关系

由图4可见,Cd对HSC70 mRNA表达量并无显著影响,各浓度组与对照组相比总体呈上升趋势,但均无显著性差异。Pb污染下褐菖鲉肝HSC70 mRNA含量仅在40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组时有显著性抑制,约为对照组的0.05倍。其他浓度组与对照组之间无显著性差异。

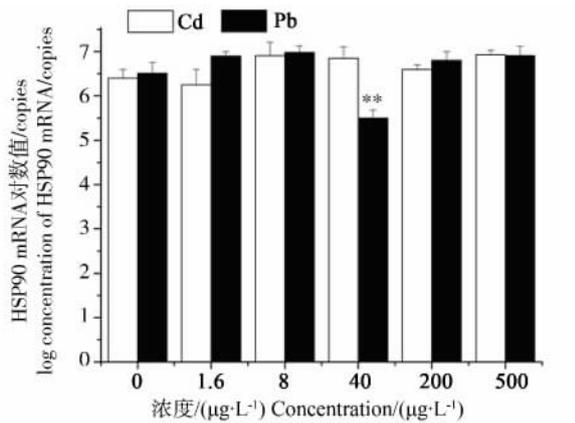


图3 Cd、Pb 污染对褐菖鲉肝 HSP90 mRNA 表达量的影响

注: $n=6$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

Fig. 3 The effects of Cd and Pb on the levels of hepatic HSP90 mRNA in *S. marmoratus*

Note: $n=6$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

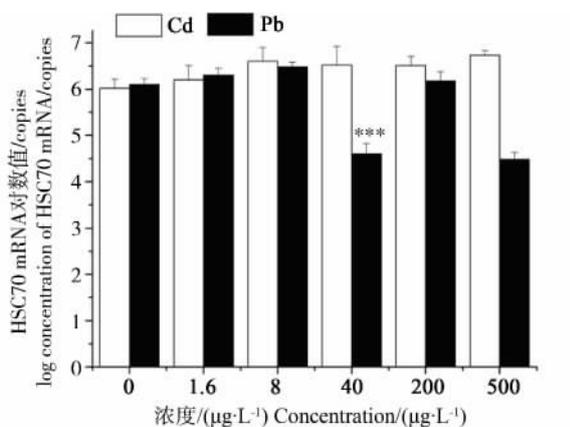


图4 Cd、Pb 污染对褐菖鲉肝 HSC70 mRNA 表达量的影响

注: $n=6$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

Fig. 4 The effects of Cd and Pb on the levels of hepatic HSC70 mRNA in *S. marmoratus*

Note: $n=6$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

综上所述,不同浓度 Cd 对褐菖鲉肝 HSP60、HSP90、HSC70 mRNA 的表达基本无显著性影响,但可以显著诱导 HSP70 mRNA 的表达,且诱导量随着浓度的增加而增加,在 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到峰值。

不同浓度 Pb 影响褐菖鲉肝 HSP60、HSP90、HSC70 mRNA 的表达也不显著,仅在 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组出现显著性抑制,其他浓度组均无显著性变化。HSP70 mRNA 表达量在 8~40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著下降,而后逐渐回升,并在 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时恢复至对照组水平。

3 讨论 (Discussion)

LAMP 技术已在病毒、细菌、寄生虫等的定性检测运用方面得到了较为广泛的应用,但在定量检测方面的研究还较少。现有的研究中对于 HSPs 的热激响应的研究较多,并有研究发现 HSPs 的表达量与温度变化有很明显的相关性,而在生物体抵御重金属污染方面的研究却较少^[21]。在本研究中,将 LAMP 技术应用于检测海洋重金属污染,从而定量检测海洋中重金属的污染情况。通过对 Cd 和 Pb 曝污后褐菖鲉肝脏中 HSP60、HSP70、HSP90、HSC70 基因的 mRNA 表达量进行检测表明,在重金属污染物暴露下,HSPs 四种亚型基因对 2 种污染物呈现不同趋势的剂量效应关系。

本文结果证实,Cd 可以显著诱导褐菖鲉肝 HSP70 mRNA 的表达,而 HSP60、HSP90、HSC70 mRNA 表达量在不同程度上也有所增加。这一结果与以往的许多研究结果相类似。例如,Cd 能够在短时间内诱导虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 肝 HSC70 mRNA 的表达量的升高,但诱导并不显著^[22]。还有研究表明,Cd 的渗透胁迫能够在一定时间内诱导轮虫 (rotifer) 中 HSP60 mRNA 表达量升高^[23]。Cd 能够诱导 ROS 的产生,而积累的 ROS 可迅速攻击蛋白质多肽链,尤其是其中的组氨酸、脯氨酸、精氨酸和赖氨酸,导致羧基基团的增加,而损伤或变性蛋白的积累又可进一步诱导 HSPs 基因的快速表达^[24]。

但 HSP70 mRNA 的表达量不会无限增加,在达到峰值后表达水平将有所下降。相关研究表明,热休克蛋白的表达对细胞的保护是有一定范围的,它并不会无限制地持续增加^[25]。虽然本研究中并未观察到 HSP70 基因表达被抑制,若进一步增加污染物浓度或延长暴露时间,就有可能抑制 HSP70 基因的表达。

Pb 污染后,HSPs 四种基因对 Pb 的反应都表现

为先抑制,然后再恢复到对照组水平。这种蛋白表达水平波动变化的可能机制是,重金属浓度较低时诱导细胞上调 HSPs 蛋白的保护性表达,然而在重金属浓度持续升高的环境下,机体消耗的 HSPs 量也在不断增加,结果导致了 HSPs 出现明显的降低。这种表达量显著降低的现象是生物体对前期积累产生的 HSPs 的一种消耗。类似的报道见于使用单倍或多倍剂量的阿司匹林会导致大鼠 (*Rattus norvegicus*) 胃组织中 HSP90 和相应的 mRNA 逐渐降低,适应后的胃脏中 HSP90 的表达量降低大约 60%^[26]。与之变化相类似的 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的外源 Pb 即可显著抑制蚕豆 (*Vicia faba* L.) 幼苗叶片内 HSP60 基因的表达^[27]。HSPs 被诱导表达是生物体克服不良环境和防止中毒的一种适应性改变,而诱导量的下降则说明生物体可能因污染的毒性作用而产生了中毒反应^[28]。

本研究结果表明,与 HSP60、HSP90、HSC70 相比,HSP70 对重金属 Cd、Pb 污染响应较为敏感,低浓度 Cd 即可显著诱导,Pb 则先抑制而后随着浓度增加而升高。他人也有类似实验结果。如 Rajeshkumar 等^[29](2013)对印度 Kaattuppalli 岛附近海域牛奶鱼 (*Chanos chanos*) 的研究表明,重金属 Fe、Mn、Zn、Cu、Pb、Cd 都会诱导 HSP70 的表达,其中以 Fe 的诱导最为明显。重金属 Cd、Pb 曝污能诱导淡水植物青萍 (*Lemna minor*) 中 HSP70 mRNA 表达量升高^[30],证实 HSP70 对重金属污染有很好的敏感性,这些特性使得 HSP70 有望成为海洋重金属污染的早期预警分子。但对海洋污染的监测,不可能仅靠单一生物标志物,需要综合分析单一和联合暴露中多种生物标志物的表达情况。因此 HSPs 基因是否可用于海洋环境监测,还需要更多的实验研究。

通讯作者简介:陈荣(1974—),男,环境科学博士,副教授,主要研究方向为海洋生态毒理学,发表学术论文 30 余篇。

参考文献(References):

- [1] 夏娜娜,王军,史云娣,等. 海洋重金属污染防治的对策研究[J]. 中国人口,资源与环境,2012,22(5): 343-346
Xia N N, Wang J, Shi Y D, et al. Countermeasures for heavy metals pollution in marine environment [J]. China Population, Resources and Environment, 2012, 22(5): 343-346 (in Chinese)
- [2] Lin Z F, Wang L S, Zhong P, et al. Advances on the monitoring approaches of organic pollutants in the marine environment [J]. Marine Environmental Science, 2006, 25(1): 88-93
- [3] Monikh F A, Maryamabadi A, Savari A, et al. Heavy metals' concentration in sediment, shrimp and two fish species from the northwest Persian Gulf [J]. Toxicology & Industrial Health, 2015, 31(6): 554-565
- [4] 余杨,王雨春,周怀东,等. 三峡库区蓄水初期大宁河鱼类重金属污染特性[J]. 生态学杂志,2013,32(7): 1870-1876
Yu Y, Wang Y C, Zhou H D, et al. Characteristics of heavy metals pollution of fishes in Daning River of Three Gorges Reservoir Area during initial impoundment [J]. Chinese Journal of Ecology, 2013, 32(7): 1870-1876 (in Chinese)
- [5] Sato T, Nakagawa H, Oikawa S, et al. Hypothesis of the lead defense mechanism of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Biomedical Research on Trace Elements, 2007, 18(4): 387-390
- [6] Mobarak Y M S, Sharaf M M. Lead acetate-induced histopathological changes in the gills and digestive system of silver sailfin molly (*Poecilia latipinna*) [J]. International Journal of Zoological Research, 2011, 7(1): 1-8
- [7] Lee S M, Lee S B, Park C H, et al. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring [J]. Chemosphere, 2006, 65(6): 1074-1081
- [8] Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila* [J]. Experientia, 1962, 18(12): 571-573
- [9] Pelham H R. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* HSP70 heat-shock gene [J]. Cell, 1982, 30(2): 517-528
- [10] Marber M S, Mestral R, Chi S H, et al. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury [J]. Journal of Clinical Investigation, 1995, 95(4): 1446
- [11] 尚进才,王亚洲,高岩,等. 热休克蛋白的研究进展[J]. 医学理论与实践,2010,23(5): 527-529
- [12] 刘志刚,张其中,张占会,等. 近江牡蛎 HSC70 基因对溶藻弧菌感染的反应[J]. 中国水产科学,2012,19(3): 500-508
Liu Z G, Zhang Q Z, Zhang Z H, et al. mRNA expression of heat-shock cognate protein 70 gene (HSC70) in the oyster (*Crassostrea hongkongensis*) in response to *Vibrio alginolyticus* challenge [J]. Journal of Fishery

- Sciences of China, 2012, 19(3): 500-508 (in Chinese)
- [13] Deane E E, Woo N Y S. Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins [J]. Reviews in Fish Biology & Fisheries, 2011, 21(2): 153-185
- [14] Airaksinen S, Jokilehto T, Rabergh C M, et al. Heat and cold inducible regulation of HSP70 expression in zebra fish ZF4 cells [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B, 2003, 136(2): 275-282
- [15] 盛连喜, 于文广, 王云彪, 等. 温度、铜离子对鲤鱼血清 HSP70 合成的影响 [J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2007, 39(1): 108-113
Sheng L X, Yu W G, Wang Y B, et al. Effects of temperature and copper on HSP70 expression in carp serum [J]. Journal of Northeast Normal University: Natural Science Edition, 2007, 39(1): 108-113 (in Chinese)
- [16] 周鑫. 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 对亚硝酸盐、氨氮和温度胁迫的生理响应 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012: 1-7
Zhou X. Physiological response to stress of nitrite, ammonia and temperature in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012: 1-7 (in Chinese)
- [17] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): 66
- [18] Denschlag C, Vogel R F, Niessen L. Hyd5 gene-based detection of the major gushing-inducing *Fusarium* spp. in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 156(3): 189-196
- [19] Wang X, Zhu J, Zhang Q, et al. Detection of enterovirus 71 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. Journal of Virological Methods, 2012, 179(2): 330-334
- [20] Thekisoe O M M, Rambritch N E, Nakao R, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Theileria parva* infections targeting the PIM and p150 genes [J]. International Journal for Parasitology, 2010, 40(1): 55-61
- [21] Spijkerman E, Barua D, Gerloff-Elias A, et al. Stress responses and metal tolerance of *Chlamydomonas acidiophila* in metal-enriched lake water and artificial medium [J]. Extremophiles, 2007, 11(4): 551-562
- [22] Boone A N, Vijayan M M. Constitutive heat shock protein70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: Effect of heat shock and heavy metal exposure [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2002, 132(2): 223-233
- [23] Rios-Arana J V, Gardea-Torresdey J L, Webb R, et al. Heat shock protein 60 (HSP60) response of *Platynus patulus* (Rotifera: Monogononta) to combined exposures of arsenic and heavy metals [J]. Hydrobiologia, 2005, 546(1): 577-585
- [24] Zhu X N, Chen L P, Bai Q, et al. PP2A-AMPK α -HSF1 axis regulates the metal-inducible expression of HSPs and ROS clearance [J]. Cellular Signalling, 2014, 26(4): 825-832
- [25] 刘海超. 唐鱼三个分子伴侣基因的克隆及重金属对其 mRNA 表达的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 87-88
Liu H C. Cloning of three molecular chaperones gene and three mRNA transcriptional regulation responding to heavy metals in *Tanichthys albonubes* Lin [J]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011: 87-88 (in Chinese)
- [26] Alderman B M, Cook G A, Familiari M, et al. Resistance to apoptosis is a mechanism of adaptation of rat stomach to aspirin [J]. American Journal of Physiology, 2000, 278(6): 839-846
- [27] 汪承润, 王晓蓉, 于红霞, 等. 运用蚕豆幼苗叶片生物标志物评价铅污染土壤 [J]. 环境科学, 2008, 29(11): 3246-3251
Wang C R, Wang X R, Yu H X, et al. Evaluation of soil lead contamination by biomarkers in leaves of *Vicia faba* L. seedlings [J]. Environmental Science, 2008, 29(11): 3246-3251 (in Chinese)
- [28] Sarkar S, Podder S, Roy S. Flubendiamide-induced HSP70 expression in transgenic *Drosophila melanogaster* [J]. Current Science, 2015, 108(11): 2044-2050
- [29] Rajeshkumar S, Mini J, Munuswamy N. Effects of heavy metals on antioxidants and expression of HSP70 in different tissues of milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattupalli Is land, Chennai, India [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 98(3): 8-18
- [30] Basile A, Sorbo S, Cardi M, et al. Effects of heavy metals on ultrastructure and HSP70 induction in *Lemna minor* L. exposed to water along the Sarno River, Italy [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 114: 93-101