文章编号:1001-5132（2007）04-0446-05

鱼类 HSP70 的研究进展

祝璟琳[1]，王国良[1,2*]

（1.宁波大学 生命科学与生物工程学院，浙江 宁波 315211；2.宁波大学 医学院，浙江 宁波 315211）

摘要：HSP70 是含量最丰富的一大家族 HSPs，具有高度保守的序列，作为分子伴侣在协助新生多肽链折叠，蛋白质复合体的装配，以及调节、修复和降解变性的蛋白质方面起着重要作用，也是目前鱼类上研究最广泛的热休克蛋白. 多种鱼类编码热应激蛋白的基因序列也已经被克隆和检测，HSP70 的表达主要在转录水平进行调控，目前对 HSP70 在应激反应中的合成机制仍不是很清楚. 本文综述了它的研究概况以及应用前景.

关键词：热休克蛋白 70；应激蛋白；应激反应

中图分类号：S917　　文献标识码：A

热休克蛋白(Heat Shock Protein，HSP)也称应激蛋白(Stress Protein，SP)，是由遗传学家Ritossa在 1962 年研究果蝇唾液腺时发现的. 生物体在各种应激作用下，能启动一组特殊基因——热休克基因，产生一组结构上非常保守的特殊蛋白质，它能快速、短暂调整应激过程中细胞的存活机能，保护细胞抗损伤，并有助于细胞恢复正常的结构和机能. 按分子量大小通常将HSPs分为 4 类：HSP90 家族、HSP70 家族、HSP60 家族及小分子量smHSP家族. HSP70 是一类最保守和最重要的热休克蛋白家族，作为分子伴侣在协助新生多肽链折叠，蛋白质复合体的装配，以及调节、修复和降解变性的蛋白质方面起着重要作用，包括分子量为 68，72，73，75，78 KD等多种蛋白质，可分为在热应激条件下可诱导表达的HSP和组成型表达的HSP(Heat Shock Congrate Proteins，HSC) 2 种[1].

鱼作为一种变温脊椎动物，温度的日变化和季节变化对鱼的生命过程有重要影响，水环境的其他因素(如重金属、缺氧、细菌感染等)也影响着鱼类的分布和生理状态，而这些因素与它们体内热休克蛋白的数量和表达程度息息相关. 此外，因为鱼是体外受精，具有大量可操作的卵和胚胎，所以可以在整个生活史中研究鱼类热休克蛋白基因的表达和调控. 因此，鱼类已成为研究热休克蛋白的理想模式生物. HSP70 是鱼类中研究最广泛的一类热休克蛋白.

1　鱼类 HSP70 的研究概况

1.1　鱼类 HSP70 基因的克隆

为了研究鱼类热休克蛋白的基因组学，需要收集大量的分子生物学信息，有关鱼类热休克蛋白的研究报道多集中在蛋白质水平，但多种鱼类编码热应激蛋白的基因序列也已经被克隆和检测，包括虹

收稿日期：2007-04-29.　　宁波大学学报（理工版）网址：http://3xb.nbu.edu.cn
基金项目：浙江省科技厅重点资助项目（2005C23080）.
作者简介：祝璟琳（1983－），男，浙江金华人，在读硕士研究生，主要研究方向：水产动物病害防治. E-mail: jlzhu83@126.com
*通讯作者：王国良（1955－），男，浙江定海人，教授，主要研究方向：水产动物病害防治. E-mail: wanggl@nbip.net

鳟[2]、青鳉[3]、斑马鱼[4]、河豚[5]、罗非鱼[6]、花斑溪鲃[7]、鲤鱼[8]，大部分实验是以所培养的某种鱼类的组织细胞为材料，有些实验是以鱼体某种组织为材料进行研究[9]. 近年来，Deane等人[10]又克隆了银鲷肝脏中热休克相关蛋白基因HSC70 和诱导性热休克蛋白HSP70. 张祖兴等人[11]通过RT-PCR获得了大黄鱼热激蛋白(HSP)的cDNA，全长 2 488 bp，其中 34～1 663 bp为编码序列. 万文菊[12]获得了剑尾鱼的 2 个HSP70 家族成员的cDNA的部分序列，序列中均包含HSP70 的特征性序列.

1.2　鱼类 HSP70 基因的表达及调控

鱼类HSP70 在各种应激条件下的表达情况一直是鱼类热休克蛋白发现以来的研究热点. Airaksinen等[13]比较了斑马鱼在热胁迫(28～37 ℃)和冷胁迫(20～28 ℃)下的表达模式的差异，发现在热胁迫条件下，HSP70 呈上调表达，而冷胁迫下HSP70 则显稳定表达. Yamashita等[14]发现，将新月鱼(platyfish)的成纤维细胞系的培养温度从 28 ℃调节到 37 ℃时诱导产生 3 种不同的热休克蛋白 70. Das等人[15]分析了鲤鱼(*Cirrhinus mrzgala*)的HSP70 的组织特异性表达，发现在热胁迫条件下，肝脏中HSP70 的表达量稳定增长，且表达量高于鳃和心脏组织.

而一些冷水性鱼类的HSP70 表达情况却有所不同. Zarate和Bradley[16]研究表明孵卵过程中的一些应激，如拥挤、缺氧、氧过多、甲醛刺激、控食及冷刺激等都不会改变鲑鱼鳃内HSP30，HSP70 和HSP90 的表达. Hofmann等[17]发现无论是 10 ℃热胁迫还是重金属胁迫均不能使一种南极鱼(*Trematomus bernacchii*)诱导产生任何HSPs，却有组成型表达的 70kDa的分子伴侣持续表达. 这种生物缺乏热激反应可能是由于这种鱼的生活环境一直处于稳定的低温(0 ℃以下)，因此在进化过程中，由于缺乏正向选择从而导致丢失这种在其他生物中均能检测到的生理能力，但导致这种能力丢失的内在原因究竟是基因的丢失、mRNA的稳定性降低还是缺乏热休克因子(HSF)等还需进一步研究.

关于鱼类热休克蛋白基因的表达调控机制还没有得到广泛研究，目前只有在HSP70 基因上有一些研究. Curri和Tufts[18]首次表明虹鳟中HSP70 的表达主要在转录水平进行调控，包括HSPs基因上游一段特殊的DNA序列，即热休克元件(HSE)以及和这一序列特异结合的因子——热休克因子(Heat Shock Transcription Factor，HSTF/HSF).

Airaksinen[19]报道了HSF1 是虹鳟HSP70 mRNA诱导表达的一部分. 随后，Rabergh等[20]在斑马鱼中克隆到了这种热休克因子. 他们又从美国蓝鳃太阳鱼中克隆到了热休克因子的一个片段. 和斑马鱼中的热休克因子相比，美国蓝鳃太阳鱼中热休克因子和人类、老鼠、鸡中的热休克因子更为相似. 这可能是因为鱼类中的热休克因子基因具有多态性，或者是因为鱼类基因组能为热休克因子编码多种基因.

2　鱼类 HSP70 的应用前景

2.1　保护细胞免受热应激损害的作用

当细胞受到热刺激时，增加合成的HSP70，可与变性蛋白或异常蛋白相结合，减少不溶性聚集物的产生并解离无法修复的蛋白质，另外，通过修复错误折叠蛋白，可加快正常蛋白的恢复，使热休克时因蛋白质变性而造成的蛋白量的减少得到补充，从而保持细胞的自稳定，保护细胞免受变性蛋白的损害. Susan等[21]研究认为，热休克蛋白的诱导合成与海洋生物耐热性及耐盐性的获得有平行关系.

2.2　作为生物指标来诊断鱼类的生理状态

由于HSP70 具有高度保守的序列以及在受到环境胁迫后能够大量表达，因此热休克蛋白有可能成为一种生物指标，用来诊断鱼类的生理状态. 在鱼类的应激研究中，需要证明实验中的一些操作，如处理动物、采样等一些物理刺激是否影响HSPs的表达. 万文菊[12]研究发现注射操作不会影响

HSP70 作为测定鱼类感染状态的应用，证明常规的操作应激不会引起HSP反应. 以热休克蛋白作为指标来测定鱼类的生理状态时，具有如下优点[22]：(1)热休克蛋白的合成具有组织特异性，可用以推断受到毒害作用的靶组织和器官；(2)应激反应与鱼类生理状态密切相关，可以定量测定某一生物所受到的环境胁迫强度.

2.3 感染免疫与抗感染免疫

由于热休克蛋白具有高度保守性，病原体HSP部分序列同源，因此可能逃避宿主的免疫防御机制，使病原体增值，病原体HSP可发挥应激保护作用，帮助病原体抵御在宿主体内的各种不利环境. 另一方面，宿主和病原体HSP虽然有同源性，但也存在差异，这种差异引起宿主免疫系统针对此病原体HSP的免疫应答；病原体HSP可协同病原体特异抗原，共同刺激宿主免疫系统，产生免疫应答. 许多病原体(细菌、寄生虫等)感染宿主后，由于宿主的体内环境(如温度、pH等)与自然环境的差异，病原体在适应新的生长环境的过程中，伴有HSP的表达，并引起宿主的抗感染免疫. 利用重组DNA技术发现，HSP70 是这一反应中被识别的主要抗原之一. Forsyth等人[25]首先从感染了细菌性肾脏病的病原菌——沙氏肾杆菌的银大马哈鱼中发现增加了HSP70 蛋白在肝脏、头和肾中的表达. 随后，Ackerman等[26]发现溶藻弧菌感染虹鳟后，也增加了HSP70 蛋白在肝脏、头和肾中的表达. 万文菊[12]研究发现HSP70 成员可能较早参与了鱼类抗病原菌感染及疫苗产生的免疫应答过程，但还需要进一步研究来阐明免疫系统与HSP70 之间的关系.

2.4 生物标记物与水环境监测

鉴于HSP70 的高度保守性，从细菌到人类都可合成HSP70，将其作为生态生物标记物，可以避免传统的环境监测指标因物种差异和环境条件差异而带来的不一致因素，可以把实验室低等生物实验结果应用于高等动物甚至人类. Vijayan等[27]提出，萘黄酮、氯化镉、牛皮纸浆漂白液(BKME)浓度在远低于LC_{50}值时，便可以诱导鲑鱼肝脏组织HSP70合成. Holloran等[28]克隆了斑马鱼诱导型HSP70 的启动因子，并利用DNA重组技术构建了HSPs-eGFP(Green Fluorescent Protein)的转基因斑马鱼模型. Blechinger等[29]成功利用这一模型在鱼幼体期测定了镉的毒性，并且发现在低于镉的致死剂量下，能非常灵敏地检测到eGFP的表达. 沈骅等[30-32]探讨了HSP70 作为重金属污染条件下生物标记物的潜力.

对HSP70 的初步研究已经显示了HSP70 作为生物标记物和在水环境监测方面的潜力，但是HSP70 的表达水平并不总是与有害因素的作用强度平行，其机制较为复杂. 同时，监测水质不能孤立考虑单项因素，单因子指标符合目前水质标准，并不能认定该水质对鱼类生存安全，还要考虑环境胁迫因子间相互作用产生的影响. 利用HSP70 作为水环境污染的检测有它的局限性，De Pomerai[33]提出不同的污染物会诱发不同HSPs家族的表达，仅仅靠一种HSPs家族不足以作为环境污染的指示物. 所以，进一步解决HSP70 检测系统的不足，以及不断完善这一系统，还需要不懈的探索.

3 展望

尽管鱼类 HSP70 的分子生物学研究仍然处在描述阶段，但大量的前期研究数据正在收集，可以尝试开始鱼类功能基因组学的研究. 不同的受试物种和不同的研究组织，不同的应激因素，HSP70 的合成规律有不同程度差异. 目前对 HSP70 在应激反应中的合成机制仍不是很清楚，这主要是因为，到目前为止，对 HSP70 合成机制研究数据有限，同时，在有限的研究中，受试物种不同，试验方案的设计以及 HSP70 的检测手段不同，造成数据之间缺乏可比性. 因此，还需要获取更多鱼类 HSP70 基因以及基因组信息，来进一步研究阐明 HSP70 诱导因素和生物适应机制以及合成表达调控机制.

参考文献：

[1] Wood L A, Brown L R, Youson J H. Characterisation of the heat shock response in the gills of sea lampreys and a brook lamprey at different intervals of their life cycles[J]. Comparative Biochemistry and Physiology A, 1998, 120 (3):509-518.

[2] Kothary R K, Burgess E A, Candido E P M. The heat-shock phenomenon in cultured cells of rainbow trout: HSP70 mRNA synthesis and turnover[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression, 1984, 783(2):137-143.

[3] Arai A, Naruse K, Mitani H, et al. Cloning and characterization of cDNAs for 70-kDa heat-shock proteins(HSP70) from two fish species of the genus Oryzias[J]. Japanese Journal of Genetics, 1995, 70(3):423-433.

[4] Lele Z, Engel S, Krone P H. HSP47 and HSP70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos[J]. Developmental Genetics, 1997, 21(2):123-133.

[5] Lim E H, Brenner S. Short-range linkage relationships, genomic organization and sequence comparisons of a cluster of five HSP70 genes in Fugu rubripes[J]. Cell and Molecular Life Sciences, 1999, 55(4):668-678.

[6] Molina A, Biemar F, Muller F, et al. Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish[J]. Federation of European Biochemical Societies Letters, 2000, 474(1):5-10.

[7] Park J H, Lee J J, Yoon S, et al. Genomic cloning of the HSC71 gene in the hermaphroditic teleost rivulus Marmoratus and analysis of its expression in skeletal muscle: identification of a novel muscle-preferred regulatory element[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29 (14):3 041-3 050.

[8] Ali K , Dorgai L, Abraham M, et al. Tissue- and stressor-specific differ rential expression of two HSC70 genes in carp[J]. Biochmical and Biophysical Research Comunications, 2003, 307(3):503-509.

[9] Iwama G K, Thomas P T, Forsyth R B, et al. Heat shock protein expression in fish[J]. Review in Fish Biology and Fisheries, 1998, 8:35-56.

[10] Deane E E, Woo N Y S W. Cloning and characterization of the HSP70 multigene family from silver sea bream: modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation[J]. Biochmical and Biophysical Research Comunications, 2005, 330(3):776-783.

[11] 张祖兴，李明云，陈炯，等．大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)热激蛋白的基因克隆、原核表达及抗血清的制备[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(4):337-341.

[12] 万文菊. 剑尾鱼 HSP70 家族两成员的分子克隆及溶藻弧菌感染与免疫对其基因的诱导表达[D]. 济南: 山东农业大学动物科技学院, 2006.

[13] Airaksinen S, Jokilehto T, Rabergh C M I, et al. Heat- and cold-inducible regulation of HSP70 expression in zebrafish ZF4 cells[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-B Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 136 (2):275-282.

[14] Yatnasaki M, Tajitna M, Lee K W, et al. Molecular cloning and phylogenetic analysis of Babesia gibsoni heat shock protein 70[J]. Veterinary Parasitology, 2002, 110 (1-2):123-129.

[15] Das P, Gupta A, Manna S K. Heat shock protein 70 expression in different tissues of Cirrhinus mrigala (Ham.) following heat stress[J]. Aquaculture Research, 2005, 36(6):525-529.

[16] Zarate J, Bradley T M. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon[J]. Aquaculture, 2003, 223(1-4):175-187.

[17] Hofmann G E, Buckley B A, Airaksinen S, et al. Heat-shock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (Family nototheniidae) [J]. The Journal of Experimental Biology, 2000, 203(3):2 331-2 339.

[18] Currie S, Tufts B L. Synthesis of stress protein 70 (HSP 70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells[J]. Journal of Experimental Biology, 1997, 200(3): 607-614.

[19] Airaksinen S, Rabergh C M, Sistonen L, et al. Effects of heat shock and hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells[J]. Journal of Experimental Biology, 1998, 201(17): 2 543-2 551.

[20] Rabergh C M, Airaksinen S, Soitamo A, et al. Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress[J]. Journal of Experimental Biology, 2000, 203(2):1 817-1 824.

[21] Susan G, Lund M, Hofinann G, et al. Turning up the heat: the effects of thermal acclimation on the kinetics of HSP

70 gene expression in the eurythermal goby *Gillichthys mimbilis*[J]. Comparativc Biochemistry and Physiology, 2006, 3(4):435-446

[22] Vijayan M M, Pereira C, Forsyth R B. Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation heat-shock-cognate HSC71 gene from rainbow trout[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 204:893-900.

[23] 胡炜, 汪亚平, 周永欣. Cu^{2+}、Zn^{2+}诱导稀有鮈应激蛋白质的研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(1):50-53.

[24] Young R A. Stress proteins and immunology[J]. Annual Review of Immunology, 1990, 8: 401-420.

[25] Forsyth R B, Candido E P M, Babich S L, et al. Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1997, 9: 18-25.

[26] Ackerman P A, Iwama G K. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to *vibrio alginolyticussis*[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2001, 13(2): 173-180.

[27] Vijavan M, Pereira C, Grau E G. Handling stress does not affect expression of hepatic heat-shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with β-naphthoflavone[J]. Life Science, 1997, 61(2):117-127.

[28] Halloran M C, Sato-Maeda M, Warren J T, et al. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish[J]. Development, 2000, 127(9):1 953-1 960.

[29] Blechinger S R, Warren J T J R, Kuwada J Y, et al. Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line[J]. Environmental Health Perspectives, 2002, 110(10):1 041-1 046.

[30] 沈骅, 王晓蓉, 张景飞, 等. 低浓度 Zn 对幼龄鲫鱼肝脏组织应激蛋自 HSP70 诱导的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3):441-443.

[31] 沈骅, 王晓蓉, 张景飞. 应用应激蛋白 HSP70 作为生物标志物研究锌、铜及其联合毒性对鲫鱼肝脏的影响[J]. 环境科学学报, 2004, 24(9):895-899.

[32] 沈骅, 王晓蓉, 张景飞, 等. 低浓度Pb^{2+}, Cd^{2+}对鲫鱼肝脏组织中HSP70诱导的影响[J]. 环境污染与防治, 2004, 26(4):244-247.

[33] De Pomerai D I. Heat shock proteins as biomarkers of pollu- tion[J]. Human and Experimental Toxicology, 1996, 15(4): 279-285.

The Research Progress on HSP70 in Fish Species

ZHU Jing-lin[1], WANG Guo-liang[1,2*]

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;
2. The Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In the family of heat shock proteins (HSPs), the HSP70 (70-kD heat-shock protein) is found to be the most abundant in terms of content, and with highly conserved structure. This type of structure plays a vital role in assisting the folding of nascent polypeptide chains as a molecular chaperone, repairing and degrading the altered or denatured proteins. It is also among the most extensively studied HSPs in fish species. HSP70 gene has been cloned and identified in several different fish species. Up to date, it is still unclear about how it is synthesized in the stress response. This review summarizes the research progress made on HSP70 in fish species along with its possible applications in the future.

Key words: heat shock proteins 70; stress protein; stress response

CLC number: S917 **Document code:** A

（责任编辑 史小丽）