

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240509002

http://www.yykxjz.cn/

刘小强, 冯春晖, 温海深, 李昀, 姜天宇, 齐鑫. *hspa5* 在花鲈高温胁迫下的表达及定位. 渔业科学进展, 2025, 46(4): 118–128  
LIU X Q, FENG C H, WEN H S, LI Y, JIANG T Y, QI X. Expression and localization of *hspa5* in response to thermal stress in the spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(4): 118–128

## *hspa5* 在花鲈高温胁迫下的表达及定位\*

刘小强 冯春晖 温海深 李 昀 姜天宇 齐 鑫<sup>①</sup>

(海水养殖教育部重点实验室(中国海洋大学) 山东 青岛 266003)

**摘要** 花鲈(*Lateolabrax maculatus*)作为我国重要的海产经济鱼类,在养殖过程中经常受到高温胁迫的影响,严重制约花鲈养殖产业的发展。已有研究表明,热休克蛋白 5 (HSPA5)作为关键的应激反应蛋白,在细胞热响应过程中发挥重要功能。为深入研究花鲈 HSPA5 在高温胁迫下的分子响应机制,本研究首先克隆了花鲈 *hspa5* 基因,并采用实时荧光定量 PCR (qPCR)技术,分析了在 30 ℃ 高温条件下不同处理时间对花鲈肝脏中 *hspa5* 基因表达的影响。结果显示,随着处理时间的延长,*hspa5* 基因的表达量逐渐上升,并在处理 12 h 时达到最高水平,随后呈下降趋势,表明 *hspa5* 在花鲈肝脏组织应对高温胁迫时具有显著的响应。对正常条件下的花鲈肝脏组织 HE 染色,初步观察了组织特征和细胞状态。原位杂交结果显示, *hspa5* mRNA 主要定位于肝细胞胞质中。综上所述,本研究通过 qPCR、HE 染色和原位杂交技术,揭示了 *hspa5* 基因在花鲈肝脏组织响应高温胁迫的表达模式。研究结果不仅有助于深入理解 *hspa5* 在花鲈响应高温胁迫时的功能机制,还为花鲈的养殖管理和耐高温性状选育提供了一定的理论依据。

**关键词** 花鲈; 高温胁迫; 热休克蛋白 5; 荧光定量 PCR; 原位杂交

**中图分类号** S96 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)04-0118-11

花鲈(*Lateolabrax maculatus*)又称中国花鲈,俗称海鲈、七星鲈、寨花等,隶属于鲈形目(Perciformes)、花鲈科(Lateolabracidae)、花鲈属(*Lateolabrax*),其广泛分布于中国、日本与韩国沿海地区,南到越南边界,北到朝鲜半岛西岸。花鲈在不同生长阶段均具有广盐的适应特性,是世界范围内海水鱼类引种与养殖对象。花鲈具有营养价值高、口感好的特点,是中国重要的海产经济鱼类之一(温海深等, 2020a、b)。

温度是影响水生动物正常生命活动的最主要的环境因素。环境温度的剧烈变化可能破坏个体与环境间的平衡状态,导致鱼类产生应激反应,生长速率及体重等生长指标下降,引起其生理功能紊乱甚至死亡,

造成经济损失。除此之外,高温胁迫还可导致鱼类的免疫功能降低,极易被病原感染,引起大规模流行病的暴发(栗雯, 2023)。随着全球气候变暖及集约化养殖模式的普及,高温胁迫成为了影响花鲈养殖的重要环境压力之一(Sun *et al*, 2021)。在高温胁迫响应过程中,热休克蛋白(HSPs)扮演着至关重要的角色。这些蛋白质不仅在维持应激状态下鱼类的正常生理机能方面发挥关键作用,而且在漫长的进化历程中展现出高度的保守性(Feder *et al*, 1999)。热休克蛋白的存在,为鱼类提供了一种有效的应对策略,通过诱导其大量产生,能够减轻应激反应对鱼体造成的损伤,从而保护其免受外界不利因素的伤害。

\* 国家重点研发计划“海洋农业与淡水渔业科技创新”重点专项“重要水产养殖生物种质资源挖掘和创新利用”项目课题三“海水鱼种质资源体系化保存与创制”(2022YFD24005103)资助。刘小强, Email: 1113006315@qq.com

① 通信作者: 齐 鑫, 教授, Email: qx@ouc.edu.cn

收稿日期: 2024-05-09, 收修改稿日期: 2024-11-07

HSPA5 (heat shock protein family A member 5), 又称葡萄糖调节蛋白 78 (Grp78)或免疫球蛋白重链结合蛋白(Bip), 是热休克蛋白家族 A (Hsp70)中的一员。该蛋白由 654 个氨基酸组成, 结构复杂, 包括内质网信号肽、N 端核苷酸结合域、C 端底物结合域以及一个 KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu-COO-)序列等关键组分 (Ibrahim *et al*, 2019; Jin *et al*, 2021)。作为热休克蛋白家族的重要成员, HSPA5 在细胞应激反应中发挥着核心作用。在细胞面临温度变化、化学物质暴露、氧化应激和营养匮乏等多种应激状况时, HSPA5 得以释放, 进而与 IRE1 (inositol- requiring kinase 1)、PERK (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase)及 ATF6 (activating transcription factor 6)等关键信号蛋白发生相互作用。这一互作能够激活多条信号通路, 缓解内质网所承受的应激压力, 并帮助细胞恢复正常功能与稳态 (Li *et al*, 2006; Hangzo *et al*, 2017)。研究结果表明, *hspa5* 基因深度参与对高温胁迫的响应过程。例如, 高温处理后的大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) *hspa5* 基因出现显著上调 (Xu *et al*, 2018)。类似结果在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Xia *et al*, 2018), 褐菖鲉 (*Sebastiscus marmoratus*) (Han *et al*, 2023)等水产动物中也被发现。此外, HSPA5 还参与细胞发育、分化、凋亡、自噬等生物学过程, 对细胞命运产生深远影响。在斑马鱼 (*Danio rerio*)中, *hspa5* 基因参与了性腺的发育过程 (He *et al*, 2017)。

实验室前期研究表明, 在高温胁迫条件下, 肝脏和肌肉组织中 *hspa5* 基因相对表达量表现出显著的变化 (Sun *et al*, 2021), 表明 *hspa5* 基因在花鲈响应高温胁迫中发挥重要作用。因此, 解析 HSPA5 在花鲈高温胁迫过程中的功能和调节机制对于完善花鲈在高温下的养殖策略是非常重要的。为了更好地解析花鲈应对热胁迫反应的分子机制, 本研究克隆了花鲈 *hspa5* 基因, 并通过实时荧光定量 PCR (qPCR)和原位杂交等方法探究 *hspa5* 在花鲈应对高温胁迫时的响应机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验所用花鲈取自山东省东营市利津县双瀛水产苗种有限责任公司。暂养期间控制水温为 15~20 °C, 盐度为 28~30, pH 7.5~8.0, 保证溶解氧浓度高于 5.0 mg/L, 总氨氮含量低于 1.0 mg/L (李冰玉等, 2021)。

### 1.2 高温胁迫实验与采样

高温胁迫实验在山东省东营市利津县双瀛水产苗种有限责任公司进行。选取健康、无伤病、体长为 (22.6±0.45) cm、体重为 (102.19±3.56) g 的花鲈幼鱼共计 300 尾。实验设备为装有 120 L 曝气除氯自来水的鱼缸, 每个处理组设置 3 个平行鱼缸, 每个鱼缸 20 尾花鲈。高温胁迫温度设置为 30 °C。暂养结束后, 水温以 1 °C/h 的速率升至实验所需温度并保持, 取样时间点为驯化温度 (对照组命名为 C 组, 即高温胁迫 0 h)、高温胁迫开始后 6、12、24 和 72 h, 每个时间点从每个缸各取 3 尾鱼, 即每个时间点共取 9 尾鱼。用 100 mg/mL 的 MS-222 对取样鱼进行麻醉, 冰上解剖取肝脏组织, 在液氮中快速冷冻后保存在 -80 °C 的冰箱中用于后续的 RNA 提取。

### 1.3 总 RNA 提取与检测

将花鲈肝脏组织从 -80 °C 冰箱中取出, 转移至 1.5 mL RNase Free 离心管中, 加入 1 mL TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国)和 3 个不锈钢珠, 使用组织研磨机进行低温充分研磨 (1 400 r/min, 4 个循环)。向研磨充分的组织中加入三氯甲烷 (每 1 mL TRIzol 加 0.2 mL 三氯甲烷), 剧烈震荡 15 s, 冰上静置 10~15 min。低温离心 10~15 min (4 °C, 12 000 r/min)后, 缓慢吸取澄清的上清液转移到无 RNase 污染的 1.5 mL 新离心管中。随后, 向管中加入与其体积相等的预冷异丙醇, 并轻轻摇动以确保混合均匀, 在室温下静置 10 min 以完成沉淀。静置结束后继续低温离心 15 min (4 °C, 12 000 r/min), 弃上清液, 向离心管中加入 1 mL 75% 乙醇 (DEPC 水配制)洗涤沉淀, 除去残留的异丙醇, 在离心机中于 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 5 min 后弃上清液。再次向离心管中加入 1 mL 75%乙醇 (DEPC 水配制)重复洗涤沉淀。弃去离心管中的乙醇, 室温下干燥 5~10 min (RNA 不可过分干燥, 以免影响溶解)。沉淀干燥后加入 30~50 μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀, 振荡混匀取 1 μL RNA 溶液进行 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 利用 BD-100 核酸分析仪测定 RNA 的纯度、浓度以及 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 比值 (1.8~2.2 为最佳)。将 RNA 转移至 -80 °C 冰箱保存备用。提取的 RNA 按照 PrimeScript<sup>TM</sup> RT 试剂盒 (TaKaRa, 日本)说明书反转录为 cDNA, 并统一稀释至 500 ng/μL 用于后续的 qPCR 实验。

### 1.4 *hspa5* 的克隆和实时荧光定量 PCR

在花鲈的参考基因组中获取了 *hspa5* 基因的开放

阅读框(ORF)核酸序列。选用反转录得到的 cDNA 作为模板,利用 NCBI 的 Primer BLAST 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计 *hspa5* 基因的全长引物 C-*hspa5* (表 1),利用 2× Phanta Max Master Mix (Dye Plus)高保真酶试剂(诺唯赞,南京)进行 PCR 扩增,克隆 *hspa5* 基因 ORF 的全长序列。PCR 产物通过 1%的琼脂糖凝胶电泳进行分离回收,随后,利用 5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit (诺唯赞,南京)将回收的 DNA 片段连接到 pCE2 TA/Blunt Zero 载体上。将连接产物通过常规方法转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 菌株中,氨苄抗性平板筛选单菌落,经测序验证后得到准确的 *hspa5* 基因 ORF 的全长序列。

根据花鲈基因组注释文件信息在花鲈参考基因组中获取 *hspa5* 基因的编码序列(CDS),使用 Primer5 软件和 NCBI Primer-BLAST 在线工具设计用于 qPCR 的基因特异性引物(RT-*hspa5*) (Chuang *et al*, 2013),并用 1%的琼脂糖凝胶电泳和 qPCR 的熔解曲线验证引物的特异性(表 1)。使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (High ROX Premixed) (诺唯赞,南京),以花鲈的 *18S* 为内参基因,利用 StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, 美国)进行 qPCR 实验。为确保实验结果的准确性,每组设 3 个生物学重复,每个个体 3 个技术重复,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的相对表达量(Livak *et al*, 2001)。实验所用反应体系见表 2。

### 1.5 HSPA5 氨基酸序列的生物信息学分析

为了更全面地研究目标蛋白的特性和功能,本研究采用了多种生物信息学工具和方法。首先,在 ORFfinder 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)

将核酸序列翻译为蛋白序列。随后,借助 ExPASy 平台上的 ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)深入分析氨基酸序列的理化性质。亲疏水性特征分析使用 ExPASy 的 ProtScale 工具(<https://web.expasy.org/protscale/>)完成。SignalP 4.1 Server 预测信号肽(Petersen *et al*, 2011),TMHMM Server V. 2.0 预测跨膜结构域(Chen *et al*, 2003),NCBI CD-Search 在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测蛋白结构域,使用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)预测三级结构,使用 MEGA 11 软件基于近邻相接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树(Tamura *et al*, 2021)。

### 1.6 组织固定、石蜡切片和 HE 染色

为了保持组织形态的完整性,将花鲈麻醉后,取出肝脏组织并在含 4%多聚甲醛的 1×PBS 溶液中固定 18 h,以稳定组织结构。随后,通过梯度酒精溶液进行脱水处理,并使用二甲苯进行透明化处理,接着进行石蜡包埋,使用组织切片机(Leica, 德国)将组织切成 7 μm 厚的切片,组织切片于 37 ℃烘箱中过夜烘干,以去除残留水分,用于后续 HE 染色和原位杂交实验。

HE 染色步骤包括:首先将石蜡切片在 37 ℃烘箱中烘干 10~30 min,接着依次在二甲苯和不同浓度的酒精中进行脱蜡和复水处理。然后,切片在苏木精中染色以标记细胞核,随后用盐酸酒精分化并用氨水返蓝。之后,切片在不同浓度的酒精中进行脱水处理,最后通过二甲苯透明化,中性树胶封固。封固后的切片经显微镜检查和图像采集分析。

表 1 基因 ORF 克隆和 qPCR 所用的引物  
Tab.1 Primers used for gene ORF cloning and qPCR

引物名称 Primer name	上游引物 Forward primer (5'~3')	下游引物 Reverse primer (5'~3')
C- <i>hspa5</i>	ATGAAGCTGTTGTGGGTTG	CTACAACTCGTCTTCTCATC
RT- <i>hspa5</i>	AGCTGCGTCGTGAGGTTGAG	AAACTTGGCACGGGTCAGGG
<i>18S</i>	GGGTCCGAAGCGTTTACT	TCACCTCTAGCGGCACAA

表 2 qPCR 体系  
Tab.2 qPCR mixture

试剂 Component	体积 Volume
2×ChamQ SYBQ qPCR Master Mix (High ROX Premixed)	10.0 μL
Primer 1 (10 μmol/L)	0.4 μL
Primer 2 (10 μmol/L)	0.4 μL
Template DNA/cDNA	× μL
ddH <sub>2</sub> O	To 20.0 μL

1.7 原位杂交

用克隆得到的目的基因, 在基因的 CDS 上的特异性区域设计引物(表 3), 在上游引物的 5'端添加保护碱基和 SP6 聚合酶启动子(ATTAGGTGACACTATAGAAGCG), 在下游引物的 5'端添加保护碱基与 T7 聚合酶的启动子(TAATACGACTCACTATAGGGAGACA)。以基因的单克隆菌液为模板, PCR 扩增目的片段, 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 使用胶回收试剂盒切胶回收目的片段, 根据 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, 瑞士)的说明书进行体外转录,

得到带有地高辛(DIG)标记的 RNA 探针。DNase I 消化 DNA 模板后用氯化锂/乙醇法纯化 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 探针的浓度, 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测合成探针的特异性及完整性, 保存于-80 ℃备用。

经石蜡切片处理得到的组织切片, 需进行一系列脱蜡复水步骤。使用二甲苯及不同浓度梯度(100%、95%、85%和 70%)的酒精溶液以及 1×PBS 进行脱蜡复水。接着, 利用 0.2 mol/L HCl 溶液冲洗切片, 以灭活组织内的内源性碱性磷酸酶。经 PBS 冲洗后, 将组织切片置于 37 ℃的含有 10 μg/mL 蛋白酶 K 的 PBS 中浸泡 5 min, 再次用 PBS 冲洗洗去蛋白酶 K。

表 3 原位杂交所用引物  
Tab.3 Primers used for ISH

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'~3')
ISH- <i>hspa5</i> -F	CGCATTAGGTGACACTATAGAAGCGGGTGACTCCTCTGTGCAGC
ISH- <i>hspa5</i> -R	CCGTAATACGACTCACTATAGGGAGACATCTCAATGCGAGCCTGGTGC

为防止带正电的蛋白质吸附带负电的 RNA 探针, 需使用含有 0.25%醋酸酐的三乙醇胺(TEA)溶液(pH=8.0)进行乙酰化处理, 持续 15 min。之后, 使用 2×SSC 溶液冲洗切片。在杂交温度下进行预杂交, 杂交缓冲液中包含(10%硫酸葡聚糖, 50%去离子甲酰胺, 0.5 mg/mL 酵母 tRNA, 5×Denharts 溶液, 5×SSC)。预杂交时间为 1 h。随后, 将含有 RNA 探针的杂交缓冲液于 95 ℃变性 5 min, 并迅速置于冰上 2 min, 解开 RNA 的高级结构。将变性后的杂交液覆盖于组织切片上, 在分子杂交炉中于 55 ℃杂交 16~20 h。杂交完成后, 使用不同浓度(5×、2×、1×和 0.2×)的 SSC 溶液和 MABT 缓冲液依次冲洗切片。接着, 使用原位杂交封闭液(Roche, 瑞士)封闭切片 30 min, 并用封闭液按照 1:400 比例稀释抗 DIG-AP Fab 片段单克隆抗体(Roche, 瑞士)覆盖组织, 室温下孵育 2 h。孵育完成后, 用 MABT 冲洗 4 次洗去未结合的抗体。

显色步骤采用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒(碧云天, 上海), 显色 30~60 min。显色完成后, 用纯水洗涤终止显色, 再用核固红复染 30 s 后纯水洗涤, 其后切片需再次经过 70%、85%、95%、100%酒精和二甲苯的处理, 最后使用中性树胶封片。利用光学显微镜(Olympus, 日本)对切片进行观察和拍照。

2 结果与分析

2.1 花鲈 *hspa5* 的克隆及进化分析

从花鲈基因组获取了花鲈 *hspa5* 的 CDS 序列, 通过基因克隆和 Sanger 测序, 证实了二者序列的一

致性。本研究的 *hspa5* 基因序列在 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)数据库中的索引号为 MN646872.1。系统发育分析表明(图 1), 花鲈与大黄鱼、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)、黄鳝(*Monopterus albus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、泰国斗鱼(*Betta splendens*)、大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)、拟海龙(*Syngnathoides biaculeatus*)和斑马鱼等硬骨鱼类的 *hspa5* 聚类在一起成为一支; 哺乳动物, 如人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)与红原鸡(*Gallus gallus*)以及两栖动物非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)聚类为另外一支。

2.2 *hspa5* 基因的序列分析

*hspa5* 基因的 CDS 长度为 1 965 bp, 编码 654 个氨基酸。前 1~16 个氨基酸的区域为信号肽, 预测其相对分子质量为 72.23 kDa, 等电点为 4.95, 不稳定系数为 31.01, 为稳定的亲水性蛋白, 无跨膜结构域。

序列比对和保守结构域分析结果显示, 花鲈的 HSPA5 与硬骨鱼类的同源性高于哺乳动物和鸟类, 具有 1 个高度保守的 HSP70 超家族结构域(图 2)。花鲈 HSPA5 蛋白的三维结构表明, HSPA5 的二级结构以  $\alpha$  螺旋为主, 并存在部分无规则卷曲(图 3)。

2.3 *hspa5* 的表达和定位分析

qPCR 结果显示, 在 30 ℃高温胁迫处理下, 花鲈的肝脏组织中 *hspa5* 的表达量随胁迫时间延长而逐渐增加, 并在 12 h 时表达量达到最高, 随后在 24 h 和 72 h 时下降(图 4), 这表明 *hspa5* 基因在高温应激下可能发挥潜在作用, 其在 12 h 时的表达峰值可能反映了

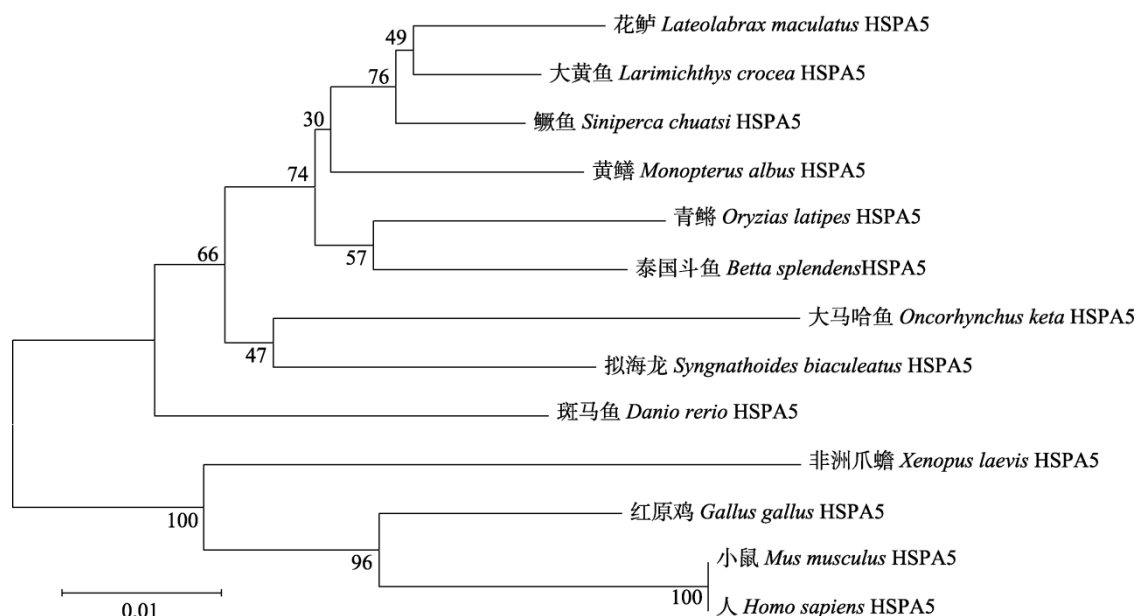


图 1 HSPA5 的系统发育树  
Fig.1 Phylogenetic tree of HSPA5

*Lateolabrax maculatus* (MN646872.1), *Monopterus albus* (AGO01985.1), *Siniperca chuatsi* (XP\_044028988.1), *Larimichthys crocea* (XP\_010737097.1), *Danio rerio* (AAH63946.1), *Oryzias latipes* (XP\_011480006.1), *Homo sapiens* (AAI12964.1), *Mus musculus* (NP\_001156906.1), *Gallus gallus* (NP\_990822.1), *Betta splendens* (XP\_029024329.1), *Oncorhynchus keta* (XP\_035628195.1), *Syngnathoides biaculeatus* (XP\_061656539.1), *Xenopus laevis* (XP\_018084185.1). Bootstrap is 1 000.

细胞对高温胁迫的一种急性反应,旨在通过增强热休克蛋白的产生来减轻潜在的热损伤。

HE 染色是指苏木精-伊红染色(Hematoxylin and Eosin staining),这是一种常用的组织学染色技术,用于在显微镜下观察组织结构。在 HE 染色的肝脏组织切片中,通常可以观察到中央静脉和肝细胞等(图 5)。

根据高温处理下花鲈肝脏组织中 *hspa5* 基因的表达分析,采用原位杂交技术对高温处理的花鲈肝脏 *hspa5* mRNA 进行定位,根据 HE 染色和原位杂交的结果共同确定参与响应高温胁迫的主要细胞,发现 *hspa5* 的 mRNA 的阳性信号主要出现在肝脏的肝细胞的细胞质中(图 6)。

### 3 讨论

#### 3.1 花鲈 HSPA5 氨基酸结构与进化分析

在本实验中,克隆了编码 654 个氨基酸的 *hspa5* cDNA 的开放阅读框。HSPA5 的蛋白质前 1~16 个氨基酸的区域为信号肽,成熟肽具有 638 个氨基酸,无跨膜结构域,是一种稳定的热休克蛋白。

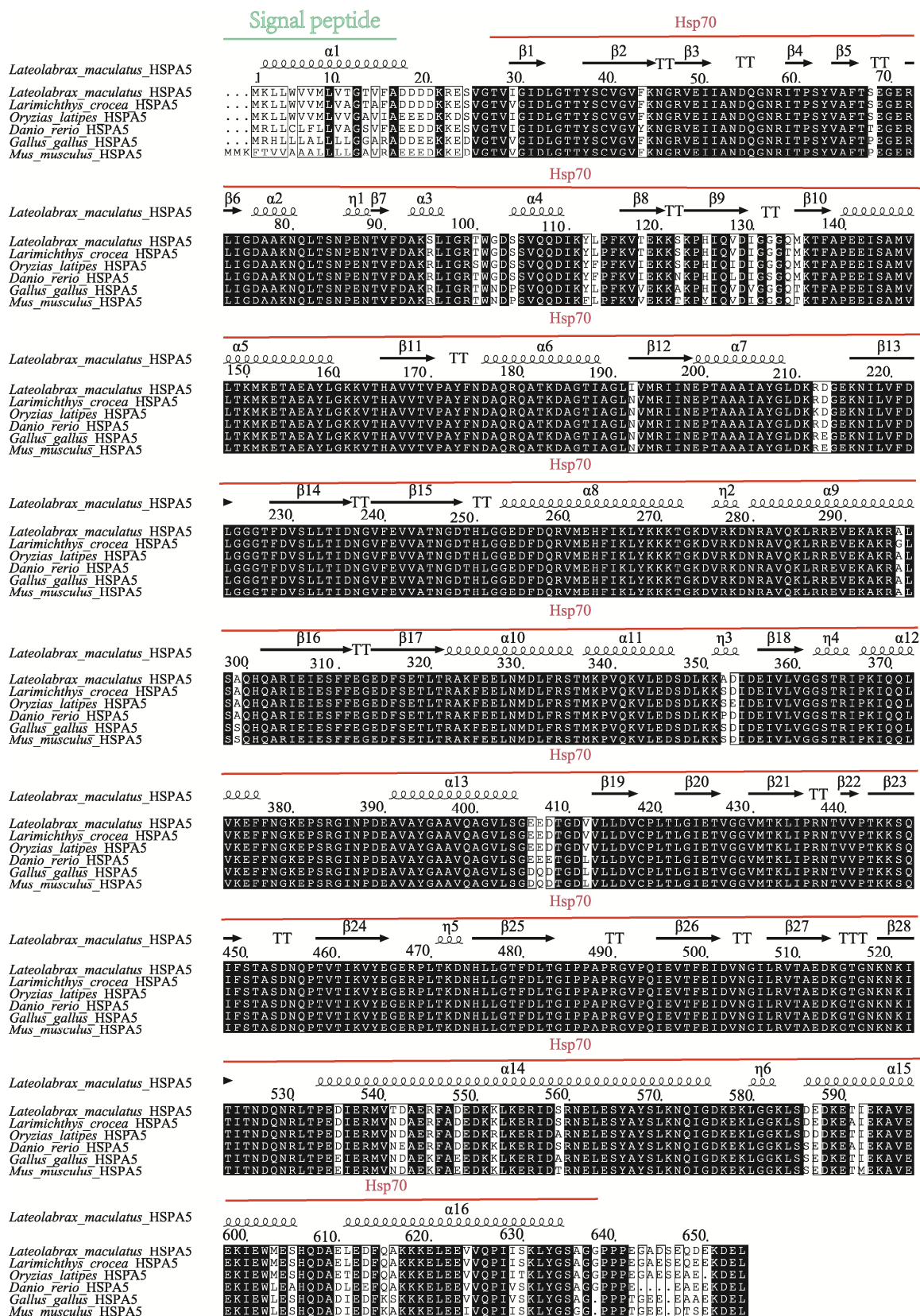
将预测的花鲈 HSPA5 蛋白的氨基酸序列与其他已知物种的 HSPA5 的氨基酸序列进行比较,结果表明,与热休克蛋白家族的其他成员相似,花鲈 HSPA5 蛋白有一个高度保守的 HSP70 超家族结构域,研究

结果与本实验室前期研究相印证(Sun *et al*, 2021)。花鲈 HSPA5 氨基酸序列长度和一级结构与斑马鱼、大黄鱼等硬骨鱼、鸟类、哺乳动物基本一致。花鲈 HSPA5 的信号肽和 HSP70 热休克蛋白家族同样存在于哺乳动物和硬骨鱼 HSPA5 中。本研究还发现,硬骨鱼、哺乳动物、鸟类的 HSP70 结构域在氨基酸序列中高度保守,类似结果在人、小鼠和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中也被发现(Otterson *et al*, 1997; Radons, 2016),表明这些区域可能对于基因序列和功能具有重要的意义。

鱼类 HSP70 在进化上具有保守性(Xu *et al*, 2018),类似的结果在褐菖鲢中也有发现(Han *et al*, 2023)。本研究的系统发育分析显示,花鲈 HSPA5 与其他硬骨鱼在氨基酸序列上具有高度的相似性,尤其与大黄鱼、鳊鱼、黄鳝,但其与哺乳动物和鸟类的相似性较低,这说明 HSPA5 蛋白结构在鱼类中相对保守。

#### 3.2 花鲈 *hspa5* 基因在高温胁迫下的表达特点

HSPA5 作为一种内质网应激蛋白,在细胞的生命活动中扮演着不可或缺的角色。有研究表明,通过提高 *hspa5* 的活性,可以有效地缓解氧化应激导致的细胞损伤与凋亡,显示 *hspa5* 在细胞保护机制中,特别是在抵御氧化应激中发挥重要作用(栾伟, 2009)。

图 2 花鲈 *hspa5* 基因的氨基酸序列分析Fig.2 Amino acid sequence analysis of *hspa5* gene in *L. maculatus*

绿色线表示 HSPA5 蛋白的信号肽, 红色线表示 Hsp70 超家族保守结构域, 黑色箭头和曲线分别表示不同的蛋白质折叠方式。

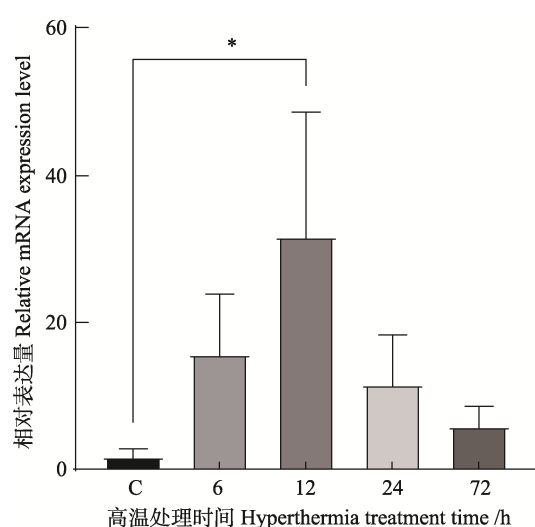
The green line indicates the signal peptide of the HSPA5 protein, while the red line highlights the conserved structural domain characteristic of the HSP70 superfamily. The black arrows and curves illustrate the diverse folding mechanisms of the proteins.





图 3 HSPA5 的同源建模

Fig.3 Homology modeling of HSPA5

图 4 *hspa5* 基因在高温胁迫处理不同时间下的表达量Fig.4 Expression levels of *hspa5* under different time during high temperature stress treatment

“\*”代表具有显著差异。n=9。

“\*” represents a significant difference. n=9.

同时,作为内质网广泛表达的伴侣,*hspa5*被认为是内质网应激反应主要调节剂(Eletto *et al*, 2010),在内质网腔内的蛋白质折叠过程中发挥关键作用,通过与DNAJC10 (DNAJ Hsp40 member C10)的相互作用参与蛋白质的正确折叠和错误折叠蛋白质的降解。高温胁迫引起错误折叠的蛋白质在内质网中积累会导致HSPA5/BiP从ERN1/IRE1中释放,从而使ERN1/IRE1发生同源二聚化并随后被激活。此外,多种诱因,包括体内诱因和体外诱因,如细胞毒性免疫反应、缺氧、重金属胁迫、生化环境变化、葡萄糖缺乏等压力均能引起*hspa5*基因的上调(Xia *et al*, 2021; 赵静等, 2024; Lindquist *et al*, 1988)。

*hspa5*在草鱼组织中广泛表达,并且在经过热激和冷激处理后,肝脏和肾脏中*hspa5*的表达水平变化尤为显著,表明*hspa5*基因可能在肝脏和肾脏中发挥重要功能(朱玉娇, 2012)。Airaksinen等(2003)的研究揭示了斑马鱼在遭受高温胁迫和冷胁迫时,其体内热休克蛋白的表达模式存在显著差异,热胁迫条件下,热休克蛋白的表达显著上调,相较之下,冷胁迫下的表达则相对稳定。此外,快速激活*hspa5*可能涉及细胞在应对外界刺激时的免疫反应机制,如Das等(2005)在麦瑞加拉鲮(*Cirrhinus mrigala*)的研究中发现,在遭受高温胁迫后,其肝脏中的*hspa5*的表达量相较于鳃和心脏等其他组织,呈现出更为显著的提升。同样地,本研究发现,在经历高温胁迫后,肝脏中的*hspa5*基因表达水平呈现显著的上调表达。在虹鳉鱼中,*hspa5* mRNA在肝脏和中肾组织中表现出显著的温度和组织特异性表达模式,表明这些组织在热应答中发挥重要作用,揭示了肝脏和中肾在热胁迫下可能具有更高的保护性作用(Xia *et al*, 2018)。

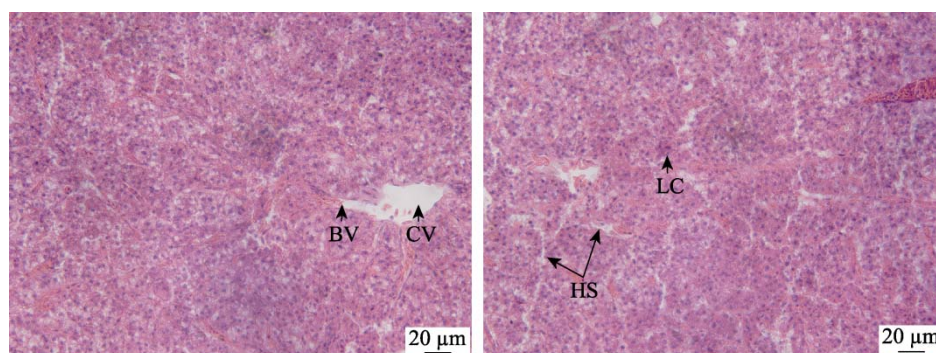
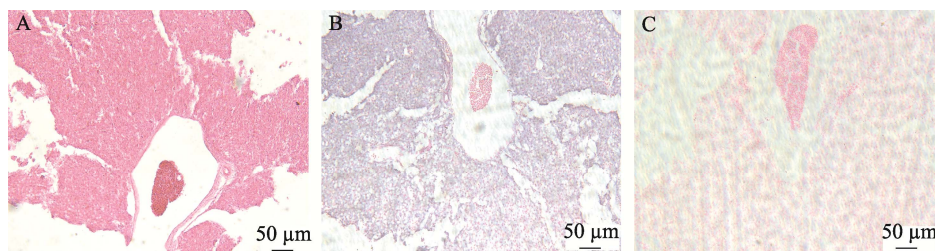


图 5 花鲈正常肝脏组织的 HE 染色结果

Fig.5 The HE staining result of liver tissue in *L. maculatus*

BV: 血管; CV: 中央静脉; LC: 肝细胞; HS: 肝血窦。

BV: Blood vessel; CV: Central vein; LC: Liver cells; HS: Hepatic sinusoid.

图 6 *hspa5* 在花鲈肝脏中的定位Fig.6 Localization of *hspa5* in the liver of *L. maculatus*

A: 肝脏组织 HE 染色结果; B: 原位杂交肝脏组织 *hspa5* 阳性信号; C: 阴性对照。

A: HE staining result of liver; B: Positive signal of *hspa5* in liver by *in situ* hybridization; C: Negative control.

本研究通过 qPCR 技术, 分析了花鲈肝脏组织在 30 °C 高温胁迫条件下不同时间点 *hspa5* 基因的表达模式。首先, *hspa5* 表达量的增加反映了花鲈肝脏组织对高温胁迫的积极响应。HSP70 家族成员, 包括 *hspa5*, 作为分子伴侣, 在高温胁迫条件下能够稳定细胞内环境, 防止蛋白质因高温而变性或聚集。因此, *hspa5* 表达量的提高可能是肝细胞为了维持其正常功能而采取的一种自我保护机制。其次, *hspa5* 的表达量在 12 h 时达到峰值, 表明肝细胞在高温胁迫初期即开始大量合成 HSPA5 蛋白以应对环境的压力。随着时间的推移, 表达量有所下降, 但仍维持在较高水平, 这反映肝细胞对高温胁迫的持续响应和适应性。其中, *hspa5* 表达量的变化与高温胁迫的持续时间密切相关。高温胁迫短时间内(6 h), 肝细胞可能尚未充分响应高温胁迫, 此时 *hspa5* 的表达量相对较低; 随着高温胁迫时间的延长, 肝细胞逐渐适应并启动了更为强烈的保护机制, 导致 *hspa5* 的表达量显著增加; 然而, 长时间的高温胁迫可能导致细胞损伤累积, 使得肝细胞无法继续维持 *hspa5* 的高水平表达。

在本研究中, 通过对未进行高温胁迫的花鲈肝脏组织进行 HE 染色, 观察到花鲈肝脏在未受到高温胁迫时的正常组织结构, 这与高温胁迫后的组织形态比较提供了一个基准。肝细胞作为肝脏的主要实质细胞, 在正常状态下表现出典型的形态和结构特征。黑龙江林蛙(*Rana amurensis*) *hspa5* 基因在肝脏细胞的胞质中表达(刘婷婷等, 2023)。本研究的原位杂交实验表明, 在高温胁迫条件下, 花鲈 *hspa5* 的 mRNA 阳性信号主要出现在肝细胞胞质中, 与先前的研究结果相印证, 进一步支持了肝细胞在高温胁迫响应中的重要作用。

肝细胞在高温胁迫中的表达模式表明, 它们可能是响应高温胁迫并发挥保护作用的主要细胞类型。在高温胁迫条件下, 肝细胞可能会通过上调 *hspa5* 的表达来增强细胞对热损伤的耐受性。肝细胞中 *hspa5* 的

表达增加可能有助于减轻高温胁迫对肝脏的损伤, 并促进肝脏组织的恢复。肝细胞作为肝脏的主要实质细胞, 不仅负责代谢、解毒和合成等多种生理功能, 还在细胞应激反应中发挥核心作用。

综上所述, 本研究不仅为解析 *hspa5* 基因在花鲈响应高温胁迫中的功能机制提供了参考, 也为今后开展相关研究和应用提供了理论依据。深入研究 *hspa5* 的调控机制和生物学作用, 对于理解其在细胞生理活动中的功能至关重要, 并可能为增强动物的环境适应性和推动相关疾病治疗提供新的视角和潜在靶点。

## 4 结论

本研究克隆了花鲈的 *hspa5* 基因, 并且探究了高温胁迫不同处理时间下, 其在肝脏组织中的表达及定位情况。花鲈 *hspa5* 序列全长为 1 965 bp, 编码 654 个氨基酸; 花鲈在高温胁迫下, *hspa5* 基因的表达量随胁迫时间的增加而上调, 在 12 h 时达到最高, 随后呈现下降趋势。这表明 *hspa5* 基因可能参与了花鲈的高温胁迫响应过程, 且基因的调控水平与胁迫时间呈现明显的相关性。另外, 原位杂交实验确定了 *hspa5* 在花鲈肝脏胞质中的表达, 并确定了肝细胞为参与高温胁迫反应及发挥生理功能的主要细胞类型。根据 *hspa5* 的表达与定位情况, 本研究推测 *hspa5* 表达量的变化在花鲈的响应高温以及生长过程中具有重要意义, 但其发挥作用的具体机制尚不完全清楚, 还需进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- AIRAKSINEN S, JOKILEHTO T, RÅBERGH C M I, *et al.* Heat- and cold-inducible regulation of HSP70 expression in zebrafish ZF4 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(2): 275–282
- CHEN Y J, YU P, LUO J C, *et al.* Secreted protein prediction



- system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT. Mammalian Genome, 2003, 14(12): 859–865
- CHUANG L Y, CHENG Y H, YANG C H. Specific primer design for the polymerase chain reaction. Biotechnology Letters, 2013, 35(10): 1541–1549
- DAS P, GUPTA A, MANNA S K. Heat shock protein 70 expression in different tissues of *Cirrhinus mrigala* (Ham.) following heat stress. Aquaculture Research, 2005, 36(6): 525–529
- ELETTO D, DERSH D, ARGON Y. GRP94 in ER quality control and stress responses. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2010, 21(5): 479–485
- FEDER M E, HOFMANN G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology, 1999, 61: 243–282
- HAN X L, JIN S H, SHOU C Y, *et al.* Hsp70 gene family in *Sebastiscus marmoratus*: The genome-wide identification and transcriptome analysis under thermal stress. Genes, 2023, 14(9): 1779
- HANGZO H, BANERJEE B, SAHA S, *et al.* Ammonia stress under high environmental ammonia induces Hsp70 and Hsp90 in the mud eel, *Monopterus albus*. Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(1): 77–88
- HE Y, FANG J, XUE L Y, *et al.* Potential contributions of heat shock proteins and related genes in sexual differentiation in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(2): 465–475
- IBRAHIM I M, ABDELMALEK D H, ELFIKY A A. GRP78: A cell's response to stress. Life Sciences, 2019, 226: 156–163
- JIN R B, ZHAO A R, HAN S Y, *et al.* The interaction of S100A16 and GRP78 activates endoplasmic reticulum stress-mediated through the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway in renal tubulointerstitial fibrosis. Cell Death & Disease, 2021, 12(10): 942
- LI B Y, WEN H S, WANG L Y, *et al.* Histology of gonadal differentiation and expression analysis of sex-related genes *cyp11b*, *cyp19a1a* in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 185–193 [李冰玉, 温海深, 王灵钰, 等. 花鲈性腺分化组织学及性别相关基因 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 的表达分析. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 185–193]
- LI J Z, LEE A S. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. Current Molecular Medicine, 2006, 6(1): 45–54
- LINDQUIST S, CRAIG E A. The heat-shock proteins. Annual Review of Genetics, 1988, 22: 631–677
- LIU T T, GUO J J, CHEN Z D, *et al.* Identification of heat shock protein hsp70 family genes from *Rana amurensis* and its expression profiles upon infection. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1710–1730 [刘婷婷, 郭晶晶, 陈兆东, 等. 黑龙江林蛙热休克蛋白 hsp70 家族基因的鉴定及其在感染下的表达分析. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1710–1730]
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup>  method. Methods, 2001, 25(4): 402–408
- LUAN W. Identification and characterization of chaperone protein genes in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2009 [栾伟. 中国明对虾重要分子伴侣蛋白基因的克隆及表达研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2009]
- OTTERSON G A, KAYE F J. A 'core ATPase', Hsp70-like structure is conserved in human, rat, and *C. elegans* STCH proteins. Gene, 1997, 199(1/2): 287–292
- PETERSEN T N, BRUNAK S, VON HEIJNE G, *et al.* SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature Methods, 2011, 8(10): 785–786
- RADONS J. The human HSP70 family of chaperones: Where do we stand? Cell Stress and Chaperones, 2016, 21(3): 379–404
- SU W. Effect of total dissolved gas supersaturation on the tolerance of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Master's Thesis of Xihua University, 2023 [粟雯. TDG 过饱和胁迫对草鱼免疫及应激反应的影响. 西华大学硕士研究生学位论文, 2023]
- SUN Y L, WEN H S, TIAN Y, *et al.* HSP90 and HSP70 families in *Lateolabrax maculatus*: Genome-wide identification, molecular characterization, and expression profiles in response to various environmental stressors. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 784803
- TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022–3027
- WEN H S, LI Y, ZHANG M Z, *et al.* *Lateolabrax japonicus*—a well-known China sea bass. China Fisheries, 2020a(8): 110–111 [温海深, 李昀, 张美昭, 等. 花鲈——家喻户晓的中国海鲈. 中国水产, 2020a(8): 110–111]
- WEN H S, YU P, LI Y, *et al.* A comparative study on morphology of the northern and southern breeding groups of *Lateolabrax japonicus*. China Fisheries, 2020b(4): 81–84 [温海深, 于朋, 李昀, 等. 花鲈南北方养殖群体的形态学比较研究. 中国水产, 2020b(4): 81–84]
- XIA B P, LIU Z, ZHOU Y J, *et al.* Effects of heat stress on biochemical parameters and heat shock protein family A (Hsp70) member 5 (HSPA5) mRNA expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Marine and Freshwater Research, 2018, 69(11): 1674

- XIA S K, DUAN W Z, LIU W W, *et al.* GRP78 in lung cancer. *Journal of Translational Medicine*, 2021, 19(1): 118
- XU K D, XU H X, HAN Z Q. Genome-wide identification of Hsp70 genes in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and their regulated expression under cold and heat stress. *Genes*, 2018, 9(12): 590
- ZHAO J, LI C Z, WANG R, *et al.* Response expression of Grp78 and its related genes in *Gymnocypris przewalskii* after salinity stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2024, 31(1): 70–81 [赵静, 李长忠, 王蓉, 等. 盐度胁迫后青海湖裸鲤 Grp78 及其相关基因的应答表达. *中国水产科学*, 2024, 31(1): 70–81]
- ZHU Y J. The functional effect of GRP78 and antioxidase from grass carp on the stress of heat and lead. Master's Thesis of Nanchang University, 2012 [朱玉娇. 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) GRP78 和抗氧化酶在抵抗温度、Pb<sup>2+</sup>胁迫中的功能. 南昌大学硕士研究生学位论文, 2012]

(编辑 冯小花)

## Expression and Localization of *hspa5* in Response to Thermal Stress in the Spotted Sea Bass (*Lateolabrax maculatus*)

LIU Xiaoqiang, FENG Chunhui, WEN Haishen, LI Yun, JIANG Tianyu, QI Xin<sup>①</sup>

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract** The Chinese spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) inhabits the coastal regions of China, Japan, and Korea and ranges from the southern border of Vietnam to the western coast of the Korean Peninsula. This species holds considerable economic significance in China and is highly valued for its nutritional content and taste. Temperature is a crucial environmental factor influencing the biological functions of aquatic animals. Global warming and the widespread practice of intensive aquaculture have rendered high-temperature stress a major challenge for *L. maculatus* farming. Heat shock proteins (HSPs) are essential in cellular responses to thermal stress. Among them, HSPA5 (also known as GRP78 or Bip) is a member of the HSP70 family that plays an essential role in mitigating endoplasmic reticulum stress induced by various stressors, including temperature fluctuations, oxidative stress, and nutrient deprivation. In this study, we elucidated the molecular response mechanism of *L. maculatus* to high-temperature stress and focused on the role of HSPA5 in liver tissue. We cloned the *hspa5* gene from the *L. maculatus*, performed amino acid sequence and evolutionary analyses, and investigated its expression and localization in liver tissues to clarify its role in heat stress response.

To further investigate the properties and functions of HSPA5, we cloned the open reading frame (ORF) of *hspa5* using the *L. maculatus* reference genome and conducted bioinformatic analyses. The ORF of *hspa5* was 1 965 bp in length and encoded a 654-amino-acid protein. The first 1–16 amino acids formed a signal peptide. The protein was predicted to possess a molecular mass of 72.23 kDa, an isoelectric point of 4.95, and an instability coefficient of 31.01. It was characterized as a stable, hydrophilic protein without transmembrane structural domains. Sequence comparison and conserved domain analysis revealed that *L. maculatus* HSPA5 exhibited higher homology with bony fish than with mammals or birds and possessed a conserved domain characteristic of the HSP70 superfamily. Structural modeling indicated that the secondary structure of HSPA5 was predominantly composed of  $\alpha$ -helices, accompanied by some irregular coiling.

① Corresponding author: QI Xin, Email: qx@ouc.edu.cn

To investigate the response mechanism of *hspa5* in *L. maculatus* under high-temperature stress, we analyzed its expression in liver tissue using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) under a 30 °C heat stress condition. The fish were acclimated in an environment with temperatures ranging from 15 to 20 °C, salinity of 28–30, pH levels of 7.5–8.0, dissolved oxygen >5.0 mg/L, and ammonia nitrogen levels <1.0 mg/L for 2 weeks. The expression of *hspa5* mRNA was measured at 0, 6, 12, 24, and 72 h after heat stress exposure. The results showed a gradual increase in *hspa5* expression over time, peaking at 12 h, followed by a decline. This indicated the crucial role of *hspa5* in the hepatic response to high-temperature stress in *L. maculatus*.

To determine the cellular localization of *hspa5* in response to heat stress, we performed *in situ* hybridization and hematoxylin-eosin (HE) staining of liver tissue sections. *In situ* hybridization results demonstrated that *hspa5* mRNA was predominantly localized in the cytoplasm of hepatocytes and confirmed the active involvement of HSPA5 in the hepatic response to thermal stress. HE staining revealed characteristic liver tissue morphology, including distinct features (e.g., the central vein and hepatocytes), under both normal and high-temperature conditions.

These findings suggest that hepatocytes are likely the primary cell type that responds to high-temperature stress and serves a protective function. Under heat stress, hepatocytes may enhance their cellular tolerance to heat injury by upregulating *hspa5* expression. This increased expression may aid in alleviating liver damage induced by high-temperature stress and promote liver tissue repair. In summary, this study elucidated the expression pattern of the *hspa5* gene in *L. maculatus* liver tissue under high-temperature stress using real-time qPCR, HE staining, and *in situ* hybridization. The findings enhance our understanding of the functional role of *hspa5* in heat stress responses and offer a theoretical basis for the management, selection, and breeding of high-temperature-tolerant *L. maculatus* strains.

**Key words** *Lateolabrax maculatus*; Heat stress; *hspa5*; Quantitative real-time PCR; *in situ* hybridization