

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) Hsp90 mRNA 在温度刺激和鳃弧菌感染下的表达特征*

生安志^{1,2} 鞠辉明¹ 李贵阳^{2,3} 李 杰^{2,3} 莫照兰^{2,3}①

(1. 扬州大学兽医学院 扬州 225009; 2. 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; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 利用 qPCR 方法, 检测 Hsp90 α 和 Hsp90 β mRNA 在不同月龄牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 不同组织的表达水平, 进一步检测在不同温度刺激、鳃弧菌感染后的表达变化。结果显示, Hsp90 α 和 Hsp90 β 在不同发育期的 13 种组织(肝脏、脾脏、头肾、后肾、心、肌肉、背皮、胃、肠、鳃、腹鳍、脑和血液)中均有表达。Hsp90 β 表达水平整体高于 Hsp90 α ; 8 月龄牙鲆在肝、鳃、背皮、背肌、腹鳍的 Hsp90 α 表达量要显著高于其他发育期(1 月龄、12 月龄、24 月龄)同组织的表达量($P < 0.05$), 而 Hsp90 β 在不同月龄牙鲆的表达量也存在差异, 在肝和肠的表达量较高, 在鳃、背肌和腹鳍的表达量较低。将 8 月龄牙鲆在 5–32℃ 刺激 1 h, 牙鲆肝、脾 Hsp90 α 在高温(22–32℃)的表达量显著升高($P < 0.05$), 而 Hsp90 β 在低温(5–10℃)的表达量显著升高($P < 0.05$); 在 10℃、28℃ 连续刺激 8 h, Hsp90 α 和 Hsp90 β 的 mRNA 的表达量呈先上升后下降的趋势, Hsp90 α 的表达量变化幅度显著高于 Hsp90 β ($P < 0.05$)。在鳃弧菌感染 72 h 内, 牙鲆脾脏 Hsp90 α 和 Hsp90 β 的表达量先下降后上升, Hsp90 β 上升的幅度更加显著($P < 0.05$)。结果显示, Hsp90 α 和 Hsp90 β 在不同月龄、不同组织的表达水平存在差异, Hsp90 α 在高温时对热应激的反应明显, Hsp90 β 在低温和对病原菌感染的反应明显, 研究结果可为了解牙鲆 Hsp90 的作用机制提供参考。

关键词 牙鲆; Hsp90 α 和 Hsp90 β ; qPCR; 温度刺激; 鳃弧菌感染

中图分类号 S961 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)05-0001-08

热激蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是一类在进化上高度保守的蛋白, 广泛存在于生物体中。根据同源性和分子量大小, HSPs 可分为 Hsp110、Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp40 和小分子 Hsp (sHsp) 家族(Feder *et al*, 1999)。生物体细胞受到环境高温、缺氧、饥饿、病原感染、重金属、农药等各种刺激时, 会激活 HSPs 的表达和合成, 作为分子伴侣抑制细胞凋亡, 保护细胞及其胞内转运功能, 维持机体的自身稳定性(Vabulas *et al*, 2010)。此外, HSPs 还参与宿主的免疫应答反应, 在抗原呈递、激活淋巴细胞和巨噬细胞、激活和活化抗原呈递细胞中发挥作用(Suzue *et al*,

1997; Osterloh *et al*, 2008)。同样, HSPs 可作为免疫佐剂, 在抗肿瘤和抗病原感染中发挥作用(Colaco *et al*, 2013)。

Hsp90 是机体细胞中主要的伴侣蛋白, 在非应激条件下的表达量占细胞蛋白总量的 1%–2%, 在诱导条件下的表达量可增至 4%–6%(Pratt, 1997)。在脊椎动物中, Hsp90 有多种异构体, 有胞浆型的 Hsp90 α 和 Hsp90 β 、内质网型的 Grp94、线粒体型的 TRAP, 它们参与细胞的多个过程, 如信号传导、细胞分化、细胞增殖和凋亡、形态发生和发育、免疫反应等(Zhao *et al*, 2005; Wandinger *et al*, 2008)。在鱼类中, Hsp90

* 国家自然科学基金(31372567; 31402342)和山东省自主创新及成果转化专项(2014ZZCX06205)共同资助。生安志, E-mail: shenganzhi@126.com

① 通讯作者: 莫照兰, 研究员, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-03-26, 收修改稿日期: 2015-10-19

参与胚胎肌肉发育(Du *et al.*, 2008)、变态(Manchado *et al.*, 2008)、氧化应激(Padmini *et al.*, 2009、2011)、抗细菌感染(Cha *et al.*, 2013)等多个过程。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是重要的海水经济鱼类,已发现牙鲆有多种 Hsp, 包括 Hsp10、Hsp40A4、Hsp40B6、Hsp40B11、Hsp60、Hsp70、Grp78、Hsp90 α 、Hsp90 β 和 Grp94(Cha *et al.*, 2013), 其中, Hsp90 α 和 Hsp90 β 的基因序列已经公布, 但他们的功能和作用机制尚未清楚。本研究拟对牙鲆 Hsp90 α 和 Hsp90 β 在 mRNA 水平的组织分布、表达及对温度和病原菌刺激的反应进行探索, 为进一步阐明牙鲆 Hsp90 的功能和作用机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用健康牙鲆购于山东海阳市水产有限公司养殖基地, 暂养于实验室, 常规养殖管理, 养殖水温(19 \pm 1) $^{\circ}$ C。实验前, 每批随机取 3 尾鱼的内脏组织进行细菌分离, 确定未经细菌感染的鱼用于后续实验。

1.2 引物设计

根据 NCBI 收录牙鲆 Hsp90 α (GenBank No. DQ662233.1)和 Hsp90 β (GenBank No. DQ662234.1) mRNA 序列设计荧光定量 PCR 上下游引物, 以牙鲆 β -actin 基因(GenBank No. HQ386788.1)为内参, 引物序列详见表 1。

表 1 实验所用 qRT-PCR 引物及序列
Tab.1 Sequences of primers used in the qRT-PCR analysis

引物 Primer	引物序列 Nucleotide sequence(5' \rightarrow 3')
RT-HSP90 α F	CCGCTGGTGGCTCCTTTA
RT-HSP90 α R	CTCTCGATGTATTCTGTCTGG
RT-HSP90 β F	TGACACTGGAATCGGTATG
RT-HSP90 β R	TTCTCGGCAACAAGGTAG
β -actin-F	AACCGCTGCCTCCTCCTCAT
β -actin-R	TCGGGACAACGGAACCTCTC

1.3 实验设计

1.3.1 Hsp90 基因在不同发育时期牙鲆不同组织的表达水平 选取 1 月龄(20 \pm 5) g、8 月龄(200 \pm 50) g、12 月龄(500 \pm 50) g、24 月龄(1000 \pm 100) g 牙鲆各 3 尾, 迅速取肝脏、脾脏、头肾、后肾、心、肌肉、背皮、胃、肠、鳃、腹鳍、脑和血液 13 个组织, 放入液氮

中冻存后, 转至 -80° C 冰箱保存。

1.3.2 温度刺激对牙鲆 Hsp90 基因表达的影响 实验选用 8 月龄(200 \pm 50) g 牙鲆。检测不同温度刺激对 Hsp90 基因表达影响, 设置 7 个温度实验组(5、10、16、19、22、28 和 32 $^{\circ}$ C), 每个温度组设置 3 个平行组, 每平行组 12 尾牙鲆, 每组在不同温度海水中放置 1 h 后, 迅速取肝脏和脾脏放入液氮中冻存, 后转至 -80° C 冰箱中保存。

设置 2 种温度(10 $^{\circ}$ C 和 28 $^{\circ}$ C)来研究温度刺激对 Hsp90 基因表达的影响, 每个温度设置 3 个平行组, 每组 12 尾, 分别刺激 1、3、5、8 h, 处理结束后, 迅速取肝脏和脾脏放入液氮中冻存, 转至 -80° C 冰箱保存。

1.3.3 鳃弧菌感染对牙鲆 Hsp90 基因表达的影响

实验选用 8 月龄(200 \pm 50) g 牙鲆, 分感染组和对照组, 每组 20 尾, 设 3 个平行组。感染组每尾鱼腹腔注射 0.1 ml 浓度为 1×10^6 CFU/ml 的鳃弧菌 M3 活菌, 对照组注射生理盐水。在注射后的 0、6、12、24、72 h, 分别迅速取 3 尾鱼脾脏组织放入液氮中冻存, 转至 -80° C 冰箱保存。

1.4 RNA 提取、cDNA 的合成和定量 PCR

取 -80° C 保存的牙鲆组织 90–100 mg, 用 RNAiso Plus(TaKaRa)抽提总 RNA, 各组织 RNA 采用反转录试剂盒(TOYOBO)按照说明步骤合成 cDNA, 保存于 -20° C 备用。

使用 TransStart Top Green qPCR Super Mix(全式金)试剂盒对牙鲆各组织 cDNA 在实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad)上进行检测。并利用 SPSS 进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 Hsp90 mRNA 在牙鲆组织中的表达和分布

通过 qPCR 检测牙鲆 Hsp90 α 和 Hsp90 β 基因的 mRNA 在不同月龄牙鲆的组织分布, 结果显示, 2 个基因在 4 种月龄牙鲆(1、8、12 和 24 月龄)的 13 种组织中均有表达和分布(图 1-A、图 1-B), Hsp90 α 在 8 月龄的牙鲆组织中的表达量较高, 其中, 在牙鲆的体表组织(鳃、背皮、背肌和腹鳍)和肝脏的表达量高于同组织其他 3 组($P < 0.05$), 在内脏组织(脾脏、肾、肠、脑、胃、血和心脏)的表达量较低; Hsp90 β 的表达水平整体上高于 Hsp90 α , 其中, 在肝和肠的表达量较高, 而在部分体表组织(鳃、背肌和腹鳍)的表达量较低。

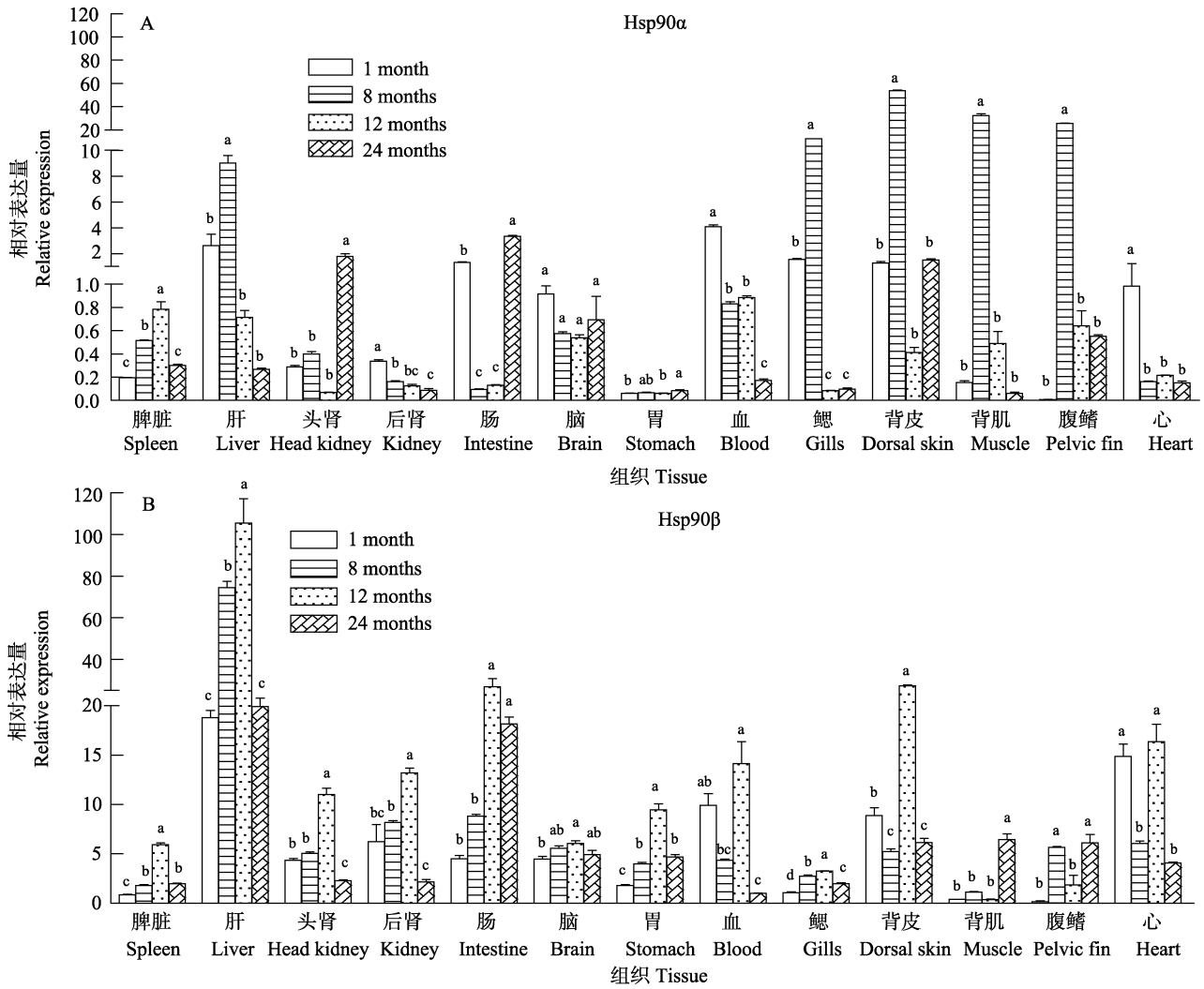


图 1 不同月龄牙鲆 Hsp90 mRNA 的相对表达水平
 Fig.1 Relative expression of Hsp90 mRNA in different tissues of *P. olivaceus* at various growth stages

A. Hsp90α mRNA; B. Hsp90β mRNA

a、b、c 和 d 代表各月龄组之间的差异性, 相同字母为差异不显著($P>0.05$), 不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Letters a, b, c and d present the differences among the various fish age groups; the same letters indicate no significant difference ($P>0.05$) and the different letters indicate significant difference ($P<0.05$)

2.2 不同温度刺激 1 h 对牙鲆 Hsp90 mRNA 表达的影响

将 8 月龄(200 ± 50) g 牙鲆放置于不同温度海水 1 h 后, 取肝脏和脾脏检测 Hsp90 基因 mRNA 表达水平。结果显示, 在较低温(5°C 和 10°C)和适宜养殖温度(16°C 和 19°C), 各处理组牙鲆肝脏和脾脏的 Hsp90α 的相对表达量较低, 分别为 0.51–0.60 和 0.03–0.04, 各组之间无显著性差异($P>0.05$)(图 2-A、图 2-C); 当水温高于 19°C 时, 肝脏 Hsp90α 的相对表达量显著升高 ($P<0.05$), 由 22°C 的 1.26 升高到 32°C 的 238.74; 而当水温高于 28°C 时, 脾脏 Hsp90α 的 mRNA 相对表达量略升高, 由 28°C 的 5.13 升高到 32°C 的 30.49。

在较低温度(5°C 、 10°C 和 16°C), 牙鲆肝脏 Hsp90β 的相对表达量为 132.36–139.11, 显著高于高温处理组(19°C 、 22°C 、 28°C 和 32°C)的 33.51–89.2 ($P<0.05$) (图 2-B); 在适应养殖水温(16°C 和 19°C)中, 脾脏 Hsp90β 的相对表达量较低(1.27–1.35), 而经过低温(5°C 和 10°C)和高温处理(22°C 、 28°C 和 32°C), 脾脏 Hsp90β 的相对表达量显著升高($P<0.05$), 为 2.15–3.12(图 2-D)。

2.3 两个温度刺激对牙鲆 Hsp90 mRNA 表达的影响

在 10°C 、 28°C 下放置不同时间, 检测牙鲆肝脏和脾脏 Hsp90α 和 Hsp90β 的 mRNA 相对表达量。总体上, 经过低温和高温的连续刺激, 牙鲆 Hsp90α 和 Hsp90β 的 mRNA 相对表达量呈现先升高后降低的变

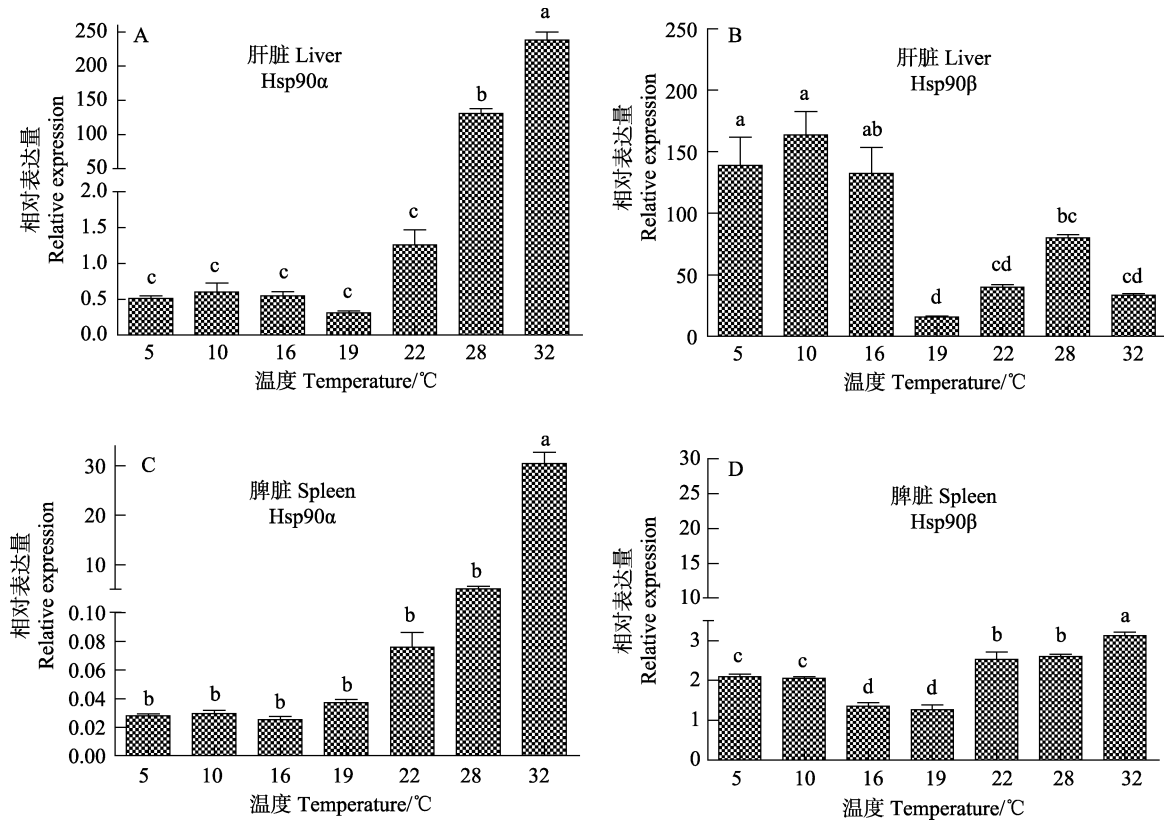


图2 不同温度刺激下 Hsp90α 和 Hsp90β mRNA 在牙鲈肝脏和脾脏中的表达

Fig.2 Expression of Hsp90α and Hsp90β mRNAs in the liver and spleen of *P. olivaceus* after stimulation at different temperatures

A: 肝脏 Hsp90α mRNA 的相对表达量; B: 肝脏 Hsp90β mRNA 的相对表达量; C: 脾脏 Hsp90α mRNA 的相对表达量; D: 脾脏 Hsp90β mRNA 的相对表达量; a、b、c 和 d 代表各组之间的差异性, 相同字母为差异不显著($P>0.05$), 不同字母表示差异显著($P<0.05$)

A: Liver Hsp90α mRNA expression level; B: Liver Hsp90β mRNA expression level; C: Spleen Hsp90α mRNA expression level; D: Spleen Hsp90β mRNA expression level; Letter a, b, c and d present the differences among various fish groups; the same letters indicate no significant difference ($P>0.05$) and the different letters indicate significant difference ($P<0.05$)

化趋势。

在10°C处理时, 肝脏的 Hsp90α 和 Hsp90β 的 mRNA 表达量分别在3 h 和1 h 时达到最大值($P<0.05$) (图3-A、图3-B), 脾脏的 Hsp90α 和 Hsp90β 的 mRNA 表达量分别在5 h 和1 h 达到最大值($P<0.05$) (图3-C、图3-D)。同时, 肝脏和脾脏中 Hsp90β mRNA 表达量整体显著高于 Hsp90α mRNA 的表达水平($P<0.05$)。

在28°C处理时, 肝脏的 Hsp90α 和 Hsp90β mRNA 表达量均在1 h 时达到最大值($P<0.05$) (图4-A、图4-B); 脾脏的 Hsp90α 和 Hsp90β mRNA 表达量均在3 h 时达到最大值($P<0.05$) (图4-C、图4-D), 而在最大值时, Hsp90α mRNA 的表达水平显著高于 Hsp90β mRNA 的表达水平($P<0.05$), 且可以维持在一个较高水平。同时, 肝脏和脾脏中 Hsp90β mRNA 表达量整体显著高于 Hsp90α mRNA 的表达水平($P<0.05$)。

2.4 鳗弧菌感染对牙鲈 Hsp90 表达的影响

以鳗弧菌 M3 感染牙鲈, 感染后 72 h 内检测脾脏 Hsp90 mRNA 的表达水平变化。与注射生理盐水的对照组相比, 感染组脾脏 Hsp90α 的表达量在 6–12 h 呈现下降($P<0.05$), 在 24–72 h 的表达量回升($P<0.05$), 在感染后的 6–24 h 的表达量低于对照组, 表达量仅在 72 h 时高于对照组(图 5-A)。同样, 感染组牙鲈脾脏 Hsp90β 的表达量在 6–24 h 呈现下降; 在感染后的 6–24 h 的表达量低于对照组, 在 72 h 表达量急剧上升($P<0.05$) (图 5-B)。鳗弧菌感染后, 牙鲈脾脏 Hsp90β 的变化幅度比 Hsp90α 大。

3 讨论

Hsp90 的表达和分布在鱼类研究中已有较多的

报道。在模式生物斑马鱼的研究中发现, Hsp90 在脑、肝脏与肌肉中均有表达(Murtha *et al.*, 2003), 在塞纳加尔鲷(*Solea senegalensis*)的心脏、骨骼肌、皮肤和胃等多个组织中也检测到 Hsp90 的表达(Manchado *et al.*, 2008)。本研究检测不同发育时期牙鲮 13 个组织中 Hsp90 的表达情况, 同样发现, Hsp90 α 和 Hsp90 β 在牙鲮多个组织中均有表达, 预示 Hsp90 在牙鲮的发育阶段及各部分组织中具有一定作用。Hsp90 在不同组织的表达量有一定差异, Hsp90 α 在 24 月龄成年牙鲮的肠和头肾表达量较高, Hsp90 β 在脑、肠和脾脏中表达量较高, 这与之前的研究报道相吻合(张俊玲等, 2010), Hsp90 在不同组织中的差异表达可能与组织的功能有关。

已有研究证明, Hsp90 α 主要为诱导型表达, 而 Hsp90 β 在大多数组织中主要为组成型表达(Millson *et al.*, 2007)。本研究发现, 相比较于 Hsp90 β 的相对表达量, Hsp90 α 在各个组织中大多处于较低水平, Hsp90 α 在

8 月龄牙鲮的肝脏、鳃、背皮、肌肉和腹鳍相对表达量高于其他 3 组的同组织($P < 0.05$), Hsp90 β 在 24 月龄肌肉和腹鳍中高于其他 3 组的同组织, 其他组织均在 12 月龄牙鲮中表现为高表达($P < 0.05$), 整体呈现随体重增加而上升的趋势, 说明 Hsp90 α 和 Hsp90 β 可能在不同的生长发育时期和细胞周期调控等生理过程中起作用(Sreedhar *et al.*, 2004)。

热休克蛋白的产生体现了生物的进化, 它可以提高生物体的适应能力, 特别是耐热能力。Lindquist (1986)研究表明, HSPs 的生成量与热耐受呈正相关。在草鱼(*Ctenophryngodon idellus*)(周鑫等, 2013)和鳊鱼(*Oncorhynchus mykiss*)(Sathiyaa *et al.*, 2001)的研究中, Hsp90 同样随温度的升高而上调。本研究同样发现, 在牙鲮的肝脏和脾脏组织中, Hsp90 α mRNA 表达量随温度的增高而增加, 且反应迅速。经不同温度刺激后, 牙鲮 Hsp90 α 的表达水平迅速变化, 在高温时变化幅度较 Hsp90 β 明显, 说明牙鲮 Hsp90 α 的表

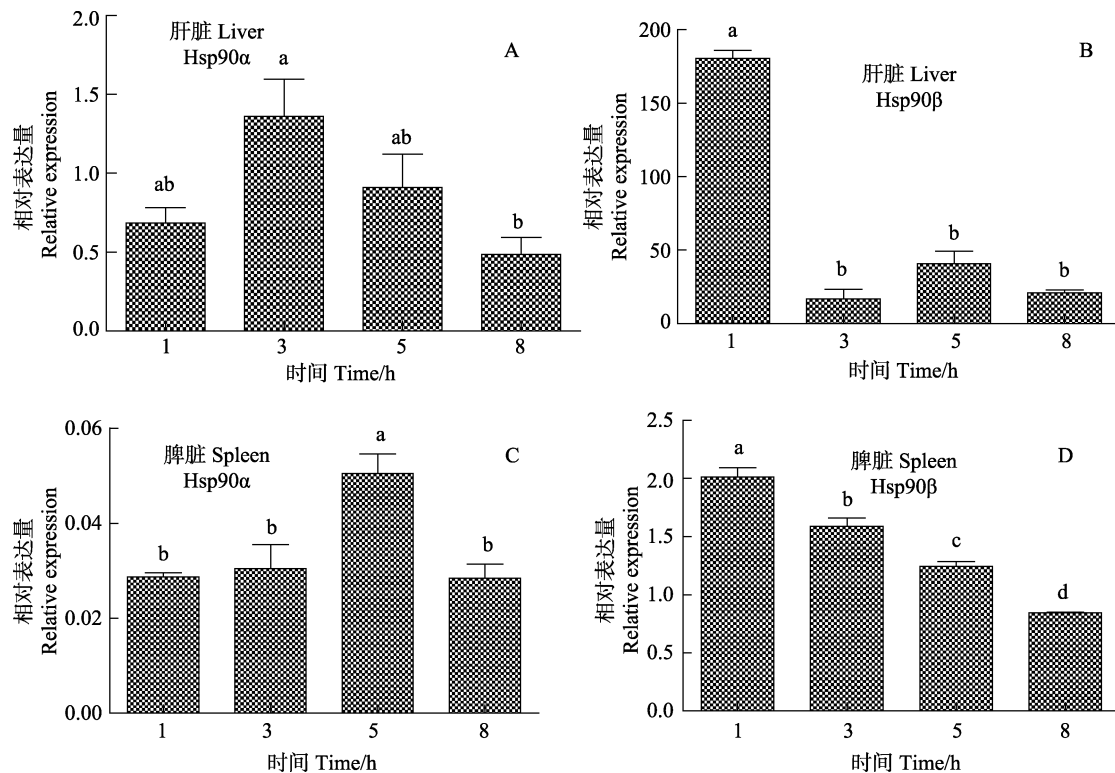


图 3 10°C 处理 8 h 牙鲮 Hsp90 mRNA 在肝脏和脾脏中的表达

Fig.3 Relative expression of Hsp90 mRNA in the liver and spleen of *P. olivaceus* treated at 10°C for 8 h

A: 肝脏 Hsp90 α mRNA 的相对表达量; B: 肝脏 Hsp90 β mRNA 的相对表达量; C: 脾脏 Hsp90 α mRNA 的相对表达量; D: 脾脏 Hsp90 β mRNA 的相对表达量; a、b、c、d 代表各组之间的差异性, 相同字母为差异不显著($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

A: Liver Hsp90 α mRNA expression level; B: Liver Hsp90 β mRNA expression level; C: Spleen Hsp90 α mRNA expression level; D: Spleen Hsp90 β mRNA expression level; Letter a, b, c and d present the differences among various fish groups; the same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$) and the different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

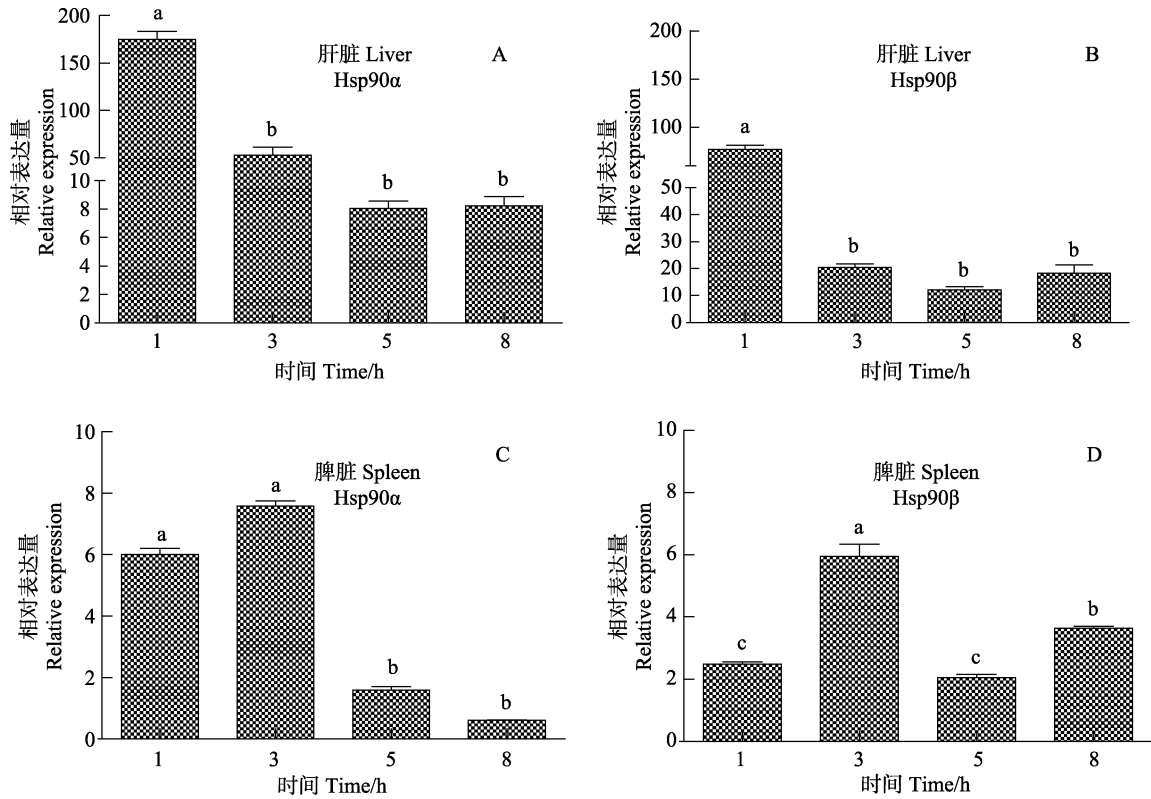


图 4 28°C 处理 8 h 牙鲈 Hsp90 mRNA 在肝脏和脾脏中的表达

Fig.4 Relative expression of Hsp90 mRNA in the liver and spleen of *P. olivaceus* treated at 28°C for 8 h

A: 肝脏 Hsp90α mRNA 的相对表达量; B: 肝脏 Hsp90β mRNA 的相对表达量; C: 脾脏 Hsp90α mRNA 的相对表达量; D: 脾脏 Hsp90β mRNA 的相对表达量; a、b、c、d 代表各组之间的差异性, 相同字母为差异不显著($P>0.05$), 不同字母表示差异显著($P<0.05$)

A: Liver Hsp90α mRNA expression level; B: Liver Hsp90β mRNA expression level; C: Spleen Hsp90α mRNA relative expression; D: Spleen Hsp90β mRNA relative expression level; Letter a, b, c and d present the differences among various fish groups; the same letters indicate no significant difference ($P>0.05$) and the different letters indicate significant difference ($P<0.05$)

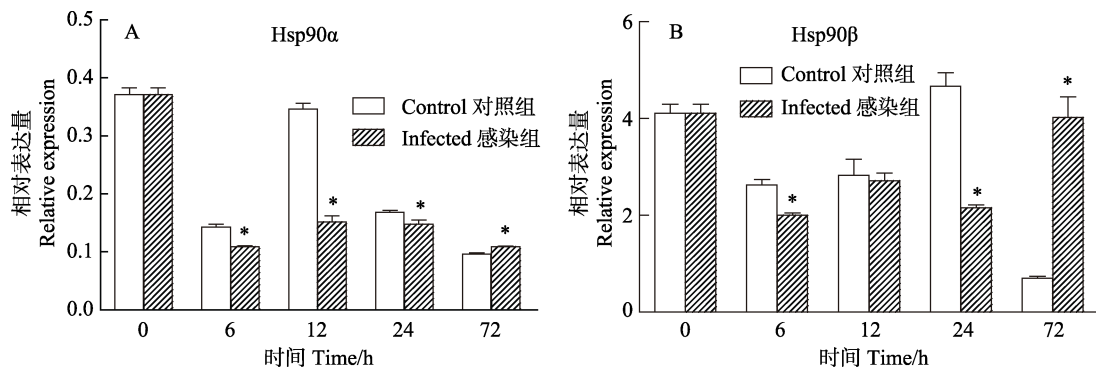


图 5 牙鲈感染鳃弧菌后脾脏 Hsp90 mRNA 的表达水平

Fig.5 Relative expression of Hsp90 mRNA in the spleen of *P. olivaceus* infected with *V. anguillarum*

*代表差异显著($P<0.05$)

* presents significant difference($P<0.05$)

达比 Hsp90β 更容易受高温的影响。通过 10°C 和 28°C 刺激发现, Hsp90α 和 Hsp90β mRNA 表达量有所差异, 在低温时 Hsp90β mRNA 的表达量高于 Hsp90α 的表

达量, 说明 Hsp90β 可能在低温时发挥不同的作用。

HSPs 在鱼类免疫反应中发挥作用。例如, 当虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 受到肾杆菌或鳃弧菌感染

时, Hsp70 表达升高(Forsyth *et al.*, 1997; Ackerman *et al.*, 2001); 当鲈鱼(*Sparus sarba*)受到藻胶弧菌感染时, Hsp70 的表达量下降, 而 Hsp60 和 Hsp90 的表达量不变(Deane *et al.*, 2005)。本研究发现, 当牙鲆受到鳃弧菌感染时, Hsp90 α 和 Hsp90 β 的表达先缓慢下降, 而后分别在感染后 24 h、72 h 升高, 变化的趋势与之前的研究有所不同(Cha *et al.*, 2013), 当牙鲆受到链球菌感染后 6 h, 包括 Hsp90 α 和 Hsp90 β 在内的多个 HSPs 基因的表达量升高, 之后出现下降趋势。Hsp90 可以识别病原模式分子(Pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 参与宿主的先天性免疫反应(Colaco *et al.*, 2013)。链球菌和鳃弧菌分别为革兰氏阳性和阴性菌, 具有不同的 PAMP 分子, 与牙鲆 Hsp90 存在不同的识别机制, 这可能是导致两个结果存在差异的原因之一。

Hsp90 广泛的生物学功能, 在人类的抗氧化、抗衰老、抗损伤和抗肿瘤药物等多个领域受到广泛的关注(Eustace *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007)。然而, 目前, 水生动物 HSPs 的研究相对滞后。本研究系统分析了不同发育期牙鲆 Hsp90 在各组织中的表达差异, 以及对温度、病原菌的应激反应, 为更好地利用 Hsp90 提供了理论数据。

参 考 文 献

- 张俊玲, 施志仪, 程琦, 等. 牙鲆变态中两种 HSP90 基因的不同表达及其与甲状腺激素的关系. 水产学报, 2010, 34(10): 1478–1485
- 周鑫, 董云伟, 王芳, 等. 草鱼 hsp70 和 hsp90 对温度急性变化的响应. 水产学报, 2013, 37(2): 216–221
- Ackerman PA, Iwama GK. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. *J Aquat Anim Health*, 2001, 13(2): 173–180
- Cha IS, Won JK, Park SB, *et al.* Heat shock protein profiles on the protein and gene expression levels in olive flounder kidney infected with *Streptococcus parauberis*. *Fish Shellfish Immun*, 2013, 34(6): 1455–1462
- Colaco CA, Bailey CR, Walker KB, *et al.* Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity. *Biomed Res Int*, 2013(1): 461230
- Deane E, Woo NYS. Evidence for disruption of Na⁺-K⁺-ATPase and hsp70 during vibriosis of sea bream, *Sparus* (= *Rhabdosargus*) *sarba* Forsskål. *J Fish Dis*, 2005, 28(4): 239–251
- Du SJ, Li HQ, Bian YH, *et al.* Heat-shock protein 90 α 1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos. *Proc Nat Sci USA*, 2008, 105(2): 554–559
- Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, *et al.* Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 α in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(6): 507–514
- Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61(1): 243–282
- Forsyth R, Candido EPM, Babich SL, *et al.* Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease. *J Aquat Anim Health*, 1997, 9(1): 18–25
- Li W, Li Y, Guan SX, *et al.* Extracellular heat shock protein-90 α : linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO Journal*, 2007, 26(5): 1221–1233
- Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*, 1986, 55(1): 1151–1191
- Manchado M, Salas-Leiton E, Infante C, *et al.* Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish *Senegalese sole* (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene*, 2008, 416(1–2): 77–84
- Millson SH, Truman AW, Racz A, *et al.* Expressed as the sole Hsp90 of yeast, the α and β isoforms of human Hsp90 differ with regard to their capacities for activation of certain client proteins, whereas only Hsp90 β generates sensitivity to the Hsp90 inhibitor radicicol. *FEBS Journal*, 2007, 274(17): 4453–4463
- Murtha JM, Keller ET. Characterization of the heat shock response in mature zebrafish (*Danio rerio*). *Exp Gerontol*, 2003, 38(6): 683–691
- Osterloh A, Breloer M. Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition. *Med Microbiol Immun*, 2008, 197(1): 1–8
- Padmini E, Rani MU. Seasonal influence on heat shock protein 90 α and heat shock factor 1 expression during oxidative stress in fish hepatocytes from polluted estuary. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2009, 372(1–2): 1–8
- Padmini E, Rani MU. Heat-shock protein 90 alpha (HSP90 α) modulates signaling pathways towards tolerance of oxidative stress and enhanced survival of hepatocytes of *Mugil cephalus*. *Cell Str Chap*, 2011, 16(4): 411–425
- Pratt WB. The role of Thehsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via map kinase. *Annu Rev Pharmacol*, 1997, 37(1): 297–326
- Sathiyaa R, Campbell T, Vijayan MM. Cortisol modulates HSP90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2001, 129(2–3): 679–685
- Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Therapeut*, 2004, 101(3): 227–257
- Suzue K, Zhou X, Eisen HN, *et al.* Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proc Nat Aca Sci*,

- 1997, 94(24): 13146–13151
- Vabulas RM, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, *et al.* Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *CSH Perspect Biol*, 2010, 2(12): 1882–1890
- Wandinger SK, Richter K, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, 2008, 283(27): 18473–18477
- Zhao R, Davey M, Hsu YC, *et al.* Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell*, 2005, 120(5): 715–727

(编辑 冯小花)

Expression Patterns of Hsp90 of *Paralichthys olivaceus* in Response to Temperature Treatment and *Vibrio anguillarum* Infection

SHENG Anzhi^{1,2}, JU Huiming¹, LI Guiyang^{2,3}, LI Jie^{2,3}, MO Zhaolan^{2,3①}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract In this study we investigated the expression patterns of Hsp90 α and Hsp90 β of *Paralichthys olivaceus* after the temperature treatment and *Vibrio anguillarum* infection. qRT-PCR was used to detect the expression of Hsp90 in different tissues of *P. olivaceus* during a series of growth stages (1-, 8-, 12-, and 24-month old). The results showed that Hsp90 α and Hsp90 β were expressed in 13 tissues including liver, spleen, head kidney, kidney, heart, muscle, dorsal skin, stomach, intestine, gill, pelvic fin, brain, and blood at all growth stages. The expression level of Hsp90 β was overall higher than that of Hsp90 α . Expression of Hsp90 α was significantly higher at 8-month than at other growth stages in the liver, gills, dorsal skin, dorsal muscle, and pelvic. As the level of Hsp90 β varied at different growth stages, it was observed to be higher in the liver and intestine. After a treatment at 5–32°C for 1 h, the expression of Hsp90 α in the liver and spleen was rapidly increased, whereas the expression of Hsp90 β did not changed evidently. After a continuous treatment at 10°C and 28°C for 8 h, the expression of both Hsp90 α and Hsp90 β in the liver and spleen declined after an initial increase. Expression of Hsp90 α varied in a wider range than Hsp90 β . Within 72 h after the infection with *V. anguillarum*, expression of Hsp90 α and Hsp90 β in the spleen first rose and then decreased, and expression of Hsp90 β had a larger variation range. These results indicated that Hsp90 α and Hsp90 β might have distinct expression patterns in different tissues at various growth stages. Hsp90 α may be apt to respond to high temperature, while Hsp90 β could be more sensitive to pathogen infection. These data will provide the basic data for better understanding of the functions of Hsp90 in *P. olivaceus*.

Key words *Paralichthys olivaceus*; Hsp90 α and Hsp90 β ; qPCR; Temperature treatment; *V. anguillarum* infection

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn