

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20181008001

薛士鹏, 王涵, 宋国英, 等. 淡水双壳类背角无齿蚌 *AwHSP70* 基因克隆及多溴联苯醚-47 对其表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(5): 168-176  
Xue S P, Wang H, Song G Y, et al. Molecular characterization of *AwHSP70* from freshwater bivalve *Anodonta woodiana*: Effects of PBDE-47 on its expression [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(5): 168-176 (in Chinese)

## 淡水双壳类背角无齿蚌 *AwHSP70* 基因克隆及多溴联苯醚-47 对其表达的影响

薛士鹏<sup>1</sup>, 王涵<sup>1</sup>, 宋国英<sup>2</sup>, 华春秀<sup>1</sup>, 于瑞雪<sup>2</sup>, 刘庆春<sup>1</sup>, 王中晓<sup>1</sup>, 张庆远<sup>1</sup>, 刘丽<sup>2</sup>, 李冰洁<sup>2</sup>, 夏西超<sup>1,2,\*</sup>

1. 南阳医学高等专科学校基础医学部, 南阳 473061

2. 平顶山学院医学院, 平顶山 476000

收稿日期: 2018-10-08 录用日期: 2019-01-18

**摘要:** 热休克蛋白(HSP)参与蛋白质折叠、细胞膜转位和错误折叠蛋白质降解等过程,提高动物对环境的应激能力和适应能力。前期研究表明,多溴联苯醚-47(PBDE-47)对背角无齿蚌具有显著的氧化应激和急性毒性效应,为探讨 PBDE-47 慢性毒性效应;将背角无齿蚌随机分为对照组和 PBDE-47 处理组,处理组用  $3.36 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度的 PBDE-47 进行处理,对照组用相同体积的二甲亚砷进行处理;克隆出 *AwHSP70* 基因,分析 PBDE-47 对 *AwHSP70* 表达的影响。结果显示,*AwHSP70* 具有 HSP70 家族的标签序列,广泛分布于斧足、鳃、肝胰脏、闭壳肌、心脏、血淋巴和外套膜。PBDE-47 处理可导致肝胰脏、鳃和血细胞中 *AwHSP70* mRNA 水平显著升高。与对照组相比,PBDE-47 处理组肝胰脏中 *AwHSP70* mRNA 水平在 1~15 d 内增加 2.79 倍( $P<0.01$ )以上;鳃中 *AwHSP70* mRNA 水平增加 3.06 倍( $P<0.01$ )以上;血淋巴中 *AwHSP70* 表达增加 1.81 倍( $P<0.05$ )以上。背角无齿蚌上调 *AwHSP70* 表达有助于增强动物对 PBDE-47 的耐受能力。

**关键词:** PBDE-47;背角无齿蚌; *AwHSP70*

文章编号: 1673-5897(2019)5-168-09 中图分类号: Q459 文献标识码: A

## Molecular Characterization of *AwHSP70* from Freshwater Bivalve *Anodonta woodiana*: Effects of PBDE-47 on Its Expression

Xue Shipeng<sup>1</sup>, Wang Han<sup>1</sup>, Song Guoying<sup>2</sup>, Hua Chunxiu<sup>1</sup>, Yu Ruixue<sup>2</sup>, Liu Qingchun<sup>1</sup>, Wang Zhongxiao<sup>1</sup>, Zhang Qingyuan<sup>1</sup>, Liu Li<sup>2</sup>, Li Bingjie<sup>2</sup>, Xia Xichao<sup>1,2,\*</sup>

1. College of Basic Medicine, Nanyang Medical University, Nanyang 473061, China

2. College of Medicine, Pingdingshan University, Pingdingshan 476000, China

Received 08 October 2018 accepted 18 January 2019

**Abstract:** Heat shock proteins (HSPs) play an important role in adaption to environmental stress by protein folding, membrane translocation, degradation of misfolded proteins and other regulatory processes. Our previous study showed oxidative stress generated from polybrominated diphenyl ether-47 (PBDE-47) could cause an acute toxicity to freshwater bivalve *Anodonta woodiana*, but the effect of chronic exposure need to be elucidated. In order to fur-

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(18A330004);河南省联合基金项目(182300410123);中国博士后基金项目(2016M590143)

作者简介: 薛士鹏(1983—),男,硕士,研究方向为分子生物学, E-mail: 409195235@qq.com

\* 通讯作者( Corresponding author), E-mail: xiachao8336@163.com

ther investigate the chronic effect of PBDE-47, clams *A. woodiana* were randomly divided into the PBDE-47 treated group administrated with PBDE-47 at a concentration of  $3.36 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and control group treated with a similar volume dimethyl sulfoxide. One complete HSP sequence was isolated from *A. woodiana* and named *AwHSP70*. *AwHSP70* was widely distributed in foot, gill, hepatopancreas, adductor muscle, heart, hemocytes and mantle. Administration of PBDE-47 could result in a significant up-regulation of *AwHSP70* expression in the hepatopancreas, gill and hemocytes. In the hepatopancreas, mRNA level of *AwHSP70* increased more than 2.79 times ( $P<0.01$ ) compared with that of control group. In the gill, during the experiment process, significant up-regulation of *AwHSP70* expression showed a reversed U shape. In the hemocytes, *AwHSP70* expression of PBDE-47 treated group increased more than 1.81 times ( $P<0.05$ ) compared with that of control group. These results indicated that up-regulation of *AwHSP70* expression accounts for enhancing adaption of bivalve *A. woodiana* exposed to PBDE-47.

**Keywords:** PBDE-47; *Anodonta woodiana*; *AwHSP70*

热休克蛋白(HSP)是一个超基因家族,在调节机体应激反应和耐受性方面发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。在正常和应激条件下,HSP帮助蛋白质折叠、膜转位和错误折叠蛋白质降解等方面具有积极作用<sup>[3-4]</sup>。根据其分子量不同,HSP可以分为HSP100、HSP90、HSP70、HSP60和小分子HSP20等5个家族,HSP70是最为保守且研究相对广泛的家族之一<sup>[5-6]</sup>。HSP70对环境应激反应性较为敏感,温度、氧化应激、重金属、能量代谢抑制剂、紫外线和辐射、病毒、细菌和寄生虫感染均可诱导HSP70表达,以增强机体的耐受能力<sup>[7-9]</sup>。多联苯醚(PBDE)是常见淡水持久性有机污染物,具有持久性和高生物蓄积的特点,已经引起学者的极大关注<sup>[10]</sup>。PBDE-47是水体中最丰富的有机污染物,其生物毒性显著强于其他溴化化合物<sup>[11]</sup>。我们前期的研究结果表明,PBDE-47可能导致淡水背角无齿蚌机体应激反应并产生急性毒性效应,具体机制有待进一步探究。在本研究中,从背角无齿蚌中克隆出*AwHSP70*完整基因序列,通过 real-time PCR 分析*AwHSP70*表达,为揭示PBDE-47毒性效应奠定理论基础。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 材料

背角无齿蚌购自南阳市水产市场,壳长( $6.5\pm 0.5$ ) cm,处理之前,动物置于实验室自动水循环系统中适应养殖2周。PBDE-47 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)溶解于二甲亚砜(DMSO)制备储备液。动物处理实验在长方形塑料盒(40 cm×25 cm,高10 cm)中进行,饲养采用人工模拟池塘水(每1 L去离子水中含48 mg  $\text{NaHCO}_3$ 、33 mg  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、60 mg  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.5 mg KCl)<sup>[10]</sup>。为了确定*AwHSP70*组织分布,对来自同一塑料盒5只动物进

行解剖,取斧足、鳃、肝胰脏、闭壳肌、心脏、血淋巴和外套膜等组织。根据上述动物处理方法,将80只河蚌随机饲养于10个塑料盒中,每盒8只,分为对照组和PBDE-47处理组,每组5个盒子。PBDE-47处理组采用 $3.36 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PBDE-47进行处理,对照组用同体积DMSO处理,水中DMSO浓度不超过3%。第0、1、3、6、9、12和15天从每组中取出5只河蚌,解剖肝胰脏、鳃和血淋巴,液氮速冻,于-80℃保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总RNA提取和cDNA第一链的合成

总RNA提取采用TRIzol试剂(宝生物工程(大连)有限公司,大连),1.2%琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,具有完整rRNA条带的RNA用于合成cDNA,M-MLV试剂盒合成第一链cDNA,用作PCR反应模板。

#### 1.2.2 背角无齿蚌*AwHSP70*核心片段的扩增

简并引物*AwHSP71*和*AwHSP72*分离*AwHSP70*cDNA保守区域片段,PCR产物连接至pMDT-19载体,双向测序。确定HSP70部分cDNA序列后,根据部分cDNA序列设计的特异性引物(表1),按照试剂盒要求,扩增*AwHSP70*cDNA 5'和3'区域序列,5' Race和3' Race的PCR产物进行测序和拼接。

#### 1.2.3 序列和系统发育分析

分析*AwHSP70*序列,通过GenBank数据库搜索(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)进行BLAST程序比对;根据<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>预测信号肽;采用Simple Modular Architecture Research Tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质结构域;使用DANMEN分析程序对*AwHSP70*基因进行多序列比对;通过Swiss-model(<http://swissmodel>).

expasy.org/)预测 AwHSP70 的蛋白质三维结构;使用 MEGA5.0 软件构建系统进化树。

#### 1.2.4 AwHSP70 mRNA 水平定量检测

为了确定 AwHSP70 转录水平,采用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒并按照要求进行定量分析。 $\beta$ -actin 作为内参基因,根据 AwHSP70-F 和 AwHSP70-R 引物常用 PCR 仪中的分离靶基因(表 1),琼脂糖凝胶电泳检测出一个条带,并进行 PCR 产物测序和序列鉴别。使用 ABI7500 实时检测系统(Applied Biosystems,美国)进行 real-time PCR 分析,构建标准曲线,通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  分析 AwHSP70 表达水平。

#### 1.2.5 统计学分析

采用 SPSS10.0 统计软件, AwHSP70 mRNA 水平以  $\bar{x} \pm s$  表示,所有数据进行单因素方差分析(ANOVA),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果(Results)

### 2.1 背角无齿蚌 AwHSP70 基因的 cDNA 及预测蛋白质序列分析

AwHSP70 cDNA 序列由 2 305 bp 核苷酸序组成,全长 cDNA 包含 1 个 67 bp 的 5'-端非编码区、1 个 267 bp 的 5'-端非编码区和 1 个 1 971 bp 的开放阅读框。开放阅读框为由 657 个氨基酸组成的多肽,分子量为 71.57 kDa,理论等电点为 5.61(图 1)。

AwHSP70 具有 HSP70 家族 3 个标签序列(7-IDIDL-GTTYSLGTTYSCV-16、197-IFDLGGGTFDVSIL-210 和 334-IVLVGGSTRIPKV-348), ATP/GTP 结合位点为 131-AEAYLGQR-137,核定位信号区域为 246-KRKHKKDISDNKRSVRR-262,另有 C 末端高度保守的 EEVD 序列和重复序列 GGXP(图 1)。

### 2.2 背角无齿蚌 AwHSP70 的进化关系

BLAST 分析显示, AwHSP70 的氨基酸序列与 HSP70 家族成员具有显著相似性,与三角帆蚌和光滑双脐螺 同源性分别为 98.63% 和 88.43%。 AwHSP70 与模式生物小鼠、斑马鱼、非洲爪蟾、水蚤和果蝇同源性分别为 86.76%、85.54%、81.76%、81.91% 和 71.88%。为了分析 AwHSP70 的进化关系,分别从脊椎动物和无脊椎动物物种中选择 HSP70 家族的不同成员,通过 MEGA5.0 邻接法构建系统进化树。 AwHSP70 与双壳类和腹足纲动物亲缘关系最近,昆虫、甲壳动物和哺乳动物次之,脊椎动物较远,细菌亲缘关系最远(图 2)。

### 2.3 背角无齿蚌 AwHSP70 mRNA 的组织分布

组织分布结果显示, AwHSP70 广泛表达于背角无齿蚌斧足、鳃、心脏、肝胰脏、血淋巴、闭壳肌和外套膜(图 3)。上述组织中, AwHSP70 mRNA 在肝胰脏中表达水平最高,鳃和血细胞次之,心脏、闭壳肌、外套膜和斧足最低(图 3)。

表 1 PCR 扩增引物序列

Table 1 PCR amplified primer sequence

| 引物<br>Primer        | 引物序列(5'~3')<br>Sequence(5'~3')     |
|---------------------|------------------------------------|
| AwHSP71             | ACCNAATGNAGGAACTGC                 |
| AwHSP72             | GTGATGCTNGTGTAGAAATC               |
| 5' Race Innerprimer | CATGGCTACATGCTGACAGCCTA            |
| 5' Race Outerprimer | CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG |
| AwHSP70-5-1         | CTGGCTTGTGTGCTTGATGA               |
| AwHSP70-5-2         | CCGCCAACCTTCTTATCCAG               |
| 3' Race Outerprimer | TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT            |
| 3' Race Innerprimer | CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG   |
| AwHSP70-3-1         | CTGGATAAGAAGGTTGGCGG               |
| AwHSP70-3-2         | TCATCAAGCACACAAGCCAG               |
| AwHSP70-F           | GGTGGAGCAGGGGAATGCCAG              |
| AwHSP70-R           | CTGCCAATTGGTTGGCATCCAGCC           |
| $\beta$ -actin-F    | CATCCCTTGCTCTCCAACATATG            |
| $\beta$ -actin-R    | CTGGAAGGTAGAGAGAAGCCAAG            |

```

GAAAGACAAAAGAAAGGAGGCAAGGCAAAACACAACCATATCTTATCCAGTTTCAGAACTCTTGGATCATGGCAAAGGTACCAGCTATAGG 90
                                                                M A K V P A I G 8
AATTGACTTGGGTACTACTACTCGTGCCTAGGGGTTTTTCAACATGGAAAAGTAGAGATCATGGCCAACGATCAAGGCAACCGAACAAC 180
I D L G T T Y S C V G V F Q H G K V E I I A N D Q G N R T T 38
GCCCAGTTATGTTGCCTTCACAGATACAGAGAGGTTAATTGGTGATGTGCCAAGAACCAGGTGGCTATGAACCCAAACAACCCGTTT 270
P S Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q V A M N P N N T V F 68
TGATGCCAAACGTTTGATGGCAGAAAGTTAATGAACCTCTGTTCAGTCTGATATGAAGCACTGGCCGTTTGATGTAATCAATGATGG 360
D A K R L I G R K F N E P S V Q S D M K H W P F D V I N D G 98
TGGAAAACCCAAGATAAAGGTAGAATACAAGGAGAGGAGAAAACATTTTATCCTGAAGAAATCTCCTCAATGGTTTGACAAAATGAA 450
G K P K I K V E Y K G E E K T F Y P E E I S S M V L T K M K 128
GAAACTGCCGAGGCTTATCTTGGAAAGTCTGTTACAAATGCTGTAGTAACGTGCCAGCATACTTAAACGATTACAGAGACAGGCCAC 540
E T A E A Y L G K V V T N A V V T V P A Y F N D S Q R Q A T 158
GAAAGATGCTGGAACAATTGCTGGTCTTAATGTAAGTCCGATCATCAATGAGCCTACAGCTGCTGCCATTGGCCTATGGCCTGGATAAGAA 630
K D A G T I A G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G L D K K 188
GGTTGGCGGTGAAAAAATGTCTTGATCTTGTATCTTGGAGGCGTACTTTTGATGTCTCCATTCTGACCATCGAGGATGGCATTTTTGA 720
V G G E K N V L I F D L G G G T F D V S I L T I E D G I F E 218
AGTTAAATCTACATCTGGAGACACCCATTGGGTGGAGAGGACTTTGACAACAGAATGGTCAATCACTTCGTCACGGAATTTAAGAGGAA 810
V K S T S G D T H L G G E D F D N R M V N H F V Q E F K R K 248
ACACAAGAAAGACATCAGTGACAACAAGAGATCAGTTCGTCGATTGAGAACCGCATGTGAAAGAGCCAAGAGGACACTGTCATCAAGCAC 900
H K K D I S D N K R S V R R L R T A C E R A K R T L S S S T 278
ACAAGCCAGTGTGGAATTTGATCACTCTATGAAGGAATTGATTCTACACCAGCATACCAGGGCAAGATTTGAAGAAGTGAATGCTGA 990
Q A S V E I D S L Y E G I D F Y T S I T R A R F E E L N A D 308
CTTGTTACAGAGAACTCTGAACCAAGTAAAGAAGGCTCTCGGGATGCCAAGATGGACAAGCCGCAAGTACATGATATTTGTTGGTAGG 1080
L F R G T L E P V K K A L R D A K M D K P Q V H D I V L V G 338
AGGGTCCACTCGTATCCCGAAAGTCCAGGAACTTCTCCAGGATTTCTTCAATGGCAAGGAACTGAACAAGAGCATTAACCCCGACGAGGC 1170
G S T R I P K V Q E L L Q D F F N G K E L N K S I N P D E A 368
AGTTGCCTATGAGACAGCTGTTCCAGGCTGCAATTTCTCAGGGCGCAAAATCTGAGGCTGTCCAGGACCTTCTGCTGCTCGATGTTGCCCC 1260
V A Y G A A V Q A A I L Q G D K S E A V Q D L L L L D V A P 398
ATTGCTTTAGGTATTGAGACGGCTGGTGGAGTAATGACTGCCCTGATCAAGAGAAAACACCACCATTTCCACCAAACAGACACAGACCTT 1350
L S L G I E T A G G V M T A L I K R N T T I P T K Q T Q T F 428
TACTACCTACTCCGACAACCAGCTGGTGTGCTGATCCAGGCTATGAAGGTGAAAGAGCCATGACCAAAGATAACAACCTCCTTGGTAA 1440
T T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E R A M T K D N N L L G K 458
ATTTGAGCTTACGGGAATTTCTCTGACCACGTGGCGTACCCAAATTTGAGGTGACCTTTGACATAGATGCCAATGGTATTCTCAACGT 1530
F E L T G I P P A P R G V P Q I E V T F D I D A N G I L N V 488
TTCTGCAGTGGACAAAAGCACTGGCAAAGAAAACAAGATTACTATTACCAATGACAAAGACGCTTAGCAAGGATGAAATTTGAACGCAT 1620
S A V D K S T G K E N K I T I T N D K G R L S K D E I E R M 518
GGTGAATGATGCAGAGAAGTACAAGGTGAAGATTCAAACAGAGAGACCGTGTGCTGCCAAGAATTCAGTGAAGAGTATGCATTCCA 1710
V N D A E K Y K G E D S K Q R D R V A A K N S L E S Y A F H 548
TATGAAATCCACGGTTGAAGACCAGAATCTTAAGACAAGATAAGTGAGTCTGATAGAAAGATCATCACAGACAAATGCAACGATATCAT 1800
M K S T V E D Q N L K D K I S E S D R K I I T D K C N D I I 578
TTCATGGCTGGATGCCAACCAATTGGCAGATAAGGAGGAGTTGAACACAAGCAGAAGGAGATGAAGGTGTTGTAATCTATAATTAC 1890
S W L D A N Q L A D K E E F E H K Q K E I E G V C N P I I T 608
GAAGCTGTATCAGCAGGCTGGTGGAGCAGGGGAATGCCAGGAGGTATGCCAGGTGATTCCAGGTGGTCCCTGGTGCAGGTGGTCA 1980
K L Y Q Q A G G A G G M P G G M P G G F P G G A P G A G G H 638
TGGTGGCCATGGTCATCCGCTGGTAGTAGCGGAGGCCAACTATTGAGGAAGTTGATTAAGATGATGATGATAACGTAATCAAACTGT 2070
G G H G H S A G S S G G P T I E E V D * 657
ATTAGGGATTAATAAATAAATTTCTCAATTTGAACTGGTTTAGGCACATACAAGTTGTTGTAAGATTTTTCACATTTTTTTTGTAGT 2160
GCTGCAAAGCATTGTTGTTGCCAAAGTGTACTTCAAAAAGGATGTTCAAGTAAAAATACTACTGTTGTAATGATAACGTAATTAATA 2250
AGTTAATGTTAGATTGCAAAATTGCAATTTTGTAAATTTGAAAAAATAAATAA 2305

```

图 1 背角无齿蚌 *AwHSP70* 基因的 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

注: □ *HSP70* 基因标签序列; — ATP/ADP 结合位点; ...  $Mg^{2+}$  结合位点; \* 终止密码子;     poly A 信号序列。

Fig. 1 The cDNA sequence of *Anodonta woodiana AwHSP70* gene and the deduced amino acid sequence

Note: □ *HSP70* gene tagging sequence; — ATP/ADP binding site; ...  $Mg^{2+}$  binding site; \* termination codon;     poly A signal sequence.

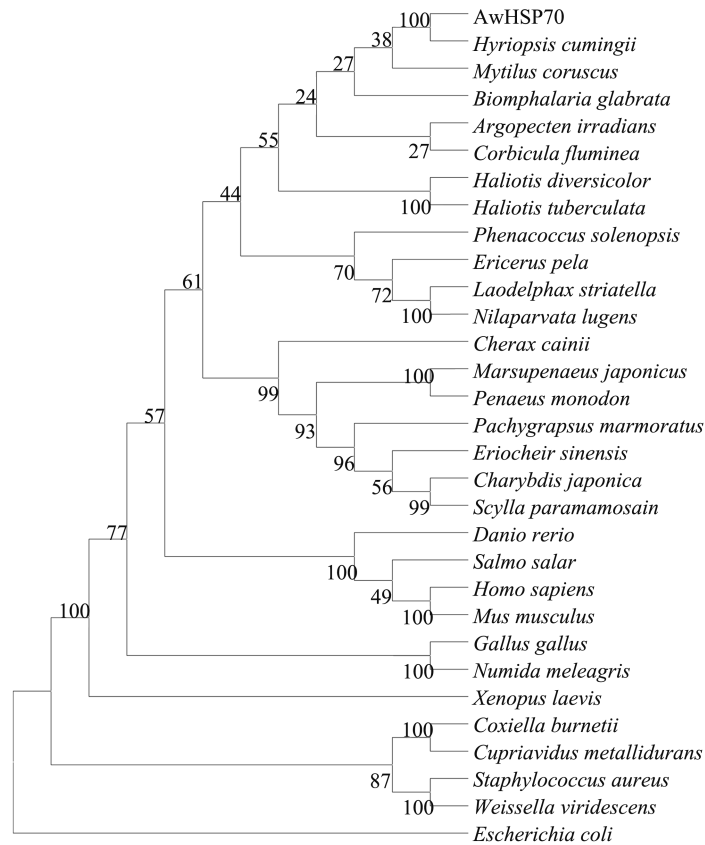


图2 根据背角无齿蚌 AwHSP70 氨基酸序列使用邻接法构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed by adjacency method according to the *Anodonta woodiana* AwHSP70 amino acid sequence

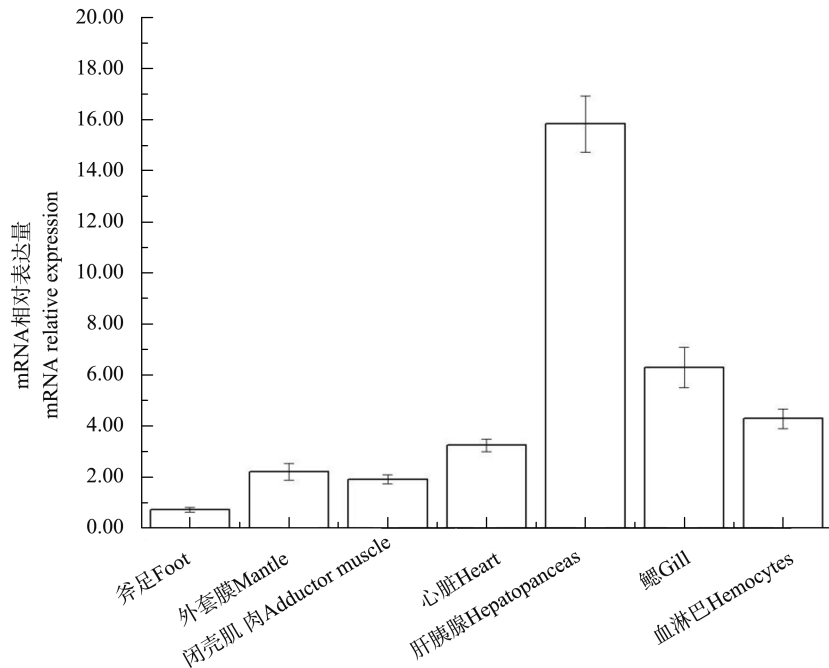


图3 背角无齿蚌 AwHSP70 基因的空间表达

注: 每组数据来源于5只动物, 重复3次。

Fig. 3 The spatial expression of *Anodonta woodiana* AwHSP70 gene

Note: Each group data was derived from five animals and the experiment was repeated three times.

## 2.4 PBDE-47 对背角无齿蚌 *AwHSP70* 表达的影响

正常条件下, *AwHSP70* 在背角无齿蚌肝胰脏、鳃和血淋巴表达稳定, PBDE-47 处理组中 *AwHSP70* 表达水平受到显著影响。1~15 d 内, PBDE-47 处理后肝胰脏中 *AwHSP70* mRNA 水平随时间显著上调(图 4); 与对照组相比, *AwHSP70* mRNA 水平在第 1 天增加 2.79 倍( $P<0.01$ ), 第 15 天增加 13.15 倍( $P<0.01$ )(图 4A)。PBDE-47 处理后, 与对照组相比, 鳃中 *AwHSP70* 表达水平显著上调; 且变化趋势呈现倒 U 字形, 1~6 d 内 *AwHSP70* 表达水平显著上调, 第 6 天达到峰值, 6~15 d 内呈现下调趋势(图 4B)。与对照组相比, 第 1 天后血淋巴中 *AwHSP70* mRNA 水平增加了 1.81 倍( $P<0.05$ )(图 4C)。

## 3 讨论 (Discussion)

在 *AwHSP70* 蛋白质序列中包括 HSP70 家族的保守结构域和特征性序列, 如: HSP70 标签序列 1、2 和 3, 细胞核定位信号、ATP/GTP 结合位点序列、C 末端最后 4 个氨基酸形成 EEVD 特定基序, 提示 *AwHSP70* 是一种胞浆类型热休克蛋白。根据 HSP70 家族特征序列和细胞中的分布, 可将 HSP70 划分为不同类型。EEVD 保守结构被视为胞浆类型热休克蛋白与其他类型区别的关键标志。HSP70 的 GGMP 氨基酸重复结构域能够促进 HSP90 和其他辅助分子与其形成多分子伴侣复合体<sup>[12-13]</sup>。GGMP 重复区域还参与蛋白质三维结构和螺旋亚结构域形成, 在介导辅助因子与分子伴侣结合方面发挥重要作用<sup>[14]</sup>。由此可见, GGMP 在 *AwHSP70* 形成的连续重复区域可能在多分子伴侣复合体形成和辅助因子识别方面发挥重要作用。值得注意的是, *AwHSP70* 氨基酸序列与其他 HSP70 家族成员具有高度同源性, 但 UTR 核苷酸序列却各不相同, 推测 HSP70 的 UTR 核苷酸序列差异性可能与不同物种 HSP70 转录调控的复杂性有关。

序列比对和系统进化分析结果显示, 从软体动物到昆虫, 以及到脊椎动物, *HSP70* 谱系高度保守。背角无齿蚌和三角帆蚌存在更为亲近的亲缘关系, 提示二者在进化上来自同一个祖先。背角无齿蚌 *AwHSP70* mRNA 具有广泛的分布, 提示这种分布模式与 *AwHSP70* 参与环境应激反应和提高耐受性相关。肝胰脏是软体动物主要的消化、吸收和分泌器官, 不断接触温度、pH 和水体成分等变化, 对环境改变敏感<sup>[15]</sup>。鳃是动物的呼吸器官, 环境中污染物主

要入口之一, 并与污染物直接接触<sup>[16]</sup>。双壳类微循环系统是一个淋巴细胞和血细胞混合在一起的开放式循环系统, 淋巴细胞和血细胞在淋巴管、血窦以及

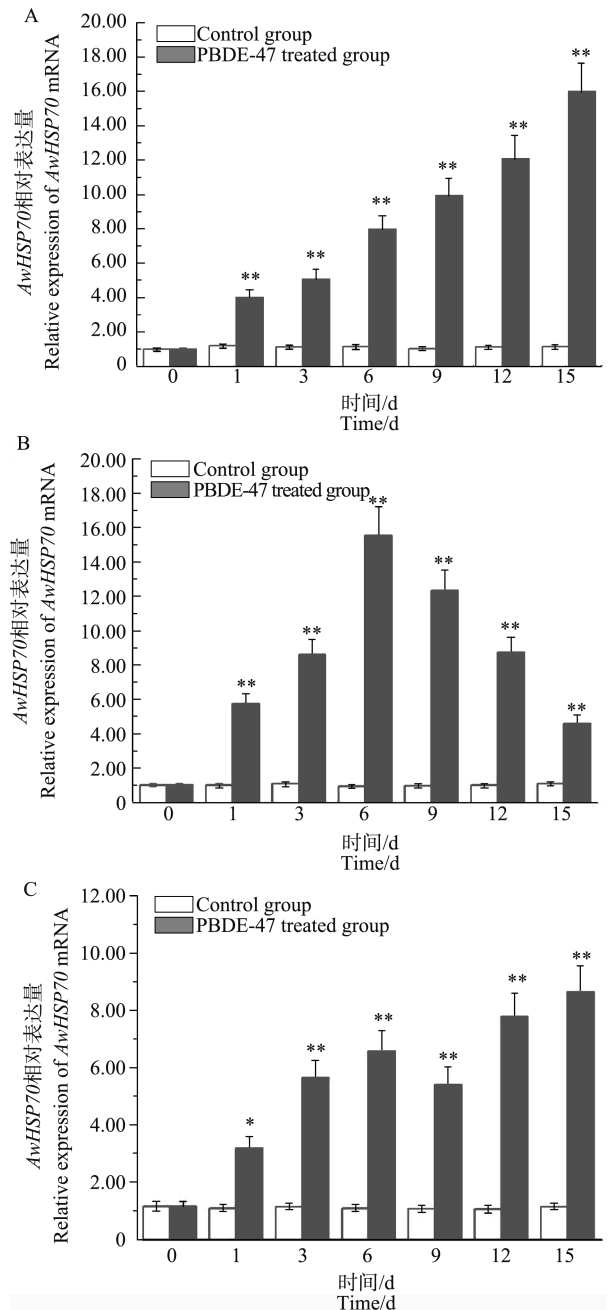


图 4 PBDE-47 对背角无齿蚌肝胰脏 *AwHSP70* 基因表达的影响

注: A 肝胰脏, B 鳃, C 血淋巴;  $n=5$ , \*、\*\*表示与相应对照组相比差异显著( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ )。

Fig. 4 The effect of PBDE-47 on *AwHSP70* gene expression in *Anodonta woodiana* hepatopancreas  
Note: A, hepatopancreas; B, gill; C, hemolymph;  $n=5$ ;  
\*, \*\* indicates a significant difference compared with the corresponding control group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

全身软组织中流通。黏膜组织中淋巴细胞和血细胞充盈充足,与这些器官与周围环境进行氧气交换或营养素提取有关。血淋巴是应对环境应激的重要防线<sup>[17]</sup>。肝胰脏、鳃和血细胞在维护动物稳态方面发挥关键作用,也是环境因素作用的关键靶器官。肝胰脏、鳃和血淋巴中的 *AwHSP70* 表达水平相对较高,提示这种分布模式很可能与器官功能有关。

在本研究中, PBDE-47 处理能够诱导肝胰脏、鳃和血淋巴中 *AwHSP70* 表达,提示背角无齿蚌能够通过上调 *AwHSP70* 表达提高对 PBDE-47 暴露的适应能力和耐受能力。背角无齿蚌作为一种滤食性淡水生物,靠过滤水体中营养物质来维持生存。PBDE 具有较高亲脂性,水中溶解的 PBDE 很容易蓄积在细胞中,导致活性氧(ROS)大量产生。正常情况下,ROS 很快被一系列抗氧化酶清除,维持在一个合理水平。在应激环境中,过量生成 ROS 引起 DNA 损伤、脂质过氧化和蛋白质糖基化,导致蛋白质错误折叠可能性增加。*HSP70* 表达上调有助于帮助错误折叠蛋白质进行修复和转膜,并促进错误折叠蛋白质降解,提高机体环境适应性和耐受性。与其他热休克蛋白家族相比,*HSP70* 研究较为广泛且对环境应激较为敏感。暴露于重金属和多环芳烃类后,紫贻扇贝能够上调 *HSP70* 表达提高对污染物的耐受能力<sup>[18]</sup>。虾夷扇贝暴露于麻痹性贝类毒素后,能够增加 *HSP70* 表达水平以增强毒性应激的适应能力<sup>[19]</sup>。高温条件下,太平洋牡蛎通过增加 *HSP70* 表达来提高自身对高温的适应能力<sup>[20]</sup>。抗抑郁型药物氟西汀处理后,河蚬消化腺中 *HSP70* mRNA 表达水平上调<sup>[21]</sup>。研究证实,一些蚌类 *HSP70* 表达可被重金属激活,该过程是金属硫蛋白调控途径的重要环节之一<sup>[22-27]</sup>。干扰机体蛋白质正确折叠是环境因素和污染物干扰机体功能的重要路径之一,而激活 *HSP* 表达是动物提高环境适应能力的关键策略<sup>[28]</sup>。由此,*AwHSP70* 表达上调是背角无齿蚌应对 PBDE-47 引起的氧化应激重要手段之一。

PBDE-47 处理后,肝胰脏中 *AwHSP70* mRNA 水平上调表现出时间依赖模式,提示这种模式与动物的代偿机制相关。动物长期暴露在 PBDE-47 环境中,机体通过适应性机制处理应激效应,并逐渐恢复细胞稳态。作为一种细胞内的分子伴侣,*HSP70* 参与细胞内外免疫调控并保护细胞免受环境应激损害,*HSP70* 表达常表现出时间和剂量依赖性模式。铜、镉和 180CST 燃料油等重金属和其他化学物质

处理后,紫贻扇贝肝胰脏中 *HSP70* 表现出时间依赖性的上调模式。涡鞭毛虫毒素处理虾夷扇贝后, *HSP70* 表达水平呈现出时间依赖性上调模式。太平洋牡蛎高温条件下 *HSP70* 表达水平呈时间依赖性上调模式。苯并芘处理后,菲律宾哈仔消化腺中 *HSP70* 和 *HSP90* 表达水平显著上调,其绝对表达水平呈现时间和剂量依赖性反应。

整个实验过程中,背角无齿蚌鳃中 *AwHSP70* 表达呈现倒 U 型曲线,早期上调,中期达到峰值,晚期下降,提示这种现象可能与动物应对持续产生氧化应激的耐受能力有关。随着 PBDE-47 处理时间延长, PBDE-47 在体内不断蓄积,将不断产生 ROS,导致细胞应对不断增加的氧化应激效应。机体通过上调 *HSP* 表达的方式减少错折叠蛋白质的产生,增强耐受性<sup>[29]</sup>。一旦 PBDE-47 处理后氧化应激水平达到峰值并超出细胞耐受能力,巨大应激效应将导致慢性损伤、炎症和细胞凋亡<sup>[30-31]</sup>。这种情况下,如果动物丧失产生新细胞去补偿死亡细胞的能力,活细胞数量将逐渐降低<sup>[32-33]</sup>。由此, PBDE-47 处理后 *AwHSP70* 表达水平呈现出倒 U 型曲线变化趋势。

值得注意的是,水蚤  $LC_{50}$  急性毒性结果显示, PBDE-28、PBDE-47、PBDE-99 和 PBDE-100 呈现出不同的毒性效应,其原因与这些物质的亲脂性有关。其中 PBDE-47、PBDE-99 和 PBDE-100 具有明显的高亲脂性,呈现出较强的毒性效应<sup>[34]</sup>。由此,为了系统分析 PBDE-47 对背角无齿蚌和淡水生物的毒性效应,需要从多个基因靶点和多个靶组织予以分析。总之,本研究首次从背角无齿蚌中克隆出 *AwHSP70* cDNA 序列,该序列包含 *HSP70* 家族高度保守的标签序列。PBDE-47 处理可显著上调肝胰脏、鳃和血淋巴中 *AwHSP70* 表达水平, *AwHSP70* 转录水平上调与提高动物的耐受性和适应能力密切相关。

通讯作者简介:夏西超(1977—),男,博士,教授,研究方向为环境毒理学,在 SCI 期刊上发表学术论文 20 余篇。

#### 参考文献 (References):

- [1] Santoro M G. Heat shock factors and the control of the stress response [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2000, 5 (9): 55-63
- [2] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein [J]. *Science*, 2002, 29(5): 1852-1858

- [3] Kregel K C. Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance [J]. *Journal of Applied Physiology*, 2002, 9(2): 2177-2186
- [4] Young J C. Mechanisms of the HSP70 chaperone system [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2010, 8(8): 291-300
- [5] Mayer M P, Bukau B. HSP70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 6(2): 670-684
- [6] Liu T, Pan L, Cai Y, et al. Molecular cloning and sequence analysis of heat shock proteins 70 (HSP70) and 90 (HSP90) and their expression analysis when exposed to benzo(a)pyrene in the clam *Ruditapes philippinarum* [J]. *Gene*, 2015, 55(5): 108-118
- [7] Xu Y, Zheng G, Dong S, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *HSP60*, *HSP70* and *HSP90* in the golden apple snail, *Pomacea canaliculata* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 4(1): 643-653
- [8] Krenek S, Schlegel M, Berendonk T U. Convergent evolution of heat-inducibility during subfunctionalization of the *HSP70* gene family [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2013, 1(3): 1-15
- [9] Liu H H, He J Y, Chi C F, et al. Differential *HSP70* expression in *Mytilus coruscus* under various stressors [J]. *Gene*, 2014, 54(3): 166-173
- [10] Berton P, Lana N B, Ríos J M, et al. Altamirano, state of the art of environmentally friendly sample preparation approaches for determination of PBDEs and metabolites in environmental and biological samples: A critical review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 90(5): 24-41
- [11] Xia X, Huang C, Zhang D, et al. Molecular cloning, characterization, and the response of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase to PBDE-47 and -209 from the freshwater bivalve *Anodonta woodiana* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 5(1): 200-210
- [12] Freeman B C, Myers M P, Schumacher R, et al. Identification of a regulatory motif in HSP70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1 [J]. *The EMBO Journal*, 1995, 1(4): 2281-2292
- [13] Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the HSP70-HSP90 multichaperone machine [J]. *Cell*, 2000, 10(1): 199-210
- [14] Demand J, Luders J, Hohfeld J. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 1(8): 2023-2028
- [15] Irmidayanti Y. Toxicity and traces of Hg, Pb and Cd in the hepatopancreas, gills and muscles of *Perna viridis* from Jakarta Bay, Indonesia [J]. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2015, 1(8): 94-98
- [16] Piazza R S, Trevisan R, Flores-Nunes F, et al. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 17(7): 146-155
- [17] Guo X, He Y, Zhang L, et al. Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 4(6): 107-119
- [18] Maria V L, Bebianno M J. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2011, 15(4): 56-63
- [19] Cheng J, Xun X, Kong Y, et al. *HSP70* gene expansions in the scallop *Patinopecten yessoensis* and their expression regulation after exposure to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 5(8): 266-273
- [20] Zhu Q, Zhang L, Li L, et al. Expression characterization of stress genes under high and low temperature stresses in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Marine Biotechnology (NY)*, 2016, 1(8): 176-188
- [21] Chen H, Zha J, Liang X, et al. Sequencing and de novo assembly of the Asian clam (*Corbicula fluminea*) transcriptome using the Illumina GAIIx method [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): 795-816
- [22] Gourdon I, Gricourt L, Kellner K, et al. Characterization of a cDNA encoding a 72 kDa heat shock cognate protein (Hsc72) from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *DNA Sequence*, 2000, 1(1): 265-270
- [23] Rathinam A V, Chen T T, Grossfeld R M. Cloning and sequence analysis of a cDNA for an inducible 70 kDa heat shock protein (HSP70) of the American oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. *DNA Sequence*, 2000, 1(1): 261-264
- [24] Piano A, Valbonesi P, Fabbri E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2004, 8(9): 134-142
- [25] Franzellitti S, Fabbri E. Differential *HSP70* gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 33(6): 1157-1163
- [26] Song L, Wu L, Ni D, et al. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck



- 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 2(1): 335-345
- [27] Yue X, Liu B, Sun L, et al. Cloning and characterization of a *HSP70* gene from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* which is involved in the immune response against bacterial infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 791-799
- [28] Sanders B M. Stress proteins in aquatic organisms: An environmental perspective [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 1993, 2(3): 49-75
- [29] Lozano-Sepulveda S A, Bryan-Marrugo O L, Cordova-Fletes C, et al. Oxidative stress modulation in hepatitis C virus infected cells [J]. *World Journal of Hepatology*, 2015, 8(7): 2880-2889
- [30] Calabrese E J. U-shaped dose response in behavioral pharmacology: Historical foundations [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2008, 3(8): 591-598
- [31] Soldatov A A, Gostyukhina O L, Golovina I V. Antioxidant enzyme complex of tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. under normal and oxidative-stress conditions: A review [J]. *Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiologiya*, 2007, 4(3): 621-628
- [32] Pipe R K, Coles J A, Carissan F M, et al. Copper induced immunomodulation in the marine mussel *Mytilus edulis* [J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, 4(6): 43-54
- [33] De Zoysa M, Pushpamali W A, Oh C, et al. Transcriptional up-regulation of disk abalone selenium dependent glutathione peroxidase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative stress and *Vibrio alginolyticus* bacterial infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 2(5): 446-457
- [34] Davies R, Zou E. Polybrominated diphenyl ethers disrupt molting in neonatal *Daphnia magna* [J]. *Ecotoxicology*, 2012, 2(1): 1371-1380 ◆