

· 动物及兽医生物技术 ·

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

刘婷婷, 郭晶晶, 陈兆东, 刘玉芬*, 井乐刚, 刘鹏*, 赵文阁

哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025

刘婷婷, 郭晶晶, 陈兆东, 刘玉芬, 井乐刚, 刘鹏, 赵文阁. 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[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1710-1730.

LIU Tingting, GUO Jingjing, CHEN Zhaodong, LIU Yufen, JING Legang, LIU Peng, ZHAO Wenge. Identification of heat shock protein *hsp70* family genes from *Rana amurensis* and its expression profiles upon infection[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1710-1730.

摘要: 热休克蛋白(heat shock protein, HSPs)是一类广泛存在于各类生物体中高度保守的应激蛋白, 当生物体受到环境中物理、化学和生物等因素的刺激时, 机体出于自我保护会迅速产生应激反应, 合成该类蛋白, 从而减少外界刺激对机体的损伤, 提高自身抵抗能力, HSP70 是该家族的重要成员。为探究 HSP70 在两栖类抗感染中的作用, 以黑龙江林蛙(*Rana amurensis*)作为研究对象, 基于同源克隆的方法, 采用反转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)技术克隆 *Ra-hsp70* 家族基因; 采用生物信息学方法对 *Ra-hsp70* 家族基因进行序列特征、立体结构、亲缘关系的分析; 再利用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR)技术对 *Ra-hsp70* 家族基因在细菌感染下的表达谱进行分析; 应用免疫组织化学技术对 HSP70 蛋白进行表达和定位分析。结果表明, 获得的 *Ra-HSP70* 家族的 4 个成员 HSP70、HSPA5、HSPA8 和 HSPA13 均包含有 3 段保守的 HSP70 家族标签序列, 属于典型的 HSP70 家族成员; 4 个成员在系统发育树中分布在 4 个不同的分支, 且含有相同亚细胞定位基序的成员分布在同一分支; 感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, *Ah*)后, *Ra-hsp70* 家族基因的 4 个成员的相对表达量均出现显著上调($P < 0.01$), 但是在不同组织中到达峰值的时间不同。免疫组织化学法检测到 HSP70 蛋白在肝脏、肾脏、皮肤和胃组织的胞质中均有不同程度表达。*Ra-hsp70* 家族基因的 4 个成员能够不同程度地响应细菌感染, 推测参与了机体对抗致病菌侵染的生物学过程, 并在其中发挥不同的生物学作用, 为两栖类 HSP70 基因的功能研究提供了理论基础。

关键词: 黑龙江林蛙; HSP70 家族; 序列分析; 嗜水气单胞菌; 表达谱

资助项目: 黑龙江省自然科学基金(LH2021C053)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (LH2021C053).

*Corresponding authors. LIU Yufen, Tel: +86-451-88060784, E-mail: liuyufen@hrbnu.edu.cn;

LIU Peng, Tel: +86-451-88060784, E-mail: liupeng111111@163.com

Received: 2022-08-14; Accepted: 2022-11-10; Published online: 2022-11-14

Identification of heat shock protein *hsp70* family genes from *Rana amurensis* and its expression profiles upon infection

LIU Tingting, GUO Jingjing, CHEN Zhaodong, LIU Yufen*, JING Legang, LIU Peng*, ZHAO Wenge

College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, Heilongjiang, China

Abstract: Heat shock proteins (HSPs) widely exist in all organisms, the structures of which are usually extraordinarily conservative. They are also well-known stress proteins that are involved in response to physical, chemical and biological stresses. HSP70 is an important member of the HSPs family. In order to study the roles of amphibians HSP70 during infection, the cDNA sequence of *Rana amurensis hsp70* family genes were cloned by homologous cloning method. The sequence characteristics, three-dimensional structure and genetic relationship of *Ra-hsp70s* were analyzed by bioinformatics methods. The expression profiles under bacterial infection were also analyzed by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). Expression and localization of HSP70 protein were tested by immunohistochemical techniques. The results showed that three conservative tag sequences of HSP70 family, HSPA5, HSPA8 and HSPA13, were found in HSP70. Phylogenetic tree analysis indicated four members are distributed in four different branches, and members with the same subcellular localization motif are distributed in the same branch. The relative expression levels of the mRNA of four members were all significantly upregulated ($P < 0.01$) upon infection, but the time for up-regulating the expression levels were diverse in different tissues. The immunohistochemical analysis showed that HSP70 was expressed to different degrees in the cytoplasm of liver, kidney, skin and stomach tissue. The four members of *Ra-hsp70* family have ability to respond bacterial infection to varying degrees. Therefore, it was proposed that they are involved in biological processes against pathogen and play different biological functions. The study provides a theoretical basis for functional studies of HSP70 gene in amphibians.

Keywords: *Rana amurensis*; HSP70 family; sequence analysis; *Aeromonas hydrophila*; expression profiles

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一类生物体内普遍存在、进化上高度保守的蛋白质家族。当生物体遭受到各种不利因素(高温/低温、细菌/病毒感染、缺氧/缺血等)的胁迫时,会大量合成该类蛋白^[1],故又称为应激蛋白。研究表明,HSPs能广泛地参与转录调控、生物基质的稳定、蛋白质的折叠及跨膜运输等生物学过程^[2]。作为生物体内重要的分子伴侣,HSPs

在细胞内外对免疫系统具有双向调节作用。胞内的HSPs可作为细胞在免疫应激条件下的胞内危险信号,将机体受到外源病原体感染、癌变等的信号传递给免疫系统,使其能够做出相应的应答反应;还可通过抑制核转录因子 κ B(nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B)信号通路的活化缓解胞内炎症反应。胞外HSPs来源于胞内HSPs的释放^[3],即长期应激和细胞凋亡会触

发 HSPs 从胞内主动或被动释放,从而增强免疫功能、激发自身免疫反应。胞外的 HSPs 可通过与抗原肽结合形成复合物,抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)可通过 HSP 受体介导的内吞作用对 HSP-抗原肽复合物进行摄取,从而增加细胞外环境中抗原和 APC 之间交叉呈递的有效性,在此基础上介导 T 淋巴细胞的活化。这些活化的细胞是机体清除感染、抵御癌症的主要力量^[4-5]。

HSPs 根据序列同源性和分子量的不同可分为 HSP110、HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和小 HSP 家族^[6]。其中 HSP70s 是进化中最保守、表达量最高的蛋白家族之一,包括诱导型和组成型 2 个亚家族成员^[7-8]。组成型 HSP70 (heat shock cognate protein 70, HSC70)属于胞内结构蛋白,主要参与细胞的分裂、增殖、发育等生理过程^[9];诱导型 HSP70 在应激条件下可被高度诱导,主要发挥分子伴侣功能,协助蛋白质正确折叠,参与应激保护、提高其对环境胁迫的耐受性^[10-11]。HSP70 家族蛋白包括 3 个功能结构域:N-末端核苷酸结合域(N-terminal nucleotide binding domain, NBD)也称为 ATP 酶域;C-末端底物结合域(substrate binding domain, SBD)也称为肽结合域;近 C 端氨基酸序列多变的 C-端结构域,空间结构类似于主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)的结合肽域^[12-13]。目前关于 HSP70 功能的研究主要集中于对温度胁迫的响应,响应病原微生物感染的研究较少。生存环境的特殊性使两栖类更易受到病原菌的侵染等不良因素的胁迫,鉴于 HSP70 在抗逆胁迫中的重要作用,开展两栖类 HSP70 功能的研究显得十分必要。

黑龙江林蛙(*Rana amurensis*)隶属于两栖纲无尾目蛙科(Ranidae)林蛙属(*Rana*),国内主要

分布于东北三省和内蒙古地区,属于可以抵御寒冷条件的东北地区优势物种^[14-15]。其皮肤富含腺体,能分泌大量的生物活性物质^[16],雌蛙的输卵管也可以入药^[17],作为名贵食材和中药材,具有较高的经济价值和药用价值,被列为东北地区重要的经济蛙类^[15]。随着掠夺式的捕捉和生态环境的不断恶化,野生黑龙江林蛙种群数量锐减,人工养殖在林区逐渐兴起,但养殖过程中容易受到病原体的侵袭^[18-19],引发蛙患上致死率较高的败血症(又称红腿病),嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)就是主要致病菌之一^[20-21]。本研究以我国东北部特有的两栖物种黑龙江林蛙作为研究对象,通过构建嗜水气单胞菌的感染模型,拟对感染后的黑龙江林蛙不同时间点、不同组织中的 *Ra-hsp70* 家族基因的转录情况进行检测,再结合免疫组织化学法对 HSP70 蛋白在不同组织中的表达谱进行分析,从而对 *Ra-hsp70* 家族基因在感染条件下的表达特性进行分析,以期为 HSP70 基因在细菌感染中的免疫功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及菌株

人工养殖的健康成体黑龙江林蛙[(20±5) g]。嗜水气单胞菌株 DW1701-1909 (Ah)由本实验室分离鉴定。传代培养后通过平板计数法测定菌液浓度,并分别制备 1.0×10^7 、 1.5×10^7 、 1.0×10^8 和 1.0×10^{10} CFU/mL 共 4 个浓度梯度的菌悬液。采用腹腔注射法,暂养 1 周,每天观察,确定黑龙江林蛙的半数致死剂量(median lethal dose, LD_{50})为 1.5×10^7 CFU/mL。

1.1.2 试剂及仪器

主要试剂:克隆载体 pMD18-T 和高效大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,宝生物工程(大连)

有限公司; DL2000 marker、Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTPs、琼脂糖胶回收试剂盒、TRIzol 试剂盒、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞(Vazyme)生物科技有限公司; 10%正常山羊血清工作液(C01-3001)、兔抗 HSP70 多克隆抗体(bs-0244R)、羊抗兔 HRP (bs-40295G-HRP), 博奥森生物技术(北京)有限公司; 10%福尔马林固定液、苏木精染色液和其他试剂均为国产分析纯。

主要仪器: 高速冷冻离心机(Allegra-64R, Beckman); PCR 扩增仪(T-Gradient, Biometra); 凝胶成像系统(Smart Gel III, 北京赛智创业科技有限公司); 组织切片机(820 型, Nikon); ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(Thermo); 电子显微镜(Nikon FX-35, Nikon)。

1.2 试验方法

1.2.1 黑龙江林蛙感染模型的构建和样品采集

依据参考文献[22], 对本实验室保存的嗜水气单胞菌种进行复苏, 通过预实验确定菌悬液浓度为 1.5×10^7 CFU/mL。选取 36 只黑龙江林蛙随机分为对照组和试验组, 每组 18 只, 设 3 个平行。对照组和试验组均采用腹腔注射法注射等体积(1 mL)的 LB 液体培养基和嗜水气单胞菌悬液(1.5×10^7 CFU/mL)。分别于注射后的 8、16、24、36、48 和 72 h 共 6 个时间点采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、皮肤、肌肉和胃 8 个组织样品, 进行液氮速冻并保存在 -80°C 冰箱备用。每个时间点选取 3 只蛙重复取材, 实验期间无实验蛙的死亡。黑龙江林蛙按照美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)实验室动物护理和使用指南的建议实施计划。本研究方案已由哈尔滨师范大学生命科学与技术学院动物实验伦理委员会(编号: HNUARIA2021002)审核通过。

1.2.2 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

用 Trizol 法提取黑龙江林蛙对照组和试验组 6 个时间点 8 种组织样品的总 RNA, 用紫外分光光度计(Beckman)定量检测总 RNA 的浓度, 采用 1%的水平式琼脂糖凝胶电泳定性检测其质量。对质量合格的总 RNA 再按照反转录试剂盒操作步骤, 合成 cDNA 第一链, cDNA 保存于 -20°C , 用于后续实验过程。

1.2.3 引物的设计与合成

根据 NCBI 数据库中已发表的中国林蛙 *hsp70*、*hspa5*、*hspa8* 和 *hspa13* 的序列(GenBank 登录号分别为: XM_040323479.1、XM_040324885.1、XM_040326389.1、XM_040338799.1), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物, 再根据获得的黑龙江林蛙 HSP70 蛋白家族基因序列设计荧光定量引物, 内参引物依据参考文献[19]获得, 用于后续 qRT-PCR。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列详情见表 1。

1.2.4 *Ra-hsp70* 家族基因的克隆及生物信息学分析

以上述心脏组织的 cDNA 第一链为模板, 按照 Taq plus DNA 聚合酶说明书进行 PCR 反应体系的配置, 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 约 55°C 退火 30 s (家族不同基因退火温度不同, 见表 1), 72°C 延伸 30 s, 32 个循环; 72°C 终延伸 10 min。用胶回收试剂盒对获得的 PCR 产物进行回收纯化, 与 pMD18-T 载体进行连接后转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 经菌落 PCR 鉴定, 进行序列测定。通过多轮 PCR 扩增获得 *Ra-hsp70* 家族基因的序列片段。使用 NCBI 在线网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)进行同源基因的查找和下载。利用 DNAMAN5.0 软件对测序结果进行拼接, 然后输入 NCBI 数据库进行 BLAST 比对分析。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Purpose or length (bp)
HSP70-F1	CACAGCGATCATATCACAGC	582
HSP70-R1	TTGAGTCCAGCGATTACCC	
HSP70-F2	GATCATCGCCAACGACCAG	1 263
HSP70-R2	GCTCGCTCGCCTTCATACA	
HSP70-F3	GGGGCTCTACACGTATTCC	1 082
HSP70-R3	GACTTGTTTGACATTTTCCTATT	
HSPA5-F1	CTGATTCCGAAACCGACTG	632
HSPA5-R1	CATCCTTTGTGGCTTGACG	
HSPA5-F2	CGTGATTGGCATTGATTTG	1 900
HSPA5-R2	CAGTAGCCAAAGGGTCATA	
HSPA8-F1	CCGTCATTCTTCTCATT	397
HSPA8-R1	GGGTCTTCCTCCATCACTAA	
HSPA8-F2	TTAGTGATGGAGGAAGACCC	1 816
HSPA8-R2	CAGGCAGATGGAGTGGATT	
HSPA13-F1	CATCAGTGAGCGGAGCAGG	171
HSPA13-R1	TGGAGTGGGCATAGGCAAA	
HSPA13-F2	TTTGCCTATGCCACTCCA	1 211
HSPA13-R2	TTGCCACTCCTATCACTACAGC	
HSPA13-F3	CAGCAAGGAGCCCAACAC	277
HSPA13-R3	ATACATTCCAGGAAAGTCT	
HSP70-F-Q	ATGTGGCTCCTCTTTCCTTG	qRT-PCR analysis
HSP70-R-Q	GGTTGTCTGAATAGGTGGTGAA	
HSPA5-F-Q	GAACCATCTCGTGGCATT	qRT-PCR analysis
HSPA5-R-Q	CACCACCAACAGTTTCAATAC	
HSPA8-F-Q	AACCACGCCAGTTATGT	qRT-PCR analysis
HSPA8-R-Q	TTCAAACCTGCGCCAAT	
HSPA13-F-Q	AAACCTTTACCGTCACCC	qRT-PCR analysis
HSPA13-R-Q	GTTGCGCTGTCTTTCATC	
β-actin-F	AAGAATGAGGGCTGGAACA	qRT-PCR analysis
β-actin-R	GTGCGTGACATCAAGGAGAAGC	

利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)、SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)、SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)等在线软件对 *Ra-hsp70* 家族基因进行生物信息学分析及蛋白质三维结构的预测。利用 ClustalW 软件对黑龙江林蛙与参考物种的氨基酸序列进行同源性比对,使用 MEGA-X 软件

中的邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统进化树(bootstrap 重复 1 000 次)。

1.2.5 *Ra-hsp70* 家族基因的定量表达分析

以未处理的黑龙江林蛙不同组织(心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、皮肤、肌肉和胃)以及不同时间点(8、16、24、36、48、72 h) cDNA 为模板,采用 SYBR GreenI 嵌合荧光法检测 *Ra-hsp70* 家族基因的转录情况。每个生物样品

重复3次,技术重复3次。以 β -actin作为内参基因, qRT-PCR的引物和内参特异性引物见表1。反应体系如下: 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, 50×ROX Reference Dye2 0.4 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L (10 μ mol/L, 表1), cDNA模板 1 μ L, ddH₂O 7.8 μ L。反应条件为: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40个循环; 72 °C 10 min, 获得溶解曲线。*HSP70*家族基因的 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算,利用 SPSS25 软件采用单因素方差分析法(one-way analysis of variance, ANOVA)分析其相对表达量,统计学意义为 $P<0.01$ 或 $P<0.05$,利用 Graphpad Prism8 软件进行作图。

1.2.6 黑龙江林蛙 HSP70 蛋白的免疫组织化学检测

选取黑龙江林蛙对照组和试验组 8、16、24、36、48 和 72 h 的肝脏、肾脏、皮肤和胃组织,用 10%福尔马林固定液固定 24 h,乙醇脱水后采用石蜡包埋法进行处理,切片厚度在 5 μ m 左右,然后用于免疫组化实验。二甲苯脱蜡处理后用 3%过氧化氢(97 mL+3 mL 30% H₂O₂)室温避光孵育 30 min,以消除内源性过氧化物酶的活性;用 0.01 mol/L 的柠檬酸缓冲液微波加热进行抗原修复;10%正常山羊血清封闭 30 min,甩去多余液体,勿洗;滴加 250 倍稀释兔抗 HSP70 多抗(bs-0244R),4 °C 过夜孵育,取出后 37 °C 复温 45 min;滴加 1:2 000 HRP 标记的羊抗兔二抗 IgG (bs-40295G-HRP),在 37 °C 温箱孵育 30–60 min;DAB 避光显色数分钟;苏木精复染、脱水透明后中性树胶封片。显微镜下观察 HSP70 蛋白的表达,用显微成像系统拍照记录,每个样品选择 3 个阳性区域进行拍照,利用 Image J 软件对数据结果进行相对平均光密度分析,SPSS25 分析其显著性。

2 结果与分析

2.1 *Ra-hsp70* 家族基因的克隆

以黑龙江林蛙心脏组织的 cDNA 为模板,进行目的条带的扩增。根据中国林蛙 *hsp70*、*hspa5*、*hspa8* 和 *hspa13* 四条序列设计特异性引物(表 1),通过分段克隆的方法,分别获得了跨度为 582、1 263 和 1 082 bp 的 3 段 *hsp70* 的片段(图 1: A1–A3);跨度为 632 bp 和 1 900 bp 的 2 段 *hspa5* 的片段(图 1: B1–B2);跨度为 397 bp 和 1 816 bp 的 2 段 *hspa8* 的片段(图 1: C1–C2)以及跨度为 171、1 211 和 277 bp 的 3 段 *hspa13* 的片段(图 1: D1–D3)。再通过 DNAMAN 软件拼接得到黑龙江林蛙 *hsp70* 的全编码区 1 920 bp、*hspa5* 的全编码区 1 962 bp、*hspa8* 的全编码区 1 944 bp 和 *hspa13* 的全编码区 1 383 bp,4 条序列均已提交至 NCBI 数据库,登录号分别为: MZ736885、ON540145、ON540147 和 ON540149,与已发表的中国林蛙 *hsp70*、*hspa5*、*hspa8* 和 *hspa13* 核苷酸序列的一致性均达到 97% 以上。上述所有片段的克隆均经过菌落 PCR 鉴定,PCR 结果条带单一清晰,与预期片段大小相符。

2.2 *Ra-hsp70* 家族基因的分析

2.2.1 *Ra-hsp70* 家族基因的氨基酸序列分析

序列拼接后得到黑龙江林蛙 *hsp70*、*hspa5*、*hspa8* 和 *hspa13* 的完整编码区(coding sequence, CDS)序列,分别编码 639、653、647 和 460 个氨基酸残基。对上述氨基酸序列进行分析,可知预测到的蛋白质相对分子量分别为 70.44、72.20、70.87 和 51.24 kDa;理论等电点分别为 5.73、5.06、5.37 和 5.63;运用 SOPMA 软件分析表明,4 种蛋白的二级结构包含的 α -螺旋分别占 41.78% (267 aa)、43.64% (285 aa)、42.04% (272 aa)和 37.83% (174 aa), β 折叠分别占 6.73%

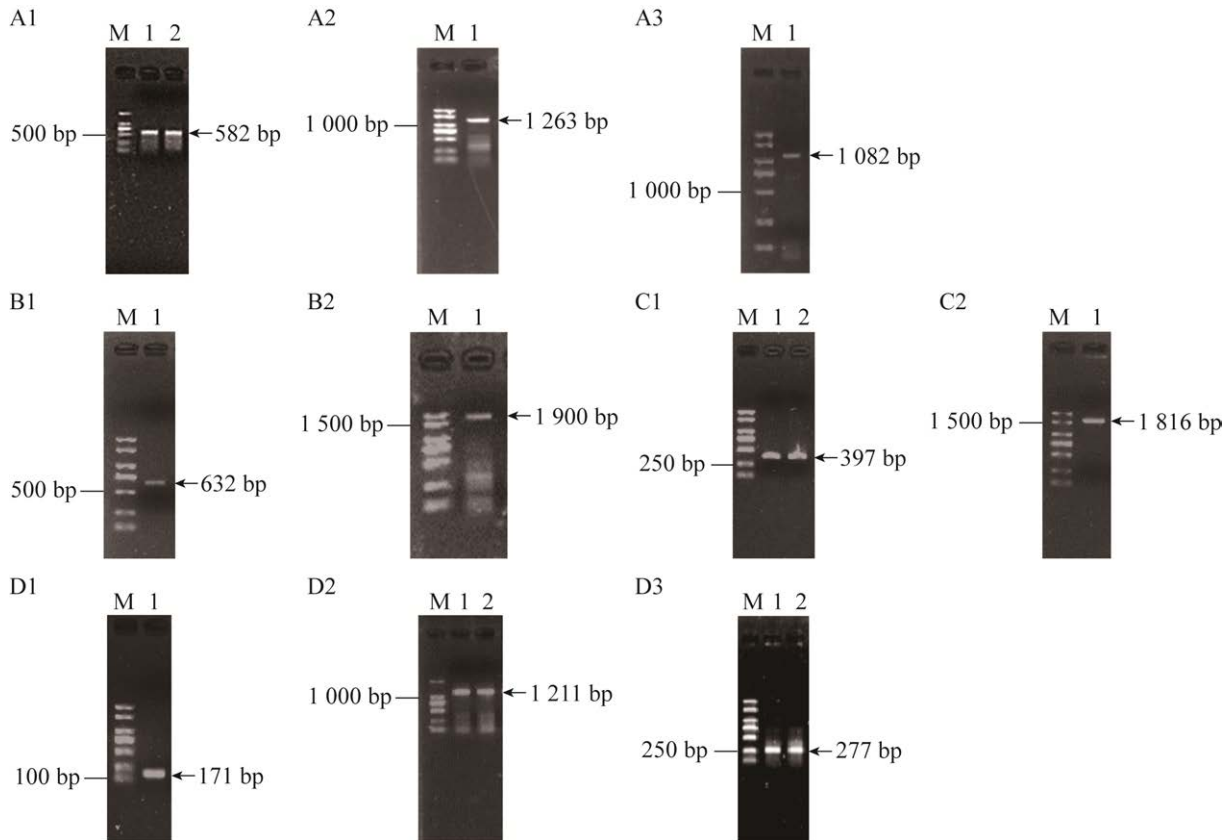


图 1 黑龙江林蛙 *hsp70* 家族基因的扩增

Figure 1 Amplification of *hsp70* family genes in *Rana amurensis*. PCR amplification of *hsp70* (A1–A3), *hspa5* (B1–B2), *hspa8* (C1–C2), *hspa13* (D1–D3) fragments of *R. amurensis*. M: DL2000 marker; Lines 1–2 (arrow indicated): PCR products.

(43 aa)、7.2% (47 aa)、6.8% (44 aa)和 6.3% (29 aa), 无规卷曲分别占 32.24% (206 aa)、30.32% (198 aa)、32.77% (212 aa)和 34.35% (158 aa), 延伸链分别占 19.25% (123 aa)、18.84% (123 aa)、18.39% (119 aa)和 21.52% (99 aa);通过 Hphob./Kyte & Doolittle 算法作图(图 2A–2D, 正值表示疏水性, 负值表示亲水性, 峰值越高强度越大), 发现图像中大部分都位于小于 0 的一侧, 可以确定家族中 HSP70、HSPA5、HSPA8 和 HSPA13 均为酸性亲水蛋白。

对 *Ra-hsp70* 家族基因的 4 条氨基酸序列进行多序列比对, 发现其均具有 HSP70 家族 3 段典型的特征标签序列, 分别为集中在 N 端部分

的保守肽段 GIDLGTTYSCV 和 2 个位于序列中心部分的保守区域 FDLGGGTFDVS 和 VLVGGSTRIPK。在 HSP70 和 HSPA8 的氨基酸序列中存在非细胞器特征的基序 RARFEEL 和 C-末端的典型胞质型标志性基序 EEVD, 表明这 2 种蛋白质具有胞质型热激蛋白氨基酸特征, 属于定位于细胞质中的胞质蛋白; HSPA5 的氨基酸序列 C-末端具有内质网靶向序列 KDEL, 表明该蛋白质具有内质网型热激蛋白氨基酸特征, 属于内质网型热激蛋白, 又称葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, Grp78)。上述结果与亚细胞定位预测的分析结果相一致。此外, HSP70、HSPA5 和 HSPA8 的

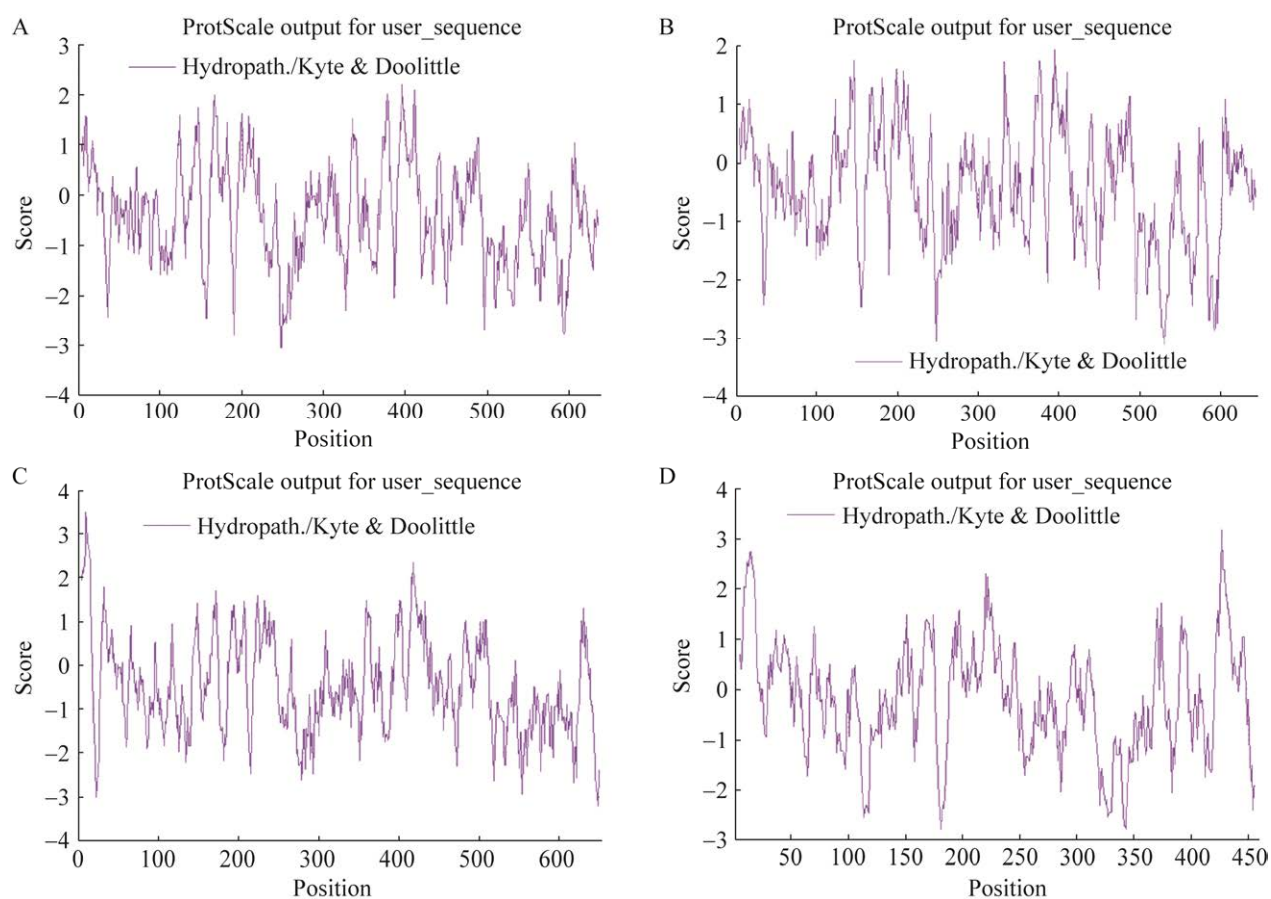


图 2 黑龙江林蛙 HSP70 家族氨基酸亲疏水性分析

Figure 2 Hydrophilicity analysis of the amino acids of HSP70 family proteins from *Rana amurensis*. A: HSP70. B: HSPA8. C: HSPA5. D: HSPA13. The positive value indicate hydrophobicity, the negative value indicate hydrophilicity.

C 末端分别具有 1 个和 4 个 GGXP 四肽序列, HSPA13 的 C-末端均不具有该序列(图 3)。通过 BLAST 分析软件对序列进行比对后发现,黑龙江林蛙 HSP70 家族的 4 个成员 HSP70、HSPA5、HSPA8 和 HSPA13 之间的氨基酸序列相似性为 60.58%, 其中 HSP70 与 HSPA5 和 HSPA8 的序列相似性分别为 58.95% 和 82.72%, 而 HSP70 与 HSPA13 的序列相似性为 22.92% (图 3), 表明在同一物种中, 分布在相同细胞区室内的 HSP70 之间相似度更高;黑龙江林蛙的 HSP70、HSPA5、HSPA8 和 HSPA13 的 4 条氨基酸序列分别与中国林蛙相应的 HSP70 (XP_040179413.1)、

HSPA5 (XP_040180819.1)、HSPA8 (XP_040182323.1) 和 HSPA13 (XP_040194733.1) 的氨基酸序列具有最高相似性(98.12%、99.06%、99.02%和 98.04%), 表明黑龙江林蛙与中国林蛙的亲缘关系十分相近。

2.2.2 Ra-HSP70 家族蛋白的三维结构预测

采用 SWISS-MODEL 在线工具对蛋白三维结构进行模拟预测, 以牛(*Bos taurus*) Hsc70 (PDB 登录号: 7o6r)为模板预测 *hsp70* 和 *hspa8* 编码蛋白的三维结构(图 4A、4B), 以人(*Homo sapiens*)的 GRP78 (PDB 登录号: 5e84)和 HSPA2 (PDB 登录号: 5fpm)为模板预测 *hspa5* 和 *hspa13*

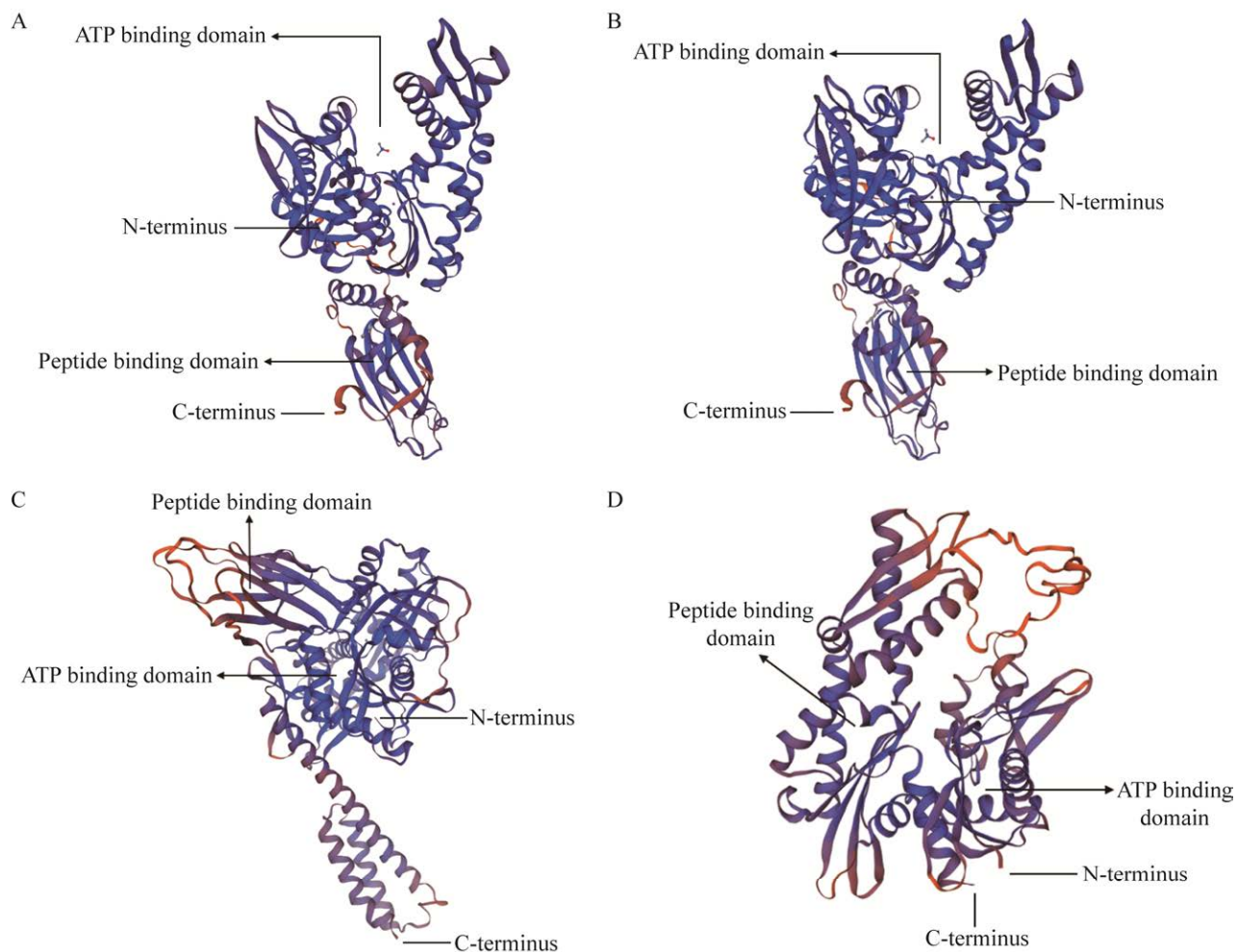


图 4 黑龙江林蛙 HSP70 家族蛋白的三维结构预测

Figure 4 Deduced three-dimensional structure of HSP70 family from *Rana amurensis*. 3-D structure of Ra-HSP70 family designed using Swiss Model workspace. A: HSP70. B: HSPA8. C: HSPA5. D: HSPA13.

编码蛋白的三维结构(图 4C、4D)。结果显示,黑龙江林蛙 HSP70 家族 4 个基因的蛋白三维结构与其他物种的已知 HSP70 十分相似,结构中均包含有 3 个部分,即分子量大小约为 45 kDa、高度保守的 N-末端核苷酸结合域(nucleotide binding domain, NBD)即 ATPase 功能域(ATP binding domain),负责结合和水解 ATP,由 4 个亚域构成 2 个叶状结构,两叶间形成 1 个深槽;靠近 C 端 18 kDa 左右、保守的底物结合域[SBD/也称为肽结合域(peptide binding domain)],具有结合未折叠多肽的功能,由 2 个反向平行的亚

域共同组成,两亚域之间由螺旋结构相连接;氨基酸序列多变的 C 端结构域。

2.3 *Ra-hsp70* 家族基因系统进化树构建

利用 MEGA-X 软件对来自两栖类、哺乳类、爬行类和鱼类等不同物种的 HSP70s 与黑龙江林蛙 HSP70 蛋白家族的氨基酸序列进行聚类分析,使用邻接(NJ)法构建系统发育树以确定 Ra-HSP70 家族成员的进化位置(图 5)。系统进化树显示,Ra-HSP70 家族的 4 个成员在系统发育树中分别类聚到 4 个不同的分支,而人的 HSP70 单独聚为一支。其中含有相同 C 末端标

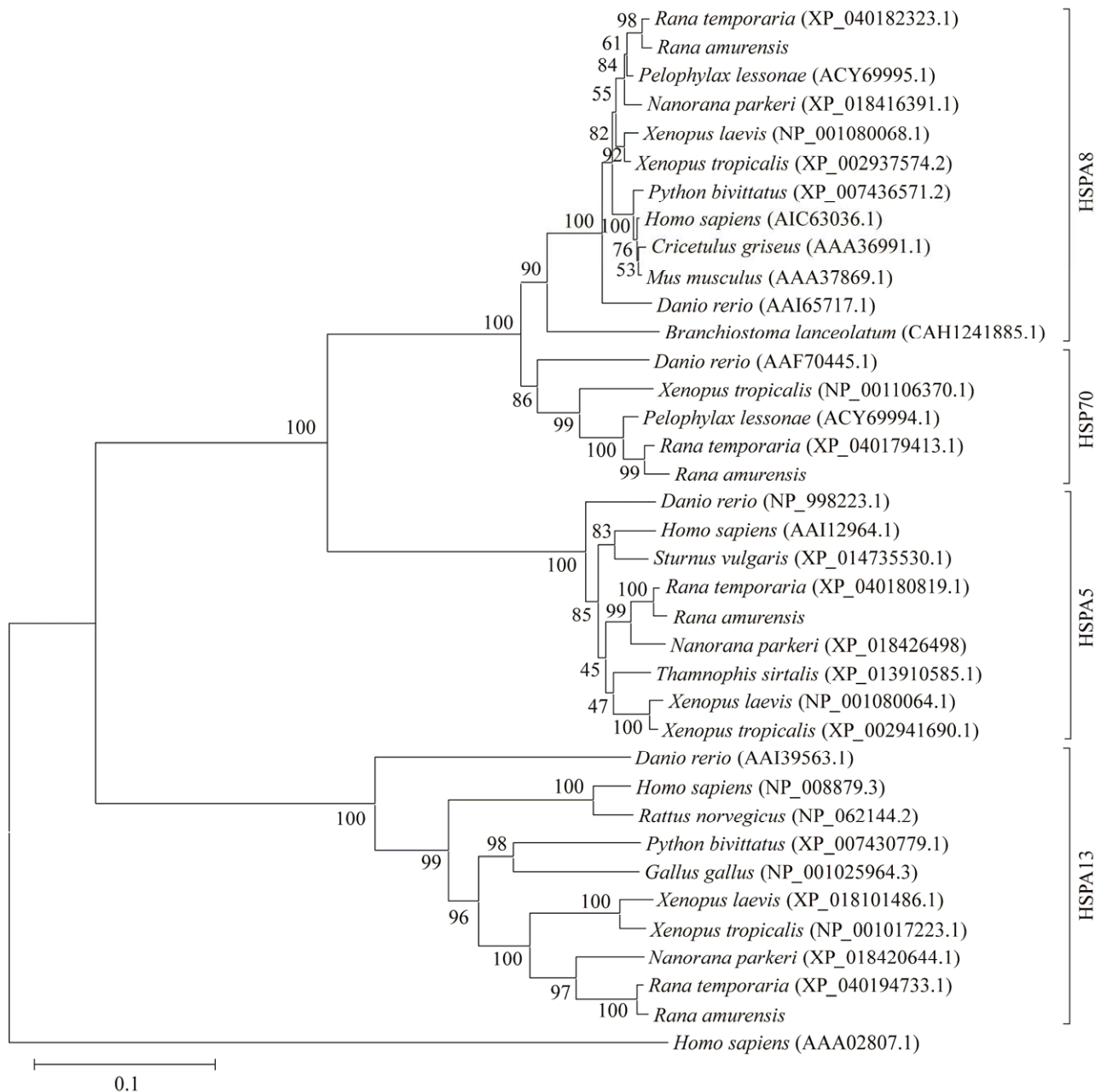


图5 黑龙江林蛙及其他物种 HSP70 家族系统发育进化树

Figure 5 Phylogenetic tree based on putative amino acid residues of HSP70 family between *Rana amurensis* and other reference species. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) method within MEGA-X. Numbers on the branches represent bootstrap values for 1 000 replications.

志性基序的 HSP70 与 HSPA8 又聚在同一大的分支内部,说明黑龙江林蛙的这 2 个 HSP70 家族成员的亲缘关系更为密切。黑龙江林蛙 HSP70 蛋白家族的 4 个成员均与中国林蛙

HSP70 蛋白家族相应的成员单独聚为一小支,序列间一致性均达到 98%以上。与其他参考物种比较来看,黑龙江林蛙 HSP70 蛋白家族的 4 个成员与两栖类 HSP70 蛋白家族相应的成员具有较

高的同源性。不同物种的同一家族成员聚为一支,说明 HSP70 家族成员在不同物种间具有高度的保守性。

2.4 *Ra-hsp70* 家族成员的组织表达谱

qRT-PCR 结果表明, HSP70 家族的 4 个成员在健康成年的黑龙江林蛙的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、皮肤、肌肉和胃中都有不同程度的表达,其中 4 个成员的表达量均在心脏中呈现最低表达水平,故以心脏为最低表达量,即统计标准 1。*hsp70* 在肌肉中的表达量最高

($P<0.01$),胃、皮肤和肾脏次之,在肺脏中表达量最低(图 6A)。*hspa5* 在肾脏中的表达量最高($P<0.01$),肝脏、皮肤和胃次之,在肌肉中表达量最低(图 6B)。*hspa8* 在肾脏中的表达量最高($P<0.01$),胃、皮肤和脾脏次之,在肌肉中表达量最低(图 6C)。*hspa13* 在肾脏中的表达量最高($P<0.01$),皮肤、胃和脾脏次之,在肌肉中表达量最低(图 6D)。HSP70 家族的 4 个成员均在正常的黑龙江林蛙的肾脏、皮肤和胃 3 个组织中呈现高水平表达($P<0.01$)。

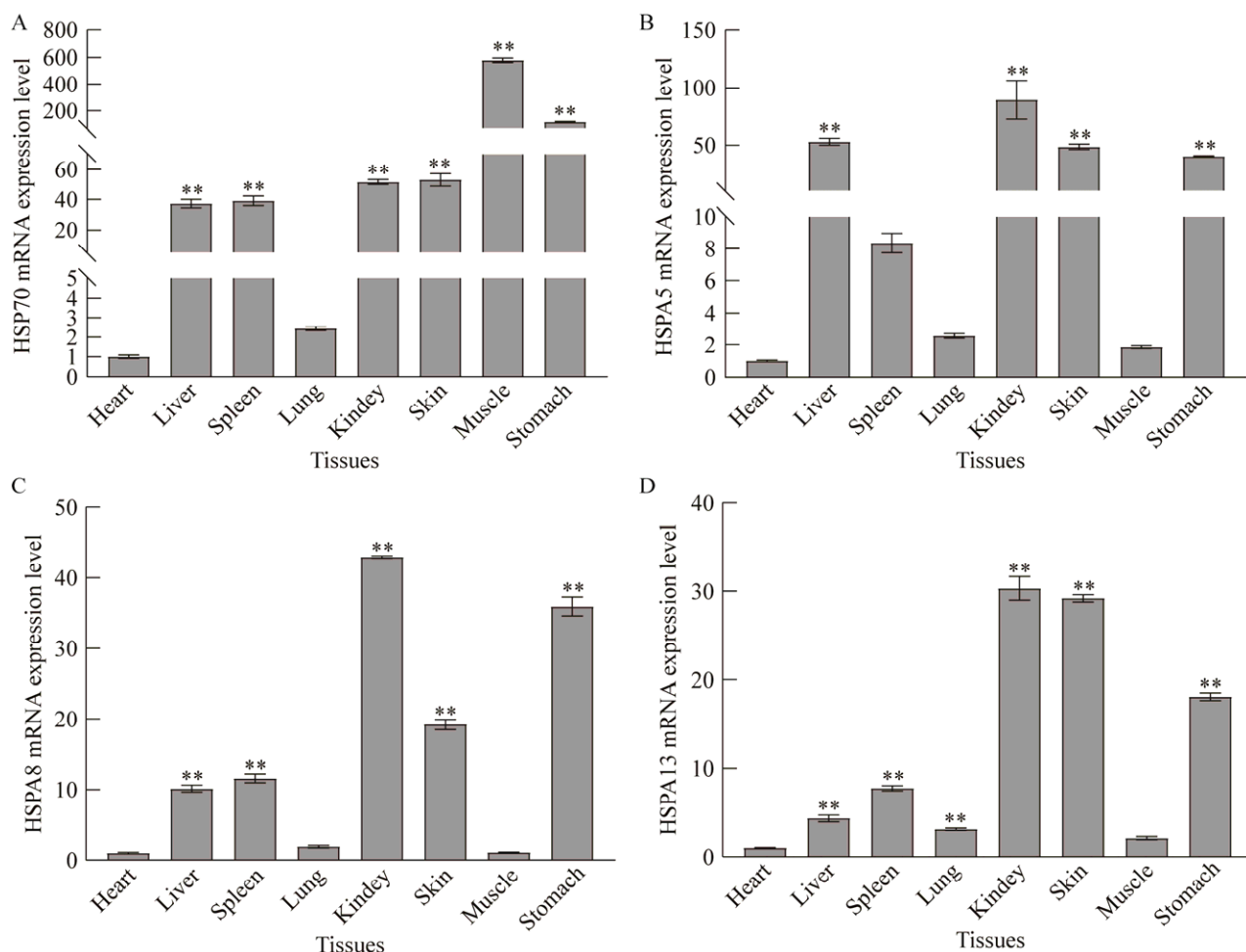


图 6 黑龙江林蛙 HSP70 家族成员在不同组织中的相对表达量

Figure 6 Relative expression of HSP70 family in different tissues of *Rana amurensis*. Graphical presentation of qPCR analysis shows changes in HSP70 family gene expression in healthy *R. amurensis*. All data were normalized by the relative expression for heart. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.5 细菌感染下 *Ra-hsp70* 家族成员在 mRNA 转录水平上的变化

Ah 胁迫后黑龙江林蛙 HSP70 家族的 4 个成员在不同组织中的时序表达情况如图 7 所示, 可见 HSP70 家族的 4 个成员在不同组织不同时间点的表达情况具有时间依赖性和组织特异性。在心脏中, *hsp70* mRNA 的表达在 8 h 显著上调, 16 h 又下调至低于本底水平, 24 h 达到峰值, 为对照组的 2.6 倍 ($P < 0.01$), 36–72 h 的表达量始终低于本底水平; *hspa5* mRNA 的表达量在心脏组织中呈现为 24 h 显著上调后下调, 在 48 h 达到峰值, 为对照组的 3.4 倍 ($P < 0.01$), 72 h 时虽有所下调, 但仍高于本底水平; 心脏组织中, *hspa8* 和 *hspa13* mRNA 的相对表达量, 除 *hspa13* mRNA 在 48 h 时以高于对照组 ($P < 0.01$) 的表达量进行表达外, 其余各时间点的表达量均低于本底水平(图 7A)。在肝脏中, *hsp70* mRNA 的表达在 8 h 时与对照组差异不显著, 24 h 上调至峰值, 为对照组的 4.5 倍 ($P < 0.01$), 而后表达量逐渐下调; *hspa5* mRNA 在肝脏中的表达趋势呈现粗略的“V”趋势, 各时间点的表达量均高于对照组, 8–16 h 显著上调表达, 16–36 h 下调至最低表达量, 而后再次上调至 72 h 达到峰值, 为对照组的 5 倍 ($P < 0.01$); 肝脏中 *hspa8* mRNA 的表达量在 72 h 达到峰值, 为对照组的 8 倍 ($P < 0.01$), 其余各个时间点的表达量基本与对照组持平; *hspa13* mRNA 在肝脏中始终维持高表达水平, 72 h 时达到峰值为对照组的 22.1 倍 ($P < 0.01$), 其余各个时间点的表达量均显著高于对照组, 16–48 h 呈现逐渐下调趋势(图 7B)。在脾脏中, 黑龙江林蛙 HSP70 家族的 4 个成员 mRNA 的相对表达量的变化趋势大致相同, 呈现为粗略的“V”型, 即 8–16 h 表达上调, 16–36 h 表达下调, 而后再次上调, 峰值出现在 48 h 或 16 h, 16、24、48 和 72 h

时的表达水平均较高(图 7C)。

在肺中, *hsp70*、*hspa5* 和 *hspa13* mRNA 的表达峰值均在应激早期出现, 即 8 h 或 16 h; 只有 *hspa8* mRNA 的表达峰值出现在 72 h, 其余时间点低于对照水平表达(图 7D)。在肾脏中, 黑龙江林蛙 HSP70 家族的 4 个成员 mRNA 的相对表达量的变化趋势大致相同, 呈现为先上调至峰值, 而后下调, 除 *hsp70* mRNA 的峰值出现在 48 h [为对照组的 3.9 倍 ($P < 0.01$)] 外, 其余 3 个成员 mRNA 表达量的峰值均出现在 36 h 时 [分别为对照组的 10.9、2.7 和 13.2 倍 ($P < 0.01$)] (图 7E)。

在皮肤中, *hsp70* mRNA 的表达量在 8–24 h 上调至峰值, 为对照组的 3.4 倍 ($P < 0.01$), 36–72 h 表达量逐渐下调至低于本底水平。*hspa5*、*hspa8* 和 *hspa13* mRNA 表达量在皮肤中的变化趋势相似, 8–36 h 表达上调, 最低表达量出现在 48 h 时, 72 h 时又显著上调。*hspa5* mRNA 表达量的峰值出现在 36 h, 为对照组的 6.4 倍 ($P < 0.01$); *hspa8* 和 *hspa13* mRNA 表达量的峰值均出现在 72 h, 分别为对照组的 8.6 倍和 5.6 倍 ($P < 0.01$) (图 7F)。在肌肉中, 黑龙江林蛙 HSP70 家族的 4 个成员 mRNA 的相对表达量的变化趋势也大抵相同, 即表达峰值均出现在 16 h, 16–36 h 下调表达, 48–72 h 时表达量有所上调(图 7G)。在胃中, *hsp70* mRNA 的表达在 16 h 时上调至峰值, 为对照组的 4.4 倍 ($P < 0.01$), 而后表达量逐渐下调; *hspa5*、*hspa8* 和 *hspa13* 的 mRNA 表达量具有相似的变化趋势, 即 8–24 h 时表达量上调, 36 h 时表达量下调至最低水平, 48–72 h 时表达水平又逐渐上调, *hspa5* 和 *hspa8* mRNA 的表达峰值出现在 72 h, 分别为对照组的 11.2 倍和 5.5 倍 ($P < 0.01$), *hspa13* mRNA 的表达峰值出现在 24 h, 为对照组的 5.1 倍 ($P < 0.01$) (图 7H)。

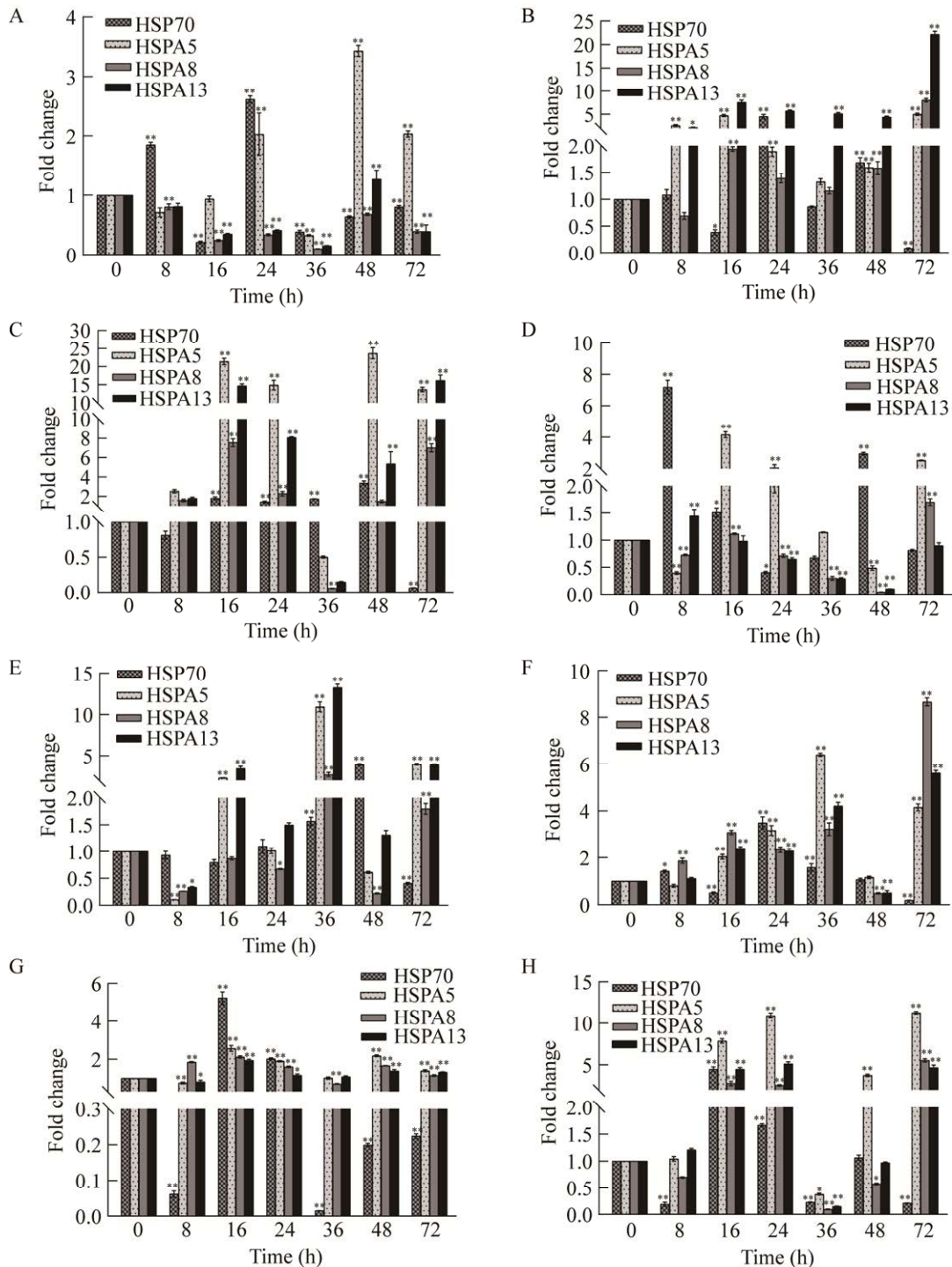


图7 黑龙江林蛙不同组织 HSP70 家族成员在 *Ah* 胁迫下的时序表达

Figure 7 Expression analysis of HSP70 family after infection with *Aeromonas hydrophila* in different tissues in *Rana amurensis*. A: Heart. B: Liver. C: Spleen. D: Lung. E: Kidney. F: Skin. G: Muscle. H: Stomach. The samples were collected at different time points upon *A. hydrophila* challenge (x-axis). Expression of 0 h as a statistical standards, β -actin as an internal control. The results were expressed as the $x \pm s$ error (bars) of three replicates. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

hsp70 mRNA 的表达量在所有被测组织中均呈现先上调至峰值后逐渐下调的趋势, 在不同组织中达到峰值的时间有所不同。不同组织中, *hspa5*、*hspa8* 和 *hspa13* mRNA 表达量的变化趋势呈现为粗略的“V”型, 即表达量逐渐上调后下调再上调。以上结果表明, 在 *Ah* 胁迫下 *Ra-hsp70* 家族基因的 4 个成员在不同组织中的应答时间和水平存在差异。

2.6 HSP70 蛋白在黑龙江林蛙不同组织中的定位和表达

采用免疫组织化学分析法对黑龙江林蛙的肝脏、肾脏、皮肤和胃等 4 个组织进行 HSP70 蛋白分子表达水平的检测, 以观察 HSP70 蛋白在 *Ah* 胁迫下不同组织中的分布和表达情况。结果表明, 在对照组和试验组的各组织切片中均存在 HSP70 蛋白的阳性表达, 但在感染后不同时间点的不同组织中 HSP70 蛋白的表达水平存在差异(图 8)。HSP70 蛋白主要定位于各组织细胞的胞质中, 强阳性染色区域为黄棕色, 弱阳性染色区域为浅黄色, 不同组织中着色深浅不一。采用软件 Image J 进行平均光密度值分析, 结果显示(图 9), *Ah* 胁迫下肝脏和皮肤中 HSP70 蛋白的表达量在 24 h 达到峰值($P < 0.01$), 肾脏和胃分别在 48 h 和 16 h 达到峰值($P < 0.01$)。不同组织中, HSP70 表达量的平均光密度值均呈现先上升后下降的趋势。该结果与 qRT-PCR 结果基本一致, 说明 HSP70 在转录和翻译水平上的变化较为同步。同时, HSP70 蛋白在肝脏和肾脏中的整体表达水平高于在皮肤和胃。

3 讨论

自从首次在果蝇唾液腺细胞中发现热休克蛋白, 关于其鉴定和功能的研究便在脊椎动物和无脊椎动物中广泛开展^[23-24]。本研究通过同源克隆的方法成功获取编码黑龙江林蛙 HSP70、

HSPA5、HSPA8 和 HSPA13 四个蛋白的完整编码区序列, 其编码的氨基酸序列均具有高度结构保守性和各自独特的特征结构域, 表明 *Ra-hsp70* 家族基因的 4 个成员属于典型的 HSP70 家族。通过对 *Ra-hsp70* 家族基因的序列特征、立体结构、亲缘关系和组织表达谱及其在感染条件下的表达规律进行分析, 为两栖类 *hsp70* 基因的功能研究提供了新的理论基础。

3.1 *Ra-hsp70* 家族基因的序列分析

研究发现^[25-26], 在不同种属间的热休克蛋白序列高度保守、具有极高的相似性, 例如细菌与人类热休克蛋白的同源性可达 50%以上, 表明这些蛋白也具有类似的功能。*Ra-HSP70* 家族的 4 个成员具有 HSP70 家族 3 个典型的特征标签序列和 3 个功能结构域, 进一步说明了两栖类 *hsp70* 基因的结构保守性。这与马铃薯甲虫^[27]、黄条鳉^[28]、西伯利亚鲟^[29]和菜粉蝶^[30]等物种的 HSP70 研究结论相一致, 表明不同物种间的 HSP70 在序列组成和结构上具有极高的保守性。在对银鲷^[31]、团头鲂^[32]和三疣梭子蟹^[33] HSP70 的研究中发现, 结构型 HSP70 (HSC70) 序列中包含有多个四肽序列—GGXP 和九肽模体—SGPTIEEVD; 而诱导型 HSP70 序列中多数情况只出现 1 次 GGXP, 九肽模体的结构也不同于结构型的 SGPTIEEVD。但非洲爪蟾诱导型 HSP701B (NP_001091238.1) 中含有九肽模体 SGPTIEEVD 和重复的 GGMP 序列^[34], 这与上述结论不一致。同时, 在马铃薯甲虫^[27] HSP70 的研究中认为, 可根据 HSP70 靠近 C 端是否具有简并重复的四肽序列 GGXP, 将 HSP70 分为诱导型和组成型。综上所述, 在不同物种中依据四肽序列 GGXP 和九肽模体 SGPTIEEVD 的存在情况去推断 HSP70 类型的标准有所不同, 所以目前无法只参考 GGXP 模体和九肽模体 SGPTIEEVD 的存在情况去推断不同物种 HSP70

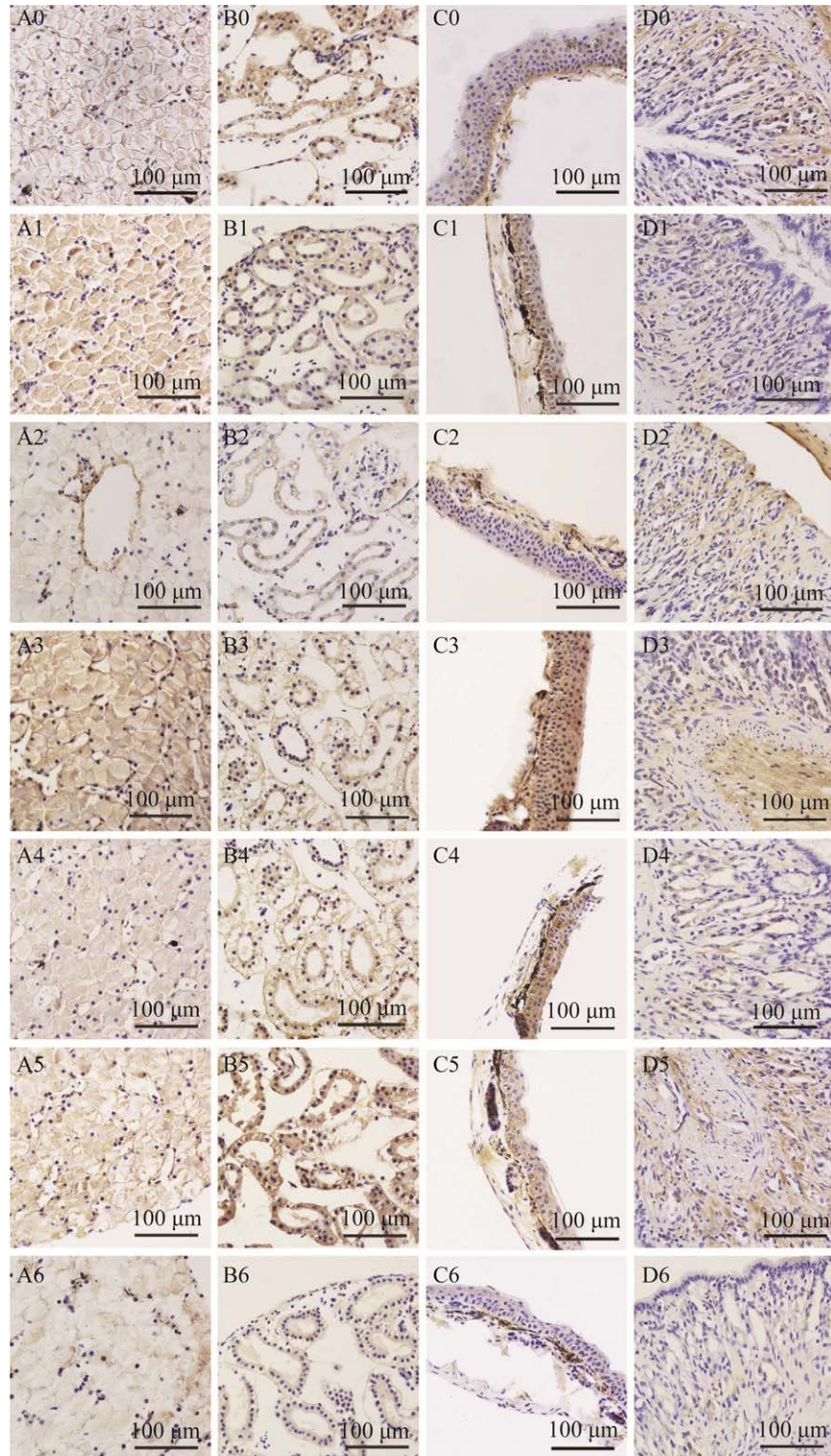


图 8 HSP70 蛋白在黑龙江林蛙不同组织中的分布

Figure 8 Distribution of HSP70 protein in different tissues of *Rana amurensis*. Observation by immunohistochemical staining in different tissues of *R. amurensis* challenged with *A. hydrophila*. A: Liver. B: Kidney. C: Skin. D: Stomach. 0: 0 h; 1: 8 h; 2: 16 h; 3: 24 h; 4: 36 h; 5: 48 h; 6: 72 h.

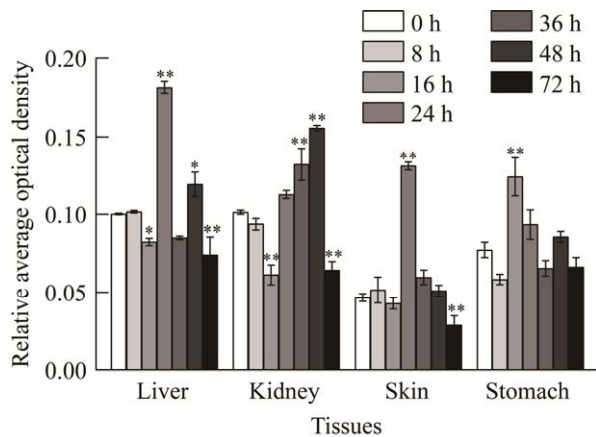


图9 HSP70 阳性反应平均光密度值分析

Figure 9 Analysis of average integral optical density of HSP70 expressions. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

的类型。本研究发现, Ra-HSP70、Ra-HSPA5 和 Ra-HSPA8 的 C 末端分别具有 1 个和 4 个 GGXP 短肽序列; Ra-HSP70 和 Ra-HSPA8 还分别含有 1 个九肽模体。参考黑龙江林蛙 HSP70 和 HSPA8 的三维结构与牛 HSC70 的三维结构十分相似, 推测 HSP70 和 HSPA8 属于组成型 HSP70, 关于黑龙江林蛙 HSP70 家族成员类型的确定还有待进一步研究。

3.2 *Ra-hsp70* 家族基因的组织分布表达分析

在组织表达分布中, *Ra-hsp70* 家族基因的 4 个成员在心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、皮肤、肌肉和胃的组织中均有表达, 但在不同组织中的表达情况存在一定的差异, 表明基因产物可能参与多种生理过程^[35], 这与达氏鲟^[36]、中华鲟^[37]和黄花鱼^[38] *hsp70* 基因的研究结果相一致。*hsp70* 在黑龙江林蛙的肌肉中表达量最高, 胃、皮肤和肾次之, 这一结果与达氏鲟的 *hsp70* 表达结果相似^[36]; *hspa5*、*hspa8* 和 *hspa13* 均在黑龙江林蛙的肾脏中显著高水平表达, 肝脏、脾脏、皮肤和胃次之。肝脏、脾脏和肾脏是两栖类重要的免疫器官^[39], 提示这些分子在这些器官中可能参与了蛙免疫系统功能的实现。上述研究结

果与在其他物种中的研究结果具有一定的差异, 如朱凌威等^[40]发现杂交黄颡鱼的 *hsp70* 基因主要在肝脏中表达, 其次为脑、鳃和肌肉。在雌性黄条鰻中 *hsp70* 基因主要在卵巢中高表达, 其次为鳃、心和脾脏^[28]。综上所述, *hsp70* 基因的组织表达特性与其基因亚型和物种种类相关。

3.3 *Ra-hsp70* 家族基因在感染中的表达模式分析

热休克蛋白可通过参与相关信号转导调节机体免疫功能, 是缓解机体应激反应的重要蛋白^[41], 炎症可激活 HSPs 的表达, 各器官的损伤和修复过程也常伴随 HSPs 的上调^[42]。HSP70 是机体内表达量最高、分布最广泛的 HSPs。细胞内的 HSP70 保护细胞免受压力, 在蛋白质的平衡中起关键作用, 能够参与保护细胞质成分免受各种应激条件的侵害^[43]; 细胞外的 HSP70 参与免疫调控^[44], 可作为交叉递呈中 MHC I 分子的免疫原, 激活 CD8⁺ T 细胞, 从而诱导适应性免疫应答^[45-46], 胞外 HSP70 来源于胞内 HSP70 的释放^[47]。*HSP70* 基因在细菌感染过程中的表达已经在鱼类中得到了广泛的研究: 与未感染的鲑鱼相比, 感染了肾杆菌的鲑鱼在肝脏和肾脏中高水平表达 HSP70^[48]; 虹鲑鱼幼鱼受鳃弧菌感染后, 肝脏和肾脏中的 HSP70 的表达也出现了升高^[49], 说明 HSP70 可能在水生生物的感染过程中具有潜在的免疫调节作用。

本研究中, 黑龙江林蛙在感染 *Ah* 后, *Ra-hsp70* 家族基因的 4 个成员在不同组织中的转录水平都存在显著上调的现象, 但在不同组织中存在不同的诱导表达特性。*Ra-hsp70* mRNA 的整体表达趋势呈现为: 在感染初期显著上调至峰值(峰值常出现在感染后的 16 h 或 24 h), 后随感染时间的延长, 表达量逐渐下调至低于本底水平。最初的上调可能是由于细菌的增殖与毒性引起机体细胞产生炎症反应, 而 HSP70 可通

过抑制 NF- κ B 的活化减少炎性介质的产生^[47]。而后期的下调表明该基因在感染初期的作用有限；亦或是由于长时间的细菌感染，黑龙江林蛙各组织受损，无法发挥正常的生理功能，而导致热激蛋白的表达途径关闭。同时推测这种表达情况也可能是由于 HSP70 在机体细胞内的合成存在一定的阈值，一旦超过这个阈值，蛋白的合成量将出现下降^[50]。司凯歌^[51]在研究 *Ah* 感染中华鲟时，也得到了相似的研究结果；地中海贻贝感染鳗弧菌^[52]后血细胞中 *hsp70* mRNA 表达量的变化规律也呈现为先上调后下调至基线。通过免疫组化技术对 HSP70 蛋白的表达情况进行了蛋白水平的检测，免疫组化结果与 qRT-PCR 结果大体一致，表明黑龙江林蛙体内的 *hsp70* 基因在转录和翻译水平具有一致性。*Ra-hspa5*、*Ra-hspa8* 和 *Ra-hspa13* mRNA 表达量的变化趋势呈现为粗略的“V”型。即感染初期表达量随侵染时间逐渐上调，上调至一定程度后下调，感染后期再次上调，即表达量逐渐上调后下调再上调。说明相较于 *Ra-hsp70*，这 3 个成员对细菌感染胁迫的响应在时间上较为同步，均可在感染初期积极响应应激并进行诱导性表达，推测它们协同发挥了相关免疫功能。目前关于这 3 个 HSP70 家族成员在细菌感染下表达情况的研究较少，中华鲟感染 *Ah* 后，*hspa13* 在脾脏和肾脏中的表达情况与本研究结果大致相似^[51]，说明在感染条件下，不同物种中的 *hspa13* 可能发挥着相似的功能。*Ra-hsp70* 家族成员的不同表达模式提示它们参与了 *Ah* 感染下机体的应答反应。

4 结论

本研究成功获得了黑龙江林蛙 HSP70 家族 4 个成员 HSP70、HSPA5、HSPA8 和 HSPA13 的完整 CDS 区序列，证明了 *Ra-HSP70* 家族的 4 个成员属于典型的 HSP70 家族。*Ra-hsp70* 家

族基因的 4 个成员在细菌感染下，均在不同组织中出现了显著的上调表达，表明其可能参与了机体对抗病原体侵染的生物学过程，揭示了细菌感染下 *hsp70* 家族基因的动态表达模式。为更好地理解两栖类 *hsp70* 基因的生理功能奠定了基础。

REFERENCES

- [1] GARBUZ DG. Regulation of heat shock gene expression in response to stress[J]. *Molekuliarnaia Biologiya*, 2017, 51(3): 400-417.
- [2] TIWARI S, THAKUR R, SHANKAR J. Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi[J]. *Biotechnology Research International*, 2015, 2015: 1-12.
- [3] SCHETT G, REDLICH K, XU Q, BIZAN P, GRÖGER M, TOHIDAST-AKRAD M, KIENER H, SMOLEN J, STEINER G. Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue, differential regulation of hsp70 expression and HSF1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear, stress, and antiinflammatory drugs[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998, 102(2): 302-311.
- [4] 王景峰, 邵军军, 常惠芸, 郝峰强. 热休克蛋白免疫学效应与应用研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(6): 587-591.
WANG JF, SHAO JJ, CHANG HY, HAO FQ. Research progress on the immunological effects and applications of heat shock proteins[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2010, 26(6): 587-591 (in Chinese).
- [5] 郭文亮, 徐元庆, 金晓, 史彬林. 热休克蛋白在冷应激引起的炎症反应和氧化应激中的调节作用[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(6): 1668-1677.
GUO WL, XU YQ, JIN X, SHI BL. Moderating role of heat shock protein under inflammatory response and oxidative stress caused by cold stress[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(6): 1668-1677 (in Chinese).
- [6] FEDER ME, HOFMANN GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology[J]. *Annual Review of Physiology*, 1999, 61: 243-282.
- [7] FRANZELLITTI S, FABBRI E. Differential HSP70

- gene expression in the mediterranean mussel exposed to various stressors[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 336(4): 1157-1163.
- [8] LI JX, ZHANG HB, ZHANG XY, YANG SY, YAN TM, SONG ZB. Molecular cloning and expression of two heat-shock protein genes (*HSC70/HSP70*) from pregnant's schizothoracin (*Schizothorax prenanti*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(2): 573-585.
- [9] KREGEL KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2002, 92(5): 2177-2186.
- [10] BALER R, DAHL G, VOELLMY R. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(4): 2486-2496.
- [11] 樊欣, 彭仁. 热休克蛋白 70: 生物学功能与作用机制研究进展[J]. *生命科学*, 2019, 31(3): 270-278.
FAN X, PENG R. Heat shock protein 70: biological function and the mechanism for its function[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2019, 31(3): 270-278 (in Chinese).
- [12] MAYER MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013, 38(10): 507-514.
- [13] 杨柳萌, 刘红亮, 郑永唐. 热休克蛋白 HSP70 和 gp96 在抗病毒感染中的作用[J]. *细胞生物学杂志*, 2004, 26(5): 483-486.
YANG LM, LIU HL, ZHENG YT. The roles of HSP70 and gp96 in viral infection[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2004, 26(5): 483-486 (in Chinese).
- [14] 李殿伟, 赵文阁, 刘鹏, 郝婧玮. 黑龙江省东部两种林蛙两性异形比较研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015, 58(13): 222-224.
LI DW, ZHAO WG, LIU P, HAO JW. Comparative studies for sexual dimorphism of two *Rana* in eastern Heilongjiang Province[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015, 58(13): 222-224 (in Chinese).
- [15] 徐磊, 董文琪, 杨新宇, 贾玉甜, 杨斌, 肖向红, 黄璞祎, 柴龙会. 黑龙江省两种林蛙耐寒能力比较研究—黑龙江林蛙较东北林蛙耐寒的新证据[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020, 63(9): 148-150, 154.
XU L, DONG WQ, YANG XY, JIA YT, YANG B, XIAO XH, HUANG PY, CHAI LH. Comparative study on cold tolerance capacities of two species of wood frogs in Heilongjiang Province: new evidence for the cold tolerance of *Rana amurensis* over *Rana dybowskii*[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020, 63(9): 148-150, 154 (in Chinese).
- [16] 吴文英, 李丕鹏, 陆宇燕, 周正彦, 王勇. 黑龙江林蛙繁殖期两性皮肤组织结构的差异比较[J]. *野生动物*, 2011, 32(3): 141-145.
WU WY, LI PP, LU YY, ZHOU ZY, WANG Y. Comparative histological observation of the skin in male and female (*Rana amurensis*) during breeding season[J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2011, 32(3): 141-145 (in Chinese).
- [17] 范玉林, 崔香顺, 姚玉霞, 卫功庆. 哈士蟆油成分研究的进展[J]. *吉林农业大学学报*, 1996, 18(3): 109-115.
FAN YL, CUI XS, YAO YX, WEI GQ. Study on components in the oviduct of Chinese forest frog[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 1996, 18(3): 109-115 (in Chinese).
- [18] FRÍAS-ALVAREZ P, ZÚIGA-VEGA JJ, FLORES-VILLELA O. A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2010, 19(13): 3699-3742.
- [19] KIESECKER JM. Global stressors and the global decline of amphibians: tipping the stress immunocompetency axis[J]. *Ecological Research*, 2011, 26(5): 897-908.
- [20] 杜嘉楠, 吴晨薇, 叶颖萱, 文艺, 李婧妍, 李靖, 翟博宇, 朱晓艺, 曾祥伟. 蛙类常见传染病介绍及病原学鉴定研究进展[J]. *今日畜牧兽医*, 2019, 35(8): 63-64.
DU JN, WU CW, YE YX, WEN Y, LI JY, LI J, ZHAI BY, ZHU XY, ZENG XW. Advances in the introduction and pathogenic identification of common infectious diseases in frogs[J]. *Today Animay Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019, 35(8): 63-64 (in Chinese).
- [21] 曲俐俐, 柴龙会, 王伯驹, 许晴, 肖向红. LPS 和嗜水气单胞菌胁迫下东北林蛙不同组织内 TBK1 转录产物表达动态的研究[J]. *野生动物学报*, 2019, 40(1): 142-146.
QU LL, CHAI LH, WANG BJ, XU Q, XIAO XH. Expression dynamics of TBK1 transcripts in different tissues of *Rana dybowskii* under LPS and *Aeromonas hydrophila* stress[J]. *Chinese Journal Wildlife*, 2019, 40(1): 142-146 (in Chinese).
- [22] 杨国钊, 叶红, 容庭. 嗜水气单胞菌生长曲线的测定

- 及药物敏感性试验[J]. 畜牧兽医科技信息, 2011, 27(9): 27-30.
- YANG GZ, YE H, RONG T. Determination of growth curve of *Aeromonas hydrophila* and drug sensitivity test[J]. Chinese Journal Animay Husbandry Veterinary Medicine, 2011, 27(9): 27-30 (in Chinese).
- [23] RITOSSA F. A new pattern induced by a temperature shock and DNP in drosophila[J]. Experientia, 1962, 18: 571-573.
- [24] TISSIÈRESÈ A, MITCHELL HK, TRACY UM. Protein synthesis in salivary glands of drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs[J]. Journal Molecular Biology, 1974, 84(3): 389-398.
- [25] LANG BJ, GUERRERO ME, PRINCE TL, OKUSHA Y, BONORINO C, CALDERWOOD SK. The functions and regulation of heat shock proteins, key orchestrators of proteostasis and the heat shock response[J]. Archives of Toxicology, 2021, 95(6): 1943-1970.
- [26] GETHING MJ, SAMBROOK J. Protein folding in the cell[J]. Nature, 1992, 355(6355): 33-45.
- [27] 郑海霞, 高玉林, 张方梅, 杨超霞, 蒋健, 朱勋, 张云慧, 李祥瑞. 马铃薯甲虫热激蛋白基因 *Ld-hsp70* 的克隆及温度胁迫下的表达特性[J]. 中国农业科学, 2021, 54(6): 1163-1175.
- ZHENG HX, GAO YL, ZHANG FM, YANG CX, JIANG J, ZHU X, ZHANG YH, LI XR. Cloning of heat shock protein gene *Ld-hsp70* in *Leptinotarsa decemlineata* and its expression characteristics under temperature stress[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(6): 1163-1175 (in Chinese).
- [28] 方璐, 徐永江, 崔爱君, 姜燕, 王滨, 周鹤庭, 柳学周, 黄条(鱼师) *hsp70* 基因克隆及其在早期生长发育过程中的表达调控特性[J]. 渔业科学进展, 2022, 43: 1-10.
- FANG L, XU YJ, CUI AJ, JIANG Y, WANG B, ZHOU HT, LIU XZ. Molecular cloning and temporal expression pattern of *hsp70* gene during the early life stages of *Seriola lalandi*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43: 1-10 (in Chinese).
- [29] 田照辉, 徐绍刚, 王巍, 胡红霞, 董颖, 宋超. 西伯利亚鲟热休克蛋白 HSP70 cDNA 的克隆、序列分析和组织分布[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(2): 150-157.
- TIAN ZH, XU SG, WANG W, HU HX, DONG Y, SONG C. Molecular cloning, characterization and tissue profiles of a HSP70 cDNA in Siberian sturgeon *Acipenser baerii*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(2): 150-157 (in Chinese).
- [30] 丁朝阳, 赵乐, 刘苏, 李茂业. 菜粉蝶热激蛋白 70 (HSP70) 基因的分子特性及其对杀虫剂胁迫的响应[J]. 昆虫学报, 2021, 64(12): 1407-1416.
- DING CY, ZHAO L, LIU S, LI MY. Molecular characterization of heat shock protein 70 (HSP70) genes from *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) and their responses to insecticide stress[J]. Acta Entomologica Sinica, 2021, 64(12): 1407-1416 (in Chinese).
- [31] DEANE EE, WOO NY. Cloning and characterization of the *HSP70* multigene family from silver sea bream: modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 330(3): 776-783.
- [32] 明建华, 谢骏, 刘波, 何义进, 周群兰, 潘良坤, 俞菊华, 徐跑. 团头鲂 HSP70 cDNA 的克隆、序列分析以及热应激对其 mRNA 表达的影响[J]. 中国水产科学, 2009, 16(5): 635-648.
- MING JH, XIE J, LIU B, HE YJ, ZHOU QL, PAN LK, YU JH, XU P. Cloning, sequence analysis of HSP70 cDNA and effects of heat stress on its mRNA expression in *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(5): 635-648 (in Chinese).
- [33] CUI ZX, LIU Y, LUAN WS, LI QQ, WU DH, WANG SY. Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70 gene in swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2010, 28(1): 56-64.
- [34] KLEIN S L, STRAUSBERG RL, WAGNER L, PONTIUS J, CLIFTON SW, RICHARDSON P. Genetic and genomic tools for xenopus research: the NIH xenopus initiative[J]. Developmental Dynamics, 2002, 225(4): 384-391.
- [35] HAN YL, YANG WX, LONG LL, SHENG Z, ZHOU Y, ZHAO YQ, WANG YF, ZHU JQ. Molecular cloning, expression pattern, and chemical analysis of heat shock protein 70 (HSP70) in the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*: evidence for its role in regulating spermatogenesis[J]. Gene, 2016, 575(2): 331-338.
- [36] 龚全, 李青芝, 孙甲华, 林珏, 肖宇, 苏旭涛, 刘光迅, 杜军. 达氏鲟 HSP70-4 基因序列特征及其饥饿与病原菌感染下的差异表达模式分析[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(8): 1584-1593.
- GONG Q, LI QZ, SUN JH, LIN Y, XIAO Y, SU XT, LIU GX, DU J. Sequence characterization and differential expression profiles after starvation and bacterial infection of HSP70-4 in *Acipenser dabryanus*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(8): 1584-1593 (in Chinese).

- [37] 司凯歌, 江南, 张海耿, 周勇, 刘文枝, 曾令兵, 倪琦, 范玉顶. 中华鲟热休克蛋白 *hsp30* 基因 cDNA 的克隆及其在高温胁迫下的表达分析[J]. 淡水渔业, 2019, 49(6): 20-26.
SI KG, JIANG N, ZHANG HG, ZHOU Y, LIU WZ, ZENG LB, NI Q, FAN YD. Molecular cloning and expression analysis under high-temperature stress of heat shock protein *hsp30* gene cDNA from *Acipenser sinensis*[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(6): 20-26 (in Chinese).
- [38] WEI T, SUN YN, SHI G, WANG RX, XU TJ. Characterization and SNP variation analysis of a *HSP70* gene from miiuy croaker and its expression as related to bacterial challenge and heat shock[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2012, 33(3): 632-640.
- [39] XI LQ, WANG C, CHEN PY, YANG Q, HU RQ, ZHANG HL, WENG Q, XU MY. Expressions of IL-6, TNF- α and NF- κ B in the skin of Chinese brown frog (*Rana dybowskii*)[J]. European Journal of Histochemistry, 2017, 61(4): 264-269.
- [40] 朱凌威, 张朝阳, 刘钊, 李良玉, 唐洪, 赵仲孟, 陈雨薇, 武佳韵, 黄小丽, 杨世勇. 杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核心序列的克隆、表达及其在高温应激下的组织表达[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 47-55.
ZHU LW, ZHANG CY, LIU Z, LI LY, TANG H, ZHAO ZM, CHEN YW, WU JY, HUANG XL, YANG SY. Cloning, expression of *hsp70* core cDNA and the effects of heat stress on its tissue expression in *Pelteobagrus fulvidraco* \times *P. vachelli* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 47-55 (in Chinese).
- [41] SU YY, ZHANG X, XIN HW, LI S, LI JF, ZHANG RX, LI X, LI JH, BAO J. Effects of prior cold stimulation on inflammatory and immune regulation in ileum of cold-stressed broilers[J]. Poultry Science, 2018, 97(12): 4228-4237.
- [42] SINGH KM, SINGH S, GANGULY I, NACHIAPPAN RK, GANGULY A, VENKATARAMANAN R, CHOPRA A, NARULA HK. Association of heat stress protein 90 and 70 gene polymorphism with adaptability traits in Indian sheep (*Ovis aries*)[J]. Cell Stress Chaperones, 2017, 22(5): 675-684.
- [43] DAS S, MOHAPATRA A, SAHOO PK. Expression analysis of heat shock protein genes during *Aeromonas hydrophila* infection in rohu, *Labeo rohita*, with special reference to molecular characterization of Grp78[J]. Cell Stress Chaperones, 2015, 20(1): 73-84.
- [44] de MAIO A. Extracellular hsp70: export and function[J]. Current Protein and Peptide Science, 2014, 15(3): 225-231.
- [45] PAWEL S, DICKINSON AM. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70[J]. Autoimmune Diseases, 2012, 2012: 1-6.
- [46] POCKLEY AG, MUTHANA M, CALDERWOOD SK. The dual immunoregulatory roles of stress proteins[J]. Trends in Biochemical Science, 2008, 33(2): 71-79.
- [47] 杨震国. 热休克蛋白 70 的生物学功能及应用的研究进展[J]. 中国饲料, 2010, 21(23): 11-14.
YANG ZG. Research progress on the biological function and application of heat shock protein 70[J]. China Feed, 2010, 21(23): 11-14 (in Chinese).
- [48] FORSYTH RB, CANDIDO EPM, BABICH SL, IWAMA GK. Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1997, 9(1): 18-25.
- [49] ACKERMAN PA, IWAMA GK. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2001, 13(2): 173-180.
- [50] 季璐, 崔旭红, 朱敏. 短时高温胁迫对褐飞虱存活及其热激蛋白基因 *hsp70* 表达的影响[J]. 植物保护学报, 2015, 42(4): 619-625.
JI L, CUI XH, ZHU M. Effects of brief heat shock on the survival and *hsp70* expression of brown planthopper *Nilaparvata lugens*[J]. Journal of Plant Protection, 2015, 42(4): 619-625 (in Chinese).
- [51] 司凯歌. 中华鲟热休克蛋白 HSP30 基因和 HSP70 家族基因的克隆及其在高温胁迫和细菌感染下的表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2019.
SI KG. Molecular cloning and expression profiles of heat shock protein HSP30 and HSP70 family from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) under high temperature stress and bacterial infection[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [52] CELLURA C, TOUBIANA M, PARRINELLO N, ROCH P. *HSP70* gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2006, 30(11): 984-997.

(本文责编 陈宏宇)