

# 温度胁迫对紫贻贝与翡翠贻贝生理活动的影响 和 Hsp27 的响应

王 静, 姚翠鸾

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了探究急性温度胁迫对温度适应性不同的贻贝的生理影响, 以紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 与翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 为对象, 分别用 4, 8, 25, 35 °C 对紫贻贝进行温度胁迫, 用 8, 15, 35, 42 °C 对翡翠贻贝进行胁迫。通过对耗氧率与排氨率的检测, 分析了贻贝的生理代谢; 制作石蜡切片观察鳃组织结构的变化, 用 Western-blot 对 Hsp27 在鳃组织中的表达变化进行研究。结果表明: 两种贻贝的耗氧率和排氨率均随温度升高而升高, 但当紫贻贝胁迫温度达到 35 °C, 翡翠贻贝胁迫温度达到 42 °C 时, 则表现出急剧下降; 急性温度胁迫破坏两种贻贝鳃组织结构, 并且损伤在恢复 24 h 后不可逆转, 同时造成贻贝鳃组织 Hsp27 表达量升高。说明在一定温度范围内, 贻贝的代谢随温度上升而加快, 但当温度超过机体耐受阈值, 可能会抑制代谢; 低温和高温胁迫均可以破坏贻贝的鳃组织结构, 且 24 h 内无法恢复; Hsp27 在紫贻贝应对低温胁迫可能更为积极, 而在翡翠贻贝应对低温及高温胁迫均有应答。

[关键词] 温度胁迫; 贻贝; 代谢; 鳃组织结构; Hsp27

[中图分类号] S 917.4

## The Impacts of Temperature Stress on Some Physiological Processes and Response of Hsp27 in *Mytilus galloprovincialis* and *Perna viridis*

WANG Jing, YAO Cuiluan

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In the present study, the impacts of cold and heat stress on physiological responses of two mussel species, blue mussel *Mytilus galloprovincialis* and green mussel *Perna viridis*, were investigated. The stimulating temperatures of blue mussels were 4 °C, 8 °C, 25 °C and 35 °C, and the green mussels were cultured at 8 °C, 15 °C, 35 °C and 42 °C, respectively. The oxygen consumption and ammonia excretion rate of mussels were analyzed, and the changes of gill tissue structure were observed by paraffin section. The expression of Hsp27 in gills was further studied by Western-blot. The results showed that oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of mussels enhanced with the increasing of temperature. However, when the temperature reached at 35 °C in *M. galloprovincialis* and 42 °C in *P. viridis*, the oxygen consumption and ammonia excretion rate showed a sharp decline. Gill tissue in both species was damaged after acute cold and heat stresses, and the damaged gill tissue could not return to the control structure within 24 h recovery. A significant increased expression of Hsp27 was detected in the gill tissue of both species after acute cold and heat exposures. These re-

[收稿日期] 2018-04-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (41076076)

[作者简介] 王静 (1988—), 女, 博士, 主要从事水产生物免疫相关研究。通信作者: 姚翠鸾 (1971—), 女, 教授, 博导, 从事水生生物免疫研究。E-mail: clyao@jmu.edu.cn

sults indicated that metabolisms of two species mussels accelerated within a certain temperature range. However, when the temperature exceeded the mussels' tolerance limits, the metabolic rate might be inhibited. The gill tissue structure of mussels was destroyed by acute cold and heat stresses, and the damage could not be recovered within 24 h. Hsp27 might be more active in response to cold stress in the gill tissue of *M. galloprovincialis*, and response to moderate cold and heat stress in *P. viridis*.

**Keywords:** temperature stress; mussel; metabolism; gill structure; Hsp27

## 0 引言

温度是影响海洋生物分布、生理活动及生活行为的重要环境因子之一<sup>[1]</sup>。环境温度决定了变温动物的新陈代谢率。温度对贝类影响的研究显示,高温和低温都会减弱其有氧代谢能力<sup>[2-3]</sup>,增强无氧代谢<sup>[4]</sup>。海水温度异常以及盐度的剧烈波动等环境因子的胁迫会影响贝类的耗氧率和排氨率,例如华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*)<sup>[5]</sup>、企鹅珍珠贝 (*Pteria penguin*)<sup>[6]</sup>与翡翠贻贝 (*Perna viridis*)<sup>[7]</sup>的排氨率在一定温度范围内,会随温度的升高而增加;斑马贻贝 (*Dreissena polymorpha*)<sup>[8]</sup>的氧消耗率则随季节发生变化。海水温度的适当升高可以加快贝类体内的各种生化反应速率,使得呼吸和代谢速度加快。但贝类属潮间带生物,常暴露于空气中,而温度暴露胁迫对于贝类的呼吸和代谢影响的相关研究鲜有报道。

胁迫环境下,生物体细胞内的蛋白质不能正常折叠,容易发生错误折叠或者相互聚集。生物为了响应这种胁迫,则通过大量合成具有修复损伤功能的蛋白酶和分子伴侣来帮助细胞恢复活性<sup>[9]</sup>。Hsp27 作为热激蛋白家族成员,可以抑制蛋白质聚集,防止细胞发生凋亡。鱼类的相关研究<sup>[10-12]</sup>表明,Hsp27 的表达与热应激、胚胎发育以及水污染密切相关。贻贝常年生活在岩石上,更容易受到环境温度的胁迫,然而关于 Hsp27 在贻贝抗温度暴露胁迫的研究较少。

紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 也称地中海贻贝,在我国东海以及南海北部广泛分布,由于繁殖迅速,具有生长优势,已经被列为世界百大入侵物种之一<sup>[13]</sup>。在恶劣环境下,紫贻贝具有较强的适应能力。据报道在美国加利福尼亚部分海岸带,紫贻贝已经成功取代了本地贻贝种海湾贻贝 (*M. trossulus*),并且相比于其他同种贻贝,紫贻贝高温适应性更强<sup>[14]</sup>。翡翠贻贝属暖水性贝类,特点是生长迅速,繁殖周期较短,在我国主要分布于南海、东海南部和台湾海峡沿岸<sup>[15]</sup>。由于其广泛性以及对环境胁迫的高耐受性,翡翠贻贝同样已经成为高度入侵物种和生物污染物种<sup>[16]</sup>。本研究通过紫贻贝与翡翠贻贝的温度暴露胁迫实验,对比分析两种温度适应性不同的贻贝耗氧率、排氨率、鳃组织结构的变化以及鳃组织 Hsp27 的蛋白表达水平,以期探究温度胁迫对这两种贻贝的影响及其抗胁迫反应,并为管理气候变化条件下的海洋生物提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及温度胁迫方案

紫贻贝购于辽宁省大连市 (39°51'N, 121°50'E),壳长 (7 ± 1) cm,采样时间为 2016 年 10 月,样本量为 200 个;翡翠贻贝购自福建省厦门市 (24°26'N, 118°04'E),壳长 (6 ± 1) cm,采样时间为 2016 年 8 月,样本量为 200 个。样本运至集美大学海水试验场暂养,期间将附着在贻贝壳上的污损生物逐一去除,养殖海水为经过沉淀砂滤后的自然海水,盐度约为 26。暂养期为 3 周,紫贻贝暂养水温控制在 (15 ± 1) °C,翡翠贻贝暂养温度为 (25 ± 1) °C,保证持续充气,每天换水三分之一,早晚各投喂两次螺旋藻粉 (1 g/m<sup>3</sup>)。

选择暂养后健康的贻贝,参照 Lockwood 等<sup>[14]</sup>的研究设计实验温度,将贻贝置于干露状态,分别进行低温及高温胁迫。紫贻贝胁迫温度分别为 4, 8, 25, 35 °C,对照温度 15 °C;翡翠贻贝胁迫温度分别为 8, 15, 35, 42 °C,对照温度 25 °C。升降速率均为 3 °C/h (温控仪, CSi8D, USA)。当温度

达到预设胁迫温度后, 维持 1 h, 迅速将贻贝置于对照温度的海水中, 进行 24 h 恢复。每个温度组设置 3 个重复。

取样时间点实验组为干露状态下胁迫 1 h, 对照组为温度海水中恢复 24 h。使用解剖刀将贻贝闭壳肌划开后, 在冰浴条件下迅速解剖, 每个平行组取 6 只贻贝, 分别取左侧鳃组织并混合为 1 个样本, 设置 3 个重复组 ( $N = 3$ ), 经液氮速冻后, 放入  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2 耗氧率与排氨率的测定

采用 Winkler 碘量法测定溶解氧, 次溴酸钠氧化法测定  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  含量<sup>[17]</sup>。具体操作如下: 以 2.5 L 大口瓶为呼吸瓶, 每瓶随机放入 6 只经过温度干露胁迫以及恢复后的贻贝, 加入对照组温度的砂滤海水后用封口膜密封, 以贝壳张开为计时起点, 持续 2 h, 测定实验前后呼吸瓶中水样的溶解氧 DO 值和  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  含量。实验结束后, 解剖取出软体部分于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘干至恒重, 称量并记录其干重 (g)。

依据代谢实验前后呼吸瓶水中测量得出的 DO 值与  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  的含量, 贻贝耗氧率 ( $R_0$ ) 的计算公式为

$$R_0 = [(O_0 - O_t) \times V] / (W \times t),$$

其中:  $R_0$  为单位体重耗氧率 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ),  $O_0$  与  $O_t$  分别为实验开始和结束时呼吸瓶水中的 DO 值 ( $\text{mg/L}$ ),  $V$  代表呼吸瓶中水的体积 (L),  $W$  为紫贻贝与翡翠贻贝软体组织的干重 (g),  $t$  代表实验持续时间 (h)。

贻贝的排氨率 ( $R_N$ ) 的计算公式为

$$R_N = [(N_t - N_0) \times V] / (W \times t),$$

其中:  $R_N$  为贻贝单位体重排氨率 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ),  $N_0$  和  $N_t$  为实验开始和结束时水中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  的质量浓度 ( $\text{mg/L}$ ),  $W$  为贻贝软体部干重 (g),  $t$  为实验持续时间 (h)。

### 1.3 石蜡组织切片

温度胁迫后, 每个平行组取 6 只贻贝, 分别取左侧鳃组织, 经磷酸盐缓冲液漂洗后放入 4% (体积分数) 中性甲醛固定液中, 固定 24 h 后, 进行水洗、乙醇逐级脱水、透明、浸蜡与包埋、切片、展片、HE 染色和封片后<sup>[18]</sup>, 置于光学显微镜下 (DM3000LED, Leica, 德国) 观察鳃组织形态结构变化。

### 1.4 免疫印迹分析

取 0.5 g 鳃组织样品加入 500  $\mu\text{L}$  RIPA 裂解液 (50 mmol/L Tris - HCl, pH = 8.0, 0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸钠, 1% NP - 40, 150 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 1 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  PMSF, 使用前加入蛋白酶抑制剂 PMSF), 用匀浆仪进行组织破碎, 置于冰上 30 min 后,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 用 Bradford 法测蛋白浓度。在蛋白样品中加入 5  $\times$  蛋白上样缓冲液,  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 等量取出 50  $\mu\text{g}$  总蛋白, 于 12% SDS - PAGE 凝胶上分离蛋白质。电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜 (Millipore, 美国) 上, 用预染蛋白检测转膜效率, PBST 和 PBS 清洗干净后用 1% 的 BSA 室温封闭 1 h, 一抗 (Hsp27, ab2790, Abcam;  $\beta$  - actin, 4970, 华安生物) 按照 1: 1000 比例稀释后  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 洗涤后再用以辣根过氧化物酶标记的二抗 (北京全式金) (1: 5000) 室温孵育 1 h, 洗涤后用 ECL 化学发光剂 (Advansta, 美国) 显影, 放入生物分子成像仪 (ImageQuant Las4000 mini 成像仪, GE, 美国) 曝光拍照, 使用 ImageJ 分析 Hsp27 及  $\beta$  - actin 蛋白表达变化。Hsp27 蛋白表达水平的计算以  $\beta$  - actin 作为内参。

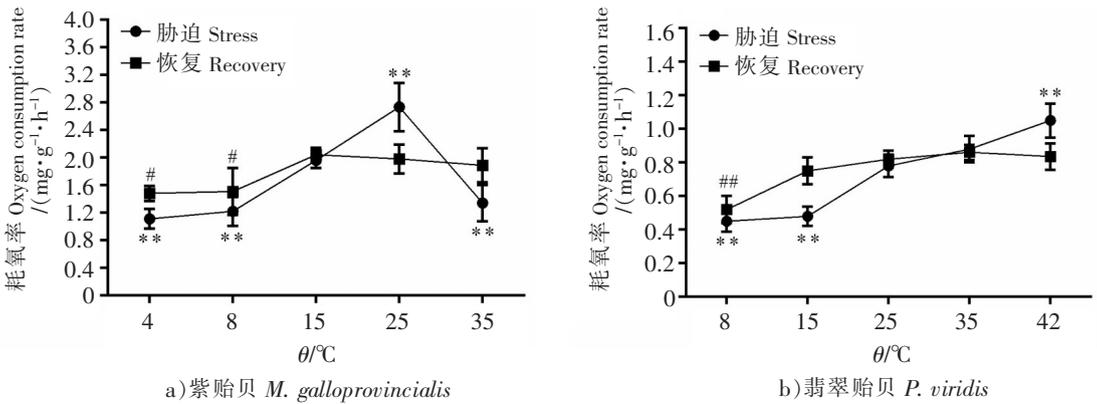
### 1.5 数据统计分析

采用平均数  $\pm$  标准误 ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ ) 表示实验结果, 利用 SPSS (13.0) 统计软件对实验数据进行统计学分析。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间差异进行 LSD 多重检验, 显著水平表示为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 耗氧率

如图 1a 所示：低温胁迫后紫贻贝耗氧率显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )，4 °C 胁迫后耗氧率达到最低值，为对照组的 0.6 倍，经过 24 h 恢复后，低温刺激组耗氧率有所上升，但仍显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )；在高温 25 °C 胁迫下，耗氧率显著升高，达到最大值，为对照组的 1.4 倍 ( $P < 0.01$ )，但在 35 °C 胁迫下，耗氧率显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )，经 24 h 恢复后，高温刺激组都恢复至对照水平。由图 1b 可知：翡翠贻贝在低温胁迫后，耗氧率显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )，8 °C 胁迫后达到最低值，为对照组的 0.6 倍，恢复 24 h 后 8 °C 胁迫组仍显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )；高温 35 °C 胁迫后，耗氧率无显著变化，但 42 °C 胁迫后显著升高，达到对照组的 1.3 倍，高温胁迫组恢复 24 h 后都回到对照组水平。



说明：急性胁迫组与对照组之间的差异显著性以 \* 表示，恢复组与对照组之间的差异显著性以 # 表示  
 Notes: Significant differences ( $P < 0.05$ ) between acute stress and the control were represented by asterisk (\*), and differences between 24 h recovery (in control seawater after stress) and their corresponding control were considered statistically significant (#) at  $P < 0.05$

图 1 不同温度下紫贻贝与翡翠贻贝的耗氧率

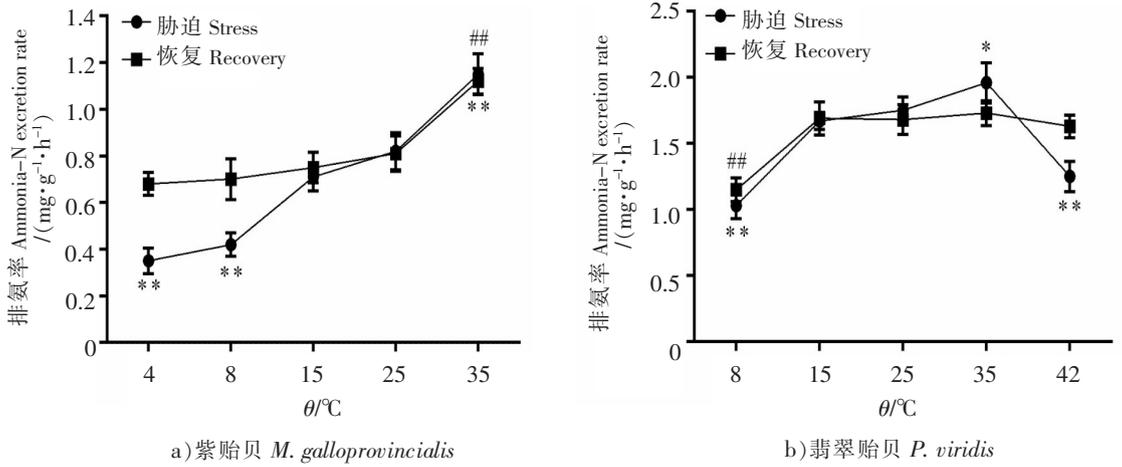
Fig.1 The oxygen consumption rate in *M. galloprovincialis* and *P. viridis* after temperature stress

### 2.2 排氨率

如图 2a 所示：低温胁迫后，紫贻贝排氨率显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )，4 °C 胁迫后达到最低，为对照组的 0.5 倍，恢复 24 h 后，低温胁迫组恢复到对照组水平；高温 35 °C 胁迫后，排氨率显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )，达到对照组的 1.6 倍，经 24 h 恢复后，仍显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。由图 2b 可知：翡翠贻贝在低温 8 °C 胁迫后，排氨率显著降低 ( $P < 0.01$ )，最低值为对照组的 0.6 倍，恢复 24 h 后仍显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )；低温 15 °C 胁迫对排氨率无显著影响；高温 35 °C 胁迫后，排氨率显著升高 ( $P < 0.05$ )，但 42 °C 胁迫后，排氨率显著降低 ( $P < 0.01$ )，恢复 24 h 后，高温胁迫组与对照组无显著差异。

### 2.3 鳃组织结构

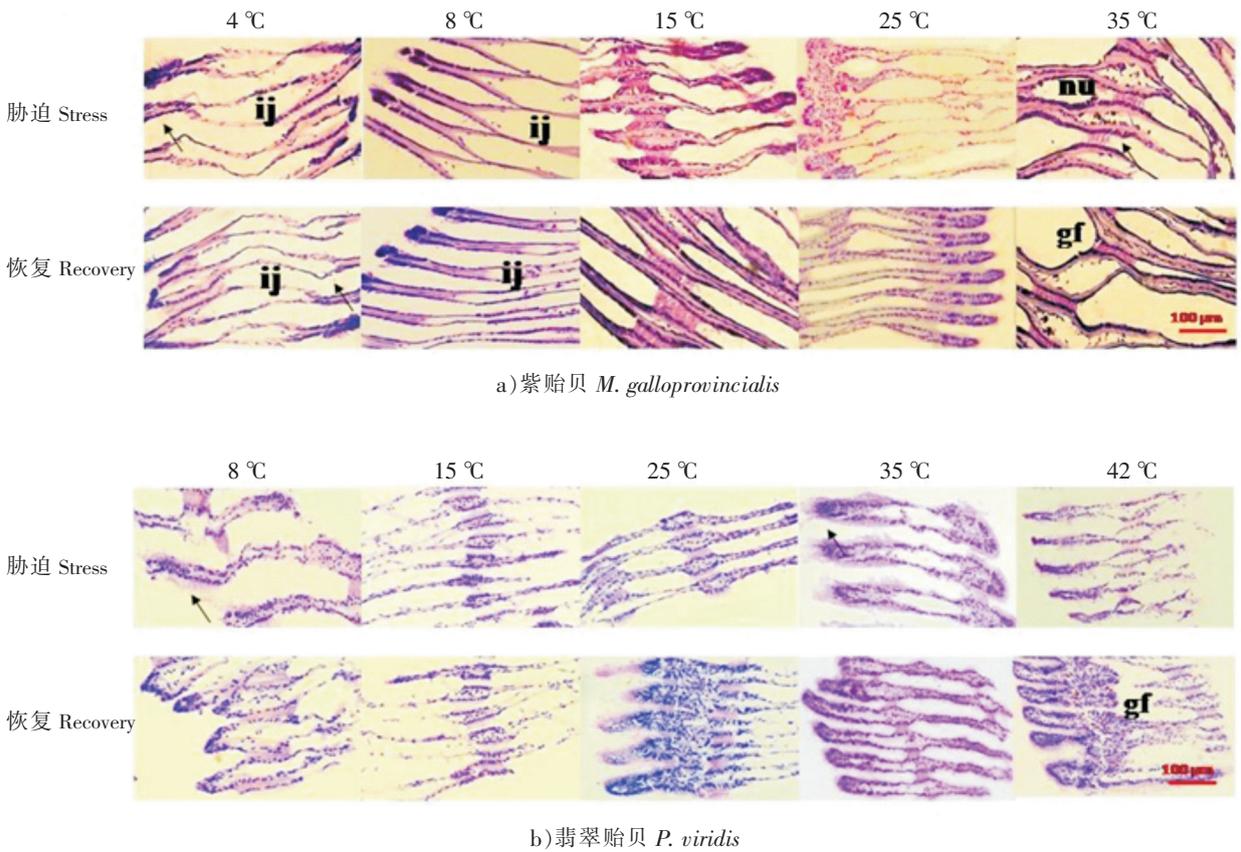
显微镜下观察的贻贝鳃组织结构如图 3 所示。由图 3a 可见：低温胁迫后，紫贻贝鳃丝间隔加大，鳃纤毛脱落，恢复 24 h 后鳃丝间隔缩小，鳃纤毛无法恢复；高温 25 °C 刺激后，鳃组织与对照组相比并没有显著变化；35 °C 胁迫后，鳃丝纤毛搭接处断裂、鳃丝受损、细胞核外溢，恢复 24 h 并无明显变化。由图 3b 可见：翡翠贻贝鳃组织经低温胁迫后，鳃丝间隔加大，鳃丝纤毛搭接处断裂；高温 35 °C 刺激出现同样现象，经 24 h 恢复后少量鳃丝纤毛恢复；但 42 °C 高温胁迫后，鳃纤毛脱落，鳃丝断裂，且恢复 24 h 后组织损伤不可逆。



说明:急性胁迫组与对照组之间的差异显著性以\*表示,恢复组与对照组之间的差异显著性以#表示  
 Notes: Significant differences ( $P<0.05$ ) between acute stress and the control were represented by asterisk (\*), and differences between 24 h recovery (in control seawater after stress) and their corresponding control were considered statistically significant (#) at  $P<0.05$

图2 不同温度下紫贻贝与翡翠贻贝的排氨率

Fig.2 The ammonia excretion rate in *M. galloprovincialis* and *P. viridis* after temperature stress



说明:ij表示鳃丝间隔;箭头表示鳃纤毛;gf表示鳃丝;nu表示细胞核

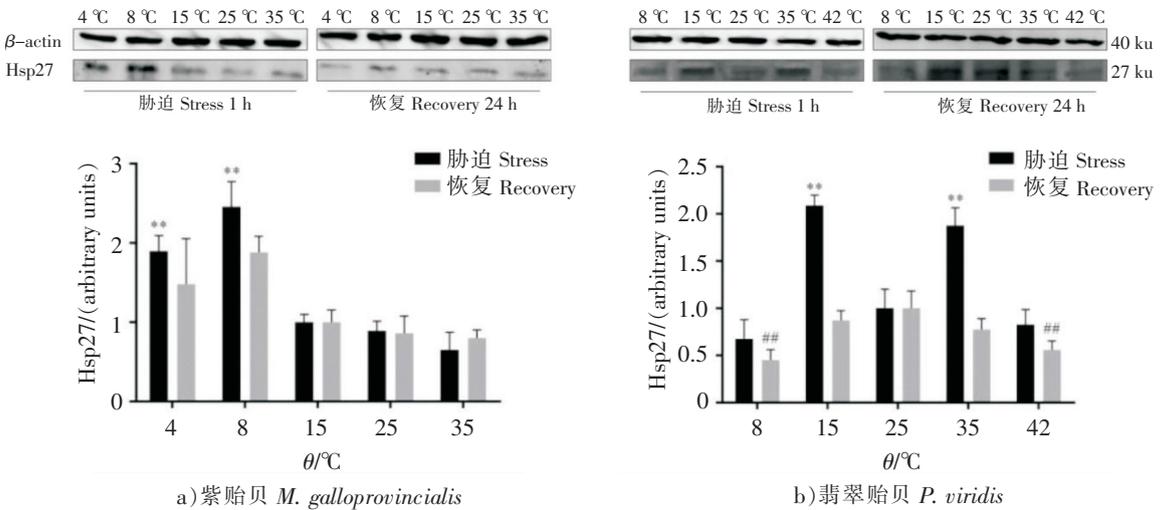
Notes: ij represents inter-filamentary junction; arrow represents cilium;gf represents gill-filaments; nu represents nucleus

图3 温度胁迫对紫贻贝与翡翠贻贝鳃组织结构的影响(x200)

Fig.3 Effect of temperature exposure on the gill structure of *M. galloprovincialis* and *P. viridis*(x200)

## 2.4 鳃组织 Hsp27 蛋白表达变化

如图 4a 所示: 低温胁迫后, 紫贻贝鳃组织 Hsp27 蛋白的表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ), 经 8 °C 胁迫后达到最大值, 为对照组的 2.5 倍, 经 24 h 恢复后 Hsp27 表达水平与对照组无显著性差异。如图 4b 所示: 低温 8 °C 胁迫后, 翡翠贻贝鳃组织 Hsp27 的表达水平无显著变化, 但恢复 24 h 后显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ); 15 °C 胁迫后, Hsp27 的表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 达到对照组的 2 倍, 恢复 24 h 后与对照组无显著差异; 高温 35 °C 胁迫后, Hsp27 的表达水平显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 恢复 24 h 后回到对照组水平; 42 °C 胁迫后, Hsp27 的表达水平无显著变化, 但恢复 24 h 后显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。



说明: 急性胁迫组与对照组之间的差异显著性以 \* 表示, 恢复组与对照组之间的差异显著性以 # 表示

Notes: Significant ( $P < 0.05$ ) differences between acute stress and the control were represented by asterisk(\*), differences between 24 h recovery (in control seawater after stress) and their corresponding control were considered statistically significant (#) at  $P < 0.05$

图 4 不同温度下紫贻贝与翡翠贻贝鳃组织 Hsp27 蛋白表达变化

Fig.4 The expression of Hsp27 in the gill tissue of *M. galloprovincialis* and *P. viridis* after temperature stress

## 3 讨论

环境温度是影响海洋无脊椎动物新陈代谢水平的重要因素, 温度的频繁变化会导致生物细胞理化性质、能量收支、免疫机能等的改变, 从而导致机体正常代谢受阻<sup>[19]</sup>。耗氧率和排氨率常用于检测水生动物在环境胁迫下的生理及能量收支状况<sup>[20]</sup>。本研究结果显示, 低温胁迫会造成紫贻贝耗氧率显著降低 ( $P < 0.01$ )。已有研究表明, 低温会显著减弱贝类的正常呼吸及其他生理活动, 例如虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)<sup>[19]</sup>、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)<sup>[21]</sup>、南非鲍 (*Haliotis midae*)<sup>[22]</sup> 以及翡翠贻贝<sup>[7]</sup>。本研究在 35 °C 以下, 紫贻贝耗氧率随着温度的上升而增加, 但在 35 °C 胁迫后显著下降 ( $P < 0.01$ ) (见图 1a)。文献 [23] 研究表明, 厚壳贻贝的耗氧率也会随温度的升高而增加, 但达到温度峰值后则下降。以上结果表明, 35 °C 可能已经超过了紫贻贝最适的温度上限, 过高的温度导致了贻贝正常呼吸受到抑制。恢复 24 h 后, 紫贻贝低温胁迫组耗氧率得到部分恢复, 说明耗氧率可以通过温度的改善而有所上升, 但是恢复 24 h 无法回到正常水平。翡翠贻贝的耗氧率同样在低温胁迫后显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 并随温度的增加而上升 (见图 1b)。林小涛等<sup>[17]</sup>的研究结果显示翡翠贻贝在 16 ~ 31 °C 温度范围内, 耗氧率会随着温度的升高而增加。但是本研究结果显示在 42 °C 胁迫后, 翡翠贻贝耗氧率达到最高值, 表明此温度可能是翡翠贻贝的耐受上限温度。

低温干露胁迫会造成紫贻贝排氨率显著降低 ( $P < 0.01$ ), 樊甄姣等<sup>[24]</sup>的实验结果表明, 低温会造成水生生物体液流动缓慢, 进而使得代谢水平降低, 因此本研究结果提示低温胁迫可能会对贻贝的

代谢产生抑制作用。但紫贻贝在 35 °C 刺激下排氨率达到最大值 (见图 2a), 恢复 24 h 后, 35 °C 刺激恢复组仍显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 这表明温度的升高会加速贝类体内各种生化反应速率, 致使机体的新陈代谢加快<sup>[7]</sup>, 并且温度急性胁迫后贝类需要消耗更高的能量<sup>[25]</sup>。低温 8 °C 干露胁迫会导致翡翠贻贝排氨率降低, 且随温度的升高而逐渐上升, 但 42 °C 胁迫后, 排氨率显著下降 (见图 2b)。当环境温度急剧升高, 海洋生物会以自身的代谢补偿来提高代谢率<sup>[26]</sup>, 但是当达到生物耐受上限时, 代谢率可能会出现急剧降低。本研究结果表明, 紫贻贝与翡翠贻贝的呼吸代谢会受到温度暴露的影响, 且在极端温度胁迫后无法恢复正常水平, 可能是由于温度影响了贝类正常的酶活性, 从而改变了贝类的生理生化活动<sup>[21]</sup>。紫贻贝在受到高温胁迫后, 耗氧率降低而排氨率增加, 提示温度过高可能会加速其机体分解代谢, 另外, 低温胁迫后其恢复能力较强。翡翠贻贝在受到高温胁迫后, 氧代谢加速, 但是排氨率降低, 提示其应对高温胁迫可能不同于紫贻贝, 另外, 受到温度胁迫后其恢复正常水平可能需要更长时间。以上结果表明紫贻贝可能通过减少耗氧, 加速分解代谢应对高温胁迫, 而翡翠贻贝则是通过增加耗氧, 降低分解代谢来应对。

鳃不仅是贝类的呼吸器官, 也是摄食器官, 通过鳃丝纤毛的摆动可以过滤海水中的食物, 并起到运输气体及离子交换等作用<sup>[27]</sup>。本实验结果显示: 低温胁迫后, 紫贻贝鳃丝间隔增大; 高温 35 °C 胁迫后, 鳃丝纤毛搭接处断裂, 鳃丝断裂并发生细胞核外溢的现象 (见图 3), 且恢复 24 h 后, 鳃组织结构无显著改变。鱼类的相关研究结果指出, 低氧<sup>[28]</sup>、高温<sup>[29]</sup>及空气暴露<sup>[30]</sup>均可以导致鱼的鳃组织结构发生改变。低温造成鱼类的鳃丝面积减小, 可以降低鳃的呼吸表面积, 从而改善缺氧状况<sup>[31-32]</sup>。由此可见, 贻贝在低温暴露胁迫下, 可能通过加大鳃丝间隔改变鳃表面积以应对环境温度的变化。对照组 15 °C 干露胁迫后, 紫贻贝鳃纤毛出现少量脱落, 但并不显著, 说明短时间的干露胁迫对鳃组织结构造成一定损伤, 这可能是由缺氧引起, 但损伤程度低, 并可在一定时间内恢复。在贝类的研究中发现, 缺氧胁迫下, 鳃纤毛显著脱落, 且鳃丝纤毛搭接处断裂<sup>[33]</sup>。本研究在 25 °C 下鳃组织结构也无明显损伤, 表明紫贻贝可能对适度的高温有一定耐受性。温度胁迫后, 翡翠贻贝鳃组织结构的变化趋势与紫贻贝类似, 但在 8 °C 胁迫后鳃丝间隔增大, 并且鳃纤毛脱落及鳃丝纤毛搭接处断裂, 而 8 °C 下紫贻贝仅观察到增加的鳃丝间隔, 表明该温度下翡翠贻贝的损伤程度可能更为严重。高温胁迫后, 翡翠贻贝鳃组织同样出现鳃纤毛脱落及鳃丝断裂的现象。以上结果显示在极端的温度暴露下, 贻贝鳃组织结构可能会出现不可逆转的损伤, 从而破坏机体对环境因子的调节机制。与紫贻贝相比, 翡翠贻贝鳃组织在低温 8 °C 与高温 42 °C 下损伤严重, 程度均高于紫贻贝, 这可能与温度耐受性有关。

温度刺激会引起生物体细胞骨架以及线粒体的损伤, 而热休克蛋白可以修订错误的蛋白折叠, 从而维持细胞稳态<sup>[34-35]</sup>。研究表明, Hsp27 的过量表达可以抑制细胞凋亡, 发挥保护细胞的作用<sup>[36]</sup>。本实验结果显示, 低温胁迫会造成紫贻贝鳃组织 Hsp27 表达水平的显著升高 ( $P < 0.01$ ) (见图 4a)。鱼类的相关研究显示, 低温胁迫会显著提高大黄鱼 Hsp27 的转录水平<sup>[37]</sup>。以上表明低温可以显著诱导紫贻贝 Hsp27 的表达水平以响应胁迫。有研究表明热应激会显著提高紫贻贝 Hsp27 的转录表达<sup>[38]</sup>, 然而本实验结果显示, 高温胁迫对紫贻贝鳃组织 Hsp27 蛋白表达无显著影响, 这可能是由于紫贻贝在高温响应过程中, Hsp27 转录与蛋白表达存在一定差异。适度的低温和高温胁迫均会造成翡翠贻贝鳃组织 Hsp27 蛋白表达的显著升高 ( $P < 0.01$ ) (见图 4b), 这表明 Hsp27 可能在翡翠贻贝抗低温和高温胁迫方面发挥重要作用。低温胁迫可以诱导这两种贻贝鳃组织 Hsp27 的过量表达, 提示 Hsp27 可能在贻贝应答温度胁迫过程中起到减轻细胞损伤或者帮助细胞进行修复的功能, 而高温胁迫后, 紫贻贝与翡翠贻贝 Hsp27 表达不同, 提示这两种贻贝的高温响应机制可能存在差异。

综上所述, 在一定温度范围内, 贻贝的耗氧率与排氨率会随温度的升高而增加, 但在较高的胁迫温度下, 机体代谢水平会显著改变。低温和高温胁迫导致贻贝鳃组织结构改变, 低温造成鳃丝间隔加大, 鳃纤毛脱落, 而高温则造成鳃丝断裂, 细胞核外溢。低温可以诱导紫贻贝鳃组织 Hsp27 的过量表达, 而翡翠贻贝 Hsp27 则是在适度低温及高温胁迫后显著表达, 表明两种贻贝抵抗温度胁迫的应

答反应存在差异,紫贻贝对低温响应更积极,而翡翠贻贝应对极端低温与高温的主动反应能力更弱。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] PÖRTNER H O, KNUST R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance [J]. *Science*, 2007, 315(5808): 95-97.
- [2] BAYNE B L, BAYNE C J, THOMPSON R J. The physiological ecology of *Mytilus californianus* conrad 2: adaptations to low oxygen tension and air exposure [J]. *Oecologia*, 1976, 22(3): 211-228.
- [3] ANESTIS A, LAZOU A, PÖRTNER H O, et al. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, 293(2): 911-921.
- [4] LOCKWOOD B L, SOMERO G N. Invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*) on the California coast: the role of physiology in a biological invasion [J]. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 2011, 400(1/2): 167-174.
- [5] 栗志民, 刘志刚, 谢丽, 等. 体重和温度对华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) 耗氧率和排氨率的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(1): 99-105.
- [6] 栗志民, 刘志刚, 谢丽, 等. 企鹅珍珠贝耗氧率和排氨率的研究 [J]. *海洋学报*, 2009, 31(6): 129-135.
- [7] 林小涛, 钟金香, 颀晓勇, 等. 温度对翡翠贻贝能量收支的影响 [J]. *海洋科学*, 2002, 26(4): 13-16.
- [8] ALEXANDER J E, JR, MCMAHON R F. Respiratory response to temperature and hypoxia in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology: Part A Molecular & Integrative Physiology*, 2004, 137(2): 425-434.
- [9] MORIMOTO R I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators [J]. *Genes Development*, 1998, 12(24): 3788-3796.
- [10] MAO L, SHELDEN E A. Developmentally regulated gene expression of the small heat shock protein Hsp27 in zebrafish embryos [J]. *Gene Expression Patterns Gep*, 2006, 6(2): 127-133.
- [11] MAO L, BRYANTSEV A L, CHECHENOVA M B, et al. Cloning, characterization, and heat stress-induced redistribution of a protein homologous to human hsp27 in the zebrafish *Danio rerio* [J]. *Experimental Cell Research*, 2005, 306(1): 230-241.
- [12] WANG J S, WEI Y H, LI X M, et al. The identification of heat shock protein genes in goldfish (*Carassius auratus*) and their expression in a complex environment in Gaobeidian Lake, Beijing, China [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology: Part C Toxicology & Pharmacology*, 2007, 145(3): 350-362. DOI:10.1016/j.cbpc.2007.01.018.
- [13] LOWE S, BROWNE M, BOUDJELAS S, et al. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database [R/OL]. Auckland, New Zealand: ISSG of SSC of IUCN, 2000: 12[2018-01-01]. <http://www.issg.org/booklet.pdf>.
- [14] LOCKWOOD B L, SANDERS J G, SOMERO G N. Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(20): 3548-3558.
- [15] 罗有声. 贻贝养殖技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 49.
- [16] RAJAGOPAL S, VENUGOPALAN V P, VELDE G V D, et al. Greening of the coasts: a review of the *Perna viridis* success story [J]. *Aquatic Ecology*, 2006, 40(3): 273-297.
- [17] 梁伟锋. 不同因子对岩扇贝摄食率、耗氧率和排氨率的影响 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
- [18] 芮菊生. 组织切片技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1980.
- [19] 姜妮妮. 扇贝和皱纹盘鲍对温度变化的生理响应研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [20] CHEN J C, CHEN K W. Oxygen uptake and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus*, during depuration following one-day exposure to different concentrations of saponin at different salinity levels [J]. *Aquaculture*, 1997, 156(1/2): 77-83.
- [21] BOUGRIER S, GEAIRON P, DESLOUSPAOLI J M, et al. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. *Aquaculture*, 1995, 134: 143-154.

- [22] VOSLOO D, VOSLOO A. Response of cold-acclimated, farmed South African abalone (*Haliotis midae*) to short-term and long-term changes in temperature [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2010, 35(7): 317-323. DOI:10.1016/j.jtherbio.2010.06.006.
- [23] 王跃斌, 孙忠, 胡则辉, 等. 温度和盐度对厚壳贻贝耗氧率的影响 [J]. *浙江海洋学院学报 (自然科学版)*, 2014, 33(6): 511-514.
- [24] 樊甄姣, 吴文常, 皇甫淑燕, 等. 温度、盐度、pH 对角螺螺排氨率的影响 [J]. *渔业现代化*, 2007, 34(3): 32-36.
- [25] 徐东, 张继红, 王文琪, 等. 温度变化对虾夷扇贝耗氧率和排氨率的影响 [J]. *中国水产科学*, 2010, 17(5): 1101-1106.
- [26] TIAN X L, DONG S L, WANG F, et al. The effects of temperature changes on the oxygen consumption of juvenile Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* Osbeck [J]. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 2004, 310(1): 59-72.
- [27] 黎筠. 紫石房蛤壳性状、摄食与消化系统及核 DNA 的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [28] SOLLID J, DE A P, GUNDERSEN K, et al. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(20): 3667.
- [29] SOLLID J, WEBER R E, NILSSON G E. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2005, 208(6): 1109-16.
- [30] ONG K J, STEVENS E D, WRIGHT P A. Gill morphology of the mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*) is plastic and changes in response to terrestrial air exposure [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2007, 210(7): 1109-1115.
- [31] NILSSON G E. Gill remodeling in fish: a new fashion or an ancient secret? [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2007, 210(14): 2403-2409.
- [32] 陈波见. 温度对六种鲤科鱼类临界氧压 ( $P_{crit}$ ) 及鳃部形态结构的影响 [D]. 重庆: 重庆师范大学, 2011.
- [33] 顾叶丹, 尚跃勇, 袁明哲, 等. 缺氧和有毒微囊藻胁迫下三角帆蚌鳃和主要消化器官以及晶杆体的扫描电镜观察 [J]. *水产学报*, 2016, 40(9): 1486-1496.
- [34] LANNEAU D, WETTSTEIN G, BONNIAUD P, et al. Heat shock proteins: cell protection through protein triage [J]. *Scientific World Journal*, 2010, 10(1): 1543.
- [35] CLEMENTS R T, FENG J, CORDEIRO B, et al. p38-MAPK-dependent heat shock protein 27 (Hsp27) and  $\alpha$ B-crystallin (cryAB) phosphorylation in regulation of myocardial function following cardioplegic arrest [J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2011, 300(5): 1669-1677.
- [36] CONCANNON C G, GORMAN A M, SAMALI A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2003, 8(1): 61-70.
- [37] YANG Q L, YAO C L, WANG Z Y. Acute temperature and cadmium stress response characterization of small heat shock protein 27 in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*, 2012, 155(2): 190-197.
- [38] NEGRI A, OLIVERI C, SFORZINI S, et al. Transcriptional response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) following exposure to heat stress and copper [J]. *Plos One*, 2013, 8(6): e66802.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)