

# 高温刺激导致虾夷扇贝死亡因素的探究

刘超<sup>1,2,3,4</sup>, 吴富村<sup>1,3,4</sup>, 林思恒<sup>1,2,3,4</sup>, 阙华勇<sup>1,3,4</sup>, 张国范<sup>1,3,4</sup>

(1. 中国科学院 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071; 4. 中国科学院 海洋研究所 海洋生态养殖技术国家地方联合工程实验室, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 本文探究了高温刺激导致一龄和二龄虾夷扇贝死亡的原因。在高温刺激以及恢复过程中, 两种贝龄的扇贝存活率存在显著差异( $P < 0.05$ ), 同时两者的谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, GPT)活性、p53 蛋白含量、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, TAOC)以及 HSP70 (heat shock protein 70) 含量在高温刺激以及恢复过程中的变化均存在显著差异。而且这些酶的活性(TAOC 活性除外)以及蛋白质含量(p53 以及 HSP70)均受到贝龄、处理时间以及两者综合作用的显著影响。经过 Cox 模型分析可知, 虾夷扇贝受到高温刺激后的存活受到贝龄、GPT 活性、TAOC 活性、p53 含量以及 HSP70 含量的显著影响。此外, 高温刺激会影响扇贝的心跳频率以及心输出量, 从而影响心脏对机体的供氧供血能力, 影响扇贝对高温的适应能力。

**关键词:** 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*); 存活曲线; 谷丙转氨酶; 总抗氧化能力; HSP70; p53; 心率  
**中图分类号:** S917.4   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1000-3096(2016)11-0091-08  
**doi:** 10.11759/hyhx20151008001

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)是一种冷水性双壳贝类。自 20 世纪 80 年代引入中国以来, 虾夷扇贝的养殖业取得了迅猛发展。但是随着养殖规模的扩大, 养殖虾夷扇贝的夏季死亡等问题也不断出现<sup>[1]</sup>。1997~1998 年, 虾夷扇贝养殖在山东半岛出现了大面积的死亡情况, 累计经济损失达到 30 亿元<sup>[2]</sup>。2009 年, 大连市长海县虾夷扇贝在 5 月份死亡率超过 50%, 7 月份之后死亡率更是高达 80%, 给养殖业带来巨大损失<sup>[3]</sup>。据相关文献报道, 双壳贝类夏季大规模死亡的原因是多方面的, 是自身生理机能、外界环境以及外界病原综合作用的结果<sup>[4]</sup>。虽然导致扇贝夏季死亡的具体原因尚无定论, 但是温度变化是一个重要因素<sup>[5-6]</sup>。

温度是影响海洋生物分布、生理状态、形态以及行为的重要环境因子<sup>[7]</sup>。温度变化会影响海洋生物的生长发育、能量代谢以及免疫能力<sup>[8-9]</sup>。较低的升温对许多海洋无脊椎动物是有益的, 可能会导致生长加快<sup>[10-12]</sup>, 而过高的升温幅度一般会引起生物的应激反应, 进而会对生物产生广泛的危害<sup>[12-13]</sup>。对于贝类而言, 过高的温度变化导致的应激反应主要包括作为分子伴侣的热激蛋白(heat shock protein, HSP)家族的大量产生以及起防卫功能的细胞黏附蛋白的增加。伴随高温往往出现低氧, 低氧会引起抗氧化蛋

白、Reactive Oxygen Species(ROS)解毒相关蛋白例如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等的产生以及 DNA 损伤等现象的出现。高温和低氧伴随出现导致扇贝对温度耐受过程中的应激反应往往是两方面综合作用的结果<sup>[14-16]</sup>。

虾夷扇贝在夏季出现大规模死亡现象报道较多, 但是关于温度刺激如何影响其生理活性并导致其死亡, 以及为何一龄贝比二龄贝更能耐受夏季高温的原因等方面的报道较少。本研究检测了虾夷扇贝在高温刺激以及恢复过程中虾夷扇贝部分免疫、代谢相关指标并测定了其存活率。利用 Cox 模型分析扇贝存活率同这些生理因素之间的关系。同时利用扇贝在高温条件下心率的变化进行扇贝能量代谢方面

收稿日期: 2015-10-08; 修回日期: 2016-06-17

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-48); 山东省泰山学者攀登计划项目; 中国科学院科技服务网络计划项目(KFJ-EW-STS-060)

[Foundation: the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System, No.CARS-48; Taishan Scholars Climbing Program of Shandong; Science and Technology Service Network Initiative of the Chinese Academy of Sciences, No.KFJ-EW-STS-060]

作者简介: 刘超(1984-), 男, 山东潍坊人, 博士研究生, 主要从事海水养殖方面的研究, 电话: 0532-82898726, E-mail: liuchaofighting@163.com; 张国范, 通讯作者, 研究员, 电话: 0532-82898701, E-mail: gfzhang@qdio.ac.cn

的预测。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验用扇贝

实验用虾夷扇贝取自獐子岛集团海洋生物技术研发部培育的家系。将 800 枚二龄贝(体质量 78.14 g±15.54 g, 壳长 79.79 mm±5.28 mm)和 1000 枚一龄贝(体质量 8.37 g±1.77 g, 壳长 40.22 mm±5.28 mm)暂养于 16℃曝气海水中, 每天 10:00 全部换水, 11:00 和 23:00 投喂螺旋藻粉(2 g/m<sup>3</sup>)。待个体状态稳定后进行以下实验。

### 1.2 高温刺激

取一龄贝和二龄贝各 300 枚均平均分为 3 组由 16℃直接放入 28℃海水中, 统计虾夷扇贝在 28℃刺激 1 h 和 2 h 后的存活数目。刺激 2 h 后, 将存活的一龄贝和二龄贝转移进入 16℃海水中, 统计 3、24、30、48、72 h 时虾夷扇贝的存活数目。实验期间不投饵, 只进行曝气与换水, 并用 YSI 型多参数水质检测仪精确监控水温变化。

### 1.3 扇贝生理指标测定

另取一龄和二龄虾夷扇贝各 300 枚也均平均分为 3 组, 进行如 1.2 所述的高温刺激过程。同时分别在未刺激、刺激 1 h, 刺激 2 h(结束刺激), 以及转入 16℃海水后的 3、24、30 和 48 h, 每组取 5 只扇贝剪取鳃组织, 液氮冷冻后存于-80℃, 用于以下指标的测定。

将同一时间点取样的 5 只同龄扇贝鳃组织等量混合后加入 10 倍体积的 0.9%生理盐水, 在冰上匀浆, 4℃下, 2000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于总抗氧化能力(TAOC)、谷丙转氨酶(GPT)、热激蛋白(HSP70)与 p53 蛋白等生理指标的测定。其中 TAOC、GPT 使用南京建成科技有限公司的试剂盒测定, HSP70 以及 p53 蛋白含量使用相应的酶联免疫反应试剂盒进行测定。

### 1.4 心率测定

利用 powerlab 信号放大器结合 Labchart 软件采集虾夷扇贝的心率数据。将 5 只一龄或者二龄虾夷扇贝放入 16℃海水中, 用蓝丁胶将信号探头黏附于扇贝心脏上方的贝壳之上, 待扇贝的心跳曲线稳定后保存扇贝的心跳频率(beats per minutes, BPM)数据, 数据采集时间为 1 分钟。保存完毕后, 继续以

0.5℃/min 速度升温至 18℃, 待扇贝心跳稳定后保存心跳频率数据, 同样的操作依次测定 20、22、24、26、28℃以及 30℃条件下虾夷扇贝的心跳频率数据。每次选取 5 只同龄扇贝作为 1 个平行组, 将其在不同温度条件下的心跳频率(BPM)数据进行混合, 并依据阿伦尼乌斯定律作出 1000/K-ln BPM 散点图, 求出扇贝的阿伦尼乌斯点(Arrhenius break temperature, ABT)<sup>[17]</sup>。一龄贝和二龄贝均设置 3 组平行, 分别计算得到一龄贝和二龄贝的 ABT 均值。

### 1.5 数据分析

利用 SPSS 19.0 软件进行扇贝的生存分析。利用单因素方差分析比较同龄扇贝的各项生理指标在不同温度刺激处理时间点的差异。利用独立样本 T 检验比较不同贝龄扇贝在同一处理时间处差异是否显著, 若  $P < 0.05$ , 则认为差异显著。用多因素方差分析比较贝龄、处理时间以及两者交互作用对扇贝各项生理指标的影响的差异。并利用 Cox 模型分析存活率与生理指标之间的关系。

## 2 实验结果

### 2.1 存活分析

将刺激开始时间作为生存曲线的计时起点。高温刺激 2 h 之后进入 16℃海水中进行恢复, 观察恢复 72 h 之内虾夷扇贝的存活状况。得到一龄贝和二龄贝的生存曲线如图 1 所示。经过 28℃高温刺激 2 h 以及后续的恢复过程中, 一龄贝和二龄贝的存活率差异显著( $P = 0.034 < 0.05$ )。

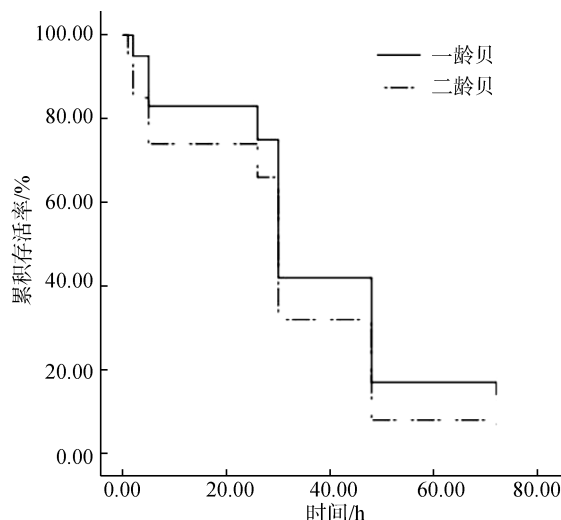


图 1 一龄贝和二龄贝生存曲线  
Fig. 1 Survival curve of one- and two-year old yesso scallops

## 2.2 代谢及免疫指标活性变化

由图 2 可知, 两贝龄扇贝的 GPT 活性随着处理时间的变化规律并不相同。一龄贝的 GPT 活性在高温处理 2 h 与恢复后 3 h 时达到最高, 显著高于其他时间点( $P<0.05$ ); 二龄贝的 GPT 活性在高温处理 2 h 以及恢复后 3 h 最低, 要显著低于其它时间点。此外, 在同一时间点, 二龄贝的 GPT 活性显著高于一龄贝 ( $P<0.05$ )。

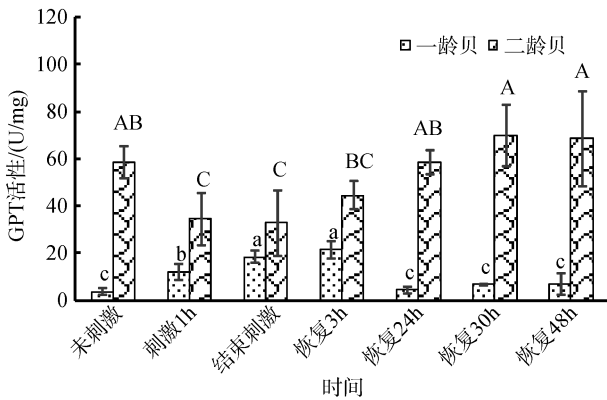


图 2 一龄贝和二龄贝中谷丙转氨酶(GPT)活性

Fig. 2 GPT activity in one- and two-year old yesso scallops 不同的字母代表差异显著 ( $P<0.05$ ), 一龄贝之间的差异用小写字母表示, 二龄贝之间的差异用大写字母来表示, 下同  
Different letters represent a significant difference ( $P<0.05$ ). The differences between the one-year olds are indicated by lower case, and the differences between the two-year olds are represented by capital letters. The same below

p53 含量在两贝龄贝体内随处理时间的变化均表现出先升高后降低的变化规律, p53 含量最高值均出现在恢复 3 h (图 3)。从结束刺激到恢复 48 h 时间内, 一龄贝体内的 p53 质量比显著高于二龄贝 ( $P<0.05$ )。

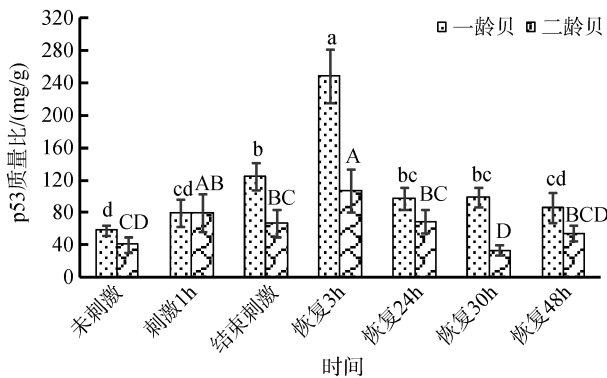


图 3 一龄贝和二龄贝中 p53 蛋白含量变化

Fig. 3 Concentration of p53 in one- and two-year old yesso scallops

两贝龄扇贝的 TAOC 活性随着处理时间的变化不明显, 并且在一龄贝与二龄贝之间差异不显著(图 4)。高温刺激后, 一龄贝的 TAOC 活性相对于未刺激阶段没有显著变化, 但是在恢复至 30 h 和 48 h 时, TAOC 活性较刺激结束时显著降低。二龄贝的 TAOC 活性则在恢复至 24 h 以及 48 h 时显著降低。

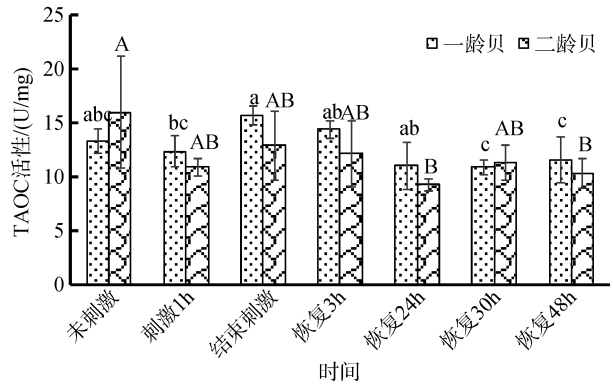


图 4 一龄贝和二龄贝中 TAOC 活性变化

Fig. 4 TAOC activity in one- and two-year old yesso scallops

由图 5 可知, 一龄贝的 HSP70 含量受到高温刺激后迅速升高, 在刺激 2 h 后达到最高值, 一直维持到恢复 24 h, 并且在恢复 48 h 后仍显著高于未受刺激时的 HSP70 含量。高温刺激并未导致二龄贝的 HSP70 含量显著升高, 只是在恢复 30 h 后显著高于其他时间点 ( $P<0.05$ )。高温刺激后, 一龄贝体内 HSP70 含量显著高于二龄贝, 但是未受高温刺激以及恢复 30 h 时, 二龄贝体内 HSP70 含量显著高于一龄贝。

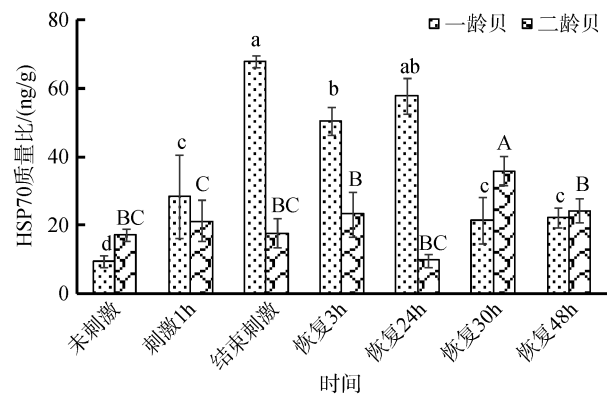


图 5 一龄贝和二龄贝 HSP70 蛋白含量

Fig. 5 Concentration of HSP70 in one- and two-year old yesso scallops

多因素方差分析结果显示, 贝龄、处理时间以及两者的交互作用对 GPT 活性、p53 含量以及 HSP70

含量变化的有显著影响( $P < 0.05$ ), 而 TAOC 活性只受到处理时间的显著影响(表 1)。

表 1 各项生理指标同贝龄、处理时间的相关性

Tab. 1 Relationship between physiology index, age, and challenge time

项目	GPT 活性		p53 含量		TAOC 活性		HSP70 含量	
	F	P	F	P	F	P	F	P
贝龄	349.09	0.00	80.81	0.00	1.81	0.19	91.14	0.00
时间	3.37	0.01	33.90	0.00	3.92	0.01	20.64	0.00
贝龄*时间	12.34	0.00	10.53	0.00	1.12	0.38	38.32	0.00

### 2.3 扇贝生存同各项生理指标的 Cox 模型分析

Cox 模型分析结果显示, 高温处理后虾夷扇贝的存活率同贝龄、GPT 活性、p53 含量、TAOC 活性以及 HSP70 含量变化均显著相关( $P < 0.05$ ), 其中 GPT 活性同扇贝的存活负相关( $B < 0$ ), 其余因素同扇

贝存活呈显著正相关( $B > 0$ , 表 2)。

### 2.4 心率变化

由图 6 可知, 一龄和二龄虾夷扇贝在 20℃ 条件下均具有明显的心跳节律, 随着温度升高, 至 30℃ 时, 扇贝的心跳已经没有规律, 心脏基本停止跳动。

表 2 Cox 模型分析中各项系数以及显著性

Tab. 2 Coefficients and significant factors in the Cox model

项目	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
贝龄	11.009	1.282	73.800	1	0.000	60421.422
GPT	-0.166	0.019	75.161	1	0.000	0.847
TAOC	0.359	0.152	5.582	1	0.018	1.432
P53	0.025	0.005	30.072	1	0.000	1.026
HSP70	0.085	0.013	46.154	1	0.000	1.089

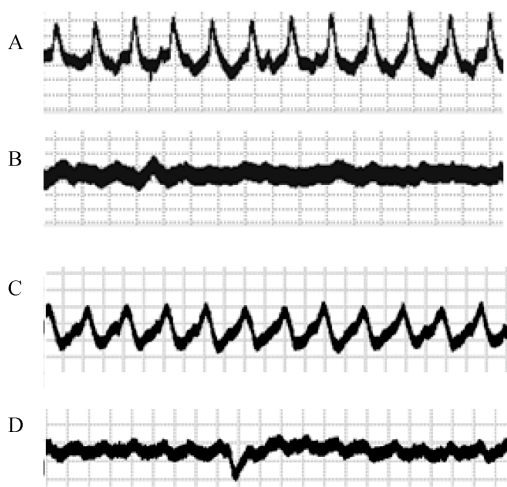


图 6 扇贝心跳曲线的变化

Fig. 6 Yesso scallop's electrocardiogram

A. 一龄贝, 20℃; B. 一龄贝, 30℃; C. 二龄贝, 20℃; D. 二龄贝, 30℃  
 A. one-year yesso scallop, 20℃; B. one-year yesso scallop, 30℃;  
 C. two-year yesso scallop, 20℃; D. two-year yesso scallop, 30℃

由图 7 可知道, 在一定温度范围内, 扇贝的心率随着温度的升高而升高。待达到一定温度(阿伦尼乌斯点, ABT)后, 心率开始逐渐降低, 最后心脏失去节

律性, 停止跳动。经计算, 图 7 中一龄和二龄贝的阿伦尼乌斯点分别为 25.49℃ 和 26.55℃。经过 3 个平行组计算得到一龄虾夷扇贝的阿伦尼乌斯点为 25.37℃ ± 0.08℃, 二龄贝的阿伦尼乌斯点为 26.47℃ ± 0.07℃, 两者差异显著( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

高温刺激会影响虾夷扇贝的生理、生长、存活等<sup>[18]</sup>方面。从图 1 可以看出, 高温刺激之后, 扇贝在恢复过程中仍然存在死亡情况。所以, 高温对扇贝存活的影响有滞后效应。而且扇贝的贝龄严重影响扇贝对高温的适应能力: 二龄贝对高温的适应能力不如一龄贝, 两者的累计存活率存在显著差异( $P < 0.05$ )。这表明在同样的温度刺激条件下, 一龄贝在恢复过程中存活率更高, 其对高温的耐受能力更强。高温对生物存活的影响主要通过对其生理、生化因素的影响进而影响其存活<sup>[19]</sup>。

GPT 是一种与氨基酸代谢相关的转氨酶, 主要分布于细胞线粒体中, 其活性越高蛋白质的氧化分解作用越迅速, 其代谢能力越强<sup>[20]</sup>。此外血淋巴中

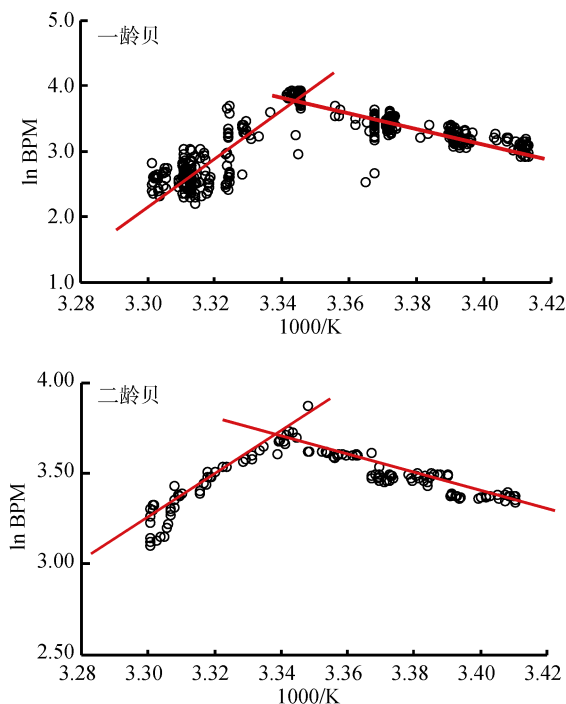


图 7 一龄贝与二龄贝的 1000/K-lnBPM 图

Fig. 7 One- and two-year old yesso scallop heart rates in 1000/K-lnBPM

GPT 活性较低, 当血淋巴中 GPT 活性上升往往是由于细胞完整性受到破坏而释放导致的<sup>[21]</sup>, 因此 GPT 活性的增强通常用来作为指示细胞代谢活性以及组织损伤的诊断指标<sup>[22-23]</sup>。本研究测定的是鳃组织中的 GPT 活性变化, 故 GPT 活性代表的是虾夷扇贝对蛋白质的氧化分解能力。由图 2 可知一龄贝和二龄贝体内 GPT 活性随着处理时间的变化呈现完全相反的变化过程。这一相反过程说明, 一龄贝在受到高温刺激的时候能够通过提高 GPT 的活性加速新陈代谢能力来提高对高温的适应能力, 而二龄贝受到高温刺激后, GPT 活性会受到损害, 导致扇贝对高温的适应能力降低, 导致其死亡率偏高。对于 GPT 活性在恢复处理中的活性恢复速度而言, 一龄贝的 GPT 活性在恢复 3~24 h 时迅速恢复到未刺激之时的水平, 而二龄贝的 GPT 活性则需要刺激结束到恢复 30 h 之间缓慢恢复到未刺激之时的水平。从而也说明一龄贝 GPT 活性变化更迅速, 有更强的对逆境的适应能力和自我修复能力。连珊珊研究证实, 二龄栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)外套膜、性腺、闭壳肌以及鳃中 GPT 活性显著高于一龄贝<sup>[20]</sup>, 这与本文章的结论相吻合, 据此可以推断正常状态下(未刺激)二龄虾夷扇贝具有更强的蛋白质代谢活性, 处于快速生长阶段。

p53 又被称作肿瘤抑制因子, 它在细胞凋亡中起着重要作用。DNA 损伤以及不正常的细胞增殖信号都会引起 p53 蛋白的激活, 若 DNA 损伤程度达到一定阈值, p53 蛋白会激活 caspase 蛋白, 促使细胞凋亡<sup>[24-25]</sup>。如果 DNA 损伤在阈值之内, 那么 p53 会激活 p21 等蛋白, 使细胞周期停滞进而对损伤的 DNA 进行修复<sup>[26]</sup>。如图 3 所示, 一龄贝和二龄贝体内, p53 蛋白含量均在恢复 3h 时达到最高。这说明高温刺激后 3 h 是扇贝进行自我修复或者凋亡的高峰期。此外, 一龄贝体内 p53 含量显著高于或者等于二龄贝, 说明一龄贝对高温刺激的适应能力更强, 这也为一龄贝的存活率高于二龄贝提供了证据。在两种贻贝(*Mytilus californianus* 和 *M. galloprovincialis*)的高温应激实验中, 其 p53 含量均在受到 28℃ 刺激 8h 后达到最高, 分别为对照组的 1.6 倍和 2.1 倍<sup>[27]</sup>。本研究中一龄贝含量最高时的 p53 含量是未刺激之时的 4.3 倍, 二龄贝则为 2.7 倍, 这在一定程度上说明虾夷扇贝比贻贝具有更强通过控制 p53 含量来适应高温刺激的能力, 也更进一步说明了一龄贝具有比二龄贝更强的自我修复能力。

生物体内的氧化防御系统分为酶类和非酶类两种。前者包括过氧化氢酶(Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)等, 非酶类包括维生素 E、半胱氨酸等。他们在消除生物体内活性氧(ROS)的过程中起着重要作用。TAOC 是反映生物体内抗氧化能力的总体指标, 是酶类和非酶类抗氧化物的总体水平<sup>[28]</sup>。对于一龄贝, 在高温刺激以及恢复过程中的 TAOC 活性同未刺激之时活性相比均没有显著变化。在二龄贝体内, 其 TAOC 活性并没有随着处理时间而出现明显变化, 但是恢复至 24 h 以及 48 h 时的 TAOC 活性明显低于未刺激之时的 TAOC 活性, 这说明一龄贝中 TAOC 活性对高温刺激的能力更强。据报道, 两种规格的虾夷扇贝(*P. yessoensis*)体腔液中 TAOC 活性在 24℃ 升至 30℃ 的变化过程中均显著降低<sup>[29]</sup>, 由此推断虾夷扇贝体腔液中 TAOC 较鳃中 TAOC 更容易受到高温刺激的影响而降低活性。这也为底播扇贝在 8 月份(高温)TAOC 活性低而 12 月(低温)TAOC 活性高(本实验室未发表的实验数据)提供了解释。原因可能是持续的高温会使生物体内酶类和非酶类的氧化防御物质失活, 从而导致 TAOC 活性降低<sup>[30]</sup>。

热激蛋白家族(HSPs)是变温动物抵御高温危害的一种重要的蛋白质家族。这一家族的蛋白在维持蛋白质的稳态以及防止高温引起的蛋白质的聚集和降解方面起着关键作用, 从而提高生物体对高温的

耐受能力<sup>[31-32]</sup>。此外, HSP 家族蛋白还可以维持溶酶体的稳定性, 防止细胞死亡<sup>[33]</sup>。如图 5 所示, 一龄虾夷扇贝的 HSP70 含量在受到高温刺激后迅速升高, 在刺激结束时达到最高值。而对于二龄贝, HSP70 含量没有显著变化, 直到恢复 30 h 时含量较其他时期显著提高。所以, 二龄贝通过调节 HSP70 含量来适应高温刺激的能力不如一龄贝。据曲凌云报道<sup>[34]</sup>, 受到高温刺激后栉孔扇贝鳃组织中 HSP70 的表达明显升高, 这与本研究的结果相同。此外长牡蛎(*Crassostrea gigas*) 在受到 27°C 高温刺激 1 h 之后的 2~14 d 内, 鳃中 HSP70 含量呈现先上升后下降趋势<sup>[35]</sup>, 这与本研究中虾夷扇贝鳃中 HSP70 含量变化趋势相一致但是虾夷扇贝 HSP70 含量变化受到高温刺激之后的变化更迅速。

为了分析 GPT 活性、p53 含量、TAOC 活性以及 HSP70 含量变化是否受到贝龄、处理时间以及两者交互作用的显著影响, 进行多因素方差分析检验。如表 1 所示分析结果可知, GPT 活性、p53 蛋白含量以及 HSP70 含量均受到贝龄、处理时间以及两者综合作用的显著影响( $P < 0.05$ ), 而 TAOC 活性仅仅受到处理时间的显著影响。这与作者上面的分析相一致。Cox 模型又称 Cox 比例风险回归模型, 是一种能够定量筛选和综合分析各种因素的多因素分析方法, 从而克服混杂因素的干扰<sup>[36]</sup>。本研究利用 Cox 模型分析了影响虾夷扇贝存活的因素, 由表 2 可知, 影响虾夷扇贝存活的因素中, 贝龄、TAOC 活性、GPT 活性、HSP70 含量以及 p53 含量均会显著影响虾夷扇贝的存活。

心跳曲线体现的是扇贝心脏的收缩和舒张的频率变化, 进而体现心脏对生物体各组织器官的供血供氧能力。据 Ritto 等<sup>[37]</sup>报道, 美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*) 的心跳曲线有三个特征: (1)高度的不稳定性; (2)无周期性; (3)心跳曲线不规则。而在本研究中, 虾夷扇贝的心跳曲线的特点是: (1)同一个体心跳曲线具有周期性、规律性; (2)不同个体的心跳曲线往往具有不同的波形, 如图 6 中 A、C 的差异。当温度升高到一定数值时, 扇贝的心跳逐渐失去节律性, 心跳出现紊乱直至停止跳动, 如图 6 中 B、D 所示。依据 Giomi 的 stroke volume proxy(SVP)理论<sup>[16]</sup>, 将心跳曲线同横轴围成的面积当做心输出量进行讨论, 并结合图 6 可知, 当温度升高到一定程度时, 扇贝的心输出量在减少直至为 0。从而严重影响扇贝心脏的供血供氧能力, 导致扇贝机体的死亡。经过计算可知, 一龄扇贝的阿伦尼乌斯点显著低于二龄扇贝的阿伦尼乌斯点。扇贝等软体动物的无氧呼吸温度往往出

现在阿伦尼乌斯点之后<sup>[38]</sup>, 由此推断, 一龄扇贝出现无氧呼吸的温度或许会低于二龄扇贝, 这一观点还有待于进一步的实验研究。

总之, 虾夷扇贝受到高温刺激后的存活受到贝龄、GPT 活性、TAOC 活性、p53 含量以及 HSP70 含量的显著影响。这些酶活性(TAOC 活性除外)以及蛋白质含量均受到贝龄、处理时间以及两者综合作用的显著影响。这些酶的活性以及蛋白质含量在不同贝龄扇贝体内的差异, 导致了不同贝龄扇贝对高温刺激的耐受能力的差异, 进而导致了存活率的差异。此外, 温度会影响扇贝的心率以及心输出量, 从而影响心脏对机体的供氧供血能力, 影响扇贝对高温的适应能力。

#### 参考文献:

- [1] 常亚青, 陈晓霞, 丁君, 等. 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)5 个群体的遗传多样性[J]. 生态学报, 2007, 27(3): 1145-1152.  
Chang Yaqing, Chen Xiaoxia, Ding Jun, et al. Genetic diversity in five scallop populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(3): 1145-1152.
- [2] 王远隆, 李美真, 邱兆星, 等. 养殖扇贝大面积死亡的原因及对策[C]//第二届全国海珍品养殖研讨会论文集. 北京: 海洋出版社, 2000: 63-69.  
Wang Longyuan, Li Meizhen, Qiu Zhaoxing, et al. The reasons and tragedy for the mass mortality of cultured scallops[C]//The 2nd Rare Marine Animals Aquaculture Conference Proceedings. Beijing: Ocean Press, China, 2000: 63-69.
- [3] 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.  
Xu Dong, Zhang Jihong, Wang Wenqi, et al. Effects of temperature elevation on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Patinopecten yessoensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 84-93.
- [4] Li Q, X Zhao, L Kong, et al. Transcriptomic response to stress in marine bivalves[J]. Isj Invertebrate Survival Journal, 2013, 10(1): 84-93.
- [5] 张明明, 赵文. 我国虾夷扇贝死亡原因的探讨及控制对策[J]. 中国水产, 2008, 2: 65-66, 74.  
Zhang Mingming, Zhao Wen. The discussion on yesso scallops' mortality and the corresponding control strategy[J]. China Fisheries, 2008(02): 65-66, 74.
- [6] 蓝淑芳. 长山岛海区夏季扇贝大批死亡的水文原因分析[J]. 海洋科学, 1990, 2: 60-61.  
Lan Shufang. Hydrologic analysis of the death of scallops in sea area of Changshan island in summer[J]. Marine Sciences, 1990, 2: 60-61.

- [7] Pörtner, H. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view[J]. Marine Ecology Progress Series, 2008, 373: 203-217.
- [8] Matozzo V A, Chinellato M M. First Evidence of Immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature[J]. Plos One, 2012, 7(3): e33820.
- [9] Mataro O B, Ivanina A V, Ullstad C, et al. Interactive effects of elevated temperature and CO<sub>2</sub> levels on metabolism and oxidative stress in two common marine bivalves (*Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology, 2013, 164(4): 545-553.
- [10] Putnam H M, Edmunds P J, Fan T Y. Effect of Temperature on the Settlement Choice and Photophysiology of Larvae From the Reef Coral *Stylophora pistillata*[J]. Biological Bulletin, 2008, 215(2): 135-142.
- [11] Whalan S, Ettinger-Epstein P, Renm de N. The effect of temperature on larval pre-settlement duration and metamorphosis for the sponge, *Rhopaloeides odorabile*[J]. Coral Reefs, 2008, 27(4): 783-786.
- [12] Byrne M, Selvakumaraswamy P, Ho M A, et al. Sea urchin development in a global change hotspot, potential for southerly migration of thermotolerant propagules[J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2011, 58(5): 712-719.
- [13] Parker L M, Ross P M, O'Connor W A. Comparing the effect of elevated pCO<sub>2</sub> and temperature on the fertilization and early development of two species of oysters[J]. Marine Biology, 2010, 157(11): 2435-2452.
- [14] Yun-Wei D, Shan-Shan Y, Qing-Lin W., et al. Physiological Responses in a Variable Environment: Relationships between Metabolism, Hsp and Thermotolerance in an Intertidal-Subtidal Species[J]. Plos One, 2011, 6(10): e26446-e26446.
- [15] Sokolova I M, Frederich M, Bagwe R, et al. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates[J]. Marine Environmental Research, 2012, 79: 1-15.
- [16] Giomi F, Portner H O. A role for haemolymph oxygen capacity in heat tolerance of eurythermal crabs[J]. Frontiers in Physiology, 2013, 4: 110.
- [17] Han G D, Zhang D S, Marshall J, et al. Metabolic energy sensors (AMPK and SIRT1), protein carbonylation and cardiac failure as biomarkers of thermal stress in an intertidal limpet: linking energetic allocation with environmental temperature during aerial emersion[J]. Journal of Experimental Biology, 2013, 216(Pt 17): 3273-3282.
- [18] Bozinovic F, Calosi P, Spicer J I. Physiological Correlates of Geographic Range in Animals[J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 2011, 42(1): 155-179.
- [19] Stillman J H, Somero G N. Adaptation to temperature stress and aerial exposure in congeneric species of intertidal porcelain crabs (*Genus Petrolisthes*): Correlation of physiology, biochemistry and morphology with vertical distribution[J]. Journal of Experimental Biology, 1996, 199(8): 1845-1855.
- [20] 连姗姗. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)能量代谢与抗氧化胁迫能力评价指标体系的构建[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- Lian Shanshan. Construction of assessment indexes for energy metabolism and antioxidant-stress ability of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*)[D]. qingdao: Ocean university of China, 2013.
- [21] Sultana M S, Koshio S, Ishikawa M, et al. Effects on Dietary Supplement of Shochu Distillery By-Product (SDBP) on the Growth of Red Sea Bream[J]. Aquaculture Science, 2013, 61.
- [22] Sakamoto S, Yone Y. Effect of Starvation on Hematological Characteristics, and the Contents of Chemical Components and Activities of Enzymes in Blood Serum of Red Sea Bream[J]. Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University, 1978, 23: 63-69.
- [23] Casillas E, Sundquist J, Ames W E. Optimization of assay conditions for, and the selected tissue distribution of, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase of English sole, *Parophrys vetulus* Girard[J]. Journal of Fish Biology, 2006, 21(2): 197-204.
- [24] Polyak K, Xia Y, Zweier J L, et al. A model for p53-induced apoptosis[J]. Nature, 1997, 389(6648): 300-305.
- [25] Benchimol, S. p53-dependent pathways of apoptosis[J]. Cell Death and Differentiation, 2001, 8(11): 1049-1051.
- [26] Jiang L, Sheikh M S, Huang Y. Decision Making by p53: Life versus Death[J]. Molecular and Cellular Pharmacology, 2010, 2(2): 69-77.
- [27] Yao C L, Somero G N. Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: cell cycle regulation and DNA repair[J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2013, 165(2): 159-168.
- [28] Daniel J W. Metabolic aspects of antioxidants and preservatives[J]. Xenobiotica, 1986, 16: 1073-1078.
- [29] 賈月. 虾夷扇贝应答高温变化的相关生理生态学研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2013.
- Ben Yue. Study on the physiological ecology of the *Mizuhopecten yessoensis* response to high temperature change[D]. Dalian: Ocean university of Dalian, 2013.
- [30] 郝振林, 刘京哲, 唐雪娇, 等. 高温下 3 种壳色虾夷扇贝存活率、代谢率、免疫酶活力及 HSP70 表达的比较研究[J]. 海洋科学, 2015, 39(11): 108-115.
- Hao Zhenlin, Liu Jingzhe, Tang Xuejiao, et al. A comparative study of survival, metabolism, immune indi-

- cators and HSP70 expression in three kinds of shell colors Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* under high temperature stress[J]. Marine Sciences, 2015, 39(11): 108-115.
- [31] Gonzalez M. Effect of thermal stress on protein expression in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk[J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 147(3): 531-540.
- [32] Ivanina A V, Taylor C, Sokolova I M. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin)[J]. Aquatic Toxicology, 2009, 91(3): 245-254.
- [33] Thomas K, Roth A G, Petersen N H T, et al. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology[J]. Nature, 2010, 463(7280): 549-553.
- [34] 曲凌云, 相建海, 孙修勤, 等. 温度刺激下栉孔扇贝不同组织热休克蛋白 HSP70 的表达研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(5): 96-100.  
Qu Lingyun, Xiang Jianhai, Sun Xiuqin, et al. Expression analysis of HSP70 in various tissues of *Chlamys farreri* under thermal stress[J]. Chinese High Technology Letters, 2015, 15(5): 96-100.
- [35] Uhlinger K R, Jackson S A, Cherr G N. Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1998, 7(1): 21-30.
- [36] 李有元, 胡志全, 叶章群. 肾细胞癌数据库三年临床资料 Cox 模型分析[J]. 现代泌尿外科杂志, 2008, 13(4): 294-296.  
Li Youquan, Hu Zhiquan, Ye Zhangqun. Analysis of 3 years' clinical data of the renal cell carcinoma database by Cox model[J]. Journal of Modern Urology, 2008, 13(4): 294-296.
- [37] Ritto P A, Alvarado-Gil J J, Contreras J G. Scaling and wavelet-based analyses of the long-term heart rate variability of the Eastern Oyster[J]. Physica A Statistical Mechanics & Its Applications, 2004, 349(1): 291-301.
- [38] Green J A. The heart rate method for estimating metabolic rate: review and recommendations[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology, 2011, 158(3): 287-304.

## Pilot study on reasons for yesso scallop's (*Patinopecten yessoensis*) survival after heat shock

LIU Chao<sup>1, 2, 3, 4</sup>, WU Fu-cun<sup>1, 3, 4</sup>, LIN Si-heng<sup>1, 2, 3, 4</sup>, QUE Hua-yong<sup>1, 3, 4</sup>, ZHANG Guo-fan<sup>1, 3, 4</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 4. National & Local Joint Engineering Laboratory of Ecological Mariculture, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Received:** Oct. 8, 2015

**Key words:** Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*); Survival curve; GPT; TAOC; HSP70; p53; Heart beat rate

**Abstract:** In this study, one- and two-year old yesso scallops were used to explore the influence of heat shock on scallop survival, physiological activity involved in immunity and metabolism, and heart rate. The differences in the above factors between the two types of scallop were also determined. During heat shock and recovery, the one-year old scallops' survival rate was significantly higher than that of the two-year scallops. In addition, the GPT activity, p53, and HSP70 were significantly different between the two types of scallops. The multiple factor variance analysis demonstrated that the enzyme activity (TAOC) and protein concentration (p53 and HSP70) were influenced by age, processing time, and the interaction between them significantly. The Cox model showed the significant contribution of age, GPT, TAOC, p53, and HSP70 to scallops' survival. In addition, heat shock can affect heart rate.

(本文编辑: 梁德海)