高温胁迫对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肝脏中抗氧化酶活性和免疫相关基因表达的影响*

董福霖[1, 2] 黄天晴[1] 刘恩慧[1] 谷 伟[1] 王高超[1]
郭福元[3] 王炳谦[1] 徐革锋[1①]

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 冷水性鱼类产业技术创新战略联盟 黑龙江哈尔滨 150070;
2. 上海海洋大学 上海 201306; 3. 烟台经海海洋渔业有限公司 山东烟台 264006)

摘要 夏季高温对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)网箱养殖会产生极大威胁, 高温胁迫会造成虹鳟应激甚至死亡。为探究高温胁迫对虹鳟肝脏抗氧化响应及相关免疫基因的影响, 选取虹鳟“水科一号”幼鱼[(24.8±10.0) g]为实验对象, 通过连续升温达到高温胁迫条件, 筛选出高温敏感组和耐受组, 并对它们的抗氧化酶活性、免疫相关基因表达和随机扩增多态性 DNA (RAPD)片段化进行比较研究。结果表明: 敏感组与耐受组的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性含量不存在显著性差异(P>0.05), 但均显著高于对照组(P<0.05); 敏感组的缺氧诱导因子-1α (*hif-1α*)、白细胞介素-1β (*il-1β*)以及热休克蛋白 10 (*hsp10*)基因的相对表达量较耐受组的分别高 1.8 倍、1.28 倍和 16.5 倍(P<0.05); 耐受组的热休克蛋白 70 (*hsp70*)基因的表达比敏感个体高 1.37 倍(P<0.05); RAPD 图谱反映出敏感组的 DNA 损伤比耐受组更严重。高温胁迫对虹鳟幼鱼 *hif-1α*、*hsp70* 和 *hsp10* 基因产生强烈的应答性表达上调, 且 RAPD 针对高温耐受个体可有效进行识别。

关键词 虹鳟; 高温胁迫; 缺氧诱导因子-1α; 热休克蛋白; RAPD
中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyhz20220300064

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)属于鲑形目、鲑科、大麻哈鱼属, 自从 1959 年引入我国以后, 成为我国广泛养殖的冷水鱼品种, 截止到 2020 年底, 我国的虹鳟产量达到了 3.8 万 t (农业农村部渔业渔政管理局等, 2021)。虹鳟适宜的水温是 12~18 °C, 当超过 20 °C 时, 虹鳟的摄食量就会减少, 生长速度放缓, 当超过 26 °C 时, 虹鳟出现浮头, 呼吸频率降低, 并且有些鱼出现侧游、腹部向上的现象(马芳, 2019)。同时姜旭阳等(2019)对虹鳟幼鱼的温度耐受性研究表明, 虹鳟幼鱼的高温临界温度为 26.5 °C。所以夏季高温是虹鳟养殖环节中最大的威胁之一, 因此研究高温胁迫条件下虹鳟的生理响应和调控机制, 开展功能基因筛选和验证, 对耐高温品种的选育具有重要的理论价值和现实意义。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是指在应激情况下生物体内的细胞新合成的或超量合成的一类蛋白质(王艳妮, 2016), 主要作用是保护机体抵抗不良环境刺激, 几乎存在于所有生物体(周彦静, 2017), 对模式物种的广泛研究揭示了热休克蛋白的三个主要家族: 热休克蛋白 90 (heat shock proteins 90, HSP90, 85~90 kDa)、热休克蛋白 70 (heat shock proteins 70, HSP70, 68~73 kDa)和低分子量热休克蛋白(16~47 kDa) (Demeke *et al*, 2016)。热休克蛋白 10 (heat shock proteins 10, HSP10)参与细胞过程中的免疫反应、信号传导以及调节细胞凋亡环节。而 HSP70

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项, HSY202010Q 号; 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助, CARS-46 号; 中国水产科学研究院科研业务费项目, 2020TD32 号; 烟台开发区创新创业团队项目, 2021TD003 号。董福霖, 硕士研究生, E-mail: 924570125@qq.com

① 通信作者: 徐革锋, 硕士生导师, 研究员, E-mail: xugefeng@hrfri.ac.cn

收稿日期: 2022-03-16, 收修改稿日期: 2022-05-06

则是目前研究最广泛的分子伴侣之一，并在应激耐受过程中通过折叠新生多肽和恢复热损伤蛋白方式起作用(Zhang *et al*, 2014)。白细胞介素-8 (Interleukin-8, *il-8*)和白细胞介素-1 (Interleukin-1, *il-1*)是两种重要的促炎细胞因子，也是炎症反应的标志物(Corripio- Miyar *et al*, 2007)。其中 *il-1β* (Interleukin-1β)在微生物入侵、组织损伤和包括自身免疫性疾病在内的免疫反应中发挥重要作用(Ma, 2016)。缺氧诱导因子(Hypoxia inducible factor, *hif*)一类高度保守的转录因子家族，是氧稳态和低氧适应性反应的主要调节因子(Semenza, 1999)。*hif-1α* (Hypoxia inducible factor 1α, *hif-1α*)通过调节供氧和新陈代谢基因的表达来协调生物对缺氧的反应(Hochachka *et al*, 2001; Semenza, 2012)。

过高的温度通过产生活性氧(Reactive oxygen species, ROS)进而导致鱼体出现氧化应激(Madeira *et al*, 2013)，并进一步造成氧化损伤，鱼类对此的应对方式主要是调节氧化应激相关基因的表达，调控多种酶的合成，而超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)是鱼类应对应激的关键酶(姜旭阳等, 2021)。为了响应 ROS 的生成，SOD 将超氧化物阴离子分解为过氧化氢，CAT 将过氧化氢分解为氧和水(Kim *et al*, 2017)，避免过多的活性氧对核酸、蛋白质以及脂质造成损伤(Tomanek *et al*, 2010)。有许多研究表明，高温与 SOD 和 CAT 的活性变化显著相关，在对翘嘴鳜(*Siniperca chuatsi*) (张晨光等, 2021)、褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (徐冬冬等, 2010)以及梭鲈(*Sander lucioperca*) (Li *et al*, 2019)等鱼的研究中发现，高温显著改变了肝脏中 SOD 和 CAT 的活性，因此 SOD 和 CAT 的活性变化可以看作鱼类高温应激状态的指示物。而肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α, TNFα)则是一种重要的炎症因子。

高温胁迫会导致鱼类产生单链和双链 DNA 的断裂和染色体碎片。随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)技术是一种可靠的、灵敏的 DNA 损伤检测技术(赖金龙等, 2015)。目前利用 RAPD 检测鱼类的 DNA 损伤基本集中在重金属胁迫方面，如重铬酸钾对鲤鱼(*Cyprinus carpio*) (Kumar *et al*, 2015)以及铀对斑马鱼(*Brachydanio rerio*) (Lerebours *et al*, 2013)的毒性研究，而使用 RAPD 研究高温对鱼类的 DNA 损伤较少，本研究评估了 RAPD 作为检测高温胁迫下虹鳟 DNA 损伤标志物的可行性。

本研究以虹鳟“水科一号”新品种为实验材料开展高温胁迫实验，通过比较高温胁迫下不同实验组中鱼的抗氧化酶活性、免疫相关基因表达和 DNA 片段化的研究，为高温胁迫下虹鳟应答机制的解析和耐高温品系的选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

虹鳟“水科一号”幼鱼体质量(24.8±10.0) g，体长(13.2±5.0) cm，来自黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼类试验站。

实验水族箱为循环控温玻璃水族箱，规格为 150 cm×60 cm×50 cm，水深为 50 cm。实验鱼在水族箱中驯养两周，连续曝气，水温控制在(16.0±0.2) °C，pH 值 7.2~7.5，溶解氧 7.8~10.0 mg/L，每日投喂商业饲料两次，投喂 30 min 后清理剩余饲料。试验期间，投喂方式、pH 值、溶解氧与驯养期间保持一致。

1.2 实验设计

在(16.0±0.2) °C 水温下驯养两周后，选取体质健康、规格均一的虹鳟 90 尾进行试验，根据预实验结果，(26.0±0.2) °C 下 12 h 可以区分出敏感组和耐受组。实验组共 60 尾，平均分在两个玻璃水族箱中，从(16.0±0.2) °C 开始升温，每日升高 1 °C，直至(26.0±0.2) °C 后 12 h 进行采样。此时，每个水族箱中能保持游泳平衡、可以自由游动的个体定义为耐受组，失去平衡、无法自游动的个体定义为敏感组。同时，另外选取体质健康、规格均一的虹鳟 30 尾始终在(16.0±0.2) °C 下饲养，此组为对照组。

1.3 RNA 的提取和 cDNA 的合成

每组采集 6 尾鱼的肝脏组织迅速置于液氮中，后存于–80 °C 中保存，直到用于后续实验。RNA 的提取采用 bioflux 公司的总 RNA 提取试剂盒，按照说明书进行肝脏组织的 RNA 提取。

cDNA 的反转录采用 TaKaRa 公司的 PrimeScript RT 试剂盒，按照说明进行反转录，加入 500 ng 的 Total RNA, 2 μL 5×PrimeScript RT Master Mix 混匀后进行反转录反应: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 1 min。反转录成的 cDNA 在–20 °C 中保存备用。

1.4 SOD、CAT 以及 TNF-α 的活性检测

每组采集 6 尾鱼的肝脏放于冻存管中并于–80 °C 中保存。将肝脏组织在生理盐水中匀浆，随后在 4 °C，6 000 r/min 下离心 10 min。取上清用于 SOD、CAT 以及 TNF-α 的活性的测定。SOD、CAT 活性测定按照南京建成生物工程研究所试剂盒(A001-1, A007-1-1)及相关说明测定。TNF-α 活性测定按照上海酶联试剂

盒(ml077404)及相关说明测定。

1.5　随机扩增多态性 DNA-PCR

每组采集 3 尾鱼的尾鳍到装有无水乙醇的采样管中, 并在 4 °C 保存, 直到用于下一步实验。DNA 提取使用 biospin 组织基因组 DNA 提取试剂盒按照说明进行提取, 使用 ScanDrop 测定浓度和纯度后, 放–20 °C 保存备用。

采用了 5 个随机引物(表 1)对三个组的 DNA 多态性进行了测试。25 μL 反应体系由 30 ng 基因组 DNA、2.5 μL 10×buffer、5 μL dNTP、1.25 μL 引物(10 mmol/L)、2.5 μL Mg^{2+}(5 mmol/L)以及 H_2O 组成。反应在伯乐 C1000 PCR 仪中按照: 95 °C 预变性反应 4 min, 95 °C 变性 1 min, 36 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 45 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。最终 PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶中于 110 V 电压下电泳 30 min, 并在凝胶成像系统中进行观察和拍照。

1.6　实时荧光定量 PCR

根据 GenBank 已公布的虹鳟 *hif-1α* 的编码序列(AF304864.1)、*β-actin* cDNA 全序列(AB196465)、*il-1β* 的编码序列(AJ298294), *il-8* 的编码序列(AJ279069)、*hsp70* 的编码序(BT073047.1)以及大西洋鲑(*Salmo salar*) *hsp10* 的编码序列(BT043672.1)使用 Primer 5.0 软件设计实时荧光定量 PCR 上、下游引物。所有引物合成均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。引物序列见表 2。

表 1　RAPD 引物序列

Tab.1　Primer sequences for RAPD

名称	引物序列(5'~3')
RAPD1	GATGACCGCC
RAPD2	GAACGGACTC
RAPD3	TGCGTGCTTG
RAPD4	GGAAGTCGCC
RAPD5	CTGAGGTCTC

表 2　基因引物序列及相关信息

Tab.2　Gene primer sequence and related information

基因	引物序列(5'~3')	GenBank 登录号
β-actin	F:CTACCTGATGAAGATCCTGACGG R:CAGCTTCTCCTTGATGTCTCGTA	AB196465
il-1β	F: ACATTGCCAACCTCATCATCG R: TTGAGCAGGTCCTTGTCCTTG	AJ298294
il-8	F: AGAATGTCAGCCAGCCTTGT R: TCTCAGACTCATCCCCTCAGT	AJ279069
hsp70	F: CAAGATCACCATCACCAACG R: TCCTACTACGTGTCTCCCTC	BT073047.1
hif-1α	F: AGGACCTGGACCTGGAGATGTTG R: CGCACAGAAGAGCACAGAGAAGAG	AF304864.1
hsp10	F: AGGCTCCACCAACCAGAAAG R: CAGCATCACGGAACAGGAAG	BT043672.1

注: F 表示正向引物; R 表示反向引物

使用 TaKaRa 公司的 TB Green® Premix Ex Taq™ 进行定量实时 PCR, 条件如下: 30 s 的 95 °C 预变性, 40 个循环的 PCR 反应(95 °C, 5 s; 60 °C, 34 s), 最后, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。

1.7　数据统计分析

实验数据以平均值±标准差(mean±SD)表示, 采用 Spss 26 中的 One-way ANOVA 进行单因素方差分析以及 T 检验对不同实验处理组进行显著性分析, P<0.05 表示存在显著差异, 并用 GraphPad Prism8.0 作图。使用 Image Lab 软件对 RAPD-PCR 的产物进行条带分析。

2　结果

2.1　高温胁迫下肝脏中 SOD、CAT 的活性和 TNF-α 含量分析

高温胁迫条件下虹鳟肝脏中 SOD 和 CAT 的活性均呈现了显著上升的趋势, 敏感组和耐受组均显著高于对照组(P<0.05), 其中敏感组和耐受组中 SOD 活性分别是对照组的 1.2 倍和 1.1 倍; 而 CAT 的活性, 两组

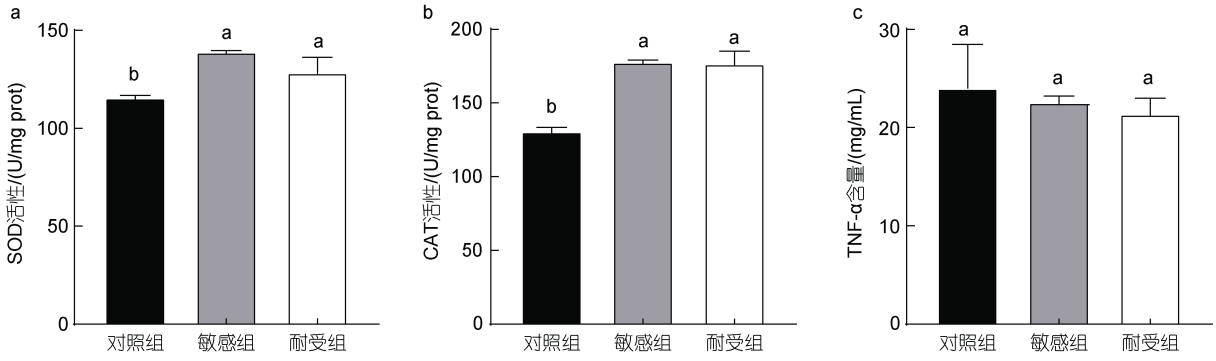


图 1　高温胁迫下虹鳟肝脏组织中 SOD 和 CAT 的活性和 TNF-α 含量

Fig.1　SOD and CAT activity and TNF-α content in the liver tissue of rainbow trout under thermal stress

注: 图中柱上标记不同的字母代表不同实验组中相对表达存在显著差异(P<0.05)

则均为对照组的 1.4 倍。同时, SOD 和 CAT 的活性在敏感组和耐受组中均未发现显著差异(图 1a, 1b)。TNF-α 含量在热应激后, 未发生显著变化(图 1c)。

2.2 RAPD-PCR 分析

对 RAPD-PCR 的结果进行分析发现, 在采用相同的五条随机引物的情况下, 对照组和耐受组分别产生了 19.3 个和 19.6 个 DNA 条带, 而敏感组则产生了 24 个 DNA 条带(图 2)。

2.3 高温胁迫下 *il-1β*、*il-8*、*hif-1α*、*hsp10* 和 *hsp70* 基因的表达分析

通过 qRT-PCR 方法检测了 *il-1β*、*il-8*、*hif-1α*、*hsp10* 和 *hsp70* 基因在不同实验组肝脏中的表达水平。如图 3a 所示, *hif-1α* 的表达在敏感组和耐受组表现出不同的趋势, 相比与对照组, 敏感组中 *hif-1α* 表达上调, 而在耐受组中未发现明显变化; 敏感组中 *hif-1α* 的表达分别为对照组和耐受组的 1.7 倍和 1.8 倍。如图 3b、图 3c 所示, *il-1β* 和 *il-8* 两个基因表达均大幅上调, 显著高于对照组(P<0.05), *il-1β* 在敏感组和耐受组中没有观察到差异, 而敏感组 *il-8* 的相对表达为耐受组的 1.28 倍。两个热应激蛋白相关的基因 *hsp10* 和 *hsp70* 在热应激后也显著上调(P<0.05); 两个基因在敏感和耐受组的表达均显著高于对照组, 敏感组中 *hsp10* 的相对表达量为耐受组的 16.5 倍, 而 *hsp70* 表达量为耐受组的 0.72 倍(图 3d, 3e)。

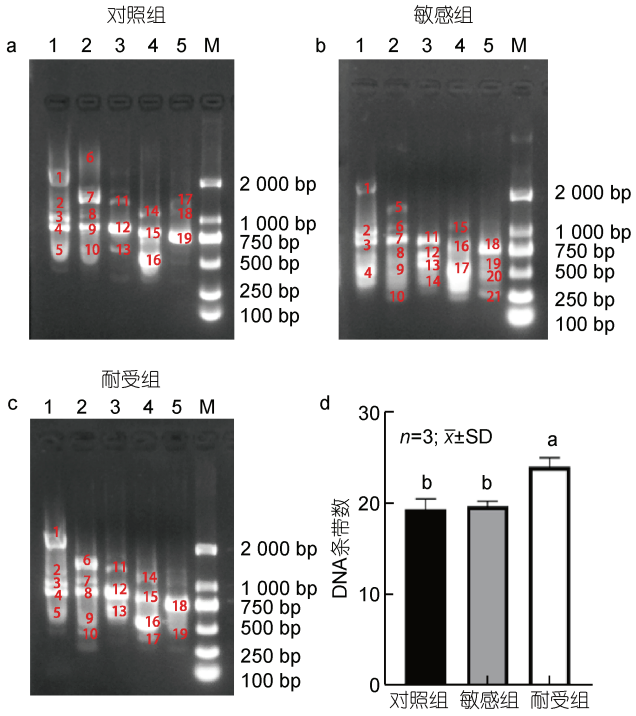


图 2 对照组(a)、敏感组(b)和耐受组(c) RAPD-PCR 分析结果

Fig.2 Results of RAPD-PCR analysis of control (a), sensitive (b), and tolerant (c) groups

注: 图中标注不同的字母代表不同实验组中相对表达存在显著差异(P<0.05)

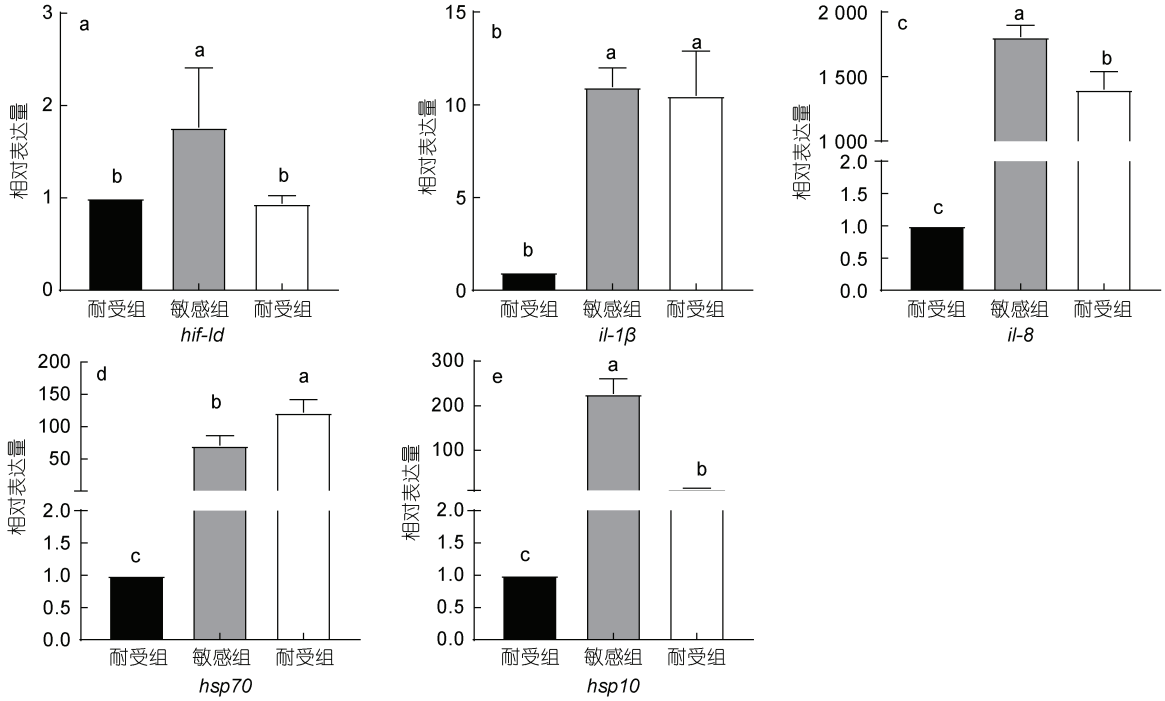


图 3 高温胁迫下虹鳟肝脏中 *hif-1α* (a)、*il-1β* (b)、*il-8* (c)、*hsp70* (d)和 *hsp10* (e)基因的相对表达

Fig.3 The relative expressions of *hif-1α* (a), *il-1β* (b), *il-8* (c), *hsp70* (d), and *hsp10* (e) genes in rainbow trout liver under thermal stress

注: 图中标注不同的字母代表不同实验组中相对表达存在显著差异(P<0.05)

3　讨论

水产养殖中高温胁迫造成鱼体疾病暴发频率升高、代谢及免疫能力下降等一系列危害, 直接影响养殖的经济效益。本研究在 26 °C 的高温胁迫条件下, 通过虹鳟是否游泳失衡、同时无法自由游动区分出敏感组和耐受组, 在此基础上研究了两者之间肝脏中的抗氧化酶活性和免疫相关基因表达上的差异, 为进一步探究虹鳟高温胁迫调控机制和培育虹鳟耐高温优良品系提供理论依据。

高温胁迫会导致鱼类体内产生氧化损伤, 其中氧化应激下的 SOD 和 CAT 活性的变化已经有许多报道(杨洪帅等, 2014; 孙永旭等, 2019)。快速的升温会导致鱼类体内产生过量的 ROS 和自由基, 而 SOD 和 CAT 则是快速清除活性氧和自由基的酶类(史鲲鹏等, 2018)。本研究中, 敏感组和耐受组的 SOD 活性和 CAT 的活性显著高于照组(P<0.05)。说明高温使敏感组和耐受组均产生了氧化应激, 体内的活性氧和自由基增多, 鱼体通过增强抗氧化酶活性来消除多余的活性氧以及自由基, 减轻肌体损伤。而敏感组与耐受组的 CAT 和 SOD 差异不显著, 原因可能是虹鳟在接近极限耐受温度条件下, 应激个体的 CAT 和 SOD 酶活性达到阈值, 导致虹鳟的抗氧化酶活性对高温的响应不敏感。TNF-α 是一种内源性致热原, 在机体炎症反应中发挥重要作用。本研究中的实验组和对照组中 TNF-α 含量不存在显著差异, 与在猪(胡艳欣等, 2006)、大鼠(Lan *et al*, 2019)中发现的结果一致, 我们认为这可能与 TNF-α 内源性致热原的性质有关, 同时在虹鳟热应激时肝脏中 TNF-α 发挥的免疫作用较小。

此外, 活性氧增多还会导致 DNA 氧化损伤, 包括链断裂、碱基错配等(Zhou *et al*, 2011)。在本研究中, DNA 损伤通过 RAPD 图谱反映出来, 敏感组相比于对照组和耐受组出线了条带强度的改变和扩增条带的增加现象, 说明高温敏感组遭受到了更严重的 DNA 损伤。RAPD 是一种经济、快速、简单的分子标记, 同时 RAPD 对鱼类伤害较小, 只需要尾鳍就可以进行检测, 我们认为, 在虹鳟养殖过程中, 可以用 RAPD 评估虹鳟热应激状态, 可以作为虹鳟高温耐受的标志, 同时开发相关的 RAPD 标记, 用于辅助耐高温品系的选育。

高温胁迫产生的氧化应激会导致体内的 *hsps* 表达量的变化, *hsps* 发挥自己的生物学功能, 减少高温应激对机体产生的损害(Iwama *et al*, 1998)。在本研究中, 敏感组和耐受组的 *hsp70* 表达相对于对照组均显著上升(P<0.05), 而耐受组又显著高于敏感组(P<0.05)。类似结果也在西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*) (田照辉等, 2013)和大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (Xu *et al*, 2018)发现。我们推测, *hsp70* 在虹鳟在应对热应激上起到了保护组织和细胞的作用。*hsp10* 的相对表达也在高温胁迫后上调, 并且敏感组中上调幅度显著大于耐受组(P<0.05)。而 *hsp10* 的主要功能是参与免疫反应以及调节细胞凋亡(Akyol *et al*, 2006; 赵考考, 2011), 我们推测, 敏感组中肝脏受到更严重的损伤, 细胞凋亡程度大于耐受组, 所以敏感组中 *hsp10* 表达量显著高于耐受组。炎症反应是机体产生的一种自身保护性反应, 目的是修复受损组织, 消除有害刺激(郭勋等, 2020)。同时机体的炎症反应也是检测健康状态的重要指标之一, *il-8* 和 *il-1β* 是两种重要的促炎因子, 在调节炎症反应中发挥重要作用(Liang *et al*, 2022)。本研究中 *il-1β*、*il-8* 表达均发生上调, 但敏感组中的 *il-8* 表达显著高于耐受组, 说明高温导致虹鳟幼鱼产生肝脏的炎症反应, 敏感组肝脏受损更加严重。此外我们认为 *hsp70*、*hsp10* 表达差异是导致虹鳟温度耐受性的差异原因之一。

氧气和容量限制的热耐受性(OCLTT)是 Pörtner 提出的一个基于血液中 O_2 的热依赖性和有氧能力的相应变化的综合概念(Pörtner *et al*, 2017; Jutfelt *et al*, 2018)。这一假说认为, 呼吸系统和心血管系统在极端温度下会受到损害, 从而限制了组织和细胞获得氧气的能力。基于这个理论, Joyce 等(2020)做出了一个推论, 缺氧和耐热性是相关的, 同时在 Anttila 等(2013)对大西洋鲑的研究中表明, 临界最高温度与耐缺氧能力呈显著正相关。*hif-1α* 控制代谢和氧气供应相关基因的表达, 在协调细胞对缺氧的反应中发挥着重要的作用, *Hif-1* 是参与血管生成、红细胞生成和葡萄糖代谢的基因, 同时也被证明在黑鲫(*Carassius carassius*) (Rissanen *et al*, 2006)中参与调节体温和缺氧之间的相互作用。在本研究中, 敏感组中 *hif-1α* 的表达量显著高于(P<0.05)对照组和耐受组, 而耐受组和对照组间则未发现显著的差异。在 Saravia 等(2021)对南极鱼(*Harpagifer antarcticus*)的研究中发现肝脏中 *hif-1α* 在临界最高温度时表达显著升高, 这与本研究中的敏感组表现出了相同的趋势。而 *hif-1α* 作为一些基因表达的重要调控因子, 会对缺氧做出反应(Cai *et al*, 2014), 因此我们推测, 敏感组和耐受组表现出

的差异是因为敏感组对温度更为敏感，为弥补高温带来的损伤，加快了代谢率和呼吸频率，所以上调了 *hif-1α* 的表达，因此我们认为耐缺氧能力是影响虹鳟温度耐受性的重要因素。

4 结论

以上结果表明 *hif-1α*、*hsp70* 和 *hsp10* 在虹鳟高温胁迫中发挥重要作用，我们认为可以从这些基因中发掘潜在的 SNP 位点，作为虹鳟高温选育潜在的分子标记。而 RAPD 可以用于评估虹鳟热应激状态，并作为虹鳟高温耐受的潜在标志。

参 考 文 献

马芳, 2019. 虹鳟热应激相关 miRNA 及其靶基因鉴定、生物信息学分析及靶向关系验证[D]. 兰州: 甘肃农业大学: 10-11.

王艳妮, 2016. 热应激对虹鳟免疫指标及热休克蛋白基因 *HSP47* mRNA 表达的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学: 6-7.

田照辉, 徐绍刚, 王巍, 等, 2013. 急性热应激对西伯利亚鲟 *HSP70* mRNA 表达、血清皮质醇和非特异性免疫的影响[J]. 水生生物学报, 37(2): 344-350.

史鲲鹏, 董双林, 周演根, 等, 2018. 不同倍性虹鳟幼鱼对急性温度胁迫的抗氧化响应[J]. 应用生态学报, 29(9): 3102-3110.

农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会, 2021. 中国渔业统计年鉴-2021[M]. 北京: 中国农业出版社: 25.

孙永旭, 董宏标, 王文豪, 等, 2019. 温度对大口黑鲈幼鱼不同组织抗氧化能力及免疫相关蛋白表达的影响[J]. 生态科学, 38(3): 18-25.

杨洪帅, 王辉, 刘加慧, 等, 2014. 高温对吉富罗非鱼幼鱼生长及超氧化物歧化酶、乳酸脱氢酶活力的影响[J]. 广东海洋大学学报, 34(1): 15-20.

张晨光, 丁炜东, 曹哲明, 等, 2021. 急性高温胁迫对翘嘴鳜幼鱼抗氧化酶和消化酶活性及热休克蛋白基因表达的影响[J]. 南方农业学报, 52(3): 815-826.

周彦静, 2017. 持续热应激下虹鳟热应激蛋白基因 *HSP90α* 和 *HSP10* mRNA 表达、组织损伤及血细胞凋亡变化[D]. 兰州: 甘肃农业大学: 8-9.

赵考考, 2011. 热休克蛋白 10 的研究进展[J]. 医学综述, 17(1): 1-3.

胡艳欣, 佘锐萍, 张洪玉, 等, 2006. 热应激后猪血清中 IL-2、IFN-γ 及 TNF-α 水平的动态变化[J]. 畜牧兽医学报, 37(5): 496-499.

姜旭阳, 黄铭, 杨小刚, 等, 2021. 急性高温胁迫对虹鳟和硬头鳟幼鱼抗氧化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 28(1): 57-65.

姜旭阳, 董双林, 刘骋跃, 等, 2019. 虹鳟和硬头鳟幼鱼对温度的耐受性[J]. 中国海洋大学学报, 49(3): 57-62.

徐冬冬, 楼宝, 詹炜, 等, 2010. 高温胁迫对褐牙鲆生长及肝脏抗氧化酶活性的影响[J]. 水产学报, 34(7): 1099-1105.

郭勋, 程珂, 马春松, 等, 2020. 饲料中维生素 D_3 的添加水平对黄颡鱼幼鱼生长和 Toll 样受体 *TLR*18、*TLR*19 和 *TLR*21 的影响[J]. 水生生物学报, 44(3): 461-469.

赖金龙, 胡健慧, 付倩, 等, 2015. 改良彗星实验和 RAPD 技术检测 DNA 损伤的实验研究[J]. 实验技术与管理, 32(6): 45-50, 54.

AKYOL S, GERCEL-TAYLOR C, REYNOLDS L C, *et al*, 2006. HSP-10 in ovarian cancer: expression and suppression of T-cell signaling [J]. Gynecologic Oncology, 101(3): 481-486.

ANTTILA K, DHILLON R S, BOULDING E G, *et al*, 2013. Variation in temperature tolerance among families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) is associated with hypoxia tolerance, ventricle size and myoglobin level [J]. Journal of Experimental Biology, 216(7): 1183-1190.

CAI X H, HUANG Y T, ZHANG X, *et al*, 2014. Cloning, characterization, hypoxia and heat shock response of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the small abalone *Haliotis diversicolor* [J]. Gene, 534(2): 256-264.

CORRIPIO-MIYAR Y, BIRD S, TSAMOPOULOS K, *et al*, 2007. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1β and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) [J]. Molecular Immunology, 44(6): 1361-1373.

DEMEKE A, TASSEW A, 2016. Heat shock protein and their significance in fish health [J]. Research & Reviews: Journal of Veterinary Sciences, 2(1): 66-68.

HOCHACHKA P W, LUTZ P L, 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 130(4): 435-459.

IWAMA G K, THOMAS P T, FORSYTH R B, *et al*, 1998. Heat shock protein expression in fish [J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 8(1): 35-56.

JOYCE W, PERRY S F, 2020. Hypoxia inducible factor-1 *α* knockout does not impair acute thermal tolerance or heat hardening in zebrafish [J]. Biology Letters, 16(7): 20200292.

JUTFELT F, NORIN T, ERN R, *et al*, 2018. Oxygen-and capacity-limited thermal tolerance: blurring ecology and physiology [J]. Journal of Experimental Biology, 221(1): jeb169615.

KIM J H, PARK H J, KIM K W, *et al*, 2017. Growth performance, oxidative stress, and non-specific immune responses in juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria*, by changes of water temperature and salinity [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 43(5): 1421-1431.

KUMAR P, KUMAR R, NAGPURE N S, *et al*, 2015. In vivo assessment of DNA damage in *Cyprinus carpio* after exposure to potassium dichromate using RAPD [J]. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 39(2): 121-127.

LAN R X, LI S Q, CHANG Q Q, *et al*, 2019. Chitosan oligosaccharides protect sprague dawley rats from cyclic heat stress by attenuation of oxidative and inflammation stress [J]. Animals, 9(12): 1074.

LEREBOURS A, CAMBIER S, HISLOP L, *et al*, 2013. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 755(1): 55-60.

LI C J, WANG Y F, WANG G C, *et al*, 2019. Physicochemical changes in liver and Hsc70 expression in pikeperch *Sander lucioperca* under heat stress [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 181: 130-137.

LIANG H L, GE X P, XIA D, *et al*, 2022. The role of dietary chromium supplementation in relieving heat stress of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 120: 23-30.

MA X J, 2016. Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases [M]. Dordrecht: Springer: 22-24.

MADEIRA D, NARCISO L, CABRAL H N, *et al*, 2013. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 166(2): 237-243.

PÖRTNER H O, BOCK C, MARK F C, 2017. Oxygen-and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology [J]. Journal of Experimental Biology, 220(15): 2685-2696.

RISSANEN E, TRANBERG H K, SOLLID J, *et al*, 2006. Temperature regulates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in a poikilothermic vertebrate, crucian carp (*Carassius carassius*) [J]. Journal of Experimental Biology, 209(6): 994-1003.

SARAVIA J, PASCHKE K, OYARZÚN-SALAZAR R, *et al*, 2021. Effects of warming rates on physiological and molecular components of response to CTMax heat stress in the Antarctic fish *Harpagifer antarcticus* [J]. Journal of Thermal Biology, 99: 103021.

SEMENZA G L, 1999. Regulation of mammalian O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 15(1): 551-578.

SEMENZA G L, 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. Cell, 148(3): 399-408.

TOMANEK L, ZUZOW M J, 2010. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress [J]. Journal of Experimental Biology, 213(20): 3559-3574.

XU K D, XU H X, HAN Z Q, 2018. Genome-wide identification of hsp70 genes in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and their regulated expression under cold and heat stress [J]. Genes, 9(12): 590.

ZHANG C N, TIAN H Y, LI X F, *et al*, 2014. The effects of fructooligosaccharide on the immune response, antioxidant capability and HSP70 and HSP90 expressions in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) under high heat stress [J]. Aquaculture, 433: 458-466.

ZHOU L, LI J Q, LIN X F, *et al*, 2011. Use of RAPD to detect DNA damage induced by nitrofurazone in marine ciliate, *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora) [J]. Aquatic Toxicology, 103(3/4): 225-232.

EFFECT OF THERMAL STRESS ON ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND EXPRESSION OF IMMUNE-RELATED GENES IN LIVER OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

DONG Fu-Lin[1, 2], HUANG Tian-Qing[1], LIU En-Hui[1], GU Wei[1], WANG Gao-Chao[1], GUO Fu-Yuan[3], WANG Bing-Qian[1], XU Ge-Feng[1]

(1. *Cold Water Fish Industry Technology Innovation Strategic Alliance*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Heilongjiang Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Harbin* 150070, *China*; 2. *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*; 3. *Yantai Jinghai Marine Fishery Co. Ltd.*, *Yantai* 264006, *China*)

Abstract High summer temperatures poses a threat to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in net pens, causing thermal stress or even death. To investigate the effects of thermal stress on the antioxidant response of rainbow trout liver and related immune genes, we selected juvenile rainbow trout [(24.8±10.0) g] as the experimental subjects and screened the sensitive and tolerant groups by gradual temperature increases to a thermal stress point. Polymorphic DNA (RAPD) fragmentation was studied in a comparative manner. Results show that the levels of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in the sensitive group showed no significant difference from those in the tolerant group (P>0.05) but the control group (P<0.05). The levels of hypoxia inducible factor 1α (*hif-1α*), interleukin-1β (*il-1β*), and heat shock proteins10 (*hsp10*) in the sensitive group had no significant difference from those in the tolerant group (P<0.05). The relative expression of *hif-1α*, *il-1β*, and *hsp10* were 1.8, 1.28, and 16.5 times higher in the sensitive group than in the tolerant group (P<0.05), respectively. The expression of heat shock proteins 70 (*hsp70*) in the tolerant group was 1.37 times higher of that in the sensitive group (P<0.05). The expression of *il-8* and *hsp10* in the sensitive group was significantly higher than that in the tolerant group, indicating that the high temperature led to an inflammatory response in the liver of juvenile rainbow trout, and the liver of the sensitive group was more severely damaged, which is consistent with the RAPD profile reflecting that the DNA damage in the sensitive group was more severe than that in the tolerant group. The expression of *hsp70* in the tolerant group was significantly higher than that in the sensitive group because *hsp70* plays a role in protecting tissues and cells in rainbow trout in response to the heat stress. It is suggested that the difference in *hsp70* and *hsp10* expression is one of the reasons for the difference in thermal tolerance and the ability to tolerate hypoxia is an important factor in thermal tolerance for rainbow trout. Meanwhile, the RAPD is an effective tool for identifying individuals with thermal tolerance.

Key words rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*; thermal stress; hypoxia-inducible factor-1α; heat shock protein; RAPD