镉急性染毒对中华稻蝗精卵巢小分子热休克蛋白基因表达的影响

寇利花[1], 吴海花[1], 刘耀明[1], 张育平[2], 张建珍[1], 郭亚平[3], 马恩波[1*]

(1.山西大学应用生物学研究所, 太原 030006; 2.太原师范学院生物系, 太原 030031; 3.山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘 要:小分子热休克蛋白(sHSPs)能够被环境胁迫诱导,采用不同浓度氯化镉($CdCl_2$)溶液对中华稻蝗 5 龄若虫进行急性染毒,利用 Real-time PCR 技术对 5 个小分子热休克蛋白基因 *OcHSP*19.1、*OcHSP*19.8、*OcHSP*20.4、*OcHSP*20.7 和 *OcHSP*21.1 在精巢和卵巢的表达进行了分析。结果表明:在精巢内,*OcHSP*19.1 和 *OcHSP*19.8 基因经 0.16 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,其在不同处理时间的表达水平与对照组相比均显著升高;经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,其在 2 h 表达水平最高,之后显著降低;经 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,*OcHSP*19.1 基因在 2 h 和 6 h 的表达量均高于对照组,在 12 h 的表达量低于对照组,*OcHSP*19.8 基因在 2 h 的表达量高于对照组,在 6 h 的表达量低于对照组,之后二者表达量都显著升高,在 36 h 表达量最高,分别为对照组的 6.3 倍和 5.4 倍。在卵巢内,*OcHSP*19.1 和 *OcHSP*21.1 基因经 0.16 μg·μL^{-1} 和 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,其在不同处理时间的表达水平与对照组相比无显著差异;经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,*OcHSP*19.1 基因在 6 h 和 12 h 的表达水平高于对照组,但在 24 h 低于对照组,*OcHSP*21.1 基因在 2、6、12 h 和 24 h 的表达水平与对照组相比均显著降低,但二者都在 36 h 表达量最高,分别为对照组的 4.8 倍和 4.6 倍;经 0.16 μg·μL^{-1} 和 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,*OcHSP*20.7 基因在 2 h 表达水平高于对照组,经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,该基因的表达水平随着时间的延长出现先升高后降低的趋势。*OcHSP*21.1 基因在精巢内和 *OcHSP*20.4 基因在卵巢内的表达水平与对照组相比无显著差异。研究结果显示,Cd 急性诱导中华稻蝗 5 个 *OcsHSPs* 基因在精巢和卵巢的表达模式不同,其表达量与 Cd 浓度和作用时间相关。

关键词:中华稻蝗;小分子热休克蛋白;镉;实时定量 PCR;精巢;卵巢

中图分类号:X171.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1672-2043(2015)01-0007-08 doi:10.11654/jaes.2015.01.002

Expression Analysis of *OcsHSP* Genes in Testis and Ovary of *Oxya chinensis* Exposed to Acute Cadmium

KOU Li-hua[1], WU Hai-hua[1], LIU Yao-ming[1], ZHANG Yu-ping[2], ZHANG Jian-zhen[1], GUO Ya-ping[3], MA En-bo[1*]

(1.Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2.Biology Department of Taiyuan Normal University, Taiyuan 030031, China; 3.School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract:Small heat shock proteins(sHSPs) can be induced by environmental stresses. In the present study, we analyzed the mRNA expression patterns of *OcHSP*19.1, *OcHSP*19.8, *OcHSP*20.4, *OcHSP*20.7, and *OcHSP*21.1 genes in the testis and ovary of the fifth-instar nymphs of *Oxya chinensis* exposed to acute cadmium(Cd) toxicity using real-time quantitative PCR. In the testis, 0.16 μg·μL^{-1} Cd^{2+} induced the expression of *OcHSP*19.1 and *OcHSP*19.8 genes in different treatment times. However, 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+} did not cause significant changes of their expression as compared with the control. When treated with 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+}, the expression levels of *OcHSP*19.1 were higher at 2 h and 6 h but lower at 12 h, and those of *OcHSP*19.8 were higher at 2 h but lower at 6 h, in comparison with the control. Both reached the highest level at 36 h. In the ovary, 0.16 μg·μL^{-1} and 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+} did not significantly change *OcHSP*19.1 and *OcHSP*21.1 genes in different treatment times, but induced the expression of *OcHSP*20.7 gene at 2 h, compared with the control. In the treatment by 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+}, the expression levels of *OcHSP*19.1 gene were higher at 6 h and 12 h but lower at 24 h, and the expression levels of *OcHSP*21.1 were lower at 2 h, 6 h, 12 h, and 24 h, as compared with the control. Both genes reached the highest level at 36 h. The expression levels of *OcHSP*20.7 gene first increased then declined significantly. The expression levels of *OcHSP*21.1 gene in the testis and *OcHSP*20.4 gene in the ovary did not significantly differ from the controls. The results show that the expression patterns of the five *OcsHSP* genes are related to the Cd concentrations and treatment times.

Keywords:*Oxya chinensis*; small heat shock protein; Cd; real-time quantitative PCR; testis; ovary

收稿日期:2014-07-14

基金项目:国家自然科学基金项目(31071980,31172161)

作者简介:寇利花(1989—),女,在读硕士,动物生化与分子生物学研究方向。E-mail:koulihua1989@126.com

* **通信作者**:马恩波 E-mail:maenbo2003@sxu.edu.cn

热休克蛋白(Heat shock proteins,HSPs),是在环境胁迫条件下能够诱导其合成或含量增加的一类蛋白质,广泛分布于植物、动物和微生物体内。1962 年,Ritossa 发现短暂的热激能诱导巴氏果蝇(*Drosophila busckii*)唾腺的多线染色体发生膨突(Puffs),膨突的生成与该区基因转录有关,后经证实在受热激的果蝇组织中产生了一类蛋白,称之为热激蛋白(HSPs)。之后又陆续从原核生物及鸟类和哺乳动物组织或培养细胞中发现了多种热休克蛋白[1]。HSPs 是一个大的分子伴侣家族,能够帮助初期多肽或者变性蛋白正确折叠并阻止蛋白不可逆降解或错误折叠[2]。

生物体内有多种 HSPs,根据其分子量大小、氨基酸序列同源性和生理功能可分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子 HSPs(sHSPs)等亚类[3]。sHSPs 家族分子量在 9~43 kDa 之间[4],该家族成员均含有一个约 100 个氨基酸的 C-端保守区域[5],不同生物中该区域 α-晶体蛋白有很高的同源性,因此也被称为 α-晶体蛋白区域。对 sHSPs 的研究表明,其参与多种生理学过程,如细胞压力对抗[6]、对组织和器官的影响及生殖发育[7]等。据文献报道,sHSPs 可被多种环境压力所诱导,如缺氧、局部缺血、重金属离子、杀虫剂和有机溶剂等[8]。近年来,已在果蝇(*Drosophila melanogaster*)、秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)、家蚕(*Bombyx mori*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)和斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)等昆虫中开展了一些 sHSPs 研究工作,然而对中华稻蝗尚未见系统研究[9]。

中华稻蝗(*Oxya chinensis*)属直翅目(Orthoptera)斑腿蝗科(Catantopidae)稻蝗属(*Oxya* Serville),主要以水稻、小麦等禾本科植物为食,是主要的农业害虫[10]。当其生存环境受到重金属污染时,重金属离子可通过食物链进入蝗虫体内,产生一系列毒害作用,重金属离子在虫体内的富集和表达也作为农业环境污染的生物标志物[11]。本课题组多年来致力于重金属镉(Cadimum,Cd)对中华稻蝗的毒性效应及虫体代谢解毒作用研究[12-15],前期已对热休克蛋白 HSP90、HSP70 和 HSP60 家族进行了分析,结果表明 Cd 急性处理可诱导其表达,经 Cd 处理后,中华稻蝗 7 个小分子热休克蛋白基因(*OcsHSPs*)的表达水平不同,通过分析 7 个 *OcsHSPs* 基因在不同组织部位的表达模式,发现 *OcHSP*19.1、*OcHSP*20.7 和 *OcHSP*21.1 基因在中华稻蝗精巢和卵巢特异性高表达,*OcHSP*19.8 基因在精巢显著高表达,*OcHSP*20.4 基因在卵巢特异性高表达。究其原因可能是不同 *OcsHSPs* 的功能有所差异(数据未显示)。Li 等[16]报道,家蚕小分子热休克蛋白基因 *BmHSP*20.1、*BmHSP*20.4 和 *BmHSP*27.4 在精巢和卵巢显著高表达,*BmHSP*19.5、*BmHSP*19.9、*BmHSP*20.2 和 *BmHSP*20.8 在精巢特异性高表达,家蚕 sHSPs 基因在生殖腺高表达显示其可能在精母细胞和卵母细胞的发育中起重要作用。为了进一步研究 Cd 对 *OcsHSPs* 基因表达的影响,本文分析了 *OcHSP*19.1、*OcHSP*19.8、*OcHSP*20.4、*OcHSP*20.7 和 *OcHSP*21.1 这5 个在中华稻蝗精巢或卵巢特异性高表达的 *OcsHSPs* 基因经 Cd 急性诱导的表达模式,研究结果将为深入揭示小分子热休克蛋白的功能提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 中华稻蝗

实验用中华稻蝗蝗卵于 2013 年 4 月采自山西省太原市晋源区(112°5′ E,37°7′ N),放入人工气候箱(27 ℃,14 h 黑暗/10 h 光照,60%湿度)内孵化,2 周后虫卵孵化,室温下饲喂至 5 龄若虫后用于实验,实验期间每日以新鲜小麦苗饲喂。

1.2 主要仪器与化学试剂

高速冷冻离心机(3K-15,德国 Sigma 公司);凝胶成像系统(Gel DOC XR™ System,美国 Bio-Rad 公司);NanoDrop 2000 紫外可见分光光度计(美国 Thermo 公司);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7300,美国应用生物系统公司)。

氯化 Cd($CdCl_2·2.5H_2O$ 分析纯,天津化工三厂);RNAiso™ Plus (日本 Takara 公司);M-MLV 反转录酶(美国 Promega 公司);SYBR Green Mix (东洋纺上海公司);本实验所用引物全部在英潍捷基公司合成,其他试剂均购自 Promega 公司和 Takara 公司。

1.3 Cd 急性染毒

参照中华稻蝗 48 h LC_{50} 值(0.64 μg·μL^{-1}),设定 0.16、0.32、0.48 μg·μL^{-1} 3 个 $CdCl_2$ 溶液浓度,以三蒸水为对照。将 4 μL 各浓度 $CdCl_2$ 溶液注射到活力、大小均匀一致的 5 龄中华稻蝗若虫 2-3 腹节处,每浓度注射雌雄虫各 280 头,分别在染毒后 2、6、12、24 h 和 36 h 随机取样,每个时间段取 12 个精巢或卵巢,设置 3 个生物学重复,每个生物学重复取 4 个精巢或卵巢,在液氮中冷冻后立即存放于-80 ℃冰箱中待用。

1.4 总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

用 RNAiso™ Plus 试剂提取总 RNA,具体操作步骤参照试剂说明书。所用样本为中华稻蝗 5 龄若虫的

精巢或卵巢。用 NanoDrop 2000 紫外可见分光光度计检测总 RNA 纯度并对其进行定量,用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性。用 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂合成第一链 cDNA, 具体步骤参照试剂说明书。

1.5 荧光定量 PCR 检测及数据分析

中华稻蝗 *sHSPs* 基因的 mRNA 定量表达分析采用 SYBR Green 法在 Real time 7300 PCR 仪上检测,以20×稀释的 cDNA 为模板,以 *β-actin* 为内参基因,引物序列见表 1。反应参数:94 ℃预变性 15 s,94 ℃变性 15 s,60 ℃退火加延伸 31 s,40 个循环。

数据采用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法进行处理, 结果以平均值±标准误(Means±SE)表示,并用 SPSS 16.0 软件进行 ANOVA 分析和多重比较(Tukey 法)。

2 结果与分析

2.1 中华稻蝗精巢和卵巢内 *OcHSP*19.1 基因的表达

图 1 为不同浓度 Cd 急性处理中华稻蝗不同时间后 *OcHSP*19.1 基因表达水平的变化。

在精巢内,经 0.16 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,*OcHSP*19.1 基因在不同处理时间的表达水平与对照组相比均有所升高;经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,其在 2 h 表达水平最高,之后降低,且与对照组相比无明显变化;经 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,其表达水平从 2 h 到 12 h 降低,从 12 h 到 36 h 显著升高,在 36 h 表达水平最高,是对照组的 6.3 倍。*OcHSP*19.1 基因在 2 h 和 6 h 的表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先升高后降低的趋势,在 12 h、24 h 和 36 h 其表达水平随着Cd 浓度的增大呈先升高后降低再升高的趋势。

在卵巢内,经 0.16 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,*OcHSP*19.1 基因在不同处理时间的表达水平与对照组相比无明显变化;经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,其表达水平从 2 h 到 12 h 升高,从 12 h 到 24 h 降低,之后显著升高,在 36 h 表达量最高,是对照组的 4.8 倍;经 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,其表达水平在 2 h 最高,之后降低,且与对照组相比无明显变化。*OcHSP*19.1 基因在 2、6、12 h和 24 h 的表达水平与对照组相比无明显变化, 在 36 h 其表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先升高后降低的趋势。

2.2 中华稻蝗精巢和卵巢内 *OcHSP*20.7 基因的表达

图 2 为不同浓度 Cd 急性处理中华稻蝗不同时间后 *OcHSP*20.7 基因表达水平的变化。

在精巢内,经 0.16 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理,*OcHSP*20.7 基因在不同处理时间的表达水平与对照组相比都有所升高;经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理,其表达水平在 2 h 到 6 h 高于对照组,之后其表达水平下降且与对照组相比无明显变化;经 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理,其表达水平从 2 h 到 12 h 降低,从 12 h 到 36 h 升高,在 2 h 表达水平最高,是对照组的 5.3 倍。*OcHSP*20.7 基因在2 h 的表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现逐渐升高的趋势,在 6 h 和 12 h 其表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先升高后降低的趋势。

在卵巢内, 经 0.16 μg·μL^{-1} 和 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,*OcHSP*20.7 基因的表达水平随时间的延长而降低,在 2 h 时其表达水平高于对照组,之后与对照组相比无明显变化;经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理,其表达水平从 2 h 到 12 h 升高, 从 12 h 到 36 h 降低, 在 12 h 表达量最高,是对照组的 8.1 倍。*OcHSP*20.7 基因在

表 1 Real-time PCR 所用引物

Table 1 List of primers used in Real-time PCR

Gene	Primer name	Primer sequence
*OcHSP*19.1	OcHSP19.1-RT-F	CTATGCCAGACGCTAATGAGAGGAT
	OcHSP19.1-RT-R	GACGGTGTTTCCTCAGTTGC
*OcHSP*19.8	OcHSP19.8-RT-F	TAGAATGCGACCTCGTTACTTACCG
	OcHSP19.8-RT-R	TCAATGACACTTGTATTTCCTCTGG
*OcHSP*20.4	OcHSP20.4-RT-F	ACTTGCTTTTACCTCGTGTGTCTGT
	OcHSP20.4-RT-R	GTTATTCTGGATGGTAGATACGCCG
*OcHSP*20.7	OcHSP20.7-RT-F	GTAGAAGGGAAGCACGAGGAAAGAC
	OcHSP20.7-RT-R	GACACTCCCTCAAGTTCAACATCAT
*OcHSP*21.1	OcHSP21.1-RT-F	CGTCGTTACAAGTTGCCCAAAAAT
	OcHSP21.1-RT-R	GTCTGGACAATAGGCACTACACGCT
β-actin	β-actin-RT-F	CGAAGCACAGTCAAAGAGAGGTA
	β-actin-RT-R	GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG

2 h 的表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先升高后降低再升高的趋势，在 6 h 和 12 h 其表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先升高后降低的趋势。

2.3 中华稻蝗精巢和卵巢内 *OcHSP*21.1 基因的表达

图 3 为不同浓度 Cd 急性处理中华稻蝗不同时间 *OcHSP*21.1 基因表达水平的变化。

在精巢内，经 0.16 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理，*OcHSP*21.1 基因在 6 h 和 36 h 的表达水平低于对照组，其他处理时间均高于对照组；经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理，不同处理时间其表达水平与对照组相比均有所降低；经 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理，在 2 h 和 36 h 其表达水平高于对照组，在 6 h 的表达水平低于对照组，其他时间与对照组相比无明显变化。*OcHSP*21.1 基因在 2、12、24 h 的表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先升高后降低再升高的趋势，在 6 h 其表达水平随着 Cd 浓度的增大而降低，在 36 h 其表达水平随着Cd 浓度的增大呈现先降低后升高的趋势。

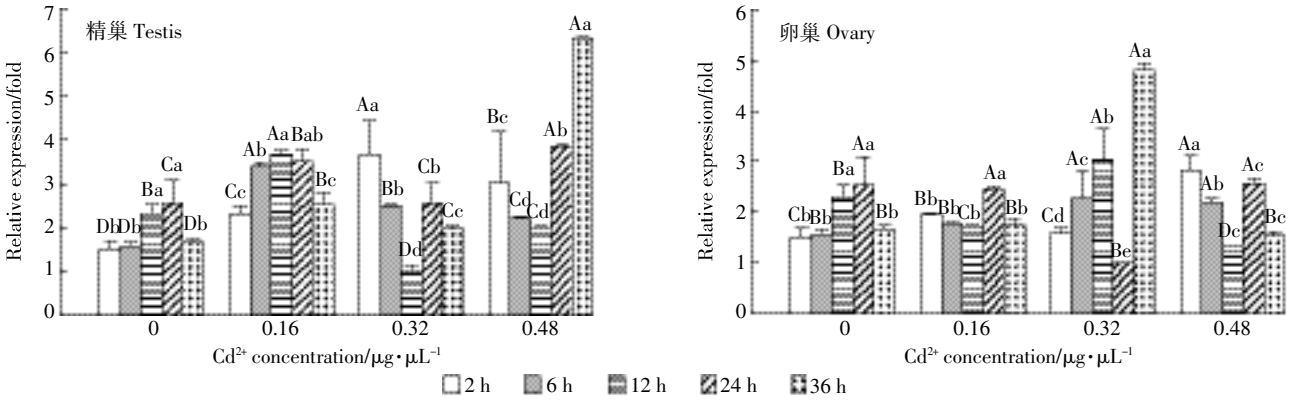
在卵巢内，经 0.16 μg·μL^{-1} 和 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理，*OcHSP*21.1 基因在不同处理时间的表达水平与对照组相比无明显变化；经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理，其表达水平从 2 h 到 24 h 无明显变化，且低于对照组，在 36 h 显著升高，表达量是对照组的 4.6 倍。*OcHSP*21.1 基因在 2 h 和 6 h 的表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先降低后升高的趋势，在 12 h 和 24 h 其表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先升高后降低再升高的趋势，在 36 h 其表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先升高后降低的趋势。

2.4 中华稻蝗精巢和卵巢内 *OcHSP*19.8 与*OcHSP*20.4 基因的表达

2.4.1 *OcHSP*19.8 基因在精巢内的表达

图 4 为不同浓度 Cd 急性处理中华稻蝗不同时间 *OcHSP*19.8 与 *OcHSP*20.4 基因表达水平的变化。

在精巢内，经 0.16 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理，*OcHSP*19.8 基因在不同处理时间的表达水平变化不明显，且均



不同大写字母表示相同时间不同 Cd 浓度处理间差异显著，不同小写字母表示同一浓度下不同处理时间的差异显著（P<0.05）。下同
Capital letters indicate significant difference between different Cd concentrations. Small letters indicate significant difference between different time（P<0.05）. The same below

图 1 Cd 急性染毒对中华稻蝗 *OcHSP*19.1 基因在精巢和卵巢表达的影响

Figure 1 Effects of acute Cd exposure on expression levels of *OcHSP*19.1 gene in testis and ovary of *O. chinensis*

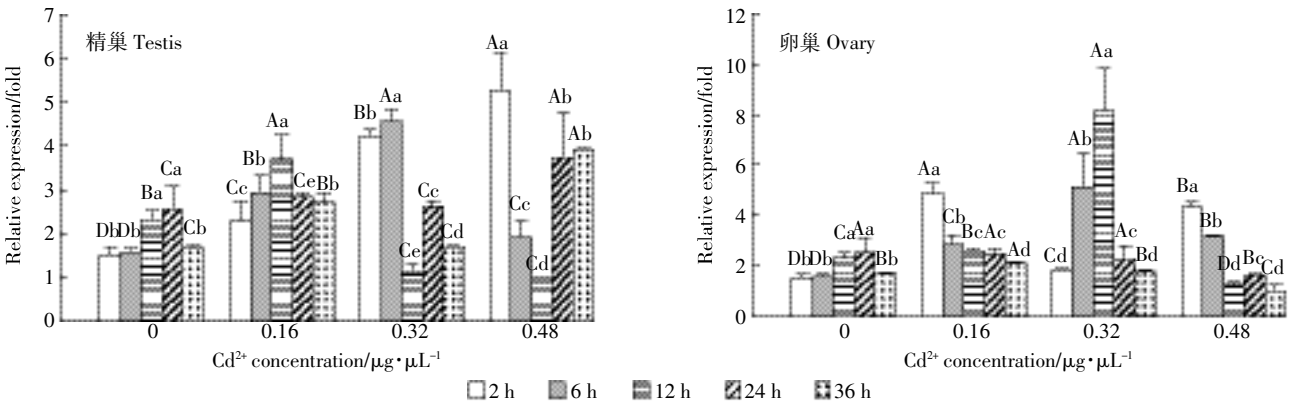


图 2 Cd 急性染毒对中华稻蝗 *OcHSP*20.7 基因在精巢和卵巢表达的影响

Figure 2 Effects of acute Cd exposure on expression levels of *OcHSP*20.7 gene in testis and ovary of *O. chinensis*

高于对照组;经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,其表达水平在 2 h 明显高于对照组,之后降低,且与对照组相比无明显变化;经 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+} 处理,其表达水平从 2 h 到 12 h 与对照组相比无明显变化,从 24 h 到 36 h 显著升高,在 36 h 表达量最高,是对照组的 5.4 倍。*OcHSP*19.8 基因在 2 h 和 6 h 的表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先升高后降低的趋势,在 12 h、24 h 和 36 h 其表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先升高后降低再升高的趋势。

2.4.2 *OcHSP*20.4 基因在卵巢内的表达

由图 4 可见,经 0.16、0.32、0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理,*OcHSP*20.4 基因在 12 h 和 24 h 的表达水平低于对照组,经 0.32 μg·μL^{-1}Cd^{2+}处理,其在 36 h 的表达水平高于对照组,其他处理时间与对照组相比均无明显变化。*OcHSP*20.4 基因在 12 h 其表达水平随着 Cd 浓度的增大逐渐降低,在 24 h 的表达水平随着 Cd 浓度的增大呈现先降低后升高的趋势,在 36 h 其表达水平随着Cd 浓度的增大呈现先升高后降低的趋势。

2.5 多因素方差分析

2.5.1 中华稻蝗精巢内 *OcsHSPs* 基因的多因素方差分析

经 Cd 急性染毒中华稻蝗精巢内 *OcsHSPs* 基因的多因素方差分析结果见表 2。Cd 浓度对中华稻蝗精巢内 *OcsHSPs* 基因的表达具有显著的影响($P<0.05$),处理时间对中华稻蝗精巢内 *OcsHSPs* 基因的表达有极显著的影响($P<0.001$)。基因×浓度之间有明显的交互作用($P<0.05$),浓度×时间之间有极显著的交互作用($P<0.001$),基因×时间、基因×浓度×时间之间无明显交互作用($P>0.05$)。

2.5.2 中华稻蝗卵巢内 *OcsHSPs* 基因的多因素方差分析

经 Cd 急性染毒中华稻蝗卵巢内 *OcsHSPs* 基因的多因素方差分析结果见表 3。Cd 浓度和处理时间对中华稻蝗卵巢 *OcsHSPs* 基因的表达有极显著的影响($P<0.001$)。基因×浓度、浓度×时间之间有极显著的交互作用($P<0.001$),基因×浓度×时间之间有明显的交

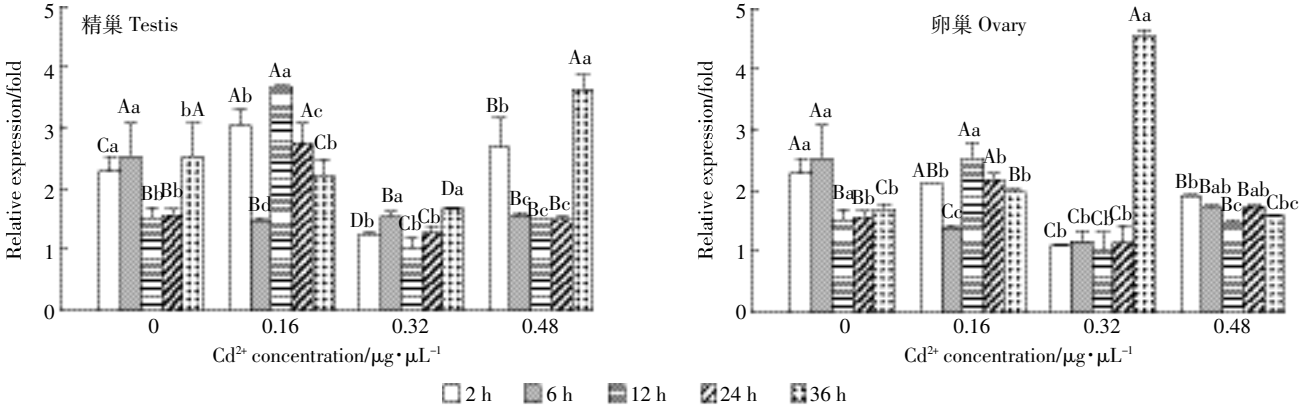


图 3 Cd 急性染毒对中华稻蝗 *OcHSP*21.1 基因在精巢和卵巢表达的影响

Figure 3 Effects of acute Cd exposure on expression levels of *OcHSP*21.1 gene in testis and ovary of *O. chinensis*

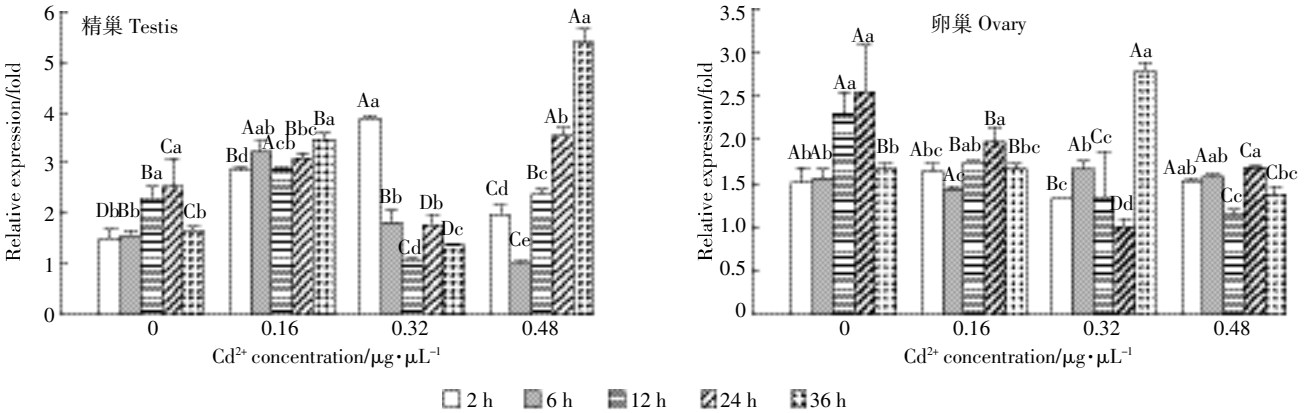


图 4 Cd 急性染毒对中华稻蝗 *OcHSP*19.8 基因在精巢和 *OcHSP*20.4 基因在卵巢表达的影响

Figure 4 Effects of acute Cd exposure on expression levels of *OcHSP*19.8 gene in testis and *OcHSP*20.4 gene in ovary of *O. chinensis*

互作用($P<0.05$),基因×时间无明显交互作用($P>0.05$)。

3 讨论

目前已有环境污染引起生物体内小分子热休克蛋白(sHSPs)基因表达改变的研究,如 Roberts 等[17]研究发现 sHSPs 的表达可以作为鱼类和甲壳类动物健康检测指标从而监测水质的污染情况,An 等[18]研究报道 HSP70 和HSP30 在黑鲫(*Carassius carassius*)肝脏和肾脏高表达,且与水质变化一致,表明肾脏中 HSP30 和肝脏中 HSP70 的表达可作为环境中水质变化的生物标记物。Cd 是环境中重要的污染元素之一,进入环境中的 Cd 很难被生物体降解,从而导致生物体中 Cd 的过量累积,影响生物体正常的生命活动[19-22]。中华稻蝗是水稻种植区重要的农业害虫,农田环境 Cd 污染可影响其生殖发育等代谢过程,包括体内起重要作用的蛋白质的合成和转运等。

本文研究结果显示,经 Cd 急性处理后中华稻蝗 5 个 *OcsHSPs* 基因在精巢和卵巢具有不同的表达模式。在精巢内,经 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理,*OcHSP*19.1 和 *OcHSP*19.8 基因在不同处理时间的表达水平均高于对照组,且随着时间的延长出现先降低后升高的趋势,在 36 h 出现了显著高表达,可能是由于 Cd 进入中华稻蝗体内,在精巢内积累和发挥作用需要一定的

表 2 经 Cd 急性染毒中华稻蝗精巢内 *OcsHSPs* 基因的多因素方差分析结果

Table 2 ANOVA results of *OcsHSP* gene expression in testis of *O. chinensis* after acute Cd exposure

方差来源 Source	Ⅲ型的平方和 Type Ⅲ sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	*F* 值 The value of *F*	*P* 值 The value of *P*
修正模型 Corrected model	3.063a	79	0.039	3.367	0.000
截距 Intercept	7.859	1	7.859	682.639	0.000
基因 Gene	0.843	3	0.281	24.398	0.000
浓度 Concentration	0.195	3	0.065	5.640	0.001
时间 Time	0.381	4	0.095	8.269	0.000
基因×浓度 Gene×Concentration	0.255	9	0.028	2.463	0.012
基因×时间 Gene×Time	0.134	12	0.011	0.971	0.479
浓度×时间 Concentration×Time	0.775	12	0.065	5.607	0.000
基因×浓度×时间 Gene×Concentration×Time	0.480	36	0.013	1.159	0.265
误差 Error	1.842	160	0.012		
总离差 Total deviation	12.764	240			
校正总离差 Corrected total deviation	4.905	239			

注:a:R^2=0.624(调整 R^2=0.439)。

表 3 经 Cd 急性染毒中华稻蝗卵巢内 *OcsHSPs* 基因的多因素方差分析结果

Table 3 ANOVA results of *OcsHSP* gene expression in ovary of *O. chinensis* after acute Cd exposure

方差来源 Source	Ⅲ型的平方和 Type Ⅲ sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	*F* 值 The value of *F*	*P* 值 The value of *P*
修正模型 Corrected model	12.052a	79	0.153	12.690	0.000
截距 Intercept	11.029	1	11.029	917.457	0.000
基因 Gene	7.503	3	2.501	208.033	0.000
浓度 Concentration	0.549	3	0.183	15.212	0.000
时间 Time	0.350	4	0.088	7.282	0.000
基因×浓度 Gene×Concentration	1.855	9	0.206	17.147	0.000
基因×时间 Gene×Time	0.222	12	0.018	1.536	0.116
浓度×时间 Concentration×Time	0.856	12	0.071	5.931	0.000
基因×浓度×时间 Gene×Concentration×Time	0.718	36	0.020	1.660	0.018
误差 Error	1.923	160	0.012		
总离差 Total deviation	25.005	240			
校正总离差 Corrected total deviation	13.976	239			

注:a:R^2= 0.862(调整 R^2=0.794)。

时间,并且 Cd 浓度越高其积累量越多[23]。本文研究结果与 You 等[24]对紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)*sHSP*22 基因经不同浓度 Cd 诱导的表达结果类似,即随着 Cd 浓度增大和时间的延长,*sHSP*22 基因表达量显著增大。

在卵巢内,*OcHSP*19.1 和 *OcHSP*21.1 基因经0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理,随着时间的延长,表达量升高,而经 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理时,表达量有所下降。其原因可能是高浓度 Cd^{2+} 降低了卵巢的代谢能力,从而破坏了 OcsHSPs 的蛋白结构或阻碍了蛋白的合成转运。本文研究结果与 Tang 等[25]对家蝇(*Musca domestica*)两个金属硫蛋白基因经 Cd 诱导后的表达水平类似,即在一定的浓度范围内,随着 Cd 浓度的增大,基因表达水平升高,而当 Cd 浓度增大到一定量时,基因表达水平降低,这可能是由于高浓度 Cd 毒性增大而引起卵巢代谢能力下降。

经 0.16 μg·μL^{-1} 和 0.48 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理,*OcHSP*20.7 基因在卵巢内于 2 h 出现了显著高表达,之后明显降低,可能是由于 *OcHSP*20.7 是一种应激蛋白,当 Cd 进入中华稻蝗体内后 *OcHSP*20.7 迅速合成以抵抗 Cd 毒性,应激过后昆虫体内其他解毒系统发挥作用,故 *OcHSP*20.7 基因表达水平降低;经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理,*OcHSP*20.7 基因的表达水平随着时间的延长出现先升高后降低的趋势,可能是 Cd 初始诱导时,未引起应激反应,经一定时间后出现对 Cd 的反应。而随着时间的延长,中华稻蝗体内其他代谢解毒基因开始起作用,故其表达水平又逐渐降低。这一结果与 You 等[24]对紫贻贝 *sHSP*24.1 基因经不同浓度 Cd 诱导后的表达结果类似,即随着 Cd 浓度增大和时间的延长,*sHSP*24.1 基因的表达水平先升高后降低,可能是由于 Cd 初始诱导时,紫贻贝迅速合成 sHSPs 以保护细胞免受毒害,应激过后昆虫体内其他解毒系统开始起作用,故 *sHSP*24.1 基因表达水平下降。

Cd 处理后中华稻蝗 *OcHSP*21.1 基因在精巢和 *OcHSP*20.4 基因在卵巢的表达水平与对照组相比无显著差异,可能是由于中华稻蝗体内积累的 Cd 抑制了 sHSPs 或者其辅助因子的合成,也可能是长期生存于 Cd 环境中而产生了适应性。这一研究结果与 Warcha1owska-Śliwaa 等[26]对细角蚱(*Tetrix tenuicornis*)的研究结果类似,重金属对 *HSP*70 没有诱导作用,可能是长期暴露于重金属环境而产生了适应性。

不同基因对 Cd 的反应不同,原因可能是这5个基因功能存在差异。由多因素方差分析结果可知,中华稻蝗 5 个 *OcsHSPs* 基因 *OcHSP*19.1、*OcHSP*19.8、*OcHSP*20.4、*OcHSP*20.7 和 *OcHSP*21.1 在抵抗 Cd 急性毒性时存在交互作用。如经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理 2 h,在精巢内 *OcHSP*19.1、*OcHSP*19.8 和 *OcHSP*20.7 基因的表达水平与对照组相比升高以抵抗 Cd 毒性,而 *OcHSP*21.1 基因的表达水平与对照组相比降低;经 0.32 μg·μL^{-1} Cd^{2+}处理 6 h 和 12 h,在卵巢内 *OcHSP*20.7 基因的表达水平与对照组相比升高以抵抗 Cd 毒性,*OcHSP*20.4 基因的表达水平与对照组相比无明显变化,而 *OcHSP*21.1 基因的表达水平与对照组相比降低。在精巢和卵巢内,Cd 浓度与处理时间之间都存在极明显的交互作用,这两个因素共同作用使得 *OcsHSPs* 基因表达发生变化,且各基因表达模式不同[27]。

中华稻蝗对 Cd 急性染毒的反应表现为 *OcsHSPs* 基因表达水平的变化,其调控作用可能发生在转录水平。Shi 等[28]研究发现 Cd 处理水生摇蚊后,*hsc*70,*hsp*90 和 *hsp*40 基因协调表达以保护机体不受 Cd 侵害,且受多种转录因子的相互作用共同调控。本研究今后将进一步从转录调控水平开展工作,以深入揭示中华稻蝗小分子热休克蛋白的生物学功能。

4　结论

Cd 急性诱导中华稻蝗 5 个 *OcsHSPs* 基因在精巢和卵巢具有不同的表达模式。中华稻蝗 5 个 *OcsHSPs* 基因经 Cd 急性诱导时存在交互作用;在精巢和卵巢内,Cd 浓度与处理时间之间都存在极明显的交互作用,这两个因素共同作用使得 *OcsHSPs* 基因表达发生变化,且各基因表达模式不同。

参考文献:

[1] Ritossa F. A new puffing patter induced by temperature shock and DNP in *Drosphila*[J]. *Experientia*, 1962, 18(12):571-573.

[2] Wan Q, Whang I, Lee J. Molecular and functional characterization of HdHSP20:A biomarker of environmental stresses in disk abalone *Haliotis discus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(1):48-59.

[3] Gupta S C, Sharma A, Mishra M, et al. Heat shock proteins in toxicology:How close and how far?[J]. *Life Sciences*, 2010, 86 (11-12):377-384.

[4] Ventura M, Canchaya C, Zhang Z D, et al. Molecular characterization of *hsp*20, encoding a small heat shock protein of *Bifidobacterium breve* UCC2003[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(14):4695-4703.

[5] Lindguist S, Craig E A. The heat shock proteins[J]. *Annual Review of*

Genetics, 1988, 22:631-677.

[6] Liu Q N, Zhu B J, Dai L S, et al. Overexpression of small heat shock protein 21 protects the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi* against thermal stress[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2013, 59(8):848-854.

[7] Morrow G, Tanguay R M. Small heat shock protein expression and functions during development[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44(10):1613-1621.

[8] Wakayama T, Iseki S. Specific expression of the mRNA for 25 kDA heat-shock protein in the spermatocytes of mouse seminiferous tubules [J]. *Anat Embryol(Berl)*, 1999, 199(5):419-425.

[9] 夏晓峰, 林海兰, 郑丹丹, 等. 小菜蛾热休克蛋白基因的鉴定及其表达模式分析[J]. 昆虫学报, 2013, 56(5):457-464.
XIA Xiao-feng, LIN Hai-lan, ZHENG Dan-dan, et al. Identification and expression patterns of heat shock protein genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella*(Lepidoptera:Yponomeutidae)[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56(5):457-464.

[10] 陈永林. 蝗虫灾害的特点、成因和生态学治理[J]. 生物学通报, 2000, 35(7):1-5.
CHEN Yong-lin. Characteristics, causes and ecological management of the grasshopper disaster[J]. *Bulletion of Biology*, 2000, 35(7):1-5.

[11] Christine Q, Todd A S, Susan L. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation[J]. *Nature*, 2002, 17(6889):598-599.

[12] 朴 君, 张育平, 杨慧敏, 等. 镉锌处理麦苗对中华稻蝗(*Oxya chinensis*)体内锌、镉水平及生化指标的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(7):1328-1333.
PIAO Jun, ZHANG Yu-ping, YANG Hui-min, et al. Effects of cadmium and zinc in wheat seedlings on heavy metal accumulation and biochemical indices of *Oxya chinensis*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(7):1328-1333.

[13] 刘耀明, 杨慧敏, 张育平, 等. 镉和铬急性染毒对中华稻蝗解毒酶及多酚氧化酶的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(7):1321-1327.
LIU Yao-ming, YANG Hui-min, ZHANG Yu-ping, et al. Acute effects of Cd^{2+} and Cr^{6+} on detoxification enzymes and polyphenol oxidase in *Oxya chinensis*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(7):1321-1327.

[14] Li L J, Liu X M, Duan Y H, et al. Accumulation of cadmium and copper by female *Oxya chinensis*(Orthoptera:Acridoidea) in soil-plant-insect system[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2006, 18(2):341-346.

[15] Zhang Y P, Song D N, Wu H H, et al. Effect of dietary cadmium on the activity of glutathione S-transferase and carboxylesterase in different developmental stages of the *Oxya chinensis* (Orthoptera:Acridoidea) [J]. *Environmental Entomology*, 2014, 43(1):171-177.

[16] Li Z W, Li X, Yu Q Y, et al. The small heat shock protein(sHSP) genes in the silkworm, *Bombyx mori*, and comparative analysis with other insect sHSP genes[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2009, 9:215-229.

[17] Roberts R J, Agius C, Saliba C, et al. Heat shock proteins(chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health:A review[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(10):789-801.

[18] An L H, Lei K, Zheng B H. Use of heat shock protein mRNA expressions as biomarkers in wild crucian carp for monitoring water quality[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 37(1):248-255.

[19] 张育平, 杨慧敏, 李丽君, 等. 中华稻蝗(*Oxya chinensis*)对重金属镉的累积及排泄[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(1):36-41.
ZHANG Yu-ping, YANG Hui-min, LI Li-jun, et al. Accumulation and excretion of cadmium in *Oxya chinensis* fed on treated diets with cadmium[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(1):36-41.

[20] 杨慧敏, 张育平, 李丽君, 等. 镉急性染毒对中华稻蝗羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶活性的影响[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(3):700-704.
YANG Hui-min, ZHANG Yu-ping, LI Li-jun, et al. Effects of Cd on carboxylesterase and glutathione S-transferase activity in *Oxya chinensis*[J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2012, 49(3):700-704.

[21] Wright D A, Welbourn P. 环境毒理学[M]. 朱琳(译). 北京:高等教育出版社, 2007:308-310.
Wright D A, Welbourn P, Zhu Lin(Translator). Environmental toxicology[M]. Beijing:Higher Education Press, 2007:308-310.

[22] Zhang Y P, Sun G, Yang M L, et al. Chronic accumulation of cadmium and its effects on antioxidant enzymes and malondialdehyde in *Oxya chinensis*(Orthoptera:Acridoidea)[J]. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2011, 74(5):1355-1362.

[23] Zhang L B, Liu X L, Chen L L, et al. Transcriptional regulation of selenium-dependent glutathione peroxidase from *Venerupis philippinarum* in response to pathogen and contaminants challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6):831-837.

[24] You L P, Ning X X, Chen L L, et al. Expression profiles of two small heat shock proteins and antioxidant enzyme activity in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium at environmentally relevant concentrations[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(2):334-343.

[25] Tang T, Huang D W, Zhang D, et al. Identification of two metallothionein genes and their roles in stress responses of *Musca domestica* toward hyperthermy and cadmium tolerance[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B*, 2011, 160(2-3):81-88.

[26] Warchalowska-Śliwa E, Niklińska M, Görlich A. Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis*(L.)(Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 133(2):373-381.

[27] 张育平. 中华稻蝗对重金属镉的解读机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2012.
ZHANG Yu-ping. The Detoxification mechanism of rice grasshopper *Oxya chinensis* to cadmium[D]. Taiyuan:Shanxi University, 2012.

[28] Planelló R, Martínez-Guitarte J L, Morcillo G. Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(7):1598-1603.