

肉鸡热应激下肝脏和下丘脑 *HSP70* mRNA 的表达

许生友 陈兴勇 姜润深* 耿照玉

(安徽农业大学 动物科技学院,合肥 230036)

摘要 研究优质黄羽肉鸡热应激期间肝脏和下丘脑组织中热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 基因 mRNA 的动态表达规律,为揭示该类型优质鸡种热应激反应机理提供参考。64 日龄 Anak 40(♂)×岭南黄(♀)杂交代母鸡置于(38±1)℃恒温室内进行持续热应激处理,采取荧光定量 PCR 方法分别测定热应激起始(0 h)、热应激后 12、24、36、48 和 60 h 肝脏和下丘脑组织中 *HSP70* mRNA 的表达水平。随着热应激时间的延长,肝脏和下丘脑组织中 *HSP70* mRNA 表达水平均显著上升,至热应激 36 h 时表达水平达峰值,约为应激起始表达水平的 7 倍,差异显著($P<0.05$);热应激 48 和 60 h,下丘脑 *HSP70* mRNA 表达量快速回落至热应激初期的水平,而肝脏表达量极显著地骤降至低于热应激初期 10% 的水平。在(38±1)℃持续热应激期间,优质肉鸡肝脏和下丘脑 *HSP70* mRNA 表达呈现基本同步的变化规律,即表达水平先上升后下降,热应激 36 h 时表达水平达峰值。

关键词 肉鸡; 热应激; 反应机理; *HSP70*; 基因表达

中图分类号 S 831.2

文章编号 1007-4333(2011)03-0112-05

文献标志码 A

Expression of *HSP70* mRNA in liver and hypothalamus in chicken under heat stress

XU Sheng-you, CHEN Xing-yong, JIANG Run-shen*, GENG Zhao-yu

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract This study is to investigate the dynamic expression profiles of *HSP70* mRNA in liver and hypothalamus in quality chicken under heat stress, and explore the mechanism of heat stress reaction of this kind of chicken. The 64-day-old subjects produced from Anak 40 (♂) × Lingnan Yellow (♀) were placed in a room with the ambient temperature at (38 ± 1)℃ for heat stress treatment. The *HSP70* mRNA levels in liver and hypothalamus were detected by fluorescence quantitative PCR at the initial, 12, 24, 36, 48, and 60 h of the stress, respectively. During heating stress, the expression of *HSP70* mRNA in the liver and hypothalamus markedly increased, and reached the peak at 36 h, which significantly ($P<0.05$) higher than the initial level by approximately 7-fold. At 48 and 60 h of the stress, the *HSP70* mRNA in hypothalamus decreased dramatically to the level as at the initial of heat stress. While in liver, the *HSP70* mRNA significantly decreased to the level less than 10% of the initial. Under heat stress of (38 ± 1)℃, the expression of *HSP70* mRNA in the liver and hypothalamus increased up to 36 h and followed by a sharp decrease, and the dynamic expression profiles of *HSP70* mRNA in both tissues were basically synchronous.

Key words chicken; heat stress; reaction mechanism; *HSP70*; gene expression

含有中国地方鸡种血缘的优质肉鸡是我国肉鸡品种的重要类型之一,其年出栏量约占国内肉鸡出栏总量的一半。肉鸡生长阶段适宜的环境温度为 17~27℃,18℃时肉鸡生长速度最快,24℃时饲料

效率最高,超过 28℃即出现热应激,38℃以上就出现死亡,从而造成经济损失^[1-2]。因此,对热应激危害的评估与预防,以及热应激反应机理的研究一直是家禽抗逆性研究的重要领域之一。热休克蛋白

收稿日期: 2010-10-23

基金项目: 国家“863”计划项目(2008AA101009); 国家科技支撑计划项目(2008BADB2B06)

第一作者: 许生友,硕士研究生, E-mail: sszwoshi@qq.com

通讯作者: 姜润深,副教授,博士,主要从事动物遗传育种研究, E-mail: jiangrunshen@ahau.edu.cn

(heat shock proteins, HSPs)是因环境温度升高而诱导机体细胞合成的蛋白质组^[3],其中 HSP70 家族最为普遍和保守,在热应激状态下的细胞中合成最为显著。作为分子伴侣,HSP70 在热应激状态下机体蛋白的合成、组装、折叠、转运和降解等方面具有重要的作用^[4-5]。在急性热应激状态下,鸡胚的 HSP70 mRNA 水平迅速提高,而热应激消除后仍需一段时间才能恢复正常表达水平^[6];Givisiez 等^[7]、Maak 等^[8]和孙培民等^[9]报道肉仔鸡在热应激条件下, HSP70 mRNA 在脑、肝、心脏等组织中的表达量快速上升。这些研究表明,鸡可以通过快速提高 HSP70 mRNA 水平诱导热应激反应。然而当前的研究大多以高产蛋鸡或白羽肉仔鸡作为研究对象,而对优质肉鸡热应激期间 HSP70 mRNA 表达规律的研究甚少。本研究以具有我国特色的优质黄羽肉仔鸡为对象,利用荧光定量 PCR 技术,测定优质肉鸡热应激期间不同时间点肝脏和下丘脑组织中 HSP70 mRNA 的表达水平,揭示优质肉鸡在热应激下 HSP70 基因的动态表达规律,旨在为研究该类型鸡种在热应激下的耐热机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与样品采集

以 1 只 Anak 40 成年公鸡的精液,配种 50 只岭南黄父母代母鸡,收集种蛋,孵化,得 F₁ 代全同胞-半同胞混合家系母鸡约 150 只。从 56 日龄的 F₁ 群中选择体重接近、健康的母鸡 60 只,置于育成舍育成笼的同一层,每笼饲养 5 只,每只鸡占笼位面积约

600 cm²。育成舍温度为 25~28 ℃,直到 63 日龄。64 日龄开始对试验鸡进行热应激处理,鸡舍快速(30 min 以内)升温至(38±1)℃,以达到此温度为热应激起始点,在热应激起始(0 h)以及热应激后 12、24、36、48 和 60 h 分别随机宰杀 6 只母鸡,快速采集每只鸡的肝脏和下丘脑组织,液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱中,用作总 RNA 的提取。整个试验期试验鸡自由采食与饮水。

1.2 主要试剂

Trizol 购于美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司,荧光定量 PCR 试剂盒为大连宝生物技术有限公司 TaKaRa SYBR Premix Ex TaqTM(2×)试剂盒。

1.3 定量表达分析

1.3.1 RNA 提取与 cDNA 合成

利用 Trizol 试剂盒提取总 RNA 后,立即利用 AMLV 反转录酶试剂盒,将 mRNA 合成 cDNA 第 1 条链。逆转录反应体系为 40 μL,包括总 RNA 4 μL, Oligo dT(18)3.2 μL, RNA 酶抑制剂 2 μL, 250 μmol/L dNTP Mix 3.2 μL, 5×RT Buffer 8 μL, 灭菌 DEPC 水 17.6 μL。反转录条件为:65 ℃ 5 min, 快速冷却后立即加入反转录酶 AMLV(200 U/μL) 2 μL, 37 ℃ 温浴 50 min, 75 ℃ 5 min。

1.3.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 登陆的 HSP70 基因(GenBank: NC_006092)和持家基因 GAPDH (GenBank: NM204305)基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件分别设计引物(表 1)。引物由上海生工生物有限公司合成。

表 1 目的基因和持家基因 PCR 引物

Table 1 Information of PCR primers for target and house-keeping gene

基因	引物序列	退火温度/℃	产物长度/bp
HSP70	F:5'-GTAGAAGAGTTCAAGCGTAAG-3'	57	166
	R:5'-TGGAGGTGTAGAAGTCAATG-3'		
GAPDH	F:5'-TGAAAGTCGGAGTCAACGGAT-3'	57	230
	R:5'-ACGCTCCTGGAAGATAGTGAT-3'		

1.3.3 荧光定量 PCR 反应

荧光定量 PCR 在 Bio-Rad 公司 Rotor-gene 6000 荧光定量 PCR 仪上进行。荧光定量 PCR 反

应体系为 25 μL, 含模板 cDNA(50 ng/μL)2.0 μL, SYBR Premix Ex TaqTM(2×) 12.5 μL, 正向引物 F (10 μmol/L)0.5 μL, 反向引物 R(10 μmol/L)0.5

μL , ddH₂O 9.5 μL 。每个样品设置 3 个重复, 设定阴性对照。反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 58 °C 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min。为了分析 real-time PCR 扩增特异性, 在定量扩增参数后增设溶解曲线程序: 64~94 °C, 升温速度 0.5 °C/10 s。

1.4 统计分析

Rotor-gene 6000 荧光定量 PCR 仪自动分析荧光信号并将其转换为 *C_t* 值, 根据标准曲线计算 *C₀* 值, 然后根据目的基因和内标持家基因 *C₀* 值的比值计算目的基因的相对表达量。mRNA 表达量以平均数±标准误表示, 各时间点间表达量比较采用单因子方差分析法和 Duncan 氏多重比较, 两组织间表达量差异采用 *T* 检验法。

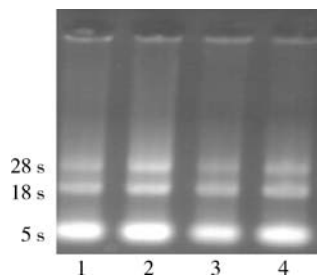
2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取结果

从试验鸡肝脏和下丘脑中提取总 RNA, 经 1.5 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭(EB)染色后, 均显示清晰的 3 条带(图 1), 证明 RNA 质量良好, 没有降解。紫外分光光度计测定, 样品在 260 nm 处有最大吸收峰, OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 均在 1.8~1.9 之间, 说明提取的总 RNA 纯度高, 无杂蛋白和酚的污染。

2.2 反转录结果

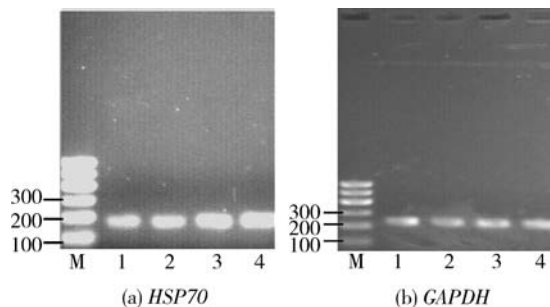
用设计的 *HSP70* 和 *GAPDH* 引物分别对反转录产物 cDNA 进行 PCR 扩增, 产物经 1.5 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2。 *HSP70* 和 *GAPDH* 扩增片段与预期片段大小一致且特异性好, 说明引



1,2 为随机选取的 2 个肝脏总 RNA;
3,4 为随机选取的 2 个下丘脑总 RNA。

图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis for total RNA



M 为 marker; 1~4 为随机选取的样品。

图 2 *HSP70* 和 *GAPDH* 基因 cDNA 的 PCR 图谱

Fig. 2 PCR for cDNA of *HSP70* and *GAPDH* gene

物和反转录的产物模板质量良好, 可用于后续的数量 PCR 分析。

2.3 基因扩增曲线和融解曲线

HSP70 和 *GAPDH* 基因扩增曲线走势正常, 呈 S 型曲线(图 3), 且 2 个基因的融解曲线均呈单一尖峰(图 4), 表明设计的引物特异性好, 无引物二聚体和非特异性产物。

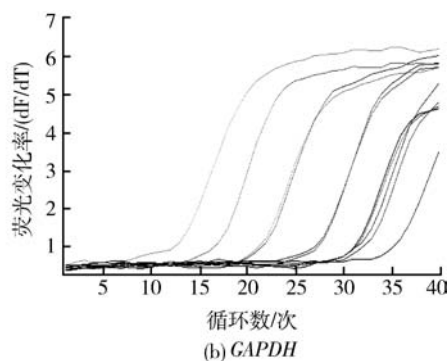
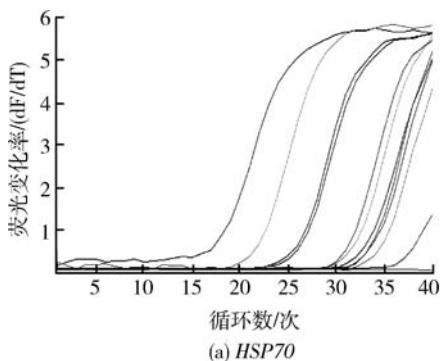


图 3 *HSP70* 及 *GAPDH* 基因的扩增曲线

Fig. 3 PCR curves for *HSP70* and *GAPDH* gene

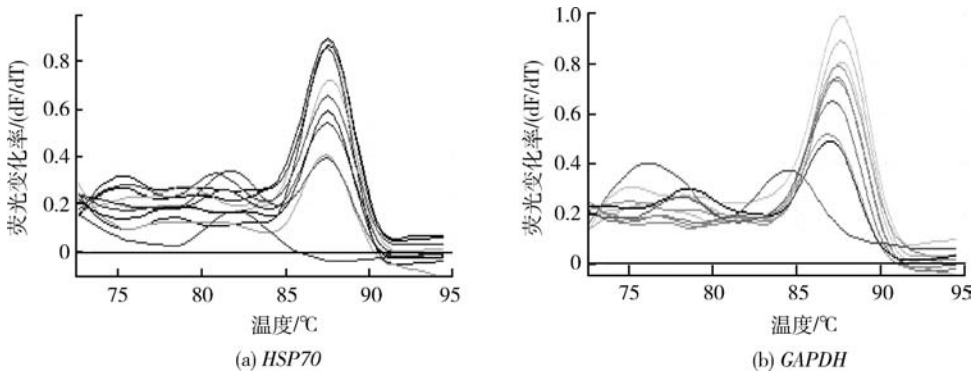


图 4 *HSP70* 及 *GAPDH* 基因的融解曲线

Fig. 4 Melting curves for *HSP70* and *GAPDH* gene

2.4 2 种组织 *HSP70* mRNA 表达结果

由表 2 可以看出,在热应激起始(0 h)和热应激后 60 h 内,试验鸡肝脏 *HSP70* mRNA 表达量均显著高于下丘脑($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。随着热应激时间的延长,肝脏和下丘脑组织中 *HSP70* mRNA 表达量均表现出先上升后下降的趋势,热应激后 36 h 表达量达高值,均为应激起始表达水平的 7

倍左右,差异显著($P < 0.05$)。下丘脑中,热应激 48 h 后 *HSP70* mRNA 表达量快速回落至热应激初期的水平,显著低于 24 和 36 h 的表达水平($P < 0.05$);而肝脏中,热应激 48 h 后 *HSP70* mRNA 表达量骤降至热应激初期的 10% 以内,极显著低于热应激起始和 36 h 内的表达水平($P < 0.01$)。

表 2 优质肉鸡热应激期间肝脏和下丘脑组织中 *HSP70* mRNA 表达量

Table 2 Expression of *HSP70* mRNA in the liver and hypothalamus in quality chicken under heat stress

热应激时间/h	组织表达量		组织间差异显著性
	肝脏	下丘脑	
0	242.81±133.50 Aa	2.74±1.31 a	$P < 0.01$
12	516.30±248.32 Aab	9.22±3.54 ab	$P < 0.01$
24	1 231.87±142.93 Ab	15.43±5.67 b	$P < 0.01$
36	1 610.92±695.56 Ab	19.87±4.58 b	$P < 0.01$
48	19.62±7.83 B	3.35±1.85 a	$P < 0.05$
60	14.01±6.52 B	4.09±0.47 a	$P < 0.05$

注:同列数据标有不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$);同列数据标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

1) 尽管本试验所选择的 60 只母鸡是全同胞或半同胞,且体重也比较接近,但是无论是肝脏还是下丘脑组织,各采样时间点不同,个体间 *HSP70* mRNA 表达水平均存在较大的差异,进一步表明了鸡热应激反应机理除了遗传背景的影响外,还有其他复杂的因素。本试验采用混合家系开展热应激研究,可在一定程度上降低遗传背景对试验的影响。

2) Leandro 等^[6]用 Western-blot 检测不同日龄

白羽肉鸡胚胎 *HSP70* mRNA 的表达特性,发现脑组织比肝脏等其他组织表达水平高 2~5 倍;Zhen 等^[5]研究显示,急性热应激时,肉鸡脑组织 *HSP70* mRNA 表达量显著高于肝脏。而本研究表明,在热应激起始以及热应激期间,鸡肝脏 *HSP70* mRNA 表达量均显著高于下丘脑。造成与前人研究结果不一致的原因可能是试验鸡品种和日龄存在差异。

3) 当机体受到热应激时,组织细胞 *HSP70* mRNA 的转录能力加强,从而增加细胞中 *HSP70* 的含量以保护细胞功能^[10]。本研究显示,热应激过

程中,肝脏和下丘脑组织中 *HSP70* mRNA 表达水平呈现较一致的动态变化规律,即在热应激早期(36 h 内)呈快速上升趋势,表明热应激早期组织通过快速提高 *HSP70* 含量的方式来应对热应激对细胞产生的危害。Gabriel 等^[11] 研究发现,在急性热应激下,白羽肉仔鸡肝脏组织细胞 *HSP70* 含量和 *HSP70* mRNA 迅速上升,且热应激后 3 h 即达表达高峰;孙培明等^[12] 报道显示,白羽肉仔鸡热应激 18 h 时肝脏和心脏 *HSP70* mRNA 水平达最高水平。相比而言,本研究中 2 种组织 *HSP70* mRNA 表达量达高峰的时间较迟(应激后 36 h)。这点可以进一步证明,含有我国地方鸡种的优质肉鸡比白羽肉鸡耐热性能更强。除了品种因素以外,其他如试验鸡日龄大小、应激温度差异等因素,也可能是 *HSP70* mRNA 表达高峰期迟来的原因。

4) 过度热应激直接的后果是导致肝脏等重要器官的细胞坏死^[13],使细胞失去正常的生理功能;热应激后肉鸡股动脉压最大变化速率特别是股动脉舒张压最大变化速率的显著或极显著下降,其心血管系统的功能受到严重影响,并导致死亡的结果^[14]。本研究中,热应激 48 h 以后肝脏和下丘脑 *HSP70* mRNA 表达水平呈现同步迅速下降的特性,其中下丘脑 *HSP70* mRNA 表达量下降至与应激起始相当的水平,而肝脏 *HSP70* mRNA 表达水平骤降至不到应激起始表达水平的 10%。表达水平下降的原因可能与组织细胞的坏死有关,且肝脏细胞的坏死可能早于下丘脑细胞,或者肝脏细胞坏死程度比下丘脑更为严重。

4 结 论

在(38±1)℃持续热应激期间,优质黄羽肉鸡肝脏组织 *HSP70* mRNA 表达水平均极显著或显著高于同期的下丘脑组织。肝脏和下丘脑组织 *HSP70* mRNA 表达水平均呈现先上升后下降的规律,且 2 个组织表达水平变化基本同步。该研究结果有助于揭示优质肉鸡热应激反应的机理,并为深入研究该类型鸡的耐热性能提供参考。

参 考 文 献

[1] 刘瑞生. 肉鸡热应激研究进展[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2001, 3

(5):5-6

- [2] Pardue S L, Thaxton J P, Brake J. Influence of supplemental ascorbic acid on broiler performance following exposure to high environmental temperature[J]. Poultry Science, 1985, 64(7): 1334-1338
- [3] Tisseres A, Mitchell H K, Tracy U M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Molecular Biology, 1974, 84(3):389-392
- [4] Taleb M, Brandon C S, Lee F S, et al. Hsp70 inhibits aminoglycoside-induced hair cell death and is necessary for the protective effect of heat shock[J]. Journal of the Association for Research in Otolaryngology, 2008, 9(3):277-289
- [5] Zhen F S, Du H L, Xu H P, et al. Tissue and allelic-specific expression of hsp70 gene in chickens: basal and heat-stress-induced mRNA level quantified with real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction [J]. British Poultry Science, 2006, 47(4):449-455
- [6] Leandro N S, Gonzales E, Ferro J A, et al. Expression of heat shock protein in broiler embryo tissues after acute cold or heat stress[J]. Molecular Reproduction and Development, 2004, 67(2):172-177
- [7] Givisiez P E, Silva M M, Mazzi C M, et al. Heat or cold chronic stress affects organ weights and Hsp70 levels in chicken embryos[J]. Canadian Journal of Animal Science, 2001, 81(1): 83-87
- [8] Maak S, Melesse A, Schmidt R, et al. Effect of long-term heat exposure on peripheral concentrations of heat shock protein 70 (Hsp 70) and hormones in laying hens with different genotypes[J]. British Poultry Science, 2003, 44(1):133-138
- [9] 孙培明, 刘雨田, 赵永刚, 等. 肉鸡心脏热应激损伤和热休克蛋白 mRNA 转录水平的相关性[J]. 中国农业科学, 2005, 38(12):2536-2541
- [10] Morimoto R I. Cell in stress: transcriptional activation of heat shock genes[J]. Science, 1993, 259(5100):1409-1410
- [11] Gabriel J E, Stefani R M, Ferro M I, et al. Effect of acute heat stress on heat shock protein 70 messenger RNA and on heat shock protein expression in the liver of broilers[J]. British Poultry Science, 1996, 37(2):443-449
- [12] 孙培明, 鲍恩东, 王志亮. 肉鸡热休克蛋白 70mRNA 荧光定量 PCR 方法的建立和优化[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(1): 45-50
- [13] 孙培明. 肉鸡热应激损伤与热休克蛋白 70 表达的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2006
- [14] 李静, 乔健, 高铭宇, 等. 40℃持续热应激对肉鸡股动脉压的影响[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(3):41-44

(责任编辑: 苏燕)