

空氣暴露及低溫緊迫對點帶石斑魚血液指標與三種熱休克蛋白基因表現的影響

許晉榮¹ · 林冠宏² · 蔡志明^{2*}

¹ 行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

² 國立高雄海洋科技大學海洋生物技術系暨研究所

摘要

本研究旨在調查空氣暴露及低溫緊迫對點帶石斑魚 (*Epinephelus coioides*) 血液學指標以及肝與頭腎三種熱休克蛋白基因 (*hsp60*、*70*、*90*) 表現的影響。12 min 的空氣暴露會造成石斑魚血漿中鹼性磷酸酶活性下降，且回到水中 24 hr 後都尚未恢復，並與對照組有顯著差異。空氣暴露誘導頭腎 *hsp60* 基因表現上升，但回到水中 24 hr 後，此誘導效應即結束，反而表現量低於起始值。魚在低溫實驗中，先由 29°C 被降溫到 20°C，再持續降溫至 14°C，在起始、20°C、14°C 及回溫後一天採樣。結果顯示，14°C 的低溫緊迫會使得魚血血糖升高。此外，低溫緊迫誘導頭腎的 *hsp60* 基因表現，且表現一直上升，最高值甚至出現在恢復溫度一天後。因此 熱休克蛋白 HSP60 可作為某些緊迫環境下合適的指標。

關鍵詞：空氣暴露、低溫、石斑、熱休克蛋白

前言

不管是在養殖或網獲過程中，各類的操作、處理經常都會對魚體造成緊迫 (stress)。除了人為操作以外，魚類棲息環境 (如鹽度、溫度、酸鹼值等) 的突然變化，重金屬、化學物質的汙染或疾病的感染也會讓魚體處於緊迫環境下。這些緊迫會促使魚類行為或生理產生相對的反應，以維持體內的平衡狀態，得以持續生存；如果無法及時調適，個體就會走向死亡 (Jobling, 1994)。魚類的緊迫反應，可以分為急性與慢性。在生理學上，急性生理反應又分為一級與二級，一級反應指的是個體面臨急性緊迫時，身體體內兒茶酚胺與皮質醇急速的上升；二級反應指的是在這些神經激素與荷爾蒙刺激下，所產生的各項血液與組織上的轉變，如血糖升高、紅血球數增加、電解質改變等。急性反

應通常會在幾秒至幾分鐘內產生；慢性反應，又稱三級反應，是魚體在持續接受緊迫環境下，免疫、生殖系統及生長等的反應狀態 (Wedemeyer *et al.*, 1990; Jobling, 1994; Wendelaar Bonga, 1997)。

緊迫反應不僅表現在個體與器官層級，也表現在細胞層級上，其中最常用來當為緊迫指標的就是熱休克蛋白 (heat shock proteins, 以下簡稱 HSP) (Basu *et al.*, 2002; Iwama *et al.*, 2004; 董等, 2008; Deane and Woo, 2011)。HSP 在正常的細胞與蛋白質摺疊、組合、分解、傳送有關，在面對緊迫時會被激活，以保護體內這些重要的蛋白質，所以又稱為蛋白質伴侶 (protein chaperone)；此外，研究也發現 HSP 在免疫作用及個體發生過程扮演重要的角色 (Basu *et al.*, 2002; 董等, 2008; Pockley *et al.*, 2008; Tsan and Gao, 2009; Sung *et al.*, 2011; Deane and Woo, 2011)。在脊椎動物，HSP 依其分子量大小，被分為 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、sHSPs (分子量小於 40 kDa)，在魚類，目前這幾種 HSP 都可發現，但仍以 HSP90、HSP70、HSP60 的研究較多 (Roberts *et al.*, 2010;

*通訊作者 / 81143 高雄市楠梓區海專路 142 號; TEL: (07) 361-7141 ext. 3816; E-mail: jmtsai@webmail.nkmu.edu.tw

Deane and Woo, 2011; Sung *et al.*, 2011)。

石斑魚是台灣重要的海水養殖魚類，魚苗的外銷每年為我國帶進很多的外匯收入，成魚的肉質鮮美也成為國人餐宴的常客。因此，有關石斑魚養殖過程中所會遇到的各種緊迫及其反應，都是產、學界相當注重的課題，例如溫、鹽度變化 (Woo and Wu, 1982; Ho *et al.*, 2002; Frisch and Anderson, 2005; 陳等, 2012; Tsui *et al.*, 2012; 施等, 2015)、低溶氧 (Wu and Woo, 1984)、捕撈 (Frisch and Anderson, 2005) 等，這些實驗多半著重在分析各項緊迫對石斑魚內分泌及血液與組織上的影響。最近，一些石斑魚類的 HSP90、HSP70、HSP60 的相關基因已被陸續選殖、定序，但對於其緊迫反應的分析則多半集中在其面對病菌或病毒的反應 (Chen *et al.*, 2010; 曲等, 2011; Cui *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2014; 林, 2015)，較少分析其他緊迫對於魚體的影響。因此，本實驗擬以點帶石斑魚 (*Epinephelus coioides*) 為材料，分析人為操作過程中經常會遇到的空氣暴露以及面臨低溫驟變的緊迫下，石斑魚個體的血液學指標及細胞層級 HSPs 基因表現的反應。

材料與方法

一、離水暴露緊迫實驗

本實驗參考葉等 (1996) 及葉 (2003) 在點帶石斑魚所進行之實驗，模擬魚體麻醉後，暴露於空氣中一段時間，等待檢驗或手術後，再置回水中恢復之情況。之前實驗顯示，以 600 $\mu\text{L/L}$ 較高劑量的 2-PE 來麻醉魚體，所造成的緊迫反應，相對比低劑量的 200 或 400 $\mu\text{L/L}$ 來得小 (Hseu *et al.*, 1996)。由動物福利考慮，所以本實驗麻醉劑劑量為 600 $\mu\text{L/L}$ 。實驗魚共 18 尾，分 3 組，體重 82.8 ± 3.6 g (Mean \pm SEM)，水溫 30 $^{\circ}\text{C}$ ，鹽度 32 psu。分三組取樣：對照組 (A)：將魚體置於 600 $\mu\text{L/L}$ 2-phenoxyethanol (2-PE) 麻醉至完全失去平衡期 (total loss of equilibrium) 後採樣 (Hseu *et al.*, 2005)；麻醉處理組 (M)：如上述麻醉後，以濕布墊底，包住頭部，模擬進行人為檢驗過程，將魚體置於空氣中 12 min 後採樣；恢復組 (R)：如 2 之處理，在置於空氣中 12 min 後之魚體，放

於水中，恢復 1 天後，再麻醉採樣。各組採樣數均為 6。採樣抽血前均先以抗凝血劑 (heparin) 潤濕針筒。採血後，先將全血測血容積比 (hematocrit) ($12,000 \times \text{g}$, 5 min)。餘血離心 ($5000 \times \text{g}$, 15 min)，血漿凍於 -80°C ，待日後分析總蛋白、血糖與鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)。另外，每組取樣肝及頭腎，置於 RNA 保存液 (RNAlater) 中，待日後進行 *hsp60*、*hsp70*、*hsp90* 基因表現之定量分析。

二、低溫緊迫實驗

本實驗參考李等 (2014) 在點帶石斑魚所進行之低溫實驗，模擬魚體由常溫 29 $^{\circ}\text{C}$ 降到 20 $^{\circ}\text{C}$ ，再降到 14 $^{\circ}\text{C}$ ，而後回溫之生理變化情況。實驗魚共 20 尾， 100.4 ± 6.7 g，海水鹽度 31 psu。實驗分四組取樣，每組 5 尾：常溫組 (N)：魚體置於常溫 29 $^{\circ}\text{C}$ ；20 $^{\circ}\text{C}$ 低溫組 (T20)：溫度降至 20 $^{\circ}\text{C}$ (約 2.5 hr) 後一天採樣；14 $^{\circ}\text{C}$ 低溫組 (T14)：溫度由 20 $^{\circ}\text{C}$ 降到 14 $^{\circ}\text{C}$ (約 4 hr) 後一天採樣；回溫組 (R)：關掉降溫設備，開始回溫，24 hr 後取樣。各組採樣數為 5。麻醉、採樣抽血方法如上。

三、血液學指標分析

血漿中蛋白質是以蛋白質折射器直接測定；血糖與鹼性磷酸酶均以商用套組測定。血糖的測試套組混合液中含有葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase)、過氧化酶 (peroxiase) 及 4-aminophenazone，樣本與混合液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養 10 min 後會生成 quinoneimine，再於分光光度計波長 500 nm 下測定 (Randox, U.K.)。鹼性磷酸酶則利用 *p*-nitrophenylphosphate 當受質，在波長 405 nm 下測定 *p*-nitrophenol 的生成，酵素活性單位同樣為 U/L (Randox, U.K.)。

四、即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)

點帶石斑魚 *hsp60* (KM89816) 與 *hsp70* (F1600726) 的 real-time PCR 引子 (primer)，分別依其 cDNA 序列設計；*hsp90* 引子則採用 Chen *et*

Table 1 The sequence of synthetic oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence
P175_qEcHsp60_F	5'- CAG GCT CAC GAC TTC GGT AAG -3'
P176_qEcHsp60_R	5'- AGC AGC GTG TCG TCT TTG GT -3'
P180_qEcHsp70_F	5'- CGT CCC TGA TTA AAC GCA ACA -3'
P181_qEcHsp70_R	5'- GGA CCC CAG GCT GGT TGT -3'
P186_HSP90-QRT-F*	5'- TGT CCA ACA GAC TGG TTT CC -3'
P187_HSP90-QRT-R*	5'- ATT CTG TAG ATG CGG TTG GA -3'
EF-1 α _F#	5'-GATGGGCAAGGGCTCCTT-3'
EF-1 α _R#	5'-CGCTCGGCCTTCAGTTTGT-3'

The primer pairs follow *(Chen *et al.*, 2010) and #(Yeh *et al.*, 2012)

al. (2010) 所設計之 *hsp90AB* 引子。所使用內部控制基因為 elongation factor-1 α (*EF-1 α*)，採用 Yeh *et al.* (2012) 所設計之引子 (Table 1)。由於肝是體內新陳代謝較為重要的器官，而頭腎則與魚體免疫抗病力有較大的關連，因此本實驗 *hsp* 基因表現之變化取兩組織作為分析。

為避免抽取組織 RNA 過程受到 DNA 碎片污染，影響 real-time PCR 數據讀值，故進行 mRNA 的反轉錄之前先進行 DNase 處理。處理完後之樣本即進行反轉錄，反轉錄所得之 cDNA 再於 real-time PCR 定量分析儀器 (ABI Step one) 進行即時定量分析。所有樣本在冰上操作，分別加入下列所有反應試劑至 PCR 96 孔盤中，2X SYBR Green 10 μ l、dd H₂O 7 μ l、primer F (10 μ M) 1 μ l、primer R (10 μ M) 1 μ l、cDNA 1 μ l，在孔盤上密封光學封膜，確保樣品不揮發。以下為 real-time PCR 反應所設定參數：95 $^{\circ}$ C 10 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 15 sec \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 1 min (共 40 個循環)。

反應結束後所得之即時聚合酶鏈鎖反應數據以 StepOne™系統(AB)軟體分析。所得數據以 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} Method 方式做相對定量分析(Livak and Schmittgen, 2001)。

五、統計

各組差異均以單維變方分析檢測各組間是否有差異，若達顯著水準 ($P < 0.05$)，則再以特奇氏公正顯著差異法 (Tukey's honestly significant difference test, HSD) 加以檢定 (Zar, 1999)。

結 果

一、離水暴露緊迫實驗

魚體麻醉至完全失去平衡期約需 139.4 ± 5.1 sec。經過 12 min 的空氣暴露，本實驗之石斑魚均未死亡，置回水中後，很快即甦醒。暴露組 (M) 的血容積比與血漿總蛋白略高於對照組 (A) 與恢復組 (R)；而在血糖方面，則是暴露組與恢復組相近，高於對照組，但都未達顯著差異。鹼性磷酸酶則是對照組最高，暴露組與恢復組逐漸降低，恢復組與對照組差異達顯著水準 ($P < 0.05$) (Fig. 1)。

本研究中，面對人為操作的緊迫時，暴露組中，魚體肝中的 *hsp60* 基因表現被誘導升高，一直到恢復階段，仍持續上升，但各組差異未達顯著水平 ($P = 0.14$)；在頭腎中，*hsp60* 基因表現同樣被空氣暴露誘導上升，但在恢復期時下降，各組間差異達顯著差異水平 ($P < 0.05$)，至於 *hsp70* 與 *hsp90* 的基因表現則並未被離水暴露的緊迫所誘導，在兩組織中的三個處理組數據未有顯著差異 (Fig. 2)。

二、低溫緊迫實驗

點帶石斑魚面對急速低溫緊迫下，血液學指數顯示如 Fig. 3。實驗顯示，對照組與降溫至 20 $^{\circ}$ C 及 14 $^{\circ}$ C 及回溫組的血容積比及血清總蛋白值沒有顯著差異。在血糖方面，20 $^{\circ}$ C 的血糖與對照組相近，但在極低溫的 14 $^{\circ}$ C 一天後，血糖飆高，至恢復組仍高於對照組，但僅 14 $^{\circ}$ C 組與對照組有顯

著差異 ($P < 0.05$)。鹼性磷酸酶在各組之間則未出現顯著差異。

在本實驗中，肝中各 *hsps* 在各組間基因表現之差異並未達顯著差異。但在頭腎中，*hsp60* 基因

表現則是隨著所處溫度下降而下降，在恢復期時到達最低，各組間差異達顯著差異水平 ($P < 0.05$)，至於 *hsp70*、*hsp90* 的基因表現在兩組織中並未被低溫緊迫所誘導 (Fig. 4)。

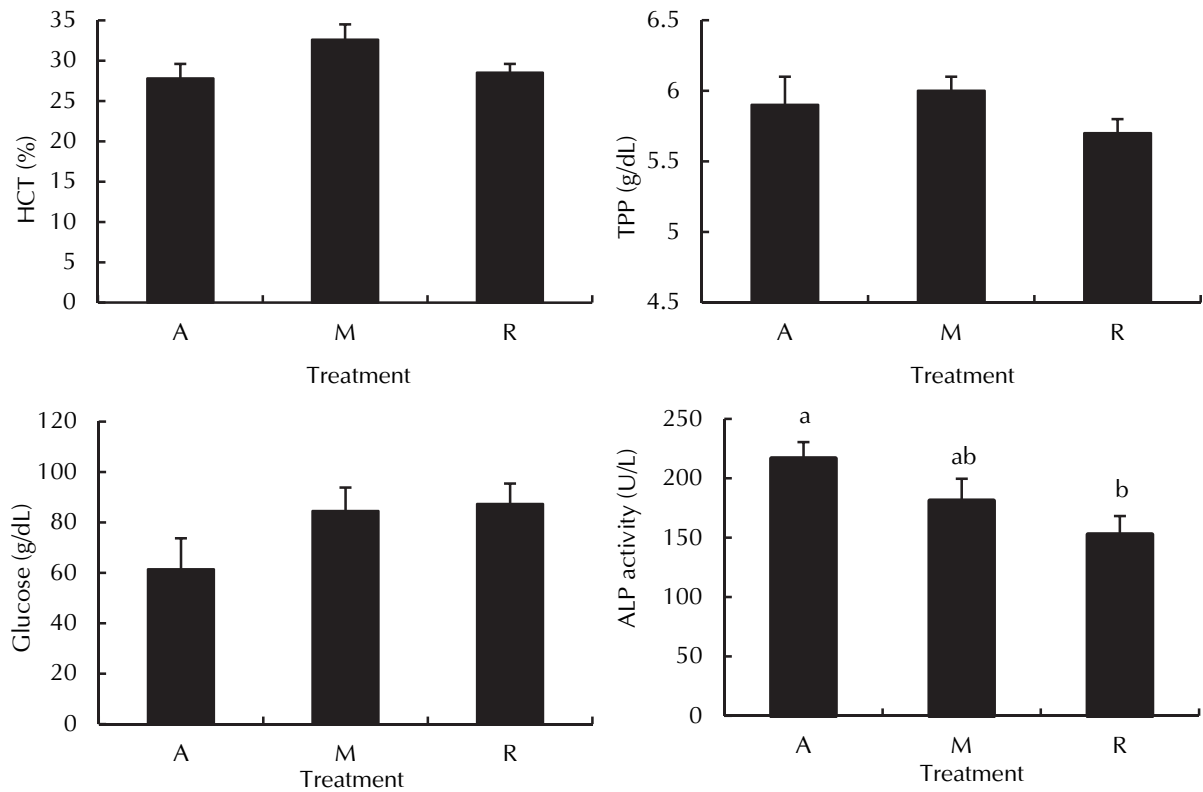


Fig. 1 Hematocrit (Hct), concentration of total plasma protein (TPP) and glucose, and enzyme activity of alkaline phosphatase (ALP) in the plasma of grouper, $n = 5-6$. A: sampling after anesthesia; M: sampling after anesthesia and exposure on air for 12 minutes; R: sampling after 1 day of recovery from treatment M. Different superscripts indicate significant difference (One-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test (HSD) test, $P < 0.05$).

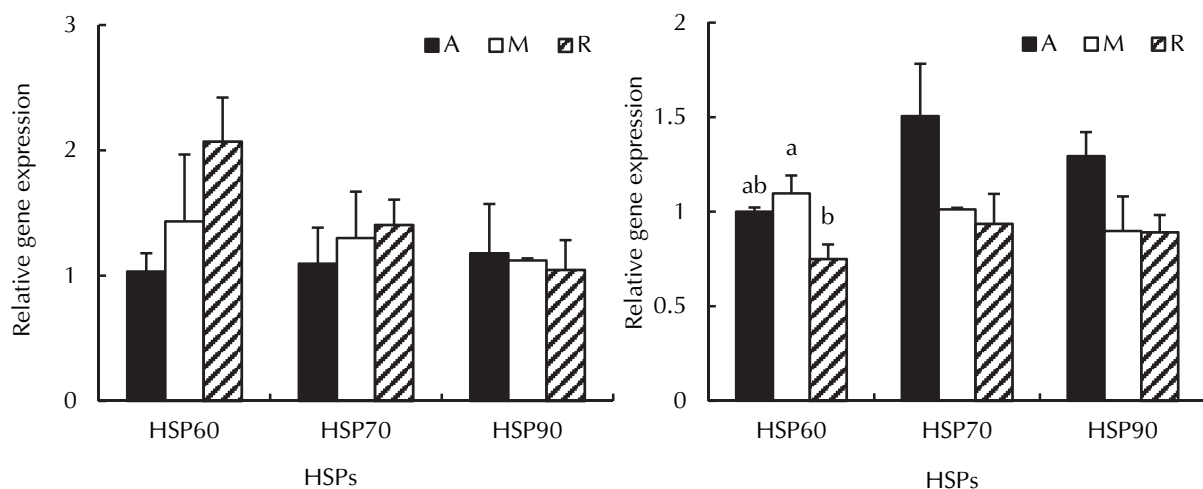


Fig. 2 Relative gene expression of HSP60, HSP70, and HSP90 to EF-1α in liver (upper) and head kidney (below) of the grouper under the above treatment (A: control, M: air exposure, R: recovery). Different superscripts indicate significant difference (One-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test (HSD) test, $P < 0.05$).

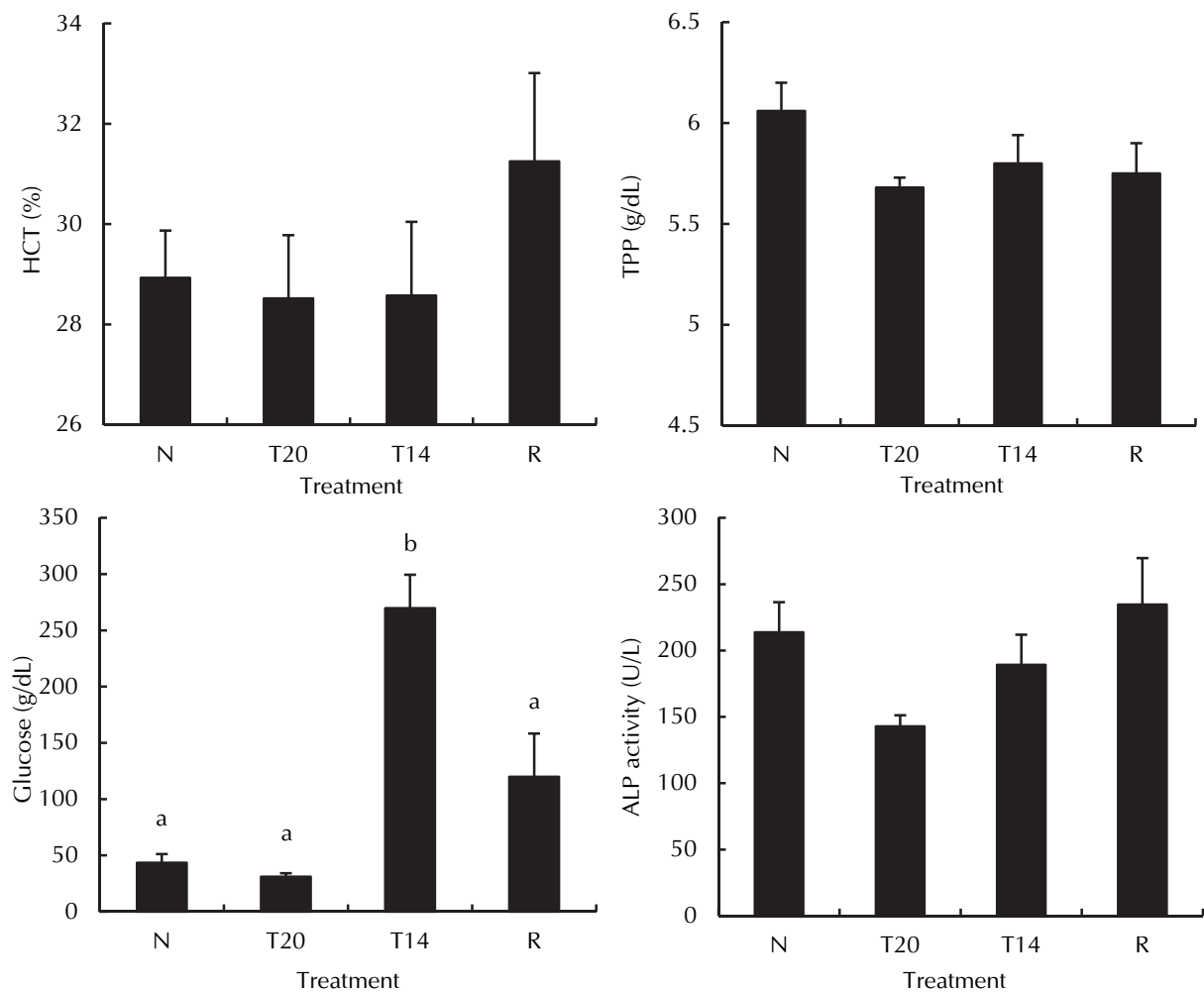


Fig. 3 Hematocrit (Hct), concentration of total plasma protein (TPP) and glucose, and enzyme activity of ALP in the plasma of grouper in different temperatures of sea water, $n = 4-5$. N: sampling at room temperature; T20: sampling at 20°C; T14: sampling at 14°C; R: sampling at 24 hours after recovery in room temperature. Different superscripts indicate significant difference (One-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test (HSD) test, $P < 0.05$).

討 論

人為的操作，例如健檢、手術、性腺成熟度檢驗都會讓魚體暴露在空氣中。在操作過程中，基於人道考量與操作方便，我們多半會將魚體麻醉至適當狀態才開始操作 (Hseu *et al.*, 2005; Karlsson *et al.*, 2012; Moosavi *et al.*, 2015)。葉等 (1996) 的模擬人為操作實驗中，4.3 cm 的點帶石斑魚以 400 $\mu\text{L/L}$ 2-PE 麻醉 2 min 後置於濕毛巾上，曝露於空氣中 15 min 後開始死亡；葉 (2003) 則是將成魚以 400~800 $\mu\text{L/L}$ 2-PE 麻醉至完全失去平衡期後，離水 25 min 後尚可存活。由於本實驗魚體大小介於兩實驗組之間，所以曝露時間取為 12 min，麻醉

劑劑量與曝露時間並未造成本實驗之石斑魚死亡。在葉 (2003) 的實驗中，較大的成魚以 800 $\mu\text{L/L}$ 2-PE 麻醉後，再曝露於空氣中 15 min，血糖與血漿總蛋白都會顯著高於對照組；若以 600 $\mu\text{L/L}$ 2-PE 麻醉後，曝露於空氣中 15 min，則只有血漿總蛋白會顯著高於對照組。曝露於空氣中對於魚體就是一種緊迫，基本上血球總量會升高，以便輸送氧氣，血糖也會上升，以供能量需求 (Hseu *et al.*, 2005; Karlsson *et al.*, 2012; Moosavi *et al.*, 2015)。但在本曝露實驗中，或許曝露時間不夠長，石斑在氧氣輸送 (血容積比) 與能量代謝 (蛋白質與血糖) 尚未產生明顯的緊迫效應。本實驗中，對照組的鹼性磷酸酶活性最高，且與恢復組出現顯著差

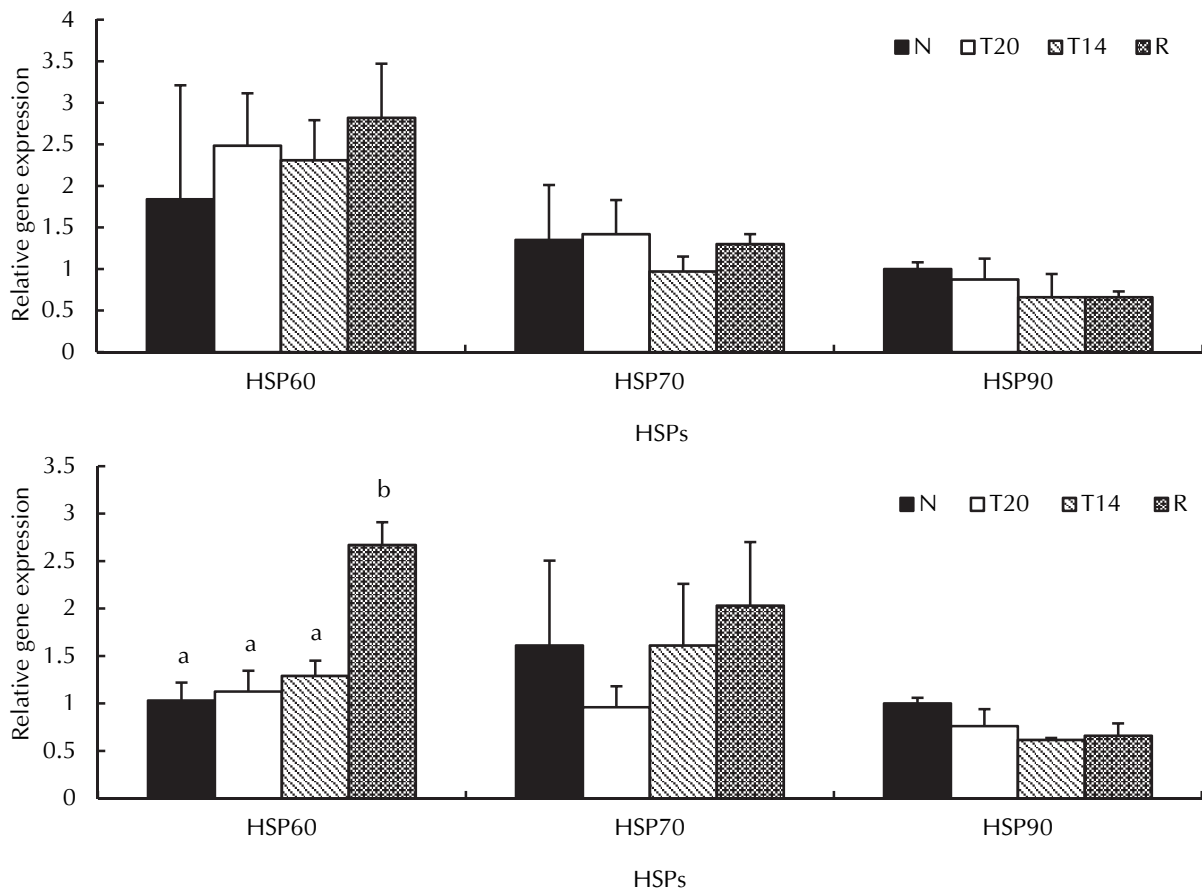


Fig. 4 Relative gene expression of HSP60, HSP70, and HSP90 to EF-1 α in liver (upper) and head kidney (below) of the grouper under temperature treatment (N: normal, T20: 20 °C, T14: 14 °C, and R: Recovery). Different superscripts indicate significant difference (One-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test (HSD) test, $P < 0.05$).

異 ($P < 0.05$)，顯示其酵素活性因空氣暴露的緊迫而下降。鹼性磷酸酶是一種重要的水解酶，不僅直接參與磷酸根的轉移與鈣、磷代謝，也與個體的免疫機能及存活有關（冀等，2009; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2010; 施等, 2015），在測量水生生物先天性免疫 (innate immunity) 機能時，組織或血漿中的鹼性磷酸酶活性也是被測定的指標之一 (Subramanian *et al.*, 2007; Hooper *et al.*, 2007)。由此看來，12 min 的空氣暴露對石斑魚的鈣、磷代謝與免疫力可能會略有影響，鹼性磷酸酶是否會持續下降？而暴露組的鹼性磷酸酶的活性下降與頭腎中 *hsp60* 基因表現上升與魚體免疫活性變動的關連為何？這皆有待進一步的研究。

對於不同體型的點帶石斑魚而言，10 ~ 14 °C 的低溫已是會造成死亡的重度寒害指標 (李等, 2014)。本實驗中，面對 20 °C 低溫下，石斑魚的

血液指標還沒有顯著變化；但在極低溫的 14 °C 一天後，該組的血糖飆高 ($P < 0.05$)，即使回溫組一天後仍高於對照組。此顯示點帶石斑魚處於其低溫極限時，肝糖會分解，產生血糖，以便魚體利用以耐過低溫緊迫。在七帶石斑魚 (*Epinephelus septemfasciatus*)，長期低溫緊迫 (10 天) 也會使得魚體的血糖上升 (陳等, 2012)。此種血糖上升的情形不僅在急速低溫緊迫下會出現，在急速高溫 (38 °C) 緊迫下也會產生 (Ho *et al.*, 2002)。雲紋石斑魚 (*E. moara*) 由 17 °C 突然改置 9 °C 低溫後 3~7 天，鹼性磷酸酶活性會持續上升 (施等, 2015)；但大黃魚 (*Pseudosciaena crocea*) 由 20 °C 以 1 °C/h 的速度降至 8.5 °C 一天半後，鹼性磷酸酶活性卻持續下降 (冀等, 2009)。本實驗石斑魚的鹼性磷酸酶活性沒有顯著變動，或許與緊迫溫度及持續時間有關。

在魚、蝦類面對不同緊迫種類或強度時，不同類型的 *hsp* 基因會被誘發，以便保護體內的蛋白質 (Basu *et al.*, 2002; Sung *et al.*, 2011)。熱休克蛋白通常可分基本表現型 (constitutive) 與誘導型 (inducible)，前者基因表現在正常細胞即可偵測，在緊迫下被誘導表現的情形通常較小；後者在緊迫下，被誘導表現較為明顯 (Deane and Woo, 2011)。本研究中，所使用的點帶石斑魚 *hsp70* 是誘導型的序列 (Cui *et al.*, 2011)；*hsp90* 則是基本表現型 (*hsp90AB*) (Chen *et al.*, 2010)。*hsp60* 目前尚未被發現有分誘導或基本表現兩型 (Sung *et al.*, 2011; Deane and Woo, 2011)，現今在石斑魚體內發現的 *hsp60* 也都只有一型 (曲等, 2011; 林, 2015)。本研究顯示，不論在面對空氣暴露或急速低溫造成的緊迫時，只有 *hsp60* 基因表現有被誘導上升，其中又以頭腎最為顯著。基本上，HSP60 在真核動物細胞中，是存在於粒線體內，它會與胞內很多蛋白質結合、作用 (Roberts *et al.*, 2010)。HSP60 除了參與傳統的 HSP 作用外，目前也被發現與免疫系統有密切的關係 (Roberts *et al.*, 2010; Sung *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011; 曲等, 2011)。曲等 (2011) 發現，當赤點石斑 (*Epinephelus akaara*) 被哈維氏弧菌 (*Vibrio harveri*) 攻毒後，*hsp60* 基因表現也會被誘發，其中表現最強的組織是肝。Xu *et al.* (2011) 也發現，當草魚 (*Ctenopharyngodon idella*) 被親水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 攻毒後，包括肝及頭腎等免疫器官的 *hsp60* 基因表現會被誘發。點帶石斑面對這兩種緊迫時，頭腎中 *hsp60* 基因表現的升高也讓我們不能排除其在後續免疫作用中可能有扮演某種角色。

點帶石斑其他兩個 *hsps* 在這兩種緊迫環境下，基因表現未見有顯著變化。點帶石斑魚在面對病菌感染或高溫時，包括腎臟及頭腎等組織內的 *hsp70* 的基因會被誘導 (Cui *et al.*, 2011)；Yokoyama *et al.* (2006) 也發現，在低溫下，點帶石斑魚鰓中的 HSP70 蛋白質表現較高會有助於魚體存活。我們使用的點帶石斑 *hsp90* 基因雖然是基本表現型 (*hsp90AB*)，但實驗顯示，它的基因表現可以被病毒 (Chen *et al.*, 2010) 或急速低鹽緊迫誘導 (許等, 2016)。但在許等 (2016) 的急速低鹽緊迫實驗中，*hsp60* 與 *hsp70* 的基因表現卻沒有顯著變化。這或許顯示，不同種類的 HSPs 在面對不同的緊迫

時，可能會有不同的表現，或者彼此合作，以保護細胞內的重要蛋白質的功能 (Basu *et al.*, 2002; Iwama *et al.*, 2004; 董等, 2008; Roberts *et al.*, 2010; Sung *et al.*, 2011)。

本研究顯示，空氣暴露或急速低溫變化這兩種緊迫都可能會對點帶石斑魚的 *hsps* 基因表現變化與血液指標產生影響，而這些生理反應的變化都有作為緊迫指標的功用。這些生理與分子指標彼此間的關係或許還待進一步的研究加以釐清。Basu *et al.* (2002) 及 Sung *et al.* (2011) 都認為如果先讓魚類經歷較為不致命的緊迫，誘發 HSPs 的產生，將有助於魚體在面對疾病或其他較為致命的緊迫時，有較高的存活率。事實上，最近的研究也顯示 HSPs 參與了石斑魚面對病毒攻擊的免疫作用 (Chen *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2014)，因此這種保護方式或許也是可以考慮使用的方法，以助漁民降低病毒或病菌對石斑魚養殖的損傷。

參考文獻

- 曲曠, 施曉峰, 張之文, 丁少雄 (2011) 赤點石斑魚 HSP60 基因克隆及弧菌應激前後的組織表達特性分析. 海洋學報, 33(1): 111-120.
- 李春梅, 林黑著, 劉錦鸞, 王賓, 黃忠, 翟志宏 (2014) 海水養殖與氣象 I-石斑魚低溫寒害指標試驗研究. 中國氣象通報, 30(8): 42-46.
- 林冠宏 (2015) 點帶石斑熱休克蛋白 60 基因選殖及特性分析. 國立高雄海洋科技大學碩士論文, 高雄, 70 pp.
- 施兆鴻, 張艷亮, 高權新, 彭士明, 張晨捷 (2015) 雲紋石斑幼魚血清生化指標對低溫脅迫的響應. 生態學雜誌, 34(8): 2222-2228.
- 許晉榮, 林冠宏, 蔡志明 (2016) 低鹽緊迫對點帶石斑熱休克蛋白基因表現的影響. 臺灣水產學會 104 年度論文發表會摘要, 屏東, 臺灣, GP-2.
- 陳超, 施兆鴻, 薛寶貴, 王魯, 李炎璐, 吳雷明, 曲江波, 馬愛軍 (2012) 低溫脅迫對七帶石斑魚幼魚血清生化指標的影響. 水產學報, 36(8): 1249-1255.
- 葉信利 (2003) 誘導石斑魚性轉變之研究. 國立台灣海洋大學博士論文, 基隆, 194 pp.
- 葉信利, 許晉榮, 朱永桐, 丁雲源 (1996) 2-Phenoxyethanol 對點帶石斑苗之麻醉. 水產研究, 4(1): 55-61.
- 董雲偉, 董雙林, 紀婷婷 (2008) 水生生物熱休克蛋白研究進展. 中國海洋大學學報, 38(1): 39-44.

- 冀德偉, 李明雲, 王天柱, 張呈念, 徐鎮, 徐萬士 (2009) 不同低溫脅迫時間對大黃魚血清生化指標的影響. 水產科學, 28(1): 1-4.
- Basu, N., A. E. Todgham, P. A. Ackerman, M. R. Bibeau, K. Nakano, P. M. Schulte and G. K. Iwama (2002) Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295: 173-183.
- Chen, Y. M., T. Y. Wang and T. Y. Chen (2014) Immunity to betanodavirus infections of marine fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 43: 174-183.
- Chen, Y. M., C. E. Kuo, T. Y. Wang, P. S. Shie, W. C. Wang, S. L. Huang, T. J. Tsai, P. P. Chen, J. C. Chen and T. Y. Chen (2010) Cloning an orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* heat shock protein 90AB (HSP90AB) and characterization of its expression in response to nodavirus. *Fish. Shellfish Immunol.*, 28: 895-904.
- Cui, M., Q. Z. Zhang, Z. J. Yao and Z. H. Zhang (2011) Molecular cloning and expression analysis of heat-shock protein 70 in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* following heat shock and *Vibrio alginolyticus* challenge. *J. Fish Biol.*, 79: 486-501.
- Deane, E. E. and N. Y. S. Woo (2011) Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 21: 153-183.
- Frisch, A. and T. Anderson (2005) Physiological stress responses of two coral trout (*Plectropomus leopardus* and *Plectropomus maculatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 140A: 317-327.
- Ho, P. Y., C. H. Kuo, C. M. Kuo and Y. N. Chen (2002) Physiological responses of spotted grouper juveniles, *Epinephelus coioides* under acute thermal shock. *J. Fish Soc. Taiwan*, 29: 275-285.
- Hooper, C., R. Day, R. Slocombe, J. Handlinger and K. Benkendorff (2007) Stress and immune response in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol.*, 22: 363-379.
- Hseu, J. R., S. L. Yeh, Y. T. Chu and Y. Y. Ting (1996) Influence of the anesthetic, 2-phenoxyethanol, on hematological parameters of black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *J. Taiwan Fish. Res.*, 4(2): 127-132.
- Hseu, J. R., Y. T. Chu, S. L. Yeh, and Y. Y. Ting (2005) Prior anesthesia with 2-phenoxyethanol can not reduce stress response of black porgy to air exposure? *J. Fish. Soc. Taiwan*, 32: 187-191.
- Iwama, G. K., L. O. B. Afonso, A. Todgham, P. Ackerman and K. Nakano (2004) Are hsp's suitable for indicating stresses states in fish? *J. Exp. Biol.*, 207: 15-19.
- Jobling, M. (1994) Environmental stressors. In: *Fish Bioenergetics*. Chapman & Hall, London, 285-290.
- Karlsson, A., B. O. Rosseland, J. C. Massabuau and A. Kiessling (2012) Pre-anaesthetic metomidate sedation delays the stress response after caudal artery cannulation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiol. Biochem.*, 38: 401-411.
- Lai, X. Y., B. L. Jin, Y. Xu, L. J. Huang, R. Q. Huang, Y. Zhang, J. Kwang, J. G. He and J. F. Xie (2014) Immune responses of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, against virus-like particles of betanodavirus produced in *Escherichia coli*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 157: 87-96.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402-408.
- Moosavi, M. J., M. M. Salahi Ardekani, A. Pirbeigi and S. Ghazi (2015) The effect of exposure duration to optimal concentration of 2-phenoxyethanol on primary and secondary stress responses in kutum (*Rutilus frisii kutum*). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 99: 661-667.
- Pockley, A. G., M. Muthana and S. K. Calderwood (2008) The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trend. Biochem. Sci.*, 33: 71-79.
- Roberts, R. J., C. Agius, C. Saliba, P. Bossier and Y. T. Sung (2010) Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *J. Fish Dis.*, 33: 789-801.
- Ruttanapornvareesakul, Y., Y. Sakakura and A. Hagiwara (2010) Screening of enzyme activity for assessing the condition of larvae in the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* and devil stinger *Inimicus japonicus*. *Fish Sci.*, 76: 295-304.
- Subramanian, S., S. L. MacKinnon and N. W. Ross (2007) A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 148B: 256-263.
- Sung, Y. Y., T. H. MacRae, P. Sorgeloos and P. Bossier (2011) Stress response for disease control in aquaculture. *Rev. Aquacult.*, 3: 120-137.
- Tsan, M. F. and B. Gao (2009) Heat shock proteins and immune system. *J. Leukoc. Biol.*, 85: 905-910.
- Tsui, W. C., J. C. Chen and S. Y. Cheng (2012) The effects of a sudden salinity changes on cortisol, glucose, lactate, and osmolarity levels in grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 38: 1323-1329.

- Wedemeyer, G. A., B. A. Barton and D. J. McLeay (1990) Stress and acclimation. In: Methods for Fish Biology (ed. by Schreck, C. B. and P. B. Moyle). Amer. Fish. Soc., Bethesda, M.A., USA, 451-489.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997) The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77(3): 592-625.
- Woo, N. Y. S. and R. S. S. Wu (1982) Metabolic and osmoregulatory changes in response to reduced salinities in the red grouper, *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel), and the black sea bream *Mylio macrocephalus* (Basilewsky). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 65: 139-161.
- Wu, R. S. S. and N. Y. S. Woo (1984) Respiratory responses and tolerance to hypoxia in two marine teleosts, *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel), and the black sea bream *Mylio macrocephalus* (Basilewsky). *Hydrobiologia*, 119: 209-217.
- Xu, X. Y., Y. B. Shen, J. J. Fu, F. Liu, S. Z. Guo, X. M. Yang and J. L. Li (2011) Molecular cloning, characterization and expression patterns of HSP60 in the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.*, 31: 864-870.
- Yeh, Y. C., C. W. Lee, Y. W. Pan, Y. J. Hsu, H. Y. Hung, Y. M. Chen, H. Y. Lin, T. Y. Chen, H. L. Yang and H. C. Wang (2012) Identification and characterization of DSCAM isoforms isolated from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Dev. Comp. Immunol.*, 38: 148-159.
- Yokoyama, S., S. Koshio, N. Takakuru, K. Oshida, M. Ishikawa, F. J. Gallardo-Cigarroa, M. R. Catacutan and S. Tshima (2006) Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low temperature stress conditions in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 255: 507-513.
- Zar, J. H. (1999) Multiple comparison. In: *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall International, Inc. Upper Saddle River, NJ, USA, 208-230.

Effects of Air Exposure and Low Temperature on Hematological Parameters and Gene Expressions of Three Heat Shock Proteins in Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*

Jinn-Rong Hseu¹, Guan-Horog Lin² and Jyh-Ming Tsai^{2*}

¹ Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

² Department of Marine Biotechnology, National Kaohsiung Marine University

ABSTRACT

We investigated the effects of air exposure and low temperature on the hematological parameters and gene expressions of heat shock proteins (HSP60, HSP70, and HSP90) in the liver and head kidney of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Air exposure for 12 minutes resulted in a decrease of alkaline phosphatase activity in plasma, which was not recovered after 24 hours after putting back into water and was significantly different from that in the control group. Air exposure induced an increase in *hsp60* gene expression in the head kidney. However, this induction effect stopped after 24 hours back into water and the level of expression was lower than the initial value. In the low temperature experiment, the temperature was reduced from 29°C to 20°C and then to 14°C. The fish were sampled at the initial temperature, 20°C, 14°C, and one day after the temperature returned to normal. The results showed that low temperature (14°C) increased plasma glucose concentration. The gene expression of *hsp60* in the head kidney was induced by low temperature and continuously increased, reaching a peak after one day of normal temperature. It is suggested that gene expression of *hsp60* could be an indicator for stress.

Key words: air exposure, low temperature, grouper, heat shock protein

*Correspondence: Department of Marine Biotechnology, National Kaohsiung Marine University; TEL: (07) 361-7141 ext. 3816; E-mail: jmtsai@webmail.nkmu.edu.tw