

MAPKs 信号通路抑制剂对红耳龟渗透压调节基因表达的影响

卢英楠, 袁悦, 孔雨晨, 吉欣宇, 史海涛, 洪美玲, 丁利*

(热带岛屿生态学教育部重点实验室, 海南省热带动植物生态学重点实验室, 海口 571158)

摘要: 为了解丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号通路对盐度耐受下红耳龟 *Trachemys scripta elegans* 渗透压相关调节基因的影响, 本研究应用 JNK、ERK、p38MAPK 抑制剂处理红耳龟后, 置于淡水及 5‰ 盐度水环境中 24 h 后取肾脏组织, 应用实时荧光定量 PCR 方法检测渗透压调节相关基因的 mRNA 相对表达量。结果表明, 盐度环境下红耳龟肾脏中水通道蛋白 3(AQP3)、热休克蛋白 70(HSP70)、醛糖还原酶(AR)、糖皮质激素诱导蛋白激酶(SGK1)、肌醇转运蛋白(SMIT)的 mRNA 相对表达量显著升高, 与淡水组差异显著 ($P < 0.05$)。不同浓度的 JNK、ERK、p38MAPK 抑制剂均能下调 HSP70、AR 的 mRNA 相对表达量, 与未用抑制剂处理的 5‰ 盐度组相比, 差异显著 ($P < 0.05$); 此外, ERK、p38MAPK 抑制剂显著降低了 AQP3 mRNA 相对表达量 ($P < 0.05$), JNK、p38MAPK 抑制剂显著降低了 SMIT mRNA 相对表达量 ($P < 0.05$); SGK1 mRNA 相对表达量随 p38MAPK 抑制剂浓度的增加呈下降趋势, 且在高浓度 ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 下的表达量最低 ($P < 0.05$)。研究结果表明, 红耳龟在适应半咸水过程中, MAPKs 信号通路对渗透压有一定的调节作用。

关键词: 入侵物种; 渗透压调节; 盐度耐受; MAPK 信号通路; 抑制剂

中图分类号: Q959.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7083(2022)02-0154-08

Effect of MAPKs Signaling Pathway Inhibitors on the Expression of Osmotic Pressure Regulation-Related Genes in *Trachemys scripta elegans*

LU Yingnan, YUAN Yue, KONG Yuchen, JI Xinyu, SHI Haitao, HONG Meiling, DING Li*

(Key Laboratory of Tropical Island Ecology, Ministry of Education, Hainan Key Laboratory of Tropical Animal and Plant Ecology, Haikou 571158, China)

Abstract: In order to understand the effect of MAPKs signaling pathway on osmotic pressure regulation-related genes in saline-tolerant red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*), three inhibitors (JNK, ERK and p38MAPK) were applied, and then the red-eared sliders were placed in freshwater and salinity water (5‰). After 24 h, the kidney tissue was extracted. The mRNA relative expression levels of osmotic pressure regulation-related genes were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that compared to the freshwater group, the mRNA relative expression levels of AQP3, HSP70, AR, SGK1 and SMIT in red-eared sliders in salinity water were significantly increased ($P < 0.05$). By contrast, the presence of JNK, ERK and p38MAPK inhibitors significantly decreased the expression of HSP70 and AR ($P < 0.05$). In addition, both ERK and p38MAPK inhibitors could significantly reduce the expression of AQP3 ($P < 0.05$). JNK and p38MAPK inhibitors significantly decreased the expression of SMIT ($P < 0.05$). The relative expression level of SGK1 mRNA decreased with the increasing concentration of p38MAPK inhibitor and reached the lowest at the concentration

收稿日期: 2021-08-02 接受日期: 2022-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960226)

作者简介: 卢英楠(1996—), 女, 研究生, 主要从事动物生理生态学研究, E-mail: luyingnan202107@163.com

* 通信作者 Corresponding author, E-mail: dingli@hainnu.edu.cn

of $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. This study suggests that MAPKs signaling pathway can regulate osmotic pressure of *T. s. elegans* in adapting to brackish water.

Keywords: invasive species; osmotic pressure regulation; salinity tolerance; MAPKs signaling pathway; inhibitors

红耳龟 *Trachemys scripta elegans* 自 20 世纪 80 年代引入我国以来,对本地龟类的生存与繁殖造成了严重的威胁(Kai & Shi 2017)。该物种原生活在湖泊、沼泽、池塘、小溪等植被丰富的淡水环境中(Swingland & Gibbons, 1991),但国内外研究发现红耳龟还可在咸水环境中生存(Morin, 1990)。杨江波(2014)野外调查发现,红耳龟可在海南南渡江(盐度 $5.3\% \sim 14.6\%$)的半咸水环境中生存,幼体也可在半咸水附近的沙滩孵出;室内模拟实验也表明,红耳龟在盐度低于 15% 的水环境中可存活 3 个月以上(Hong *et al.* 2014);环境中盐度的改变可显著影响动物渗透压调节(Brocker *et al.*, 2012),红耳龟可通过离子和非离子的转运进行渗透压调节以应对环境盐度的增加(Hong *et al.*, 2014),但红耳龟适应盐度环境的渗透压调节机制尚不清楚。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)及其亚家族信号通路在动物应对高渗胁迫渗透压调节过程中发挥重要作用(Cakir & Ballinger, 2005; Raja *et al.*, 2017)。MAPKs 由 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun NH₂-terminal kinase, JNK)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular-regulated kinase, ERK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK) 3 类蛋白激酶组成,可通过磷酸化将上游信号传递至下游应答分子,通过级联反应直接或者间接进行盐度胁迫下的渗透压调节(Cakir & Ballinger, 2005; Raja *et al.*, 2017)。目前,关于 MAPKs 信号通路在动物响应盐度应激中的研究集中在鱼类、两栖动物和哺乳动物,如将高渗溶液作用于日本鳗鲡 *Anguilla japonica* 鳃原代细胞(Chow & Wong 2011)、底鳉 *Fundulus heteroclitus* 鳃上皮细胞(Kültz & Avila 2001)后, JNK、ERK 和 p38MAPK 活性均显著升高;对湖蛙 *Rana ridibunda* 心脏灌注

过量 NaCl 溶液, p38MAPK 活化,而低渗溶液刺激后 p38MAPK 变化不明显,说明 p38MAPK 在高渗调节中起重要作用(Aggeli *et al.* 2002)。也有研究表明, MAPKs 信号通路在高渗条件下主要通过激活下游渗透压保护基因,如:糖皮质激素诱导蛋白激酶(SGK1)(Bell *et al.*, 2000)、热休克蛋白 70(HSP70)(Kim 2006)、肌醇转运蛋白(SMIT)(Bissonnette *et al.*, 2008)、醛糖还原酶(AR)(Winges *et al.* 2016)、水通道蛋白 3(AQP3)(Lei *et al.* 2017)等的高表达来发挥作用,以抵抗高渗带来的不利影响,在维持细胞稳态中发挥重要作用。

目前关于 MAPKs 信号通路是否参与龟类的渗透压调节以及是否对渗透压调节基因产生影响等尚不清楚。本研究将 3 种抑制剂(JNK、ERK、p38MAPK)作用于红耳龟,并对其进行盐度胁迫处理,探究 MAPKs 抑制剂对渗透压调节相关基因 mRNA 转录水平的影响,以期了解红耳龟在适应半咸水过程中 MAPKs 信号通路对渗透压的调节作用。

1 材料和方法

1.1 试验动物和饲养条件

红耳龟购自海口泓旺农业养殖有限公司。试验在海南师范大学生命科学学院龟鳖养殖室进行。试验前,将体型较统一、活力好、健康的幼龄个体(体质量 $120.37 \text{ g} \pm 10.25 \text{ g}$)驯养 2 周以适应养殖室环境。驯养期间 1 周喂食 2 次,并于喂食后 24 h 更换养殖水体,养殖水体 pH 7.45 ± 0.26 ,溶解氧含量 $8.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \pm 0.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。驯养结束后,分为淡水组(对照组)、淡水 + MAPKs 抑制剂(不同浓度)组、 5% 盐度组、 5% 盐度 + MAPKs 抑制剂(不同浓度)组,每组 8 只,组间体质量无显著性差异,试验期间停止喂食。

1.2 主要试剂

JNK 抑制剂 (SP600125) (货号: S1876)、MEK1/2 抑制剂(U0126) (货号: S1901)、p38MAPK 抑制剂(SB203580) (货号: S1863)、二甲基亚砷(DMSO) (货号: ST038) 均购自上海碧云天生物技术有限公司。Genious 2 × SYBR Green Fast qPCR Mix(货号: RK21204) 购自 ABclonal Technology Co., Ltd.。PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(RR047A) 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 JNK 抑制剂(SP600125) 处理 将红耳龟随机分为 8 组,每组 8 只:淡水组、淡水 + JNK 抑制剂组(SP600125 浓度: 5 mg · kg⁻¹、15 mg · kg⁻¹、25 mg · kg⁻¹)、5‰盐度组、5‰盐度 + JNK 抑制剂组(SP600125 浓度: 5 mg · kg⁻¹、15 mg · kg⁻¹、25 mg · kg⁻¹)。SP600125 使用 DMSO 溶解后腹腔注射,同时给淡水组和 5‰盐度组的腹腔注射相同体积(0.2 mL)的 DMSO。

1.3.2 MEK1/2 抑制剂(U0126) 处理 将红耳龟随机分为 8 组,每组 8 只:淡水组、淡水 + MEK1/2 抑制剂组(U0126 浓度: 1 mg · kg⁻¹、5 mg · kg⁻¹、10 mg · kg⁻¹)、5‰盐度组、5‰盐度 + MEK1/2 抑制剂组(U0126 浓度: 1 mg · kg⁻¹、5 mg · kg⁻¹、10 mg · kg⁻¹)。U0126 使用 DMSO 溶解后腹腔注射,同时给淡水组和 5‰盐度组的腹腔注射相同体积(0.2 mL)的 DMSO。

1.3.3 p38MAPK 抑制剂(SB203580) 处理 将红耳龟随机分为 8 组,每组 8 只:淡水组、淡水 + p38MAPK 抑制剂组(SB203580 浓度: 5 mg · kg⁻¹、15 mg · kg⁻¹、25 mg · kg⁻¹)、5‰盐度组、5‰盐度 + p38MAPK 抑制剂组(SB203580 浓度: 5 mg · kg⁻¹、15 mg · kg⁻¹、25 mg · kg⁻¹)。SB203580 使用 DMSO 溶解后腹腔注射,同时向淡水组和 5‰盐度组的腹腔注射相同体积(0.2 mL)的 DMSO。

1.4 盐度处理及样品采集

抑制剂处理后,将红耳龟置于淡水和 5‰盐度

水环境中 24 h,麻醉后处死,取肾脏组织, -80 °C 保存。

1.5 总 RNA 的提取和反转录

常规 Trizol 法提取样品总 RNA,微量核酸蛋白定量仪 NanoDrop™One/OneC 检测总 RNA 浓度和纯度。以 1 μg 的总 RNA 为模板进行反转录,反转录体系及条件参照 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书。

1.6 实时荧光定量 PCR

通过 GenBank 和实验室红耳龟转录组数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE117354>) 确定基因序列,运用 Primer-BLAST 进行引物设计(表 1)。以内参基因 β-actin 为参照进行实时荧光定量 PCR 分析,反应体系参照 Genious 2 × SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂盒说明书,反应条件为:95 °C 3 min;95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环;运用 2^{-ΔΔCt} 法分析 AQP3、HSP70、SMIT、SGK1、AR 的 mRNA 相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物信息
Table 1 Primers used for real-time fluorescence quantitative PCR

基因	GenBank 登录号	引物序列 (5'-3')	产物长度 /bp
β-actin	MH195268.1	F: GCACCCTGTGCTGCTTACA R: CACAGTGTGGGTGACACCAT	190
AQP3		F: ACTAGTGAAGCAAGCACTGG R: CACAGTCAAGAAGCCTCCGT	118
HSP70	XM_034778730.1	F: ACCTCTTCGCAGTGTCTCG R: GGCCTCATCTGCGTTCAAAG	157
SMIT	XM_034752326.1	F: AGGTCTGCTGGCAATCACTG R: AGGGAAGGTGACAGGTGACA	266
SGK1	XM_034765612.1	F: TGCAGTGGTTACTTGCAGT R: AGCAAGTACTCAGGTGTGC	172
AR	XM_034781910.1	F: CCAGAGGAATGTGGCAGTCA R: GAGGATGGTTCCATCTCCTCA	109

1.7 统计与分析

使用 Kolmogorow-Smirnov 检验数据是否符合正态分布,若数据符合正态分布,则采用 *t* 检验或 ANOVA 分析。若数据不符合正态分布,则采用

Kruskal-Wallis 非参数检验比较组间的差异显著性, 并采用 Mann-Whitney *U* 非参数检验比较组内差异显著性。试验结果用 $\bar{x} \pm SE$ 表示, 统计分析采用 SPSS 17.0。显著性水平设置为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 MAPKs 抑制剂对 AQP3 基因表达水平的影响

与淡水组相比, 5‰盐度组 AQP3 mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。淡水 + 不同浓度的 JNK、ERK、p38MAPK 抑制剂组中, AQP3 mRNA 相对表达量无显著变化 ($P > 0.05$)。但 5‰盐度 + 不同浓度的 ERK、p38MAPK 抑制剂组中, AQP3 mRNA 相对表达量均显著下调, 与 5‰盐度组之间的差异显著 ($P < 0.05$)。但不同浓度的 ERK、p38MAPK 抑制剂组间 AQP3 mRNA 相对表达量无

显著差异 ($P > 0.05$)。5‰盐度 + 不同浓度的 JNK 抑制剂组中, AQP3 mRNA 相对表达量的组间差异不显著 ($P > 0.05$; 图 1)。

2.2 MAPKs 抑制剂对 HSP70 mRNA 基因表达水平的影响

与淡水组相比, 5‰盐度组的 HSP70 mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。在淡水 + JNK、ERK、p38MAPK 抑制剂各组中, HSP70 mRNA 相对表达量无显著变化 ($P > 0.05$)。5‰盐度 + JNK、ERK、p38MAPK 抑制剂各组中, 3 种抑制剂均下调了 HSP70 mRNA 相对表达量, 与 5‰盐度组之间的差异显著 ($P < 0.05$)。且在 JNK、ERK、p38MAPK 抑制剂浓度分别为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, HSP70 mRNA 相对表达量最低 (图 2)。

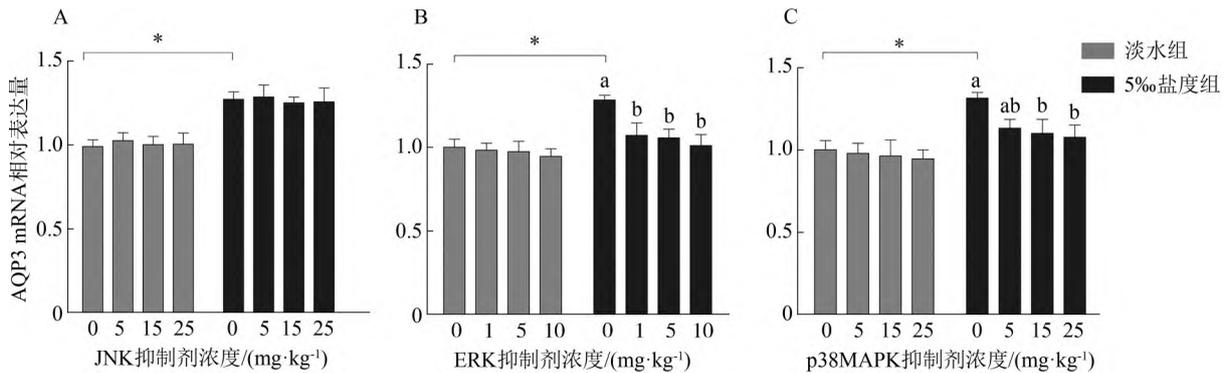


图 1 MAPKs 抑制剂对 AQP3 mRNA 相对表达量的影响

Fig. 1 Effects of MAPKs inhibitors on the expression of AQP3 mRNA

不同小写字母代表 5‰盐度组内不同抑制剂浓度的差异显著性 ($P < 0.05$); * $P < 0.05$; 下同

Different lowercase letters represent there is a significant difference within the 5‰ salinity group ($P < 0.05$); * $P < 0.05$; the same below

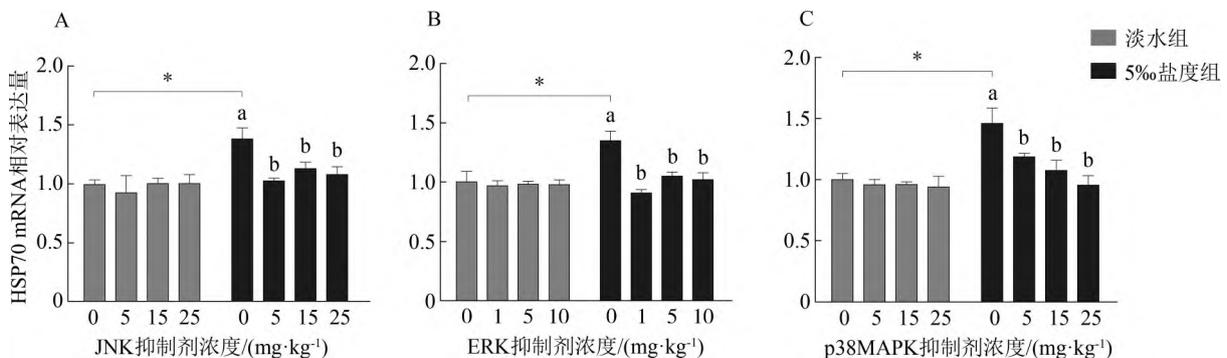


图 2 MAPKs 抑制剂对 HSP70 mRNA 相对表达量的影响

Fig. 2 Effects of MAPKs inhibitors on the expression of HSP70 mRNA

2.3 MAPKs 抑制剂对 AR mRNA 基因表达水平的影响

与淡水组相比 5‰盐度组的 AR mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。在淡水 + JNK、ERK、p38MAPK 抑制剂各组中, AR mRNA 相对表达量无显著变化 ($P > 0.05$)。5‰盐度 + JNK、ERK、p38MAPK 抑制剂各组中, JNK 抑制剂浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, AR mRNA 相对表达量较 5‰盐度组显著下调 ($P < 0.05$)。浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时的 AR mRNA 相对表达量与 5‰盐度组之间的差异不显著 ($P > 0.05$)；ERK 抑制剂浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, AR mRNA 相对表达量比 5‰盐度组显著下调 ($P < 0.05$)；p38MAPK 抑制剂浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, AR mRNA 相对表达量比 5‰盐度组显著降低 ($P < 0.05$ ；图 3)。

2.4 MAPKs 抑制剂对 SGK1 基因表达水平的影响

与淡水组相比 5‰盐度组的 SGK1 mRNA 相

对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。在 5‰盐度 + JNK、ERK、p38MAPK 抑制剂各组中, 随着 p38MAPK 抑制剂浓度的增加, SGK1 mRNA 相对表达量呈下降趋势, 且在浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, SGK1 mRNA 相对表达量最低 ($P < 0.05$)；随 ERK 抑制剂浓度增加, SGK1 mRNA 相对表达量虽表现出下降的趋势, 但各组间差异不显著 ($P > 0.05$)；JNK 抑制剂组与 5‰盐度组的 SGK1 mRNA 相对表达量之间差异不显著 ($P > 0.05$) (图 4)。

2.5 MAPKs 抑制剂对 SMIT 基因表达水平的影响

与淡水组相比 5‰盐度组的 SMIT mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。在 5‰盐度 + 抑制剂各组中, JNK、p38MAPK 抑制剂组中 SMIT mRNA 相对表达量均下调, 与 5‰盐度组相比差异显著 ($P < 0.05$)；ERK 抑制剂组与 5‰盐度组相比, SMIT mRNA 相对表达量无显著变化 ($P > 0.05$ ；图 5)。

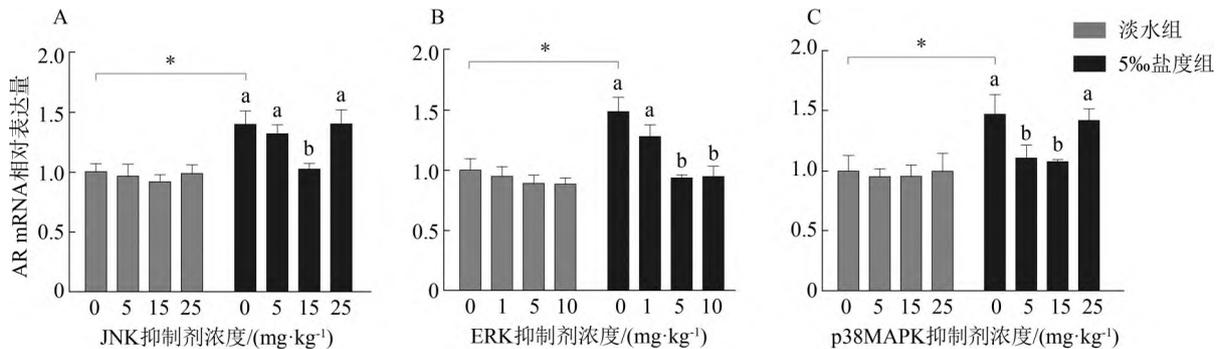


图 3 MAPKs 抑制剂对 AR mRNA 相对表达量的影响
Fig. 3 Effects of MAPKs inhibitors on the expression of AR mRNA

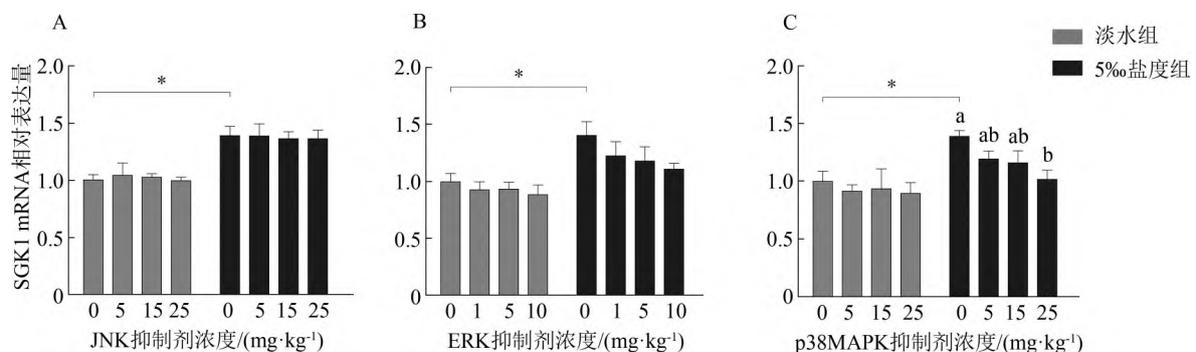


图 4 MAPKs 抑制剂对 SGK1 mRNA 相对表达量的影响
Fig. 4 Effects of MAPKs inhibitors on the expression of SGK1 mRNA

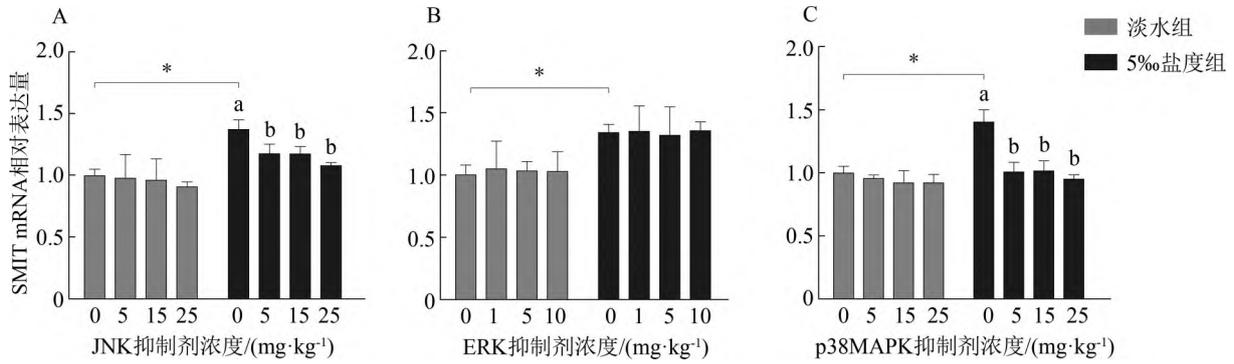


图5 MAPKs 抑制剂对 SMIT mRNA 相对表达量的影响
Fig. 5 Effects of MAPKs inhibitors on the expression of SMIT mRNA

3 讨论

盐度是影响水生生物生存的重要环境因子,外界环境中的盐度急剧升高时,会造成机体细胞失水、离子浓度增加、DNA 损伤、细胞骨架重排、转录和翻译受到抑制等问题,为了使细胞在高渗下维持正常功能和稳态,机体进化出一系列机制(Dmitrieva & Burg, 1998; Burg *et al.*, 2007)。通过激活高渗响应信号 MAPKs 通路以适应高盐环境,本研究发现,MAPKs 信号通路抑制剂显著降低了 AQP3、SGK1、SMIT、HSP70 等的表达,说明 MAPKs 信号调控的渗透压调节基因在红耳龟入侵半咸水环境中起到了一定的保护作用。

MAPKs 是从酵母到人类高度保守的信号蛋白,在高渗条件下,MAPKs 可迅速激活,并发挥多种功能,在渗透胁迫信号传导中起关键作用,如调节细胞体积以及下游渗透压调节基因的表达等(Kültz & Burg, 1998; de Nadal *et al.*, 2002; de Hoffmann *et al.*, 2009)。在 MAPKs 众多调控基因中,AQP3 作为传统的选择性水通道蛋白,参与水的分泌、吸收及细胞膜内外平衡调节(李金库等, 2021),高渗条件下 SGK1 在维持体内 Na⁺、K⁺ 稳态中发挥重要作用(Kaneko *et al.*, 1990; Arteaga, 2005; Flores *et al.*, 2005; Aoi *et al.*, 2006),AR 和 SMIT 通过积累有机渗透物质山梨醇和肌醇等参与高渗条件下的渗透调节(Bagnasco *et al.*, 1987; Miyakawa *et al.*, 1999),而 HSP70 的高表达可减少高渗

对细胞的损害(Yang *et al.*, 2009)等,以上渗透压调节基因在机体应对高渗胁迫、维持细胞稳态中均发挥重要作用。而 MAPKs 作为其上游调控因子可以直接或者间接对其进行调控。如在高渗环境中阻断 p38MAPK 可以抑制 HSP70 的转录水平(Sheikh-Hamad *et al.*, 1998);高盐生长环境诱发 DNA 损伤,p53 被活化,促进 ERK1/2 的磷酸化,磷酸化 ERK1/2 诱导 SGK1 的高表达(You *et al.*, 2004);阻断狗肾脏细胞 p38MAPK 活性可以抑制高渗条件下的钠/肌醇转运(Bissonnette *et al.*, 2008);高渗条件下在人视网膜色素上皮细胞中加入 ERK、p38MAPK 抑制剂会显著抑制 AR 的表达(Winges *et al.*, 2016);AQP3 缺失小鼠的 p38、JNK 和 ERK 磷酸化水平显著下降(Lei *et al.*, 2017)等。本研究也发现,红耳龟在进入盐度环境后,相关的渗透压调节基因表达显著上调,在应用特异性抑制剂阻断 MAPKs 信号通路后,其中,ERK、p38MAPK 抑制剂可显著降低 AQP3、AR mRNA 相对表达量,3 种抑制剂均可显著降低 HSP70 mRNA 的相对表达量,而 SGK1 的表达水平主要受 p38MAPK 抑制剂的调控,JNK、p38MAPK 抑制剂可以显著降低 SMIT mRNA 相对表达量,且随着 JNK 抑制剂浓度的升高,抑制效果加强。结合试验结果,推测外来淡水物种红耳龟入侵半咸水环境过程中,在响应高渗胁迫初期,可能通过提高渗透压调节因子 SGK1 表达,促使 Na⁺ 快速进入细胞,并通过 AQP3 吸水来恢复细胞体积,在适应高渗压力下的离子跨膜运输中发挥

作用。此外,为了克服高渗带来的不利影响,有机渗透物质可能成为红耳龟在应对高渗环境下的保护剂,依靠转运蛋白积累包括肌醇和山梨糖醇来平衡渗透性变化(Ho 2006; Alfieri & Petronini 2007)。HSP70 高渗条件下的合成水平增加,则是用来修复或降解细胞内变性蛋白质,从而提高肾脏组织对渗透压剧烈变化的适应能力(Yang & Feige,1992)。而 MAPKs 信号通路参与了上述渗透压相关基因的调控过程,并通过提高渗透压调节基因的转录水平以抵消外界盐度变化引起的渗透压不平衡所造成的破坏性后果。但 MAPKs 信号通路作用是错综复杂的,不只 1 条支路对渗透压保护基因有调节作用,多是两者或三者共同参与渗透压调节(崔文晓,2020)。p38MAPK 作为红耳龟响应高渗应激的重要感知途径,在调节下游渗透压保护基因 AQP3、HSP70、AR、SGK1、SMIT 的表达中发挥着不可替代的作用。

4 结论

红耳龟在入侵半咸水环境后,会通过提高 AQP3、HSP70、AR、SMIT、SGK1 等渗透压调节基因 mRNA 的转录水平以抵御外界的不良影响。MAPKs 信号通路抑制剂显著降低了相关渗透压调节基因的表达,说明 MAPKs 信号通路参与了红耳龟在适应半咸水过程中的渗透压调节过程。

参考文献:

崔文晓. 2020. 肌醇及其相关通路在大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) 渗透压调节中的作用[D]. 上海: 上海海洋大学.

李金库,于朋,温海深,等. 2021. 花鲈 *aqp3a* 基因的克隆,表达分析及渗透调节功能研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),51(9): 15-25.

杨江波. 2014. 红耳龟(*Trachemys scripta elegans*) 在海南南渡江半咸水区域的生态适应性研究[D]. 海口: 海南师范大学.

Aggeli I, Gaitanaki C, Lazou A, et al. 2002. Hyperosmotic and thermal stresses activate p38-MAPK in the perfused am-

phibian heart [J]. Journal of Experimental Biology, 205(Pt4): 443-454.

Alfieri RR, Petronini PG. 2007. Hyperosmotic stress response: comparison with other cellular stresses[J]. European Journal of Physiology, 454(2): 173-185.

Aoi W, Niisato N, Sawabe Y, et al. 2006. Aldosterone-induced abnormal regulation of ENaC and SGK1 in Dahl salt-sensitive rat[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 341(2): 376-381.

Arteaga MF. 2005. Functional specificity of Sgk1 and Akt1 on ENaC activity [J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 289(1): 90-96.

Bagnasco SM, Uchida S, Balaban RS, et al. 1987. Induction of aldose reductase and sorbitol in renal inner medullary cells by elevated extracellular NaCl [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84(6): 1718-1720.

Bell LM, Leong M, Kim B, et al. 2000. Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38MAPK-dependent pathway [J]. Journal of Biological Chemistry, 275(33): 25262-25272.

Bissonnette P, Lahjouji K, Coady MJ, et al. 2008. Effects of hyperosmolarity on the Na⁺-myo-inositol cotransporter SMIT₂ stably transfected in the Madin-Darby canine kidney cell line [J]. AJP Cell Physiology, 295(3): 791-799.

Brocker C, Thompson DC, Vasiliou V. 2012. The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease [J]. Biomolecular Concepts, 3(4): 345-364.

Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. 2007. Cellular response to hyperosmotic stresses [J]. Physiological Reviews, 87(4): 1441-1474.

Cakir Y, Ballinger SW. 2005. Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: the role of MAPK [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 7(5-6): 726-740.

Chow SC, Wong C. 2011. Regulatory function of hyperosmotic stress-induced signaling cascades in the expression of transcription factors and osmolyte transporters in freshwater Japanese eel primary gill cell culture [J]. Journal of Experimental Biology, 214(8): 1264-1270.

- de Nadal E , Alepuz PM , Posas F. 2002. Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation [J]. *Embo Reports* , 3(8) : 735-740.
- Dmitrieva NI , Burg MB. 2005. Hypertonic stress response [J]. *Mutation Research* , 569(1-2) : 65-74.
- Flores SY , Loffing CD , Kamynina E , *et al.* 2005. Aldosterone-induced serum and glucocorticoid-induced kinase 1 expression is accompanied by nedd4-2 phosphorylation and increased Na⁺ transport in cortical collecting duct cells [J]. *Journal of the American Society of Nephrology* , 16(8) : 2279-2287.
- Ho SN. 2006. Intracellular water homeostasis and the mammalian cellular osmotic stress response [J]. *Journal of Cellular Physiology* , 206(1) : 9-15.
- Hoffmann EK , Lambert IH , Pedersen SF. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates [J]. *Physiological Reviews* , 89(1) : 193-277.
- Hong ML , Zhang K , Shu C , *et al.* 2014. Effect of salinity on the survival , ions and urea modulation in red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) [J]. *Asian Herpetological Research* , 5(2) : 128-136.
- Kai M , Shi HT. 2017. Red-eared slider *Trachemys scripta elegans* (Wied-Neuwied) [M]. Singapore: Springer.
- Kaneko M , Carper D , Nishimura C , *et al.* 1990. Induction of aldose reductase expression in rat kidney mesangial cells and Chinese hamster ovary cells under hypertonic conditions [J]. *Experimental Cell Research* , 188(1) : 135-140.
- Kim YK. 2006. Deletion of the inducible 70-kDa heat shock protein genes in mice impairs cardiac contractile function and calcium handling associated with hypertrophy [J]. *Circulation* , 113(22) : 2589-2597.
- Kültz D , Avila K. 2001. Mitogen-activated protein kinases are *in vivo* transducers of osmosensory signals in fish gill cells [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* , 129(4) : 821-829.
- Kültz D , Burg M. 1998. Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades [J]. *Journal of Experimental Biology* , 201(22) : 3015-3021.
- Lei L , Wang W , Jia Y , *et al.* 2017. Aquaporin-3 deletion in mice results in renal collecting duct abnormalities and worsens ischemia-reperfusion injury [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) : Molecular Basis of Disease* , 1863(6) : 1231-1241.
- Miyakawa H , Woo SK , Dahl SC , *et al.* 1999. Tonicity-responsive enhancer binding protein , a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 96(5) : 2538-2542.
- Morin PJ. 1990. Decades of turtles (book review: life history and ecology of the slider turtle) [J]. *Science* , 250(4984) : 1164.
- Raja V , Majeed U , Kang H , *et al.* 2017. Abiotic stress: interplay between ROS , hormones and MAPKs [J]. *Environmental & Experimental Botany* , 137: 142-157.
- Sheikh-Hamad D , Mari JD , Suki WN , *et al.* 1998. p38 kinase activity is essential for osmotic induction of mRNAs for hsp70 and transporter for organic solute betaine in madin-darby canine kidney cells [J]. *Journal of Biological Chemistry* , 273(3) : 1832-1837.
- Swingland IR. 1991. Review of life history and ecology of the slider turtle by Gibbons JW [J]. *Journal of Animal Ecology* , 60(2) : 715-716.
- Winges A , Garcia TB , Prager P , *et al.* 2016. Osmotic expression of aldose reductase in retinal pigment epithelial cells: involvement of NFAT5 [J]. *Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* , 254(12) : 2387-2400.
- Yang MW , Huang WT , Tsai MJ , *et al.* 2009. Transient response of brain heat shock proteins 70 and 90 to acute osmotic stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. *Zoological Studies* , 48(6) : 723-736.
- Yang XD , Feige U. 1992. Heat shock proteins in autoimmune disease. From causative antigen to specific therapy? [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences* , 48(7) : 650-656.
- You H , Jang YJ , You-Ten A , *et al.* 2004. P53-dependent inhibition of FKHRL1 in response to DNA damage through-protein kinase SGK1 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 101(39) : 14057-14062.