

DOI: 10.12264/JFSC2024-0105

## 兴国红鲤幼鱼对高温胁迫与复温恢复的氧化应激和适应机制

余子豪, 陆俊杰, 孙佳敏, 胡文静, 徐烨彤, 刘其根

上海海洋大学, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 农业农村部稻渔综合种养生态重点实验室, 农业农村部淡水水产遗传资源重点实验室, 上海 201306

**摘要:** 为了解析兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *singuonensis*)在热应激下的生理调控特征, 本研究通过模拟高温环境和复温环境, 研究了在不同温度水平(28 °C 和 38 °C)下兴国红鲤幼鱼鳃组织的相关酶活性指标和转录组变化。酶活指标结果显示, 高温胁迫后丙二醛(MDA)含量显著上升( $P<0.05$ ), 过氧化氢酶(CAT)活性显著下降( $P<0.05$ ), 而谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和超氧化物歧化酶(SOD)活性无显著差异( $P>0.05$ ); 复温后, SOD 活性显著下降( $P<0.05$ ), 其余均无显著差异( $P>0.05$ )。通过转录组测序分析, 共检测出 5752 个差异表达基因(DEGs), KEGG 分析揭示这些基因主要富集在免疫和凋亡相关通路, 包括内质网蛋白加工、IL-17 信号通路、NF-κB 信号通路、p53 信号通路和细胞凋亡等。在这些通路中, 热休克蛋白(HSPs)、白细胞介素-1β (IL-1β)、白细胞介素-8 (IL-8)、P53 肿瘤抑制基因(*p53*)、半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspases)、缺氧诱导因子-1α (*HIF-1α*)等关键信号因子表现出不同的表达趋势。研究结果表明, 在高温环境下, 兴国红鲤幼鱼的细胞免疫和细胞凋亡被抑制, 导致脂质过氧化损伤, 并且机体处于缺氧状态; 复温后, 机体解除缺氧状态, 但机体损伤不可逆, 细胞免疫与细胞凋亡依旧被抑制。该研究为揭示水产养殖物种适应高温环境的分子机制提供了理论依据。

**关键词:** 兴国红鲤; 高温应激; 氧化应激; 转录组学; 鳃

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)11-1351-14

全球变暖和温室效应导致全球气温持续升高<sup>[1-2]</sup>。适宜的环境条件是水生生物维持正常生命活动的必要条件<sup>[3]</sup>。温度作为关键的环境因子之一, 其变化可对鱼类的生理稳态和生物学功能产生重要影响<sup>[4]</sup>。研究发现红鲑(*Oncorhynchus nerka*)会因温度上升致使耗氧量增加而导致缺氧<sup>[5]</sup>。此外, 全球气温每升高 3.2 °C 将导致近 1/3 淡水鱼类的生态栖息地受到破坏<sup>[6]</sup>, 进而对水产养殖行业造成巨大打击<sup>[7-8]</sup>。高温不仅带来经济损失, 还会削弱鱼类的活力和免疫力, 增加疾病感染的概率<sup>[9]</sup>。鳃作为重要的气体交换和免疫器官, 是抵御病原体的第一道防线<sup>[10]</sup>, 也是环境胁迫最直接的靶器官<sup>[11-12]</sup>。因此, 本研究选择鳃组织作为研究材料,

对鱼类应对高温环境的适应性机制展开研究。

兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *singuonensis*)属鲤属(*Cyprinidae*), 既可作为观赏鱼, 也可作为食用鱼, 具有极高的经济价值, 因具有生长速度快、繁殖能力高、抗逆境强和杂交亲和性好等特点, 被广泛运用于品种改良和新品种选育。兴德鲤(*Cyprinus carpio* var. *singdenensis*)、芙蓉鲤(*Cyprinus carpio* var. *furongensis*)、丰鲤(*Cyprinus carpio* var. *fengnensis*)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)等优良品种均以兴国红鲤为杂交亲本<sup>[13]</sup>。因此, 兴国红鲤在我国水产养殖中具有重要意义。然而, 关于兴国红鲤的研究大多是对杂交品种的培育, 对其高温适应性机制的研究相对较

收稿日期: 2024-06-14; 修订日期: 2024-08-19.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172995); 上海科技馆长三角城市群生态安全与生物多样性保护实验室资助项目(FW-2024-079).

作者简介: 余子豪(1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类环境适应. E-mail: 18070222037@163.com

通信作者: 刘其根, 教授, 研究方向为生态养殖技术与综合养殖生态工程. E-mail: qgliu@shou.edu.cn

少。目前了解到兴国红鲤的适宜生长温度为 18~32 °C, 对于其最高热临界值尚未可知。为此本研究以青田鲤(*Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*)的最大热临界值 38 °C 为参考<sup>[14]</sup>, 利用 RNA-Seq 转录组测序技术, 系统揭示兴国红鲤在高温和复温期间的转录组变化, 旨在找到关键的基因表达调控网络, 深入了解兴国红鲤在高温与复温下的适应性调节机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料与暂养管理

实验用鱼取自江西省赣州市兴国县方太乡富坑村合群组, 个体规格相近, 体重(74.28±9.08) g, 体长(13.54±1.32) cm, 生命力旺盛且健康无损。正式实验前在室内空调房中暂养 14 d, 将兴国红鲤幼鱼置于水箱中(250 L), 每个水箱正中间吊放一个 500 W 的加热棒加热, 水温控制在(28±1) °C, 溶氧保持在>5.5 mg/L, 每两天进行一次投喂, 正式实验前一天停止投喂。在每日 9:00 和 19:00 分别用曝气自来水置换 1/2 的养殖用水, 保障养殖用水的更新。

### 1.2 实验设计和样品采集

本实验对兴国红鲤幼鱼进行高温胁迫与复温恢复, 以青田鲤(*Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*)的最大热临界值 38 °C 为参考<sup>[14]</sup>, 共设置 3 个实验组: 对照组(28 °C)、高温组(38 °C)、复温组(28 °C), 每个处理组 3 个重复。暂养 14 d 后, 以 1 °C/h 的速度, 将水温从暂养温度 28 °C 升直至 38 °C, 胁迫 6 h。胁迫后自然降温至 28 °C 并维持 6 h。采集样品时, 从每个重复中随机挑选 3 尾鱼, 每个处理组共取 9 尾鱼。采用 MS-222 (300 mg/L) 麻醉后取出鳃组织于液氮中速冻后, 置于-80 °C 超低温冰箱中保存待用。

### 1.3 鳃的氧化应激参数

冻存的鳃组织寄送至南京建成生物工程研究所, 对超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量进行检测和分析。利用 SPSS22.0 统计分析软件对试验所得的数据进行单因素方差分析(one-way, ANOVA), 运用邓肯(Duncan)多重比较

对均值进行差异显著性检验, 显著水平设为  $P<0.05$ 。所得数据用平均数±标准差(  $\bar{x}\pm SD$  )表示。

### 1.4 RNA 提取、文库制备和测序

从-80 °C 冰箱中取出样品, 在提前预冷的研钵中加入液氮研磨成粉末, 使用 Trizol 法提取总 RNA。运用琼脂糖凝胶电泳(1% 琼脂糖)和 NanoDrop2000 对提取的总 RNA 进行完整性、浓度和纯度等方面的质量检测。通过混样各重复的 3 尾鱼鳃组织样品来消除个体间差异, 每组取 1 μg RNA 用于 cDNA 文库构建及 Illumina 测序。本次研究中的文库构建和 Illumina 测序均由美吉生物科技有限公司完成, 建库使用试剂为 Truseq™ RNA sample prep Kit (Illumina, CA, USA), 测序系统为 Illumina Novaseq 6000, 测序模式为 2×150。

### 1.5 质量控制和序列比对

使用 SeqPrep 和 Sickle 软件去除掉原始序列(raw reads)中接头、含 N (N: 模块碱基)的序列和过滤掉低质量序列(质量值<20), 得到质控后高质量测序序列(clean reads)。统计质控后 clean reads 的错配率(error rate)、Q20、Q30 和 GC 含量, 以评估测序质量。

基于改进的 BWT (Burrows-heeler transform) 算法, 使用 HISAT2 v.2.1.0 软件将 clean reads 与 2014 年公布的鲤基因组信息<sup>[15]</sup>进行比对获得比对序列(mapped reads)。

### 1.6 转录组组装和注释

以鲤基因组为参考基因, 使用 Cufflinks v.2.2.1 软件将获得的 mapped reads 进行拼接, 最终组装成转录本(unigene)。通过 Gffcompare 软件进行组装后转录本与已知转录本的比较, 发现未知基因, 优化转录本并完成功能注释。使用 BLAST+ v.2.9.0 软件将获得的所有基因和转录本与 Swiss-Port、Nr、Pfam、COG、GO 和 KEGG 数据库进行比对, 为后续获得的基因和转录本的功能信息进行统计注释。

### 1.7 基因差异表达及富集分析

使用 RSEM1.3.1 软件通过 TPM (Transcripts Per Million) 定量标准, 对基因长度进行均一化后对测序深度均一化, 统一不同样本的总表达量获

得 read counts 分析样本之间的基因差异表达情况。使用 DEGseq2 v.1.24.0 软件进行 read counts 的标准化处理并筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 以校正  $P$  值( $P\text{-adjust}$ ) $<0.05$  与  $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$  作为差异表达的阈值。在差分表达式的统计计算中, 采用多重统计检验的校正方法对  $P$  值进行校正, 得到  $P\text{-adjust}$ 。使用 Goatools v.0.6.5 软件和 KOBAS v.2.1 软件, 运用 Fisher 检验分别对 DEGs 进行 GO 功能富集分析和对 KEGG Pathway 代谢通路进行富集分析。

### 1.8 实时荧光定量 PCR 验证

为确认转录组的结果精确度, 根据获得的 RNA-Seq 数据选取 5 个显著不同的基因进行了 RT-qPCR 测试以进一步证实其正确性。利用 Primer 6.0 软件进行引物设计, 以  $\beta$ -actin 基因为内参。在实时荧光定量 PCR 仪(ABI7300, 美国)上进行试验。每个反应进行 3 个生物学重复和技术重复, 使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析结果。使用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同温度条件下鳃的抗氧化酶活性

兴国红鲤幼鱼对高温胁迫和复温恢复氧化应激的鳃组织酶活指标见表 1。高温胁迫对兴国红鲤幼鱼抗氧化系统产生了显著影响。在  $P=0.05$  的置信水平下, 高温组的 MDA 含量显著高于对照组( $P<0.05$ ), CAT 活性显著低于对照组( $P<0.05$ ),

SOD 及 GSH-PX 活性无显著差异( $P>0.05$ )。另外, 复温组的 SOD 活性显著低于对照组和高温组( $P<0.05$ ), 其 MDA 含量显著高于常温组( $P<0.05$ ), CAT 和 GSH-PX 活性无显著差异( $P>0.05$ )。

表 1 3 个实验组兴国红鲤幼鱼鳃组织中氧化应激指标

Tab. 1 Oxidative stress indices in the gill tissues of juvenile Xingguo red carp (*Cyprinus carpio* var. *singuonensis*) in three experimental groups

$n=3$ ;  $\bar{x} \pm SD$

分组 group	超氧化物 歧化酶/ SOD (U/mg prot)	谷胱甘肽过 氧化物酶/ GSH-PX (U/mg prot)	过氧化 氢酶/ CAT (U/mg prot)	丙二醛/ MDA (nmol/ mg prot)
XGSC	43.62 $\pm$ 3.04 <sup>a</sup>	56.99 $\pm$ 5.73 <sup>a</sup>	0.86 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	5.25 $\pm$ 1.19 <sup>b</sup>
XGSH	39.92 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	49.53 $\pm$ 4.26 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	9.31 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>
XGRW	33.14 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	46.46 $\pm$ 4.55 <sup>a</sup>	0.77 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	7.47 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>

注: XGSC 为对照组( $28^{\circ}\text{C}$ ), XGSH 为高温组( $38^{\circ}\text{C}$ ), XGRW 为复温组( $28^{\circ}\text{C}$ )。同一列中, 不同字母表示各组之间差异显著( $P<0.05$ )。

Note: XGSC represents the control group ( $28^{\circ}\text{C}$ ); XGSH is the high temperature group ( $38^{\circ}\text{C}$ ), and XGRW is the recovery temperature ( $28^{\circ}\text{C}$ ) group. In the same column, different letters indicate significant differences between groups ( $P<0.05$ ).

### 2.2 转录组测序数据的质量评估

采用 Illumina 测序平台对 3 组 9 个独立 cDNA 文库完成的转录组测序, 共产生 523189978 个原始序列(Raw reads), 过滤后其中有 509446572 个序列通过质量控制。GC 含量为 47.33%~48.64%, Q20 值均超过 97%, Q30 值均超过 94%, 错配率仅有 0.024%~0.025%, 表明数据可靠, 能够进一步开展相关研究和分析。具体详情如表 2 所示。

表 2 兴国红鲤幼鱼鳃组织 RNA-seq 文库原始序列和质控序列的统计值

Tab. 2 Statistics of the raw sequence and quality control sequences of RNA-seq libraries from the gill tissues of juvenile Xingguo red carp (*Cyprinus carpio* var. *singuonensis*) in three experimental groups

实验组 experimental group	原始序列 raw reads	质控序列 clean reads	clean bases/ Gb	错配率/% error rate	Q20/%	Q30/%	GC 含量/% GC content
XGSC-repeat 1	53664986	52465922	7.28	0.024	98.08	94.51	47.54
XGSC-repeat 2	54225242	52943920	7.25	0.024	98.08	94.52	47.64
XGSC-repeat 3	58301810	56777482	7.75	0.024	98.05	94.52	47.33
XGSH-repeat1	58601646	56836386	7.81	0.025	97.97	94.19	48.57
XGSH-repeat2	60908802	59212988	8.11	0.025	97.97	94.23	48.29
XGSH-repeat3	61051104	59695998	8.19	0.024	98.13	94.63	48.24
XGRW-repeat1	60041018	58625966	8.04	0.024	98.09	94.47	48.34
XGRW-repeat2	56466466	55041908	7.61	0.025	98.01	94.27	48.48
XGRW-repeat3	59928904	57846002	7.97	0.025	97.96	94.20	48.64

### 2.3 转录组组装和注释

将构建的 86185 种转录本用 6 个公用数据平台(GO、KEGG、COG、NR、Swiss-Prot、Pfam)进行注释, 分别成功注释到 56980、61784、76440、81851、71513、55901 条转录本, 总计注释了 81883 条转录本。将获取的 69065 个基因与 6 个数据库进行注释, 分别成功注释到 47112、49617、61010、65233、57099、42984 条转录本, 共计注释 65263 条转录本(表 3)。

### 2.4 差异基因(DEG)表达分析

从 3 个实验组筛选 DEGs (differentially expressed genes): XGSH vs XGSC、XGRW vs XGSC 和 XGRW vs XGSH。将差异基因进行聚类热图分析和韦恩分析(图 1)。从 3 组中分别得到了 2643、908 和 2396 个 DEGs, 其中分别包括了 1401、300 和 936 个上调表达的基因, 以及 1242、608 和 1460 个下调表达的基因(图 1, 2)。

### 2.5 DEGs 的 GO 功能富集分析

通过 Fisher 检验对差异表达基因进行富集分析。当  $P\text{-adjust} < 0.05$  时, 认为 DEGs 在此两类中

表现出显著的富集现象。将 GO 功能分为分子功能(MF)、生物过程(BP)和细胞组分(CC), 其富集分析结果如下:

在 XGSH vs XGSC 组有 1931 个 DEGs 在 GO 功能中显著富集, 有 377 个 GO 二级条目, 包括 BP 227 个、CC 55 个和 MF 95 个(图 3)。在 XGRW vs XGSH 组中, 有 1792 个 DEGs 显著地富集在

表 3 转录本和基因注释统计

Tab. 3 Statistics of annotation for unigenes and genes

注释数据库名 称 database	注释到转录 本数目 number of annotated unigenes	注释比例/% percentage of annotation	注释到基 因数目 number of annotated genes	注释比例 /% percentage of annotation
GO	56980	66.11	47112	68.21
KEGG	61784	71.69	49617	71.84
COG	76440	88.69	61010	88.34
NR	81851	94.97	65233	94.45
Swiss-Prot	71513	82.98	57099	82.67
Pfam	55901	64.86	42984	62.24
注释总数 total	81883	95.01	65263	94.50
annotation				

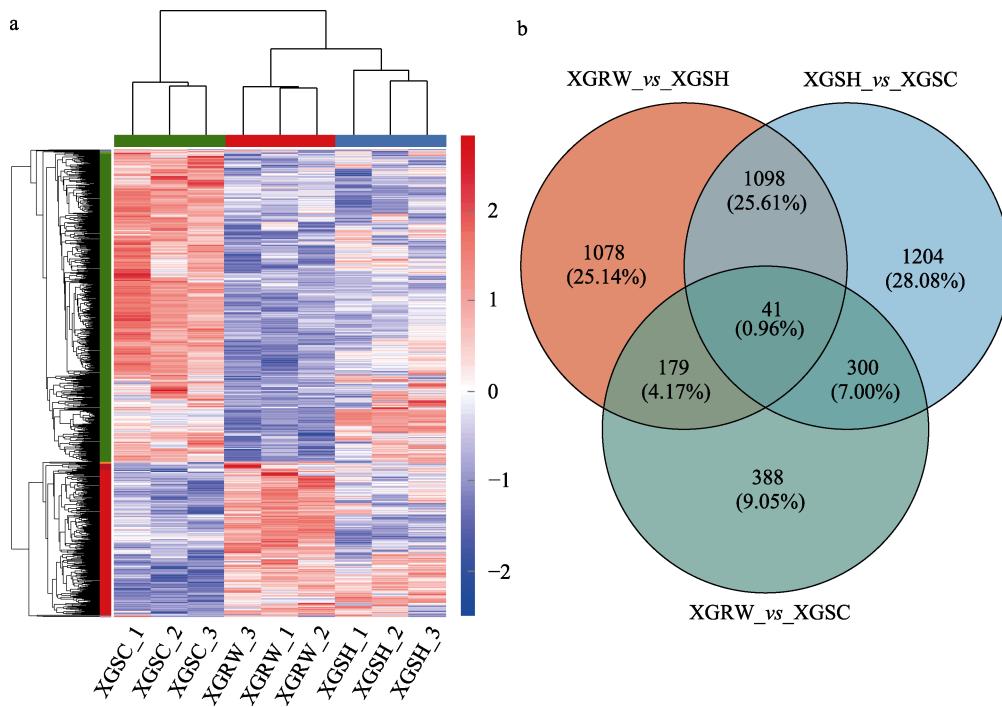


图 1 各实验组间基因差异表达(DEGs)统计图

a. 基因差异表达聚类热图; b. 基因差异表达 Venn 图.

Fig. 1 Statistical figure of differentially expressed genes among different experimental groups  
a. The heat map of clustering analysis on DEGs among groups; b. The Veen diagram of DEGs among groups.

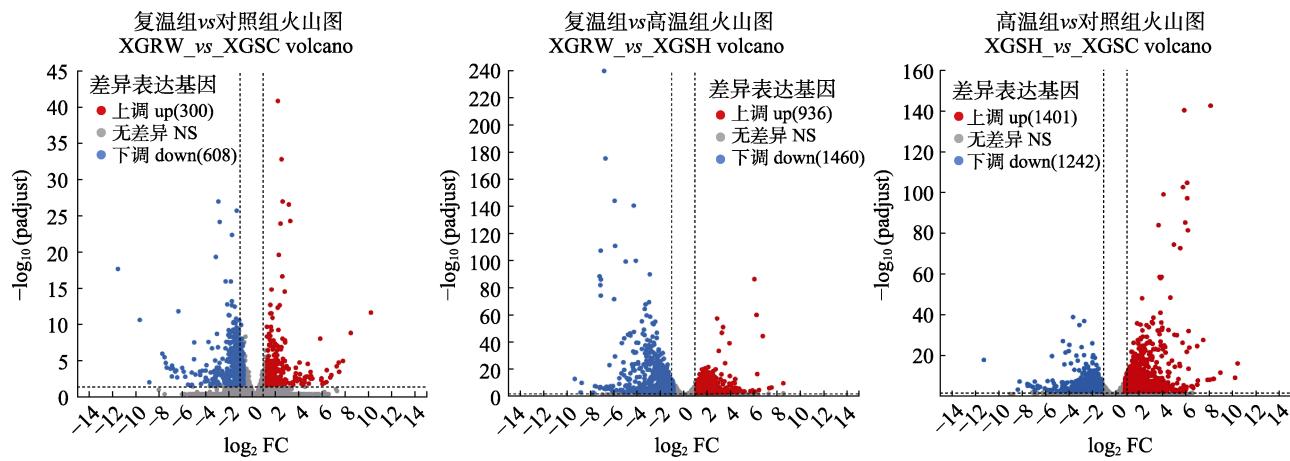


图 2 3 组差异表达基因统计图  
Fig. 2 Volcano plot of DEGs in 3 groups

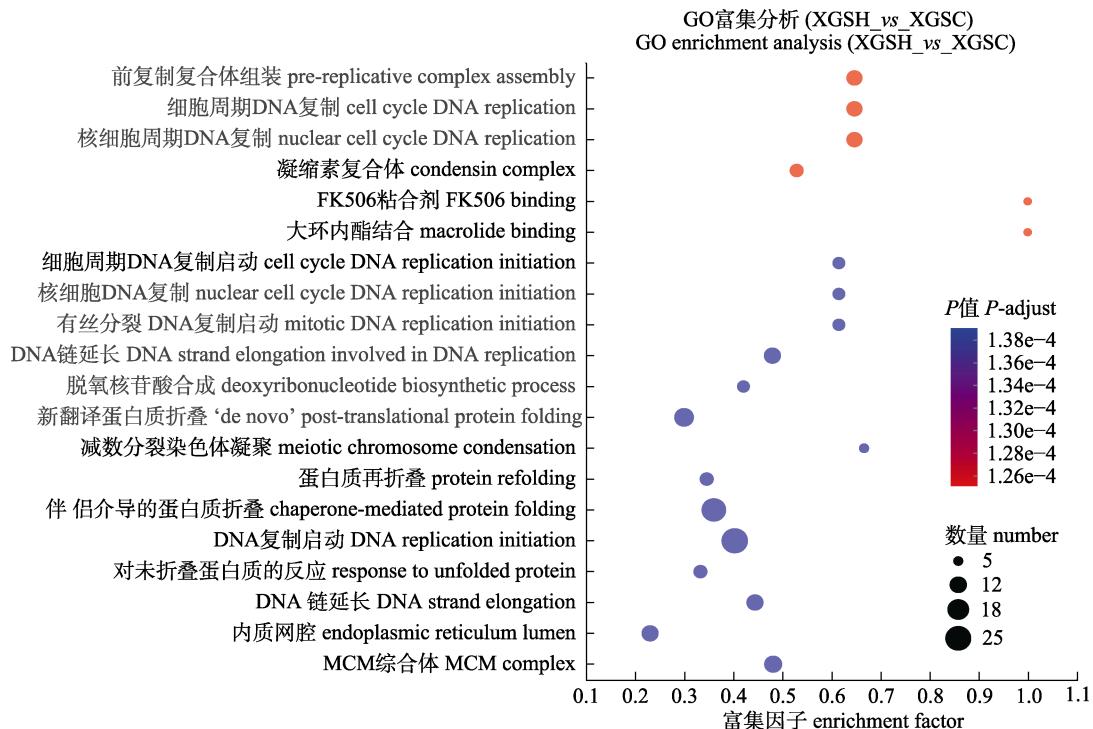


图 3 XGSH vs XGSC 组中 GO 富集分析结果(富集排名前 20)  
Fig. 3 Results of GO function enrichment analysis in XGSH vs XGSC groups (top20)

GO 功能上, 其中包含了 199 个 GO 二级条目, 包括 BP 103 个、CC 27 个、MF 69 个(图 4)。在 XGRW vs XGSC 组有 645 个 DEGs 在 GO 功能中显著富集, 其中有 150 个 GO 二级条目, 包括 BP 92 个、CC 34 个、MF 24 个(图 5)。生物过程主要涉及 DNA 复制、细胞凋亡、昼夜节律的调控等; 分子功能主要涉及细胞信号转导、免疫调节或细胞内蛋白质的折叠修复等; 细胞组分主要涉及细胞的生长、分裂、信号转导等。

## 2.6 DEGs 的 KEGG 通路富集分析

在 XGSH vs XGSC 组中有 2016 个 DEGs 在 KEGG 通路显著富集, 有效富集到 53 条 KEGG 通路上, 其中主要包括 DNA 复制(36 个基因)、内质网中的蛋白质加工(84 个基因)、细胞周期(61 个基因)、p53 信号通路(38 个基因)、IL-17 信号通路(38 个基因)、病毒致癌(76 个基因)、系统性红斑狼疮(52 个基因)等, 主要涉及细胞免疫系统和细胞凋亡方面(图 6)。

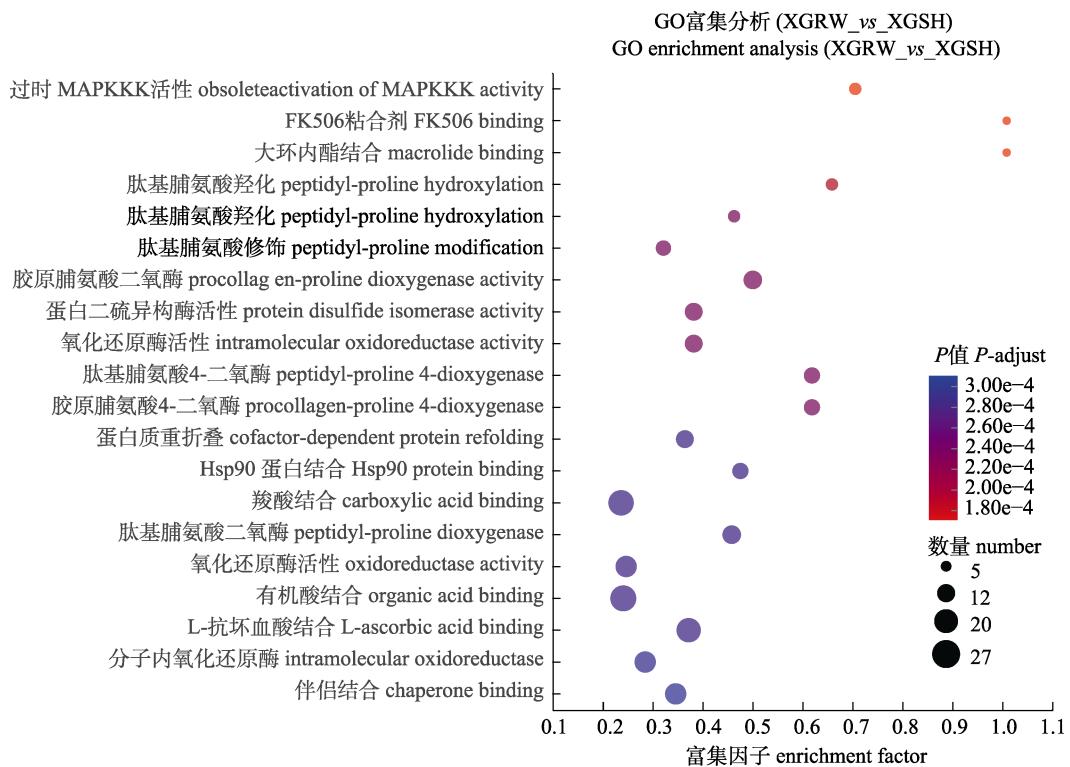


图 4 XGRW vs XGSH 组中 GO 富集分析(富集排名前 20)

Fig. 4 GO function enrichment analysis in XGRW vs XGSH groups (top20)

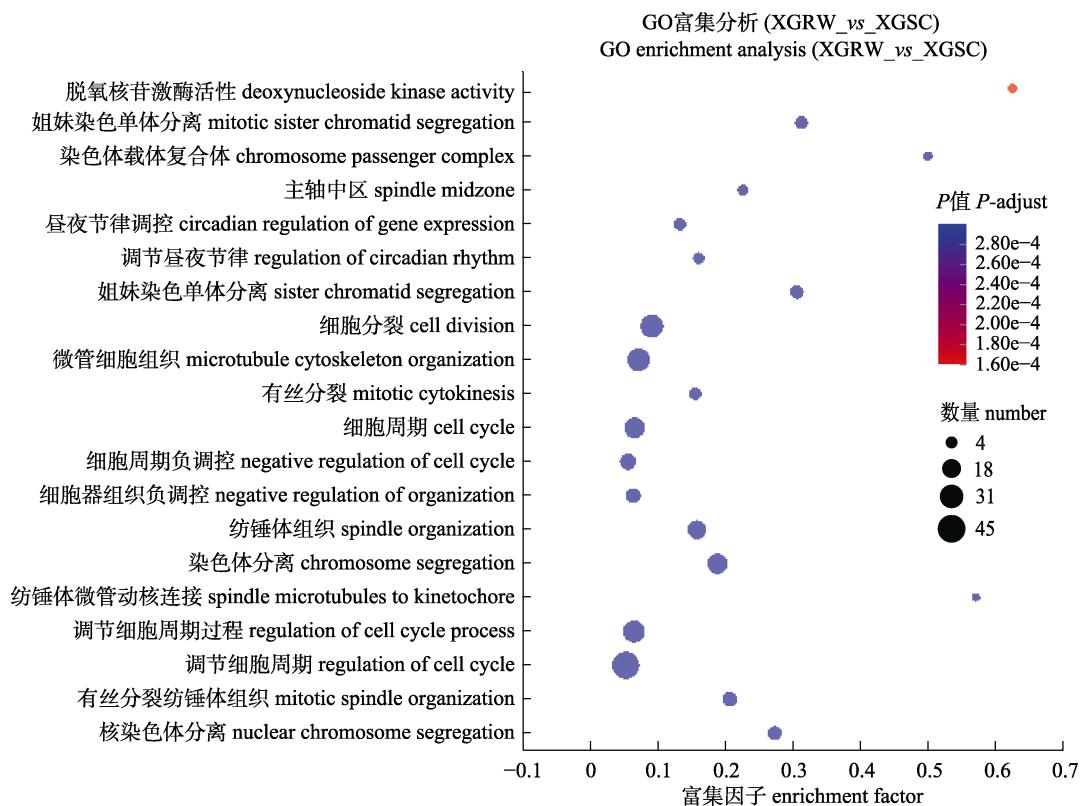


图 5 XGRW vs XGSC 组中 GO 富集分析结果(富集排名前 20)

Fig. 5 Results of GO function enrichment analysis in XGRW vs XGSC groups (top20)

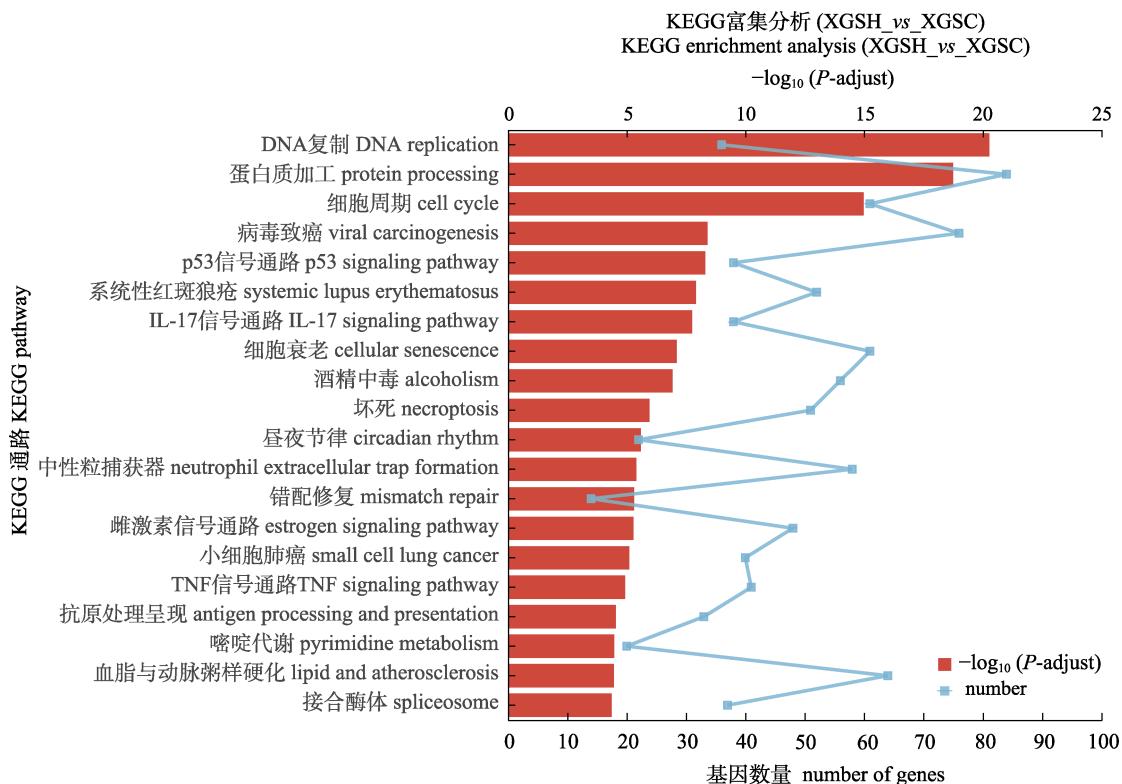


图 6 XGSH vs XGSC 组中 KEGG pathway 富集分析结果(富集排名前 20)  
Fig. 6 Results of KEGG pathway function enrichment analysis in XGSH vs XGSC groups (top20)

在 XGRW vs XGSH 组之间共有 1786 个 DEGs 在 KEGG 通路被发现显著富集, 有效富集到 41 条 KEGG 通路上, 其中主要包括内质网中的蛋白质加工(89 个基因)、昼夜节律(29 个基因)、抗原处理和呈递(41 个基因)、细胞凋亡(49 个基因)、系统性红斑狼疮(53 个基因)、IL-17 信号通路(28 个基因)等, 这些通路主要涉及到治疗相关疾病方面(图 7)。

在 XGRW vs XGSC 组之间发现有 675 个 DEGs 在 KEGG 通路显著富集, 其中有效富集到 15 条 KEGG 通路, 主要包括昼夜节律(Circadian rhythm, 16 个基因)、细胞周期(Cell cycle, 25 个基因)、卵母细胞减数分裂(Oocyte meiosis, 22 个基因)、孕激素介导的卵母细胞成熟(Progesterone-mediated oocyte maturation, 17 个基因)、p53 信号通路(p53 signaling pathway, 13 个基因)、近曲小管的重吸收碳酸盐(Proximal tubule bicarbonate reclamation, 9 个基因)等, 这些通路主要涉及到治疗疾病以及相关恢复等方面(图 8)。

## 2.7 RT-qPCR 验证 RNA-seq 结果

在 XGSH vs XGSC 组选取了 5 个 DEGs (*HSP90a*、*HIF-1α*、*IL-1β*、*CASP3* 和 *IL8*) 进行 RT-qPCR 试验来验证 RNA-seq 的准确性。这些基因的表达与转录组测序获得的结果显示了相似的表达水平且升降趋势相同, 表明转录组测序结果准确可信(图 9)。

## 3 讨论

### 3.1 高温胁迫与复温恢复下氧化应激指标变化

Billard 等<sup>[16]</sup>发现, 鲤作为一种变温动物, 可以在接近 0 ℃ 到超过 30 ℃ 的宽温度范围内生存。Vinagre 等<sup>[17]</sup>的研究结果中表明, 鱼类的脂质过氧化对环境温度非常敏感, 温度超过一定阈值下会发生氧化应激反应<sup>[18]</sup>。本研究发现热胁迫对兴国红鲤幼鱼的氧化应激水平具有显著影响。在高温胁迫阶段, 兴国红鲤幼鱼的 MDA 含量显著增加。MDA 是脂质过氧化的二次产物, 可作为氧化应激的标志物<sup>[19]</sup>, 产生氧化应激时, 其活性氧

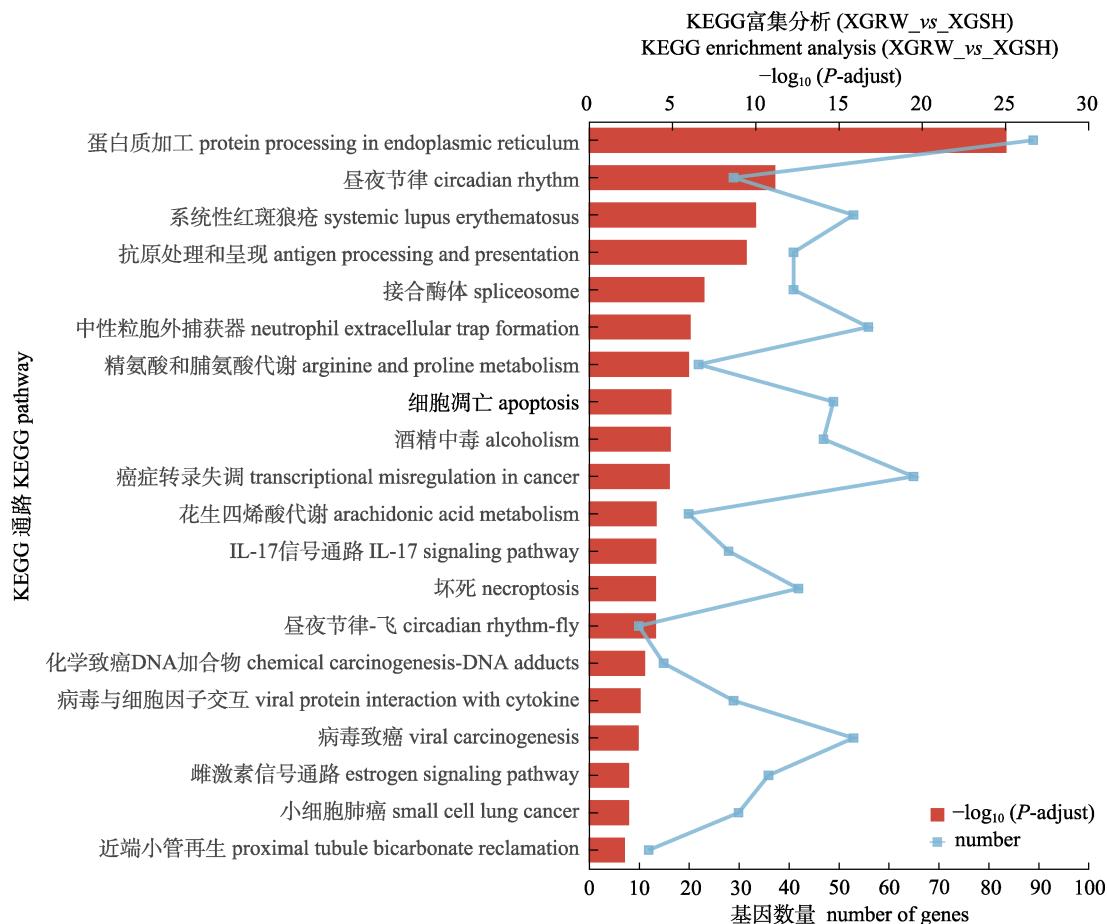


图 7 XGRW vs XGSH 组中 KEGG pathway 富集分析结果(富集排名前 20)

Fig. 7 Results of KEGG pathway function enrichment analysis in XGRW vs XGSH groups (top20)

(ROS)大量积累,当 ROS 积累超过抗氧化防御系统的能力时,会引发脂质过氧化<sup>[20]</sup>。抗氧化酶则是中和或清除 ROS 的第一防线,包括 CAT、SOD 和 GSH-PX,这些酶在鱼类中已被广泛发现<sup>[21]</sup>,王涛等<sup>[22]</sup>的研究发现,在急性铜胁迫下河鲀 (*Takifugu fasciatus*) 通过提升 CAT、SOD 和 GSH-PX 来清除 ROS。本研究中兴国红鲤幼鱼在高温胁迫下 CAT 活性显著下调, SOD 与 GSH-PX 活性无显著变化,这与 Liu 等<sup>[23]</sup>的研究结果相似,即武昌鱼 (*Megalobrama amblycephala*) 在热应激下抗氧化酶活性显著下降,这种现象是由于高温导致抗氧化酶的失活和破坏<sup>[24]</sup>。在复温恢复阶段,兴国红鲤幼鱼的 SOD 活性显著下降,其余无明显差异,在其他鱼类的研究中也出现相似的结果,如双带鲷 (*Diplodus vulgaris*)<sup>[25]</sup> 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[26]</sup>,这些结果表明,在高温胁迫下,鱼体的抗氧化酶很可能已经失活,导致其抗氧化系统

受到了抑制。此外,过量 ROS 的形成会导致 DNA 损伤,出现抗氧化酶降解的现象,这也可能是抗氧化酶减少的原因之一<sup>[27]</sup>。综上所述,高温胁迫降低了兴国红鲤幼鱼的抗氧化防御能力并扰乱生理平衡,致使脂质过氧化损伤,并在复温后也未能及时恢复。

### 3.2 高温胁迫与复温对细胞免疫与细胞凋亡相关通路和基因表达的影响

在 Makrinos 等<sup>[28]</sup>和 Valero 等<sup>[29]</sup>的研究中发现,水温会影响鱼类的生理机能,包括免疫反应。尤其是在夏季的,高温环境会抑制鱼类机体的免疫系统。Ndong 等<sup>[30]</sup>研究发现莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 被转移至高温环境后免疫力会降低,细胞凋亡增加,染病风险升高。Guijarro 等<sup>[31]</sup>曾表明,鱼类对各种病原体的免疫反应也会因温度影响而降低。由此可见,温度是变温脊椎动物细胞免疫、凋亡的重要影响因素。

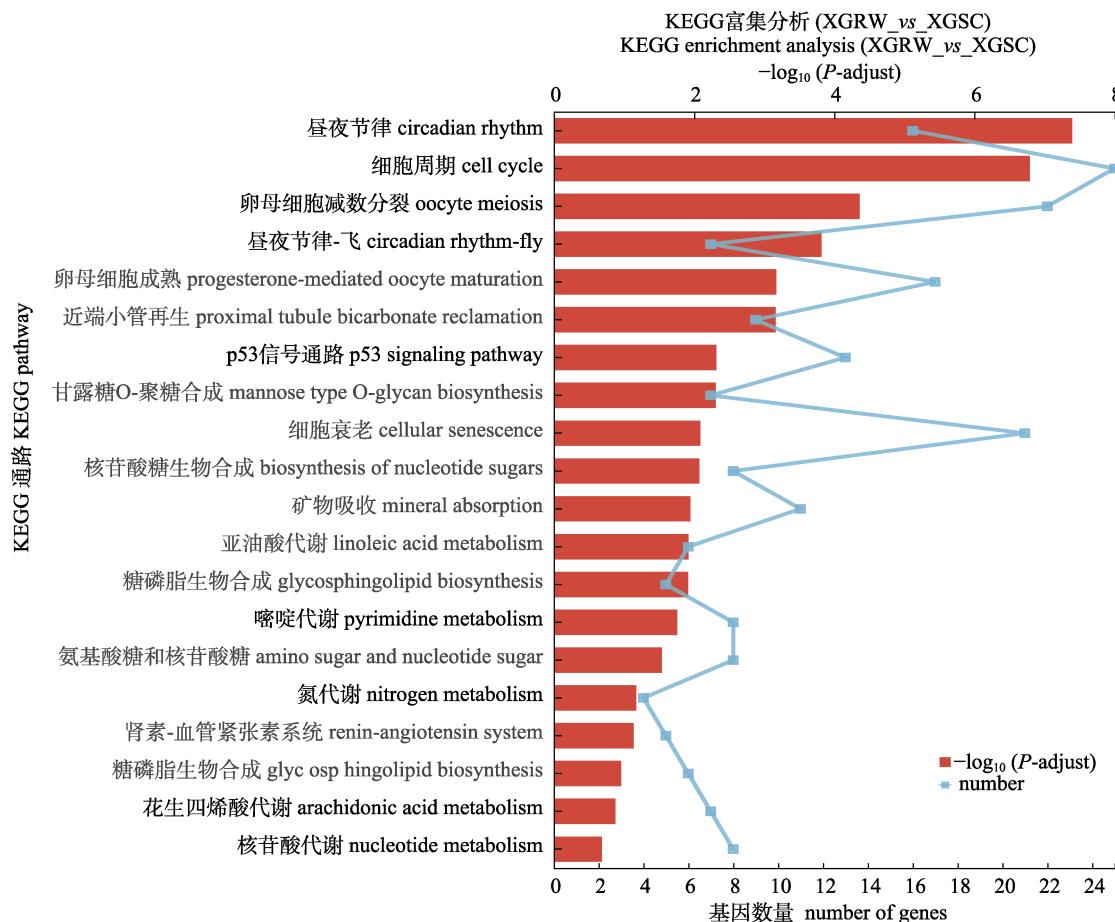


图 8 XGRW vs XGSC 组中 KEGG pathway 富集分析结果(富集排名前 20)

Fig. 8 Results of KEGG pathway function enrichment analysis in XGRW vs XGSC groups (top20)

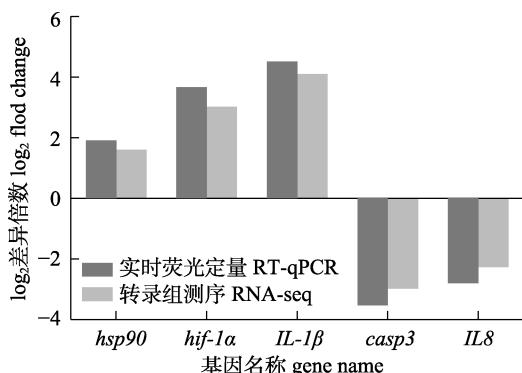


图 9 RT-qPCR 与 RNA-seq 基因表达量的比较

Fig. 9 Comparison of gene expression between RT-qPCR and RNA-seq

在本研究中, 通过 KEGG 分析发现, 显著富集的与细胞免疫相关的信号通路有内质网蛋白加工、NF-kappa B 信号通路和 IL-17 信号通路, 筛选到与细胞免疫相关的差异表达基因有 HSPs (*HSP40*、*HSP70*、*HSP90*)、*IL-8*、*IL-1β* 等。Chen

等<sup>[32]</sup>发现分子伴侣 HSPs 在维持细胞内稳态中起到关键作用, 并且通过 Calderwood 等<sup>[33]</sup>证明每一类的 HSP 在炎症和免疫平衡方面发挥重要作用。对鮈(*Miichthys miuy*)的研究中发现, NF-kappa B 信号通路受到抑制会影响到免疫反应<sup>[34]</sup>, 同时 Kim 等<sup>[35]</sup>在研究褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)时证明 NF-kappa B 信号通路受到 IL-8 趋化因子的激活。在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的研究中发现, 通过激活 *IL-1β* 基因的表达来促进炎症反应<sup>[36]</sup>, 而 *IL-1β* 基因主要由 IL-17 信号通路激活。对高温组和对照组进行转录组测序, 结果显示高温组的 HSPs (*HSP40*、*HSP70*、*HSP90*) 和 *IL-1β* 基因以及 IL-17 信号通路表达显著上调或激活, *IL-8* 基因和 NF-kappa B 信号通路表达显著下调或抑制。表明在高温胁迫后, 兴国红鲤幼鱼虽然通过 HSPs 的上调表达来维持机体稳定, 但是激活

了 IL-17 信号通路, 产生了炎症反应, 同时下调了 NF-kappa B 信号通路, 抑制免疫系统。在对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)鳃组织和肝脏组织的研究发现它们的变化趋势一致, 高温下调了鳃组织和肝脏组织免疫相关基因的表达(如 *IL-8*), 抑制了机体的免疫系统<sup>[37]</sup>, 与本研究结果相似, 为本研究用鳃组织分析兴国红鲤幼鱼的氧化应激和适应机制提供了支持。而复温恢复后与高温组相比, 细胞免疫相关基因表达显著下调, 表明热应激对兴国红鲤幼鱼产生了不可逆的损伤, 导致免疫应答功能下降。

通过 KEGG 分析发现, 显著富集的与细胞凋亡相关的信号通路主要是细胞凋亡和 P53 信号通路, 筛选出与细胞凋亡相关的关键差异表达基因 *Caspases* (*Caspase3*、*Caspase6*、*Caspase7* 和 *Caspase8*) 和 *P53*。在细胞凋亡过程中, 每一类的 *Caspase* 相互配合以达到促进细胞凋亡, 例如 *Caspase3* 会被 *Caspase8* 直接或间接激活, 并催化一些关键细胞蛋白的切割<sup>[38]</sup>。在对河鲀的研究中发现, *P53* 信号通路可能在热应激诱导的细胞凋亡中发挥重要作用<sup>[39]</sup>。对高温组和对照组进行转录组测序, 结果显示高温组的 4 种 *Caspases* 和 *P53* 信号通路表达显著下调或抑制。表明在高温胁迫后兴国红鲤幼鱼鳃组织的细胞凋亡受到抑制, 这一结果一方面与 Cheng 等<sup>[14]</sup>研究结果一致, 会增强细胞的存活能力, 另一方面可能会导致无法有效清除异常和受损细胞, 促使炎症的发生。根据机体的氧化损伤, 本研究结果更倾向于后者。复温恢复后与高温组相比, 细胞凋亡相关基因无显著变化, 表明热应激对兴国红鲤幼鱼产生了不可逆的损伤, 或者是需要更多的时间进行恢复, 导致细胞凋亡调控功能下降。

### 3.3 高温胁迫与复温对缺氧调节相关通路和基因表达的影响

在 Stehfest 等<sup>[40]</sup>的研究中发现, 较高的温度会降低氧气的溶解度, 也会增加鱼类新陈代谢率, 从而增加需氧量。对大西洋鲑(*Salmo salar*)的相关研究中发现热耐受性和缺氧耐受性在功能上相关<sup>[41]</sup>, Remen 等<sup>[42]</sup>表明极限氧饱和度会随着水温的上升而增加, 因此在高温下, 氧气的供给和

需求不匹配会导致组织缺氧。在本研究中, 经 KEGG 富集分析发现, 与缺氧调节相关的 HIF-1 信号通路被显著富集, 筛选到 *HIF-1α* 与 *HIF-1β* 关键亚基显著差异表达。当生物处于低氧环境时, *HIF-1α* 被激活, 与 *HIF-1β* 一起作用, 直接调节参与缺氧反应特定基因的转录<sup>[43]</sup>。大量研究表明, *HIF-1α* 显著差异表达, 起到血管生成、能量代谢改变以及炎症调节等作用<sup>[44-46]</sup>, 但其主要的作用是应对缺氧环境, 如武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*)<sup>[47]</sup>、石首鱼(*Leiostomus xanthurus*)<sup>[48]</sup> 和胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)<sup>[49]</sup> 等处于缺氧环境时, 其不同组织中的 *HIF-1α* 均显著富集上调表达。本研究高温胁迫后, 兴国红鲤幼鱼鳃组织的 *HIF-1α* 与 *HIF-1β* 显著上调, 表明在高温胁迫下兴国红鲤幼鱼的鳃组织出现了缺氧, 通过上调基因的表达来响应低氧环境刺激, 但这仅仅代表着鳃组织, 其他组织是否也发生了缺氧呢? 在青鳉(*Oryzias latipes*)缺氧的研究中表明, 虽然不同组织(鳃、脑和肝脏)的基因表达差异有所不同, 但是导致的代谢趋势趋于一致, 不同组织 HIF-1 的靶基因均显著表达<sup>[50]</sup>, 表明鳃、脑和肝脏组织均出现缺氧情况, 这也为兴国红鲤幼鱼的其他组织缺氧提供一定的佐证。复温恢复后, *HIF-1α* 显著下调, 与常温组无显著差异, 表明机体不再缺氧。根据氧限热耐受模型, 变温动物会在最佳温度范围之外时出现功能性缺氧<sup>[51]</sup>。在本研究中, 笔者验证热应激诱导缺氧信号假设的同时, 也证明了 38 ℃ 超出了兴国红鲤幼鱼的适宜温度范围。

## 4 结论

本研究通过转录组测序技术对高温胁迫和复温恢复的兴国红鲤幼鱼鳃组织进行了转录组学分析, 揭示了该过程中细胞免疫、细胞凋亡和缺氧因子的变化。基因表达情况表明, 在高温胁迫后, 其细胞免疫与细胞凋亡受到抑制, 产生脂质过氧化损伤, 同时机体出现缺氧症状; 复温后, 缺氧症状消除, 但机体细胞免疫与细胞凋亡依旧受到抑制。该研究为揭示水产养殖物种适应高温环境的分子机制提供了理论依据。

## 参考文献:

- [1] Abernethy S, Jackson R B. Global temperature goals should determine the time horizons for greenhouse gas emission metrics[J]. Environmental Research Letters, 2022, 17(2): 024019.
- [2] Nita I A, Sfica L, Voiculescu M, et al. Changes in the global mean air temperature over land since 1980[J]. Atmospheric Research, 2022, 279: 106392.
- [3] Li S, Guo H, Chen Z Y, et al. Effects of acclimation temperature regime on the thermal tolerance, growth performance and gene expression of a cold-water fish, *Schizothorax prenanti*[J]. Journal of Thermal Biology, 2021, 98: 102918.
- [4] Fu K K, Fu C, Qin Y L, et al. The thermal acclimation rate varied among physiological functions and temperature regimes in a common cyprinid fish[J]. Aquaculture, 2018, 495: 393-401.
- [5] Steinhausen M F, Sandblom E, Eliason E J, et al. The effect of acute temperature increases on the cardiorespiratory performance of resting and swimming sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*)[J]. Journal of Experimental Biology, 2008, 211(Pt 24): 3915-3926.
- [6] Barbarossa V, Bosmans J, Wanders N, et al. Threats of global warming to the world's freshwater fishes[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1701.
- [7] Wang W Q, Zhao H H, Yang F Y. Influence of meteorological conditions on cold-water fish culture and key points of meteorological service[J]. Agricultural Technology Service, 2017, 34(12): 88-89. [王宛青, 赵恒和, 杨发源. 气象条件对冷水鱼养殖的影响及气象服务要点[J]. 农技服务, 2017, 34(12): 88-89.]
- [8] 李姗蔚, 韩世成, 刘英杰, 等. 高温胁迫下虹鳟肝脏代谢组学研究[J]. 中国水产科学, 2022, 29(8): 1168-1178. [Li Shanwei, Han Shicheng, Liu Yingjie, et al. Metabolomics of rainbow trout liver under heat stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(8): 1168-1178.]
- [9] Tunsjø H S, Paulsen S M, Mikkelsen H, et al. Adaptive response to environmental changes in the fish pathogen *Moritella viscosa*[J]. Research in Microbiology, 2007, 158(3): 244-250.
- [10] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. Physiological Reviews, 2005, 85(1): 97-177.
- [11] Shuang L, Su X L, Zheng G D, et al. Effects of hypoxia and reoxygenation on gill remodeling, apoptosis, and oxidative stress in hypoxia-tolerant new variety blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2022, 48(1): 263-274.
- [12] Harper C, Wolf J C. Morphologic effects of the stress response in fish[J]. ILAR Journal, 2009, 50(4): 387-396.
- [13] Wang Y Y, Wang J S, Liu X X, et al. Identification of purge red carp and Xingguo red carp based on SNP markers[J]. Food and Nutrition in China, 2021, 27(8): 21-23, 41. [王彦云, 王济世, 刘晓夏, 等. 基于 SNP 标记的荷包红鲤与兴国红鲤鉴别研究[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(8): 21-23, 41.]
- [14] Cheng X B, Li F C, Lu J J, et al. Transcriptome analysis in gill reveals the adaptive mechanism of domesticated common carp to the high temperature in shallow rice paddies[J]. Aquaculture, 2024, 578: 740107.
- [15] Xu P, Zhang X F, Wang X M, et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. Nature Genetics, 2014, 46(11): 1212-1219.
- [16] Billard R, Cosson J, Perche G, et al. Biology of sperm and artificial reproduction in carp[J]. Aquaculture, 1995, 129(1-4): 95-112.
- [17] Vinagre C, Madeira D, Narciso L, et al. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*[J]. Ecological Indicators, 2012, 23: 274-279.
- [18] Madeira D, Narciso L, Cabral H N, et al. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology, 2013, 166(2): 237-243.
- [19] Lee J W, Jo A H, Lee D C, et al. Review of cadmium toxicity effects on fish: Oxidative stress and immune responses[J]. Environmental Research, 2023, 236: 116600.
- [20] Stara A, Machova J, Velisek J. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L. )[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2012, 33(2): 334-343.
- [21] Ma Y B, Zhou X Q, Jiang W D, et al. Tea polyphenols protect against *Flavobacterium columnare*-induced gill injury via suppression of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in grass carp[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 254: 127050.
- [22] Wang T, Wang W, Cheng T Q, et al. Effects of acute copper stress from copper accumulation, oxidative stress, digestive enzymes, tissue lesions, and gene expression related to lipid metabolism in *Takifugu fasciatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(6): 1144-1152. [王涛, 王玮, 陈同庆, 等. 急性铜胁迫对暗纹东方鲀组织铜积累、氧化应激、消化酶、组织病变及脂代谢相关基因表达的影响 [J].]

- 中国水产科学, 26(6): 1144-1152.]
- [23] Liu B, Xu P, Brown P B, et al. The effect of hyperthermia on liver histology, oxidative stress and disease resistance of the Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 52: 317-324.
- [24] Abele D, Puntauro S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology, 2004, 138(4): 405-415.
- [25] Madeira D, Narciso L, Cabral H N, et al. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2013, 166(2): 237-243.
- [26] Topal A, Özdemir S, Arslan H, et al. How does elevated water temperature affect fish brain? (a neurophysiological and experimental study: Assessment of brain derived neurotrophic factor, cFOS, apoptotic genes, heat shock genes, ER-stress genes and oxidative stress genes)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 115: 198-204.
- [27] Wang Y F, Li C J, Pan C L, et al. Alterations to transcriptomic profile, histopathology, and oxidative stress in liver of pikeperch (*Sander lucioperca*) under heat stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 95: 659-669.
- [28] Makrinos D L, Bowden T J. Natural environmental impacts on teleost immune function[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 53: 50-57.
- [29] Valero Y, García-Alcázar A, Esteban M Á, et al. Seasonal variations of the humoral immune parameters of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. )[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(2): 185-187.
- [30] Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H, et al. The immune response of Tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(6): 686-694.
- [31] Guijarro J A, Cascales D, García-Torrico A I, et al. Temperature-dependent expression of virulence genes in fish-pathogenic bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 700.
- [32] Chen W, Feng P M, Liu T, et al. Recent advances in machine learning methods for predicting heat shock proteins[J]. Current Drug Metabolism, 2019, 20(3): 224-228.
- [33] Calderwood S K, Gong J L, Murshid A. Extracellular HSPs: The complicated roles of extracellular HSPs in immunity[J]. Frontiers in Immunology, 2016, 7: 159.
- [34] Xu T J, Chu Q, Cui J X, et al. The inducible microRNA-203 in fish represses the inflammatory responses to Gram-negative bacteria by targeting IL-1 receptor-associated kinase 4[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(4): 1386-1396.
- [35] Kim K H, Kim H C, Park C J, et al. Interleukin-8 (IL-8) expression in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) challenge[J]. Development & Reproduction, 2019, 23(3): 231-238.
- [36] Wang X Y, Yang X, Wen C, et al. Grass carp TGF- $\beta$ 1 impairs IL-1 $\beta$  signaling in the inflammatory responses: Evidence for the potential of TGF- $\beta$ 1 to antagonize inflammation in fish[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 59: 121-127.
- [37] Sun J L, Zhao L L, Liao L, et al. Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 923-936.
- [38] Hegazy A M, Chen N, Lin H Z, et al. Induction of apoptosis in SSN-1 cells by Snakehead Fish Vesiculovirus (SHVV) via Matrix protein dependent intrinsic pathway[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 113: 24-34.
- [39] Cheng C H, Guo Z X, Luo S W, et al. Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 150: 190-198.
- [40] Stehfest K M, Carter C G, McAllister J D, et al. Response of Atlantic salmon *Salmo salar* to temperature and dissolved oxygen extremes established using animal-borne environmental sensors[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4545.
- [41] Anttila K, Dhillon R S, Boulding E G, et al. 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, 2013, 216(Pt 7): 1183-1190.
- [42] Remen M, Oppedal F, Imsland A K, et al. Hypoxia tolerance thresholds for post-smolt Atlantic salmon: Dependency of temperature and hypoxia acclimation[J]. Aquaculture, 2013, 416: 41-47.
- [43] Wang J, He Z, Cui M Z, et al. Hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  promotes *Listeria monocytogenes* invasion into *Tilapia*[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(5): e0140523.
- [44] Kim J W, Tchernyshyov I, Semenza G L, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia[J]. Cell Metabolism, 2006, 3(3): 177-185.
- [45] Semenza G L. Oxygen-dependent regulation of mitochond-

- rial respiration by hypoxia-inducible factor 1[J]. Biochemical Journal, 2007, 405(1): 1-9.
- [46] Bandarra D, Biddlestone J, Mudie S, et al. HIF-1 $\alpha$  restricts NF- $\kappa$ B-dependent gene expression to control innate immunity signals[J]. Disease Models & Mechanisms, 2015, 8(2): 169-181.
- [47] Shen R J, Jiang X Y, Pu J W, et al. HIF-1alpha and-2alpha genes in a hypoxia-sensitive teleost species *Megalobrama amblycephala*: CDNA cloning, expression and different responses to hypoxia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 2010, 157(3): 273-280.
- [48] Smith M J, Gelsleichter J, Smith K J. Protein expression of hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) in spot (*Leiostomus xanthurus*) exposed to constant and diel-cycling hypoxia[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2012, 424: 1-4.
- [49] Chen N, Chen L P, Zhang J, et al. Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 $\alpha$ /2 $\alpha$ /3 $\alpha$  of the hypoxia-sensitive freshwater species, Chinese sucker[J]. Gene, 2012, 498(1): 81-90.
- [50] Ju Z L, Wells M C, Heater S J, et al. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology, 2007, 145(1): 134-144.
- [51] Pörtner H O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology, 2002, 132(4): 739-761.

## Analysis of oxidative stress and acclimatization mechanism of gill tissues of Xingguo red carp juvenile fish (*Cyprinus carpio* var. *singuonensis*) by high temperature stress and cooling recovery

YU Zihao, LU Junjie, SUN Jiamin, HU Wenjing, XU Yetong, LIU Qigen

Shanghai Ocean University; Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Integrated Rice-fish Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Increasing global temperature is causing water temperatures to increase, potentially leading to metabolic disorders in fish. The Xingguo red carp (*Cyprinus carpio* var. *singuonensis*) is an economically important fish in China; however, studies on its adaptation mechanism to high temperatures are relatively few. To analyze the changes in physiological regulation under heat stress, the present study simulated an acute high-temperature environment and cooling environment, and gill tissues of Xingguo red carp at different temperature levels (28 °C and 38 °C) were examined. The results of enzyme activity indices showed that malondialdehyde (MDA) increased significantly and catalase (CAT) content decreased significantly after high temperature stress, whereas no significant difference was observed in glutathione peroxidase (GSH-PX) and superoxide dismutase (SOD). The SOD content decreased significantly after cooling, and the rest of the indicators were not significantly different. Using transcriptome sequencing analysis, 2643 differentially expressed genes (DEGs) were screened for differential genes between the high- and normal-temperature groups, of which 1,401 DEGs were upregulated and 1,242 were downregulated in Xingguo Red Carp. A total of 2396 DEGs were screened to compare the cooled and high-temperature groups, including 936 upregulated DEGs and 1460 downregulated DEGs. In comparing the cooled and normal-temperature groups, a total of 908 DEGs were screened, of which 300 DEGs were upregulated and 608 DEGs were downregulated. Meanwhile, the activation and involvement of DEGs in immune and apoptosis-related pathways were identified using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis, such as endoplasmic reticulum protein processing, IL-17 signaling pathway, NF-κB signaling pathway, p53 signaling pathway, and apoptosis. Within these pathways, key signaling factors such as *HSPs*, *IL-1β*, *IL-8*, *p53*, *Caspase-3*, and *HIF-1α* showed different expression trends. The results showed that Xingguo red carp responds to high-temperature stress stimuli during high temperature stress by positively upregulating gene expression. However, the expression of Xingguo red carp immune-related genes and pathways were downregulated or suppressed, leading to suppression of the immune system, while apoptosis regulation was blocked, preventing the effective removal of abnormal and damaged cells. Furthermore, no signs of hypoxia existed. Following cooling recovery, the stress of the Xingguo red carp decreased. The immune response of Xingguo red carp was activated, and the inflammatory symptoms were reduced, but they did not recover completely. The symptoms of hypoxia returned to normal. These two levels were used to systematically investigate the physiological regulation mechanism of Xingguo red carp in high temperature environment. This study provides valuable information on how aquatic species adapt to high-temperature environments.

**Key words:** *Cyprinus carpio* var. *singuonensis*; heat stress; oxidative stress; transcriptomics; gill

**Corresponding author:** LIU Qigen. E-mail: qgliu@shou.edu.cn