

基于肠转录组学探究 NaHCO_3 碱度胁迫下红罗非鱼应激响应与耐受机制

陶易凡¹, 曹巍², 华吉祥¹, 李祖辰³, 姜冰洁¹, 张会昆³, 马雪彬⁴, 路思琪¹, 强俊¹

1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 河北省渤海鱼类种质资源保护与利用重点实验室, 河北 秦皇岛 066100;

3. 唐山市水产技术推广站, 河北 唐山 063200;

4. 沧州市农林科学院, 河北 沧州 061001

摘要: 为探究红罗非鱼(*Oreochromis spp.*)对 NaHCO_3 碱度胁迫的应激响应机制, 本研究以初始体重为(73.43 ± 1.62) g 的红罗非鱼作为研究对象, 进行 40 d NaHCO_3 碱度胁迫, 比较 NaHCO_3 碱度胁迫组[CA, (35.51 ± 0.17) mmol/L]和淡水对照组[Con, (1.75 ± 0.08) mmol/L]红罗非鱼血清生理参数、肠组织学和肠转录组差异。结果显示, 红罗非鱼血清过氧化氢酶(CAT)活性与总抗氧化能力(TAOC)、丙二醛(MDA)、血氨和尿素氮(BUN)水平在碱度胁迫下显著增加($P<0.05$); 碱度胁迫导致红罗非鱼肠绒毛缩短和肠上皮损伤等现象的发生; 肠转录组学分析共获得 2853 个差异表达基因, 其中上调基因 1674 个, 下调基因 1179 个。富集分析揭示了红罗非鱼肠组织响应碱胁迫的关键通路(内吞作用、氨基酸生物合成和 IgA 生成相关肠道免疫网络等), 这些途径主要涉及物质跨膜运输、能量代谢和免疫响应等生物学过程。qRT-PCR 检测验证 12 个碱应激响应关键基因转录水平的表达。结果表明, 碱度胁迫会损伤红罗非鱼肠道组织结构, 并造成其氧化应激; 肠道运输、代谢和免疫响应关键基因表达的变化是红罗非鱼耐受高碱度环境的重要策略, 本研究结果能够为阐释红罗非鱼对环境碱度的适应性调节机制提供理论参考。

关键词: 红罗非鱼; 碱度胁迫; 转录组测序; 肠道; 盐碱水

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)08-0897-13

水产养殖业对世界粮食安全做出了重大贡献, 但有限的养殖水体限制了水产养殖业的发展^[1]。盐碱水域开发利用是促进水产养殖业可持续发展的有效途径之一。中国盐碱地分布广阔、类型多, 其中约有低洼盐碱水域 4600 万 hm^2 ^[2]。盐碱水具有高碱、高 pH、离子组成复杂等特点, 会严重影响鱼类的生长、生存和繁殖^[3-4]。绝大部分盐碱水域难以通过移植驯化常规的淡水和海水水产经济动物实现开发利用^[5]。因此, 有必要了解鱼类对盐碱环境的适应机制, 培育耐盐碱鱼类优良品种。

高碳酸盐碱度是盐碱水的典型特征之一, 长

期暴露在高碱环境下会引起淡水鱼类排氨异常, 血浆和组织内氨的大量积累, 引发氨中毒甚至死亡^[6]。碱度胁迫可诱导鱼类产生过量的活性氧自由基(ROS), 导致氧化应激的发生^[7-8]。例如, Wei 等^[9]研究发现高碱度胁迫(60 mmol/L)会显著提高鲫(*Carassius auratus*)体内 MDA 含量, 并激活血清超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的活性, 引起氧化应激。肠道不仅是鱼类重要消化和吸收器官, 其在应激响应和免疫稳态维持中也起着至关重要的作用^[10]。相关研究表明, 高碱度环境会改变松浦镜鲤(*Cyprinus carpio Songpu*)^[11]、草

收稿日期: 2024-05-14; 修订日期: 2024-06-16.

基金项目: 国家重点研发计划-政府间国际科技创新合作重点专项(2022YFE0139600); 农业生物育种重大专项(2023ZD04065).

作者简介: 陶易凡(1992-), 男, 副研究员, 研究方向为水产动物生物育种. E-mail: taoyifan@ffrc.cn

通信作者: 强俊, 研究员, 研究方向为水产动物育种. E-mail: qiangj@ffrc.cn

鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[4]和瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)^[12]等鱼类肠组织结构,降低消化酶活性,引起肠道功能紊乱。但目前,鱼类肠道碱应激响应机制和途径仍不明晰。

罗非鱼具有生长快、肉质鲜美、抗逆能力强等特点,其适盐碱水养殖的潜力巨大^[13]。目前,已有一些学者对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)碱度代谢响应^[14]、耐受机制^[15]、良种选育^[16]和配套饲料开发^[17]等方面进行了研究工作。红罗非鱼(*Oreochromis spp.*)一般认为是由突变型红色莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)与其他种罗非鱼,如尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*),杂交,经多代选育而成的优良品种^[18]。红罗非鱼作为广盐性鱼类,耐盐性能出色^[19]。课题组前期研究发现红罗非鱼也具有较好的碱度耐受性,其可作为耐盐碱鱼类新品种选育的重要候选材料。然而关于红罗非鱼在碱度环境下的耐受和适应机制却鲜有报道。因此,本研究拟利用转录组测序技术和生物信息学分析挖掘红罗非鱼肠道碱应激响应关键基因和信号通路,并结合组织学观察和生理参数分析,以期为阐明红罗非鱼对环境碱度的适应性调节机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用红罗非鱼[体重(73.43±1.62) g,体长(13.68±0.14) cm]选自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心扬中基地。实验鱼在温度 25~26 °C,溶氧>6.0 mg/L 的环境中暂养两周,暂养期间每天 8:00 和 17:00 投喂商业浮性饲料(粗蛋白 32%,粗脂肪 5%),投喂量约为鱼体重的 3%。

1.2 实验设计与样品采集

实验在 6 个塑料养殖桶[直径×高度 0.8 m×1 m,水深 0.75 m]内进行,依据养殖水源可能达到的中高碱度值^[2]和罗非鱼碱度耐受结果^[15,17],设置 NaHCO₃碱度胁迫组[CA, 碱度(35.51±0.17) mmol/L]和淡水对照组[Con, 碱度(1.75±0.08) mmol/L],每组设置 3 个平行,每个平行放养红罗非鱼 20 尾。为了减少红罗非鱼的急性应激反应,CA 组采用 NaHCO₃(分析纯)配制相应碱度的水体,以每天 7 mmol/L

的速度上升至设定浓度后开始碱度胁迫实验。实验过程中每日换水 1/3,采用酸碱滴定法^[4]对水体碳酸盐碱度进行监测,并加入相应质量的 NaHCO₃使水体碱度维持在设定值。实验过程中其他养殖条件,如溶氧、水温和投喂频率等与暂养期一致。

胁迫实验持续 40 d,样品采集前禁食 24 h。采样时从每个平行随机取 3 尾实验鱼,使用 100 mg/L MS-222 进行麻醉处理,尾静脉采集血液,血样经 4 °C, 5000 g 离心 15 min 后收集血清,-20 °C 保存,用于血清生化参数检测。同时,剖取肠道组织去除肠道内容物后,液氮冷冻后置于-80 °C 冰箱保存,用于总 RNA 提取、反转录和测序。另外,从每桶中另取 1 尾鱼剖取肠道中段,保存于 4% 多聚甲醛中,用于组织切片观察。

1.3 血清生化参数的测定

血清中 SOD、CAT、总抗氧化能力(TAOC)、丙二醛(MDA)、血氨和尿素氮(BUN)水平的测定根据南京建成科技有限公司试剂盒说明进行。

1.4 HE 染色切片的制备

肠组织经 4% 多聚甲醛固定 24 h,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋处理后用切片机切成 4 μm 厚的组织切片,通过苏木精和伊红(HE)染色,封片后用光学显微镜进行观察。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对肠道绒毛高度、绒毛宽度和肌层厚度进行测量^[20]。

1.5 RNA 提取与转录组测序

使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, USA)提取肠组织总 RNA,并采用安捷伦 2100 生物分析仪和 Nano Drop 紫外分光光度计对总 RNA 浓度及完整性进行鉴定。将同组各平行 3 个样本等量提取的 RNA 混合,制备 CA_1、CA_2、CA_3、Con_1、Con_2 和 Con_3 共 6 个样品用于测序。通过 Oligo (dT)磁珠富集法分离真核 mRNA,并使用 mRNA-Seq 文库准备试剂盒(Illumina, USA)构建测序文库^[21]。文库定量检查合格后,使用 NovaseqTM 6000 平台进行上机测序。

1.6 数据拼接与功能注释

使用 cutadapt 1.9 软件^[22]处理原始下机数据,包括去除含 N 比例大于 5% 的未知 reads、接头污

染的 reads 和低质量 reads (质量值 $Q \leq 10$ 的碱基占总碱基的 20%)。使用 HISAT2 软件^[23]将过滤得到的 clean reads 比对到参考基因组(*O. niloticus* ASM185804v2)^[24]来获得注释信息。

1.7 差异基因筛选和富集分析

利用 StringTie 软件^[25]计算 FPKM 值, 采用 DEseq2 软件^[26]筛选 CA 组和 Con 组间的差异表达基因(DEGs), 筛选阈值为差异倍数 $|\log_2(\text{FC})| \geq 1$ 且 $P \leq 0.05$ 。对筛选得到的 DEGs 进行 GO 功能注

释、KEGG 通路富集分析和 GSEA 分析, 显著富集标准为 $P < 0.05$ 。

1.8 实时荧光定量 PCR

根据 PrimeScrip™ RT Master Mix (Takara) 试剂盒说明逆转录合成 cDNA, 并利用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 试剂盒在 ABI Q5 荧光定量仪上 qRT-PCR 反应。每个样品重复 3 次, β -actin 用作内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[27]计算基因的相对表达水平。引物序列如表 1 所示。

表 1 用于 qRT-PCR 的引物序列
Tab. 1 Primer sequences for qRT-PCR

引物名称 primer name	正向引物序列(5'-3') forward primer sequences (5'-3')	反向引物序列(5'-3') reverse primer sequences (5'-3')
ass1	CAAGATCATCGCACCCCTGGA	TGCGAGCTTACCTGGGATT
sams	TGTTCACGTCCGAGTCTGTC	GGTCTACCGTGGCTTGAT
tpi	GCTTCGCAAGTTCTCGTGG	TTGGATCGGGCAAAGTCCAG
ldlr	TTCCAGGCCACACTCTTTAGGT	AACGTAGCAGCTTGGTGATT
snx4	GACCAAACGGGAGCGGATG	GCATTTTGCCGCTCCTCTTC
snx6	AATAGCAGTGGCCTGTGGAC	GCCCAGTCCAAGAGTGTCA
ccr9	GGGGTTAACATTCAAGGGGCT	CTCGTCTCTGGTGCCTCTTG
cxcr4	CTTGGCAGTTGTACGGGCTA	CCGTGTCCCTCGCTTCTTCT
tnfsf13b	ACGCTTCCGTTCCAGAGA	TGCACCGACACATATTATCCCA
nlrp1b	TCTACAAACTGTCCCAGTGC	TGTTCTCAGTGACGGCAAGTT
nampt	GGACTAGGGGTGAGGACCG	CAAAGTCTCCGCTCTGGGTC
il1 β	TGAACATACAAGTTAACAGCAGA	AGTGTGGTCATTAACCCGT
β -action	GTACCACCATGTACCCCTGGC	TGAAGTTGTTGGCGTTGG

1.9 统计分析

本实验使用 SPSS22.0 软件进行统计分析, 结果均以平均值±标准误($\bar{x} \pm \text{SE}$)表示。使用独立样本 t 检验评估 CA 组和 Con 组血清生化、肠道形态学和 qRT-PCR 检测结果之间的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 血清生化参数

碱度胁迫 40 d 后, CA 组红罗非鱼血清 CAT 活性与 TAOC、MDA、血氨和 BUN 水平显著高于 Con 组($P < 0.05$)。CA 组红罗非鱼血清 SOD 活力呈上升趋势, 但与 Con 组无显著差异($P > 0.05$)(表 2)。

2.2 肠道组织学特征

碱度胁迫 40 d 后, Con 组红罗非鱼肠道组织结构完整, 肠绒毛完好无损伤(图 1b), 而 CA 组肠

表 2 碱度胁迫对红罗非鱼血清生化参数的影响

Tab. 2 Effects of alkalinity stress on serum biochemical indexes of red tilapia

指标 index	碱度胁迫组 CA group	淡水对照组 Con group	$n=9; \bar{x} \pm \text{SE}$
TAOC/(U/mL)	2.95±0.19*	2.13±0.13	
SOD/(U/mL)	55.71±4.37	44.70±3.83	
CAT/(U/mL)	132.91±5.92*	99.91±6.48	
MDA/(nmol/mL)	6.58±0.31*	5.08±0.25	
血氨/($\mu\text{mol/L}$) serum ammonia	338.8±20.52*	181.16±17.14	
BUN/(mmol/L)	3.56±0.31*	1.90±0.21	

注: *表示两组间存在显著差异($P < 0.05$)。

Note: * indicates a significant difference between two groups ($P < 0.05$).

道绒毛上皮出现破损脱落的现象(图 1a)。Image-Pro Plus 6.0 软件分析结果显示, CA 组肠道绒毛长度及肌层厚度显著低于 Con 组($P < 0.05$), 肠道绒毛宽度在两组间未存在显著差异($P > 0.05$)(表 3)。

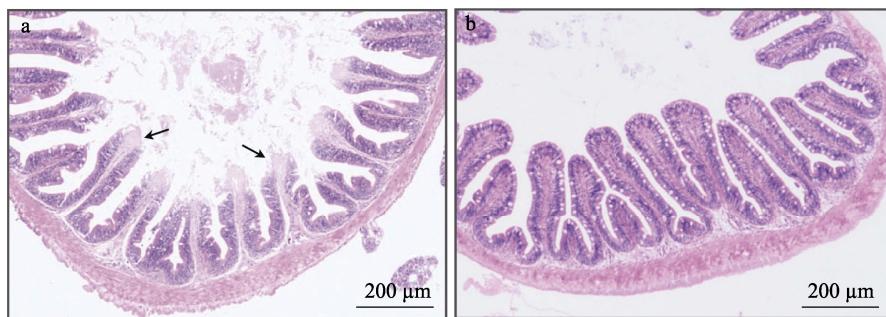


图 1 NaHCO_3 碱度胁迫对红罗非鱼肠道组织结构的影响

a. NaHCO_3 碱度胁迫组; b. 淡水对照组; 黑色箭头: 肠绒毛上皮部分脱落、破损.

Fig. 1 Effects of NaHCO_3 alkalinity stress on intestinal histological structure of red tilapia
a. CA group; b. Con group; black arrow: intestinal villous epithelium was partially exfoliated and broken.

表 3 NaHCO_3 碱度胁迫下红罗非鱼
肠道组织测量参数变化

Tab. 3 Changes in intestinal histological parameters
of red tilapia under NaHCO_3 alkalinity stress

指标/ μm index	碱度胁迫组 CA group	淡水对照组 Con group
绒毛长度 fluff length	$314.86 \pm 14.86^*$	430.38 ± 24.95
绒毛宽度 fluff width	93.25 ± 4.43	96.61 ± 3.28
肌层厚度 muscle layer thickness	$56.42 \pm 4.46^*$	74.21 ± 5.68

注: *表示两组间存在显著差异($P < 0.05$).

Note: * indicates a significant difference between two groups ($P < 0.05$).

2.3 肠道测序结果概述

6 个红罗非鱼肠道转录组文库经高通量测序获得的 raw reads 在 41953000~44929544 之间。数据过滤后, clean reads 占比 96.19%~96.89%, Q20 值大于 99%, Q30 值大于 95%, GC 含量占比 47%~48%, 这些结果表明本次测序质量较高, 满足后续分析要求(表 4)。

表 4 NaHCO_3 碱度胁迫下红罗非鱼肠
转录组测序数据统计

Tab. 4 Summary of sequencing data in intestinal
transcriptome of red tilapia under alkalinity stress

样品 sample	原始读段 raw reads	过滤读段(比率/%) clean reads (ratio/%)	Q20/%	Q30/%	GC/%
CA_1	44929544	43335426 (96.45)	99.73	97.91	48.0
CA_2	41953000	40466838 (96.46)	99.73	97.88	47.5
CA_3	42874320	41510656 (96.82)	99.54	95.63	48.0
Con_1	42239830	40924300 (96.89)	99.73	97.76	48.0
Con_2	44043406	42363164 (96.19)	99.73	97.84	47.0
Con_3	42647680	41246250 (96.71)	99.52	95.68	48.0

2.4 差异表达基因筛选

主成分分析(PCA)结果显示, 前两个主成分(PCA1 和 PCA2)分别解释了主成分分析模型中 86.95% 和 7.27% 的方差, 且 CA 组和 Con 组样本之间存在明显分离, 这表明碱度胁迫使红罗非鱼肠组织中基因表达模式发生了明显变化(图 2a)。碱

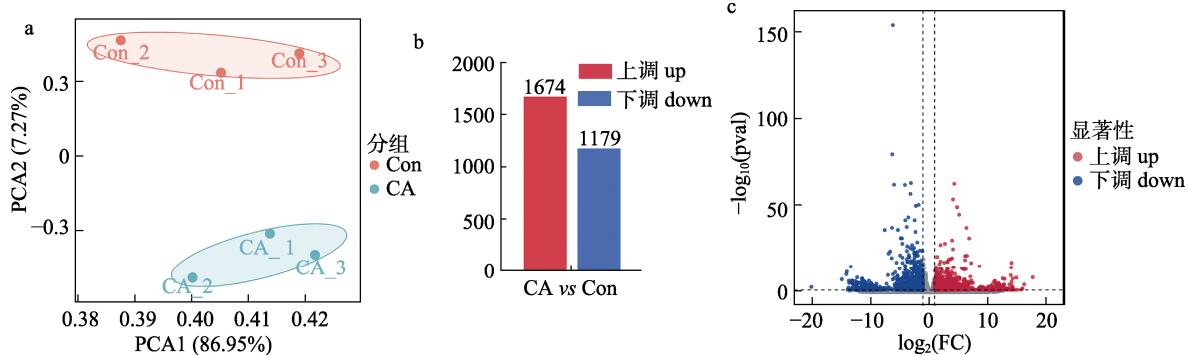


图 2 红罗非鱼 NaHCO_3 碱度胁迫组和淡水对照组肠道差异表达基因筛选

a. 主成分分析图; b. 差异表达基因柱状图; c. 差异表达基因火山图.

Fig. 2 Detection of differentially expressed genes in the gut of red tilapia between CA group and Con group
a. Principal component analysis plot;
b. Histogram of differentially expressed genes;
c. Volcano plot of differentially expressed genes.

度胁迫后, CA vs Con 组共得到 2853 个差异表达基因, 其中包括 1674 个上调表达基因和 1179 个下调表达基因(图 2b, c)。

2.5 GO 与 KEGG 富集分析

GO 富集分析结果显示, 差异表达基因显著富集($P<0.05$)于 234 个 GO 条目中, 其中包括 109 个生物学过程条目、24 个细胞组分条目和 101 个分子功能条目。在生物学过程条目中, 差异表达

基因主要富集在信号转导(GO: 0007165)、跨膜运输(GO: 0055085)和免疫响应(GO: 0006955)等子条目中; 在细胞组分条目中, 膜(GO: 0016020)和膜组分(GO: 0016021)子条目富集的差异表达基因最多; 在分子功能条目中, 差异表达基因主要富集在水解酶活性(GO: 0016787)、催化活性(GO: 0003824)和 GTP 结合(GO: 0005525)等子条目中(图 3)。

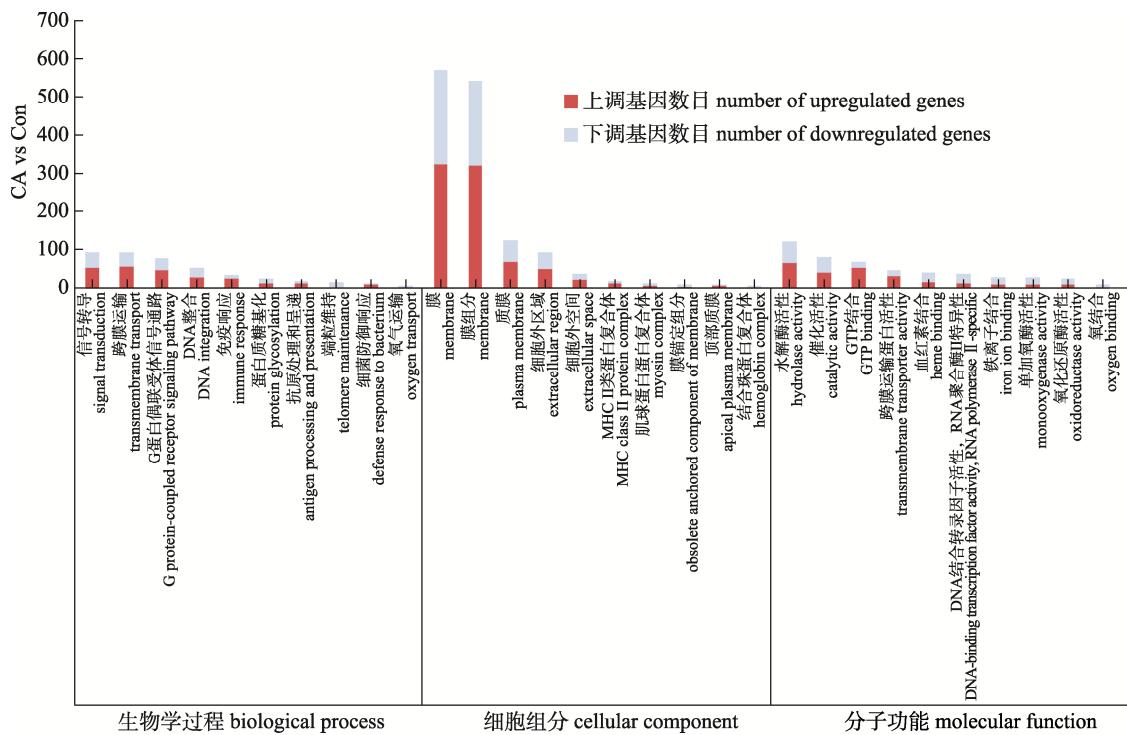


图 3 NaHCO₃ 碱度胁迫下红罗非鱼肠道差异基因 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in the gut of red tilapia under NaHCO₃ alkalinity stress

KEGG 富集分析表明差异表达基因显著富集($P<0.05$)于 112 条信号通路中。如图 4 所示, 富集最显著的 20 条信号通路分为细胞过程、环境信息处理、人类疾病、新陈代谢和生物系统 5 大类, 包括跨膜运输相关通路: ABC 转运器(onl02010)和吞噬体(onl04145); 炎症与免疫响应相关通路: 细胞因子-细胞因子受体相互作用(onl04060)和 IgA 生成相关肠道免疫网络(onl04672)和生理代谢相关通路: PPAR 信号通路(onl03320)和氨基糖和核苷酸糖代谢(onl00520)。

2.6 肠道物质运输与代谢关键通路的变化

碱度胁迫对肠道物质运输与代谢相关信号通路影响显著, 包括内吞作用(图 5a, $P<0.001$)和氨基

酸生物合成(图 5c, $P<0.001$)。在内吞作用信号通路中, 碱度胁迫使 14 个基因上调表达, 6 个基因下调表达(图 5a)。在氨基酸生物合成信号通路中, 碱度胁迫使 6 个基因上调表达(图 5c)。GSEA 富集分析结果显示碱度胁迫会诱导内吞作用和氨基酸生物合成信号通路上调表达(图 5b, d)。

2.7 肠道炎症反应与免疫应答关键通路的变化

碱度胁迫对肠道炎症反应与免疫应答相关信号通路影响显著, 包括免疫球蛋白 A 产出的肠道免疫网络(图 6a, $P<0.001$)和 Nod-like 受体信号通路(图 6c, $P<0.001$)。在免疫球蛋白 A 产出的肠道免疫网络信号通路中, 碱度胁迫使 14 个基因上调表达, 2 个基因下调表达(图 6a)。在 Nod-like 受体

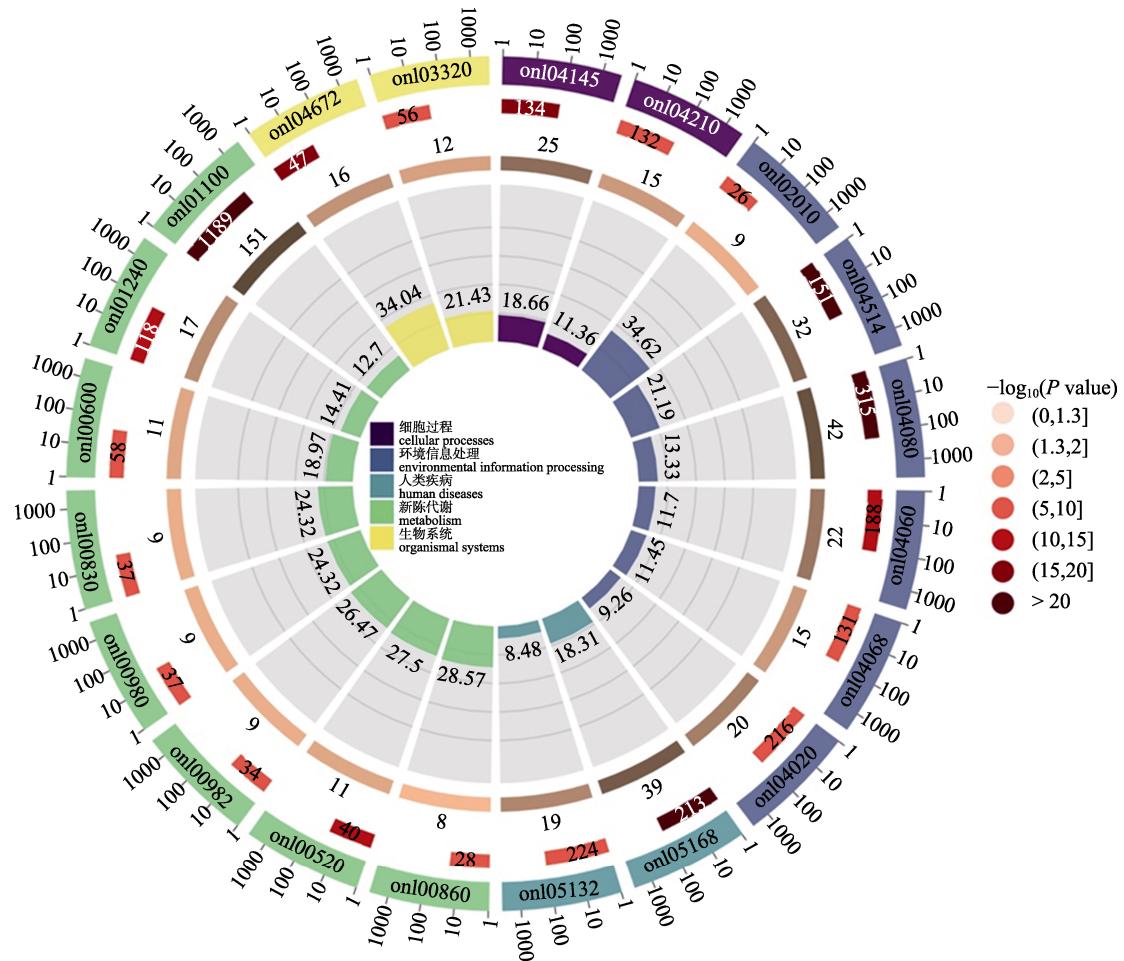


图 4 NaHCO₃ 碱度胁迫下红罗非鱼肠道差异基因 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in the gut of red tilapia under NaHCO₃ alkalinity stress

信号通路中，碱度胁迫使 7 个基因上调表达，2 个基因下调表达(图 6c)。GSEA 富集分析结果显示碱度胁迫会诱导 IgA 生成相关肠道免疫网络和 Nod-like 受体信号通路上调表达(图 6b, 6d)。

2.8 qRT-PCR 验证

挑选内吞作用通路关键基因：分选连接蛋白 4 基因(sorting nexin-4, *snx4*)、*snx6*、低密度脂蛋白受体基因(low-density lipoprotein receptor, *ldlr*)；氨基酸生物合成通路关键基因：精氨酸琥珀酸合成酶 1 基因(argininosuccinate synthase 1, *ass1*)、S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因(S-adenosylmethionine synthetase, *sams*)、磷酸丙糖异构酶基因(triosephosphate isomerase, *tpi*)；IgA 生成相关肠道免疫网络通路关键基因：细胞表面趋化因子受体 9 基因(C-C chemokine receptor type 9, *ccr9*)、趋化因子 C-X-C-基元受体 4 基因(C-X-C motif chemokine

receptor 4, *cxcr4*)、肿瘤坏死因子配体超家族成员 13b 基因(tumor necrosis factor ligand superfamily member 13b, *tnfsf13b*)和 NOD-like 受体信号通路关键基因：核苷酸结合寡聚化结构域样受体 1b 基因(NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1b, *nlrp1b*)、烟酰胺磷酸核糖基转移酶基因(nicotinamide phosphoribosyltransferase, *nampt*)、白细胞介素 1β 基因(interleukin 1β, *il1β*)进行 qRT-PCR 检测，验证结果与转录组分析结果一致($R^2=0.880$ ；图 7a, 7b)。

3 讨论

3.1 NaHCO₃ 碱度胁迫对红罗非鱼血清生化的影响

鱼类正常生理代谢过程中会产生一定的活性氧自由基(ROS)，机体可通过体内抗氧化酶(SOD 和 CAT)、抗氧化分子(维生素 E)对其进行动态清除，

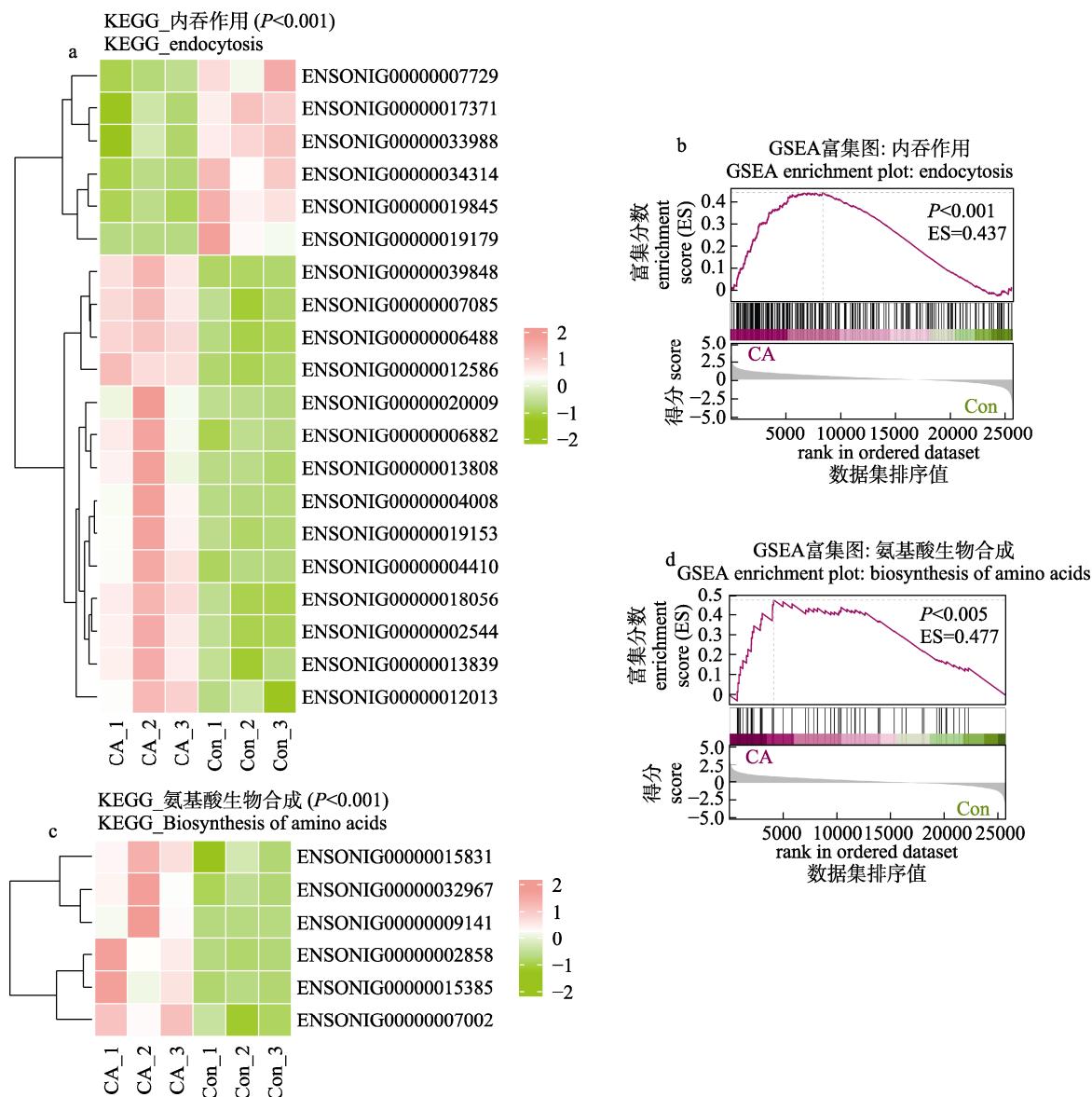


图 5 NaHCO₃ 碱度胁迫对红罗非鱼肠道物质运输与代谢关键通路的影响

- a. 内吞作用通路差异表达基因热力图; b. 内吞作用通路 GSEA 富集图; c. 氨基酸生物合成通路差异表达基因热力图; d. 氨基酸生物合成通路 GSEA 富集图.

Fig. 5 Effect of NaHCO₃ alkalinity stress on key pathways of intestinal material transport and metabolism in red tilapia
a. Heat map of differentially expressed genes in the endocytosis pathways; b. GSEA for the endocytosis pathways;

- c. Heat map of differentially expressed genes in the pathways of biosynthesis of amino acids;
d. GSEA for the pathways of biosynthesis of amino acids.

从而维持内环境稳态^[28]。水产养殖过程中, 环境应激或饲料营养素失衡会引起 ROS 的过量产生, 易造成鱼体的氧化损伤^[17]。血清抗氧化水平能在一定程度上反映鱼体的氧化应激状态^[29]。本研究中, 红罗非鱼血清 TAOC、SOD 和 CAT 酶活性在碱度胁迫下呈上升趋势, 这与鲫^[9]和尼罗罗非鱼^[30]上的结果相一致。笔者推测红罗非鱼的抗氧化防御系统在碱度胁迫被激活, 抗氧化酶活性增强有

助于加速清除体内 ROS。然而, 有报道指出碱度胁迫下青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)体内抗氧化酶的活性呈先上升后下降的趋势^[31], 造成这一差异的可能原因是青海湖裸鲤对高碱度环境有较强的耐受能力, 机体能快速调节生理代谢水平以适应外界碱环境的变化。

MDA 是生物脂质氧化的天然产物, 其含量变化可以直接反映脂质过氧化水平, 是衡量细胞损

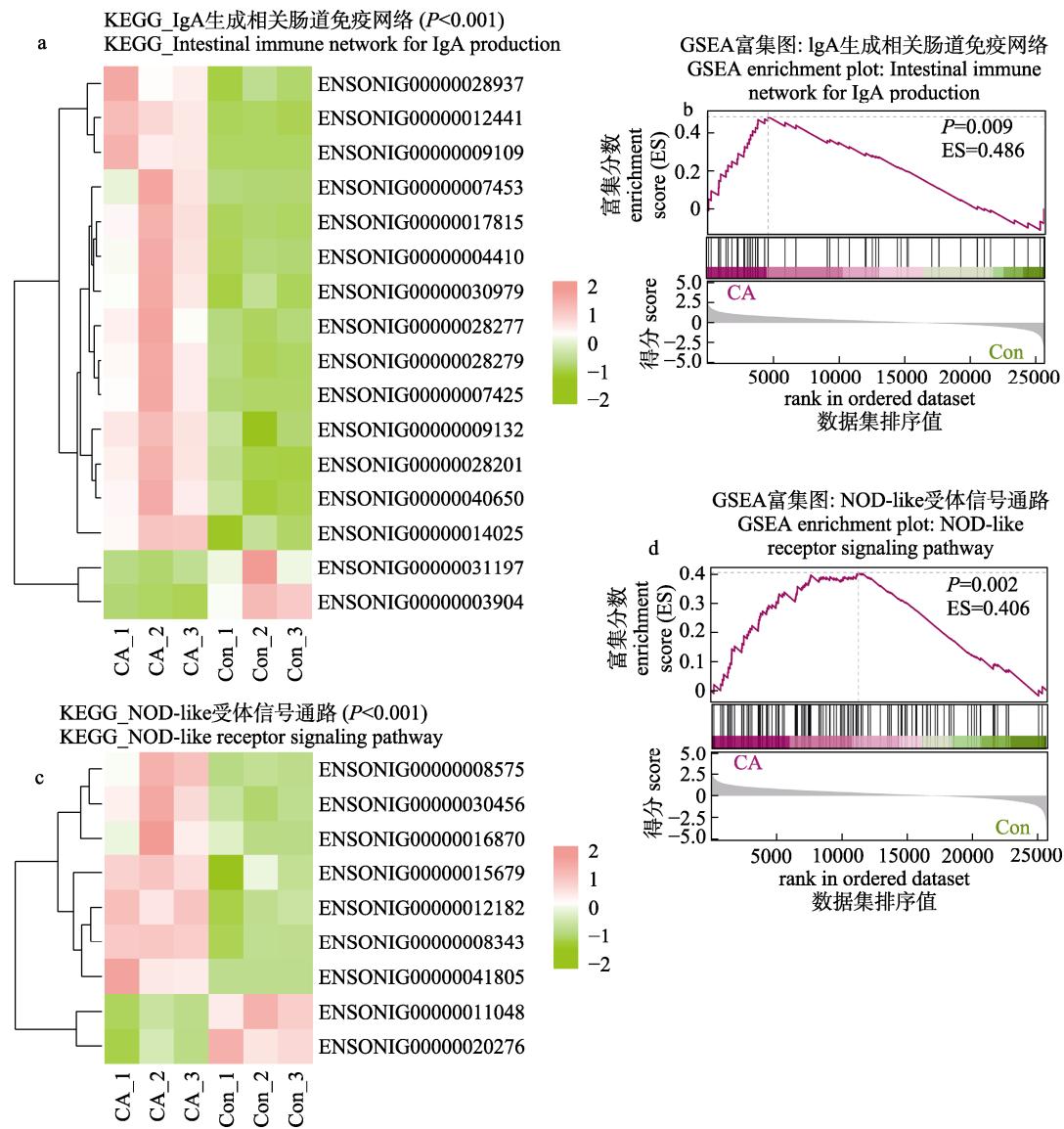


图 6 NaHCO_3 碱度胁迫对红罗非鱼肠道炎症反应与免疫应答关键通路的影响

a. IgA 生成相关肠道免疫网络通路差异表达基因热力图; b. IgA 生成相关肠道免疫网络通路 GSEA 富集图;
c. NOD-like 受体信号通路差异表达基因热力图; d. NOD-like 受体信号通路 GSEA 富集图。

Fig. 6 Effect of NaHCO_3 alkalinity stress on key pathways of intestinal inflammation and immune response in red tilapia
a. Heat map of differentially expressed genes in the intestinal immune network for IgA production; b. GSEA for the intestinal immune network for IgA production; c. Heat map of differentially expressed genes in the NOD-like receptor signaling pathway; d. GSEA for the NOD-like receptor signaling pathway.

伤程度的关键指标^[20]。本研究发现碱度胁迫下红罗非鱼血清 MDA 含量显著增加, 这表明红罗非鱼抗氧化防御系统的激活不足以清除体内过多 ROS, 使得脂质过氧化反应加剧, 可能会导致鱼体氧化损伤的发生^[8]。

鱼类的排氨能力是其适应高碱环境的关键因素之一^[32]。碱度胁迫下, 鱼体内外离子浓度的变化会导致氨的排泄途径受限制, 血浆和组织内氨

的大量积累, 严重时会引发氨中毒甚至死亡^[6]。BUN 是鱼体内蛋白质代谢的主要代谢产物, 氨的尿素代谢途径也是排氨的手段之一^[14]。研究发现瓦氏雅罗鱼^[32]和鲫^[3]在碱度胁迫下血氨和 BUN 的含量显著升高, 与本实验结果相似, 这说明高碱度环境可能造成了红罗非鱼排氨异常, 通过尿素途径一定程度上增加了红罗非鱼体内氨的排出, 降低有害氮堆积造成的损伤。

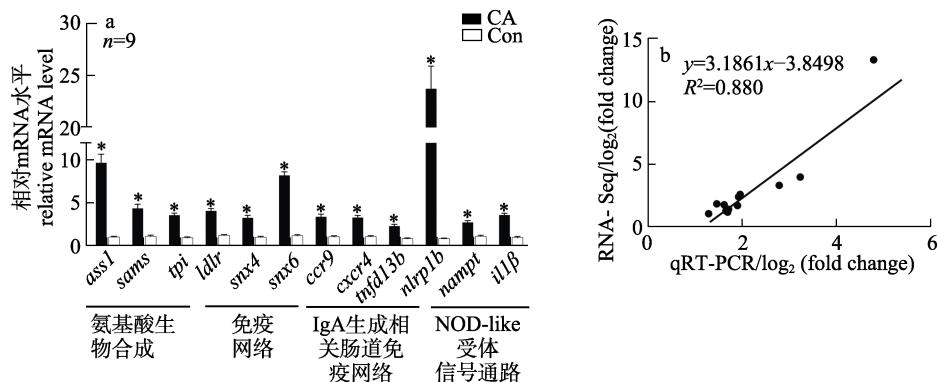


图 7 NaHCO₃ 碱度胁迫对红罗非鱼肠道 12 个关键基因转录水平表达的影响

a. qRT-PCR 检测结果, *表示两组间存在显著差异($P<0.05$); b. qRT-PCR 与 RNA-Seq 结果相关性分析.

Fig. 7 Effect of NaHCO₃ alkalinity stress on the transcription level of 12 key genes in the intestine of red tilapia

a. Results for qRT-PCR analysis, * indicates a significant difference between two groups ($P<0.05$);
 b. Correlation analysis between qRT-PCR and RNA-Seq.

3.2 NaHCO₃ 碱度胁迫对红罗非鱼肠道组织结构的影响

肠道是鱼类消化食物和获取营养的重要场所。绒毛高度、绒毛宽度或肌层厚度可以作为评估鱼类肠道形态和吸收能力的重要标志^[33]。程龙等^[11]研究发现碱度胁迫会抑制松浦镜鲤肠绒毛的发育、降低消化酶活性。在草鱼^[4]和瓦氏雅罗鱼^[12]上也有类似发现。本研究结果表明碱度胁迫下红罗非鱼绒毛长度和肌层厚度显著低于淡水对照环境, 这说明高碱度环境不利于红罗非鱼肠绒毛的发育, 可能会降低肠道对营养物质的消化和吸收, 延缓红罗非鱼生长发育。另外, 肠道也是抵御外界有害物质的有力屏障。刘佳^[34]研究报道指出碱度胁迫会对鲫的肠道组织结构造成损伤, 破坏其物理屏障功能。本实验中, 碱度胁迫引起了红罗非鱼肠道绒毛上皮破损脱落, 肠道屏障功能受损会加剧炎症反应的发生^[35], 这不利于红罗非鱼的肠道健康。

3.3 NaHCO₃ 碱度胁迫对红罗非鱼肠道物质运输与代谢的影响

碱度胁迫下, 水生生物体内多种生理过程会发生适应性变化, 主要涉及物质跨膜运输、营养代谢和免疫响应等过程^[36]。本研究基于转录组测序发现碱度胁迫下红罗非鱼肠道有 2853 个基因表达发生显著变化。KEGG 富集分析表明这些差异表达基因在跨膜运输相关的信号通路中显著富集, 比如内吞作用和 ABC 转运器等。同时, GSEA

富集分析暗示着红罗非鱼内吞作用的激活与碱度胁迫密切相关。内吞作用是指细胞主动摄取外源物质或微粒且消耗能量的过程^[37]。已有转录组学分析表明内吞作用途径对于鱼类适应外界环境胁迫至关重要^[38-39]。本实验中, 碱度胁迫诱导红罗非鱼肠道内吞作用相关基因 *ldlr*、*snx4*、*snx6* 表达上调, 笔者推测碱度胁迫会破坏红罗非鱼细胞内外离子稳态平衡, 内吞作用的激活有助于细胞更好地摄取外源性物质, 如大分子营养物质、细胞因子, 这对于维持细胞内稳态具有重要的作用。

鱼类在氧化应激状态下, 体内过量的 ROS 会引起蛋白质、脂质和 DNA 分子的氧化损伤, 导致细胞代谢功能异常^[40]。Wei 等^[9]研究表明碱度胁迫引起的鲫脂质代谢紊乱与能量代谢失衡与氧化应激的发生密切相关。本研究也有类似的发现, 碱度胁迫会诱导红罗非鱼氧化应激的发生并改变肠道代谢功能, 包括氨基酸生物合成、PPAR 信号通路和氨基糖和核苷酸糖代谢途径。当鱼类处于高碱环境时, 氨基酸的合成代谢是降低鱼体积累的内源性氨的有效途径之一^[2]。例如, 碱度胁迫会提高瓦氏雅罗鱼氨基酸合成代谢, 导致血浆游离氨基酸水平显著上升^[41]。本研究发现, 氨基酸生物合成关键基因 *ass1*、*sams* 和 *tpi* 转录水平表达上升暗示着碱度胁迫激活了氨基酸的合成代谢。笔者推测碱度胁迫下红罗非鱼积累的内源性氨向氨基酸的转化可能有助于缓解体内过量氨堆积产生的毒性效应, 这可能是红罗非鱼耐受高碱度环境的重要策略。

3.4 NaHCO₃ 碱度胁迫对红罗非鱼炎症反应与免疫应答的影响

研究表明碱度胁迫会诱导抗炎因子发生变化并介导以炎症为特征的免疫反应^[42-43]。NLR 是一类细胞质模式识别受体，其通过调节一系列级联信号传导，如 MAPK 信号通路，从而诱导细胞炎症反应和免疫应答过程^[44]。近期研究表明 NLRs 还可以对宿主自身受损组织的内源性分子作出响应^[45-46]。本研究中，笔者发现碱度胁迫可诱导红罗非鱼 NOD-like 受体信号通路中 9 个基因出现异常表达，包括 *nlrp1b*, *nampt*。GSEA 分析结果进一步证实 NOD-like 受体信号通路在碱度胁迫下明显上调，激活的 NOD-like 受体信号通路可能有助于增强促炎因子 *il1β* 转录水平的表达，从而诱导炎症反应的发生。研究表明高温胁迫能迅速激活半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) NOD-like 受体信号通路^[47]，这说明该通路在鱼类响应环境胁迫中起着重要的调节作用。另外，MAPK 信号通路在细胞氧化应激调控中发挥了重要作用^[48]。本实验中，KEGG 富集分析表明差异表达基因在 MAPK 信号通路(Top22)也存在显著富集。笔者推测碱度胁迫下，红罗非鱼可能通过介导 NLR-MAPK 信号途径激活鱼体抗氧化防御(血清 TAOC 和 CAT 上升)，以应对氧化应激。

肠道是鱼类三大黏膜免疫系统之一，其在应激响应和内稳态维持中起着至关重要的作用^[49]。IgA 作为鱼类黏膜免疫的主要抗体，肠黏膜分泌的 IgA 可以有效地抵御各种病原菌的入侵^[50]。研究表明病原感染或环境毒物暴露会激活鱼类 IgA 生成相关肠道免疫网络途径^[51-52]。本研究中 NaHCO₃ 碱度胁迫上调了该通路中 *ccr9*、*cxcr4* 和 *tnfsf13b* 等关键基因转录水平的表达。结合组织学观察结果，笔者推测碱度胁迫下红罗非鱼肠道组织损伤可能会加剧感染外源病原菌的风险，IgA 生成相关肠道免疫网络信号通路的激活有助于增强红罗非鱼肠道黏膜免疫力，维持肠道健康。

4 结论

综上所述，NaHCO₃ 碱度胁迫会引起红罗非鱼氧化应激并损伤其肠道组织结构。转录组测序结

果表明，碱度胁迫下红罗非鱼肠道有 2853 个基因表达发生显著变化。富集分析揭示了红罗非鱼肠组织响应碱胁迫的关键通路(内吞作用、氨基酸生物合成和 IgA 生成相关肠道免疫网络等)，这些途径主要涉及物质跨膜运输、能量代谢和免疫响应等生物学过程。本研究有助于深入了解红罗非鱼在碱度胁迫下的适应性调节机制，为耐盐碱鱼类优良品种培育提供理论依据。

参考文献：

- [1] Zhang W B, Belton B, Edwards P, et al. Aquaculture will continue to depend more on land than sea[J]. Nature, 2022, 603(7900): E2-E4.
- [2] Chang Y M, Liang L Q. Advances of research of physiological and molecular mechanisms related to alkali-saline adaptation for fish species inhabiting alkali-saline water[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(5): 798-812. [常玉梅, 梁利群. 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展[J]. 水产学报, 2021, 45(5): 798-812.]
- [3] Liu Y J, Yao M Z, Li S W, et al. Integrated application of multi-omics approach and biochemical assays provides insights into physiological responses to saline-alkaline stress in the gills of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Science of the Total Environment, 2022, 822: 153622.
- [4] Wen J, Chen S L, Xu W Y, et al. Effects of high NaHCO₃ alkalinity on growth, tissue structure, digestive enzyme activity, and gut microflora of grass carp juvenile[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023, 30(36): 85223-85236.
- [5] Yao M Z, Liu Y J, Li S W, et al. Metabolomics study on gill tissues of *Carassius auratus gibelo* under NaHCO₃ habitat stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(6): 792-802. [姚明珠, 刘英杰, 李姗蔚, 等. NaHCO₃生境胁迫下方正银鲫鳃耙器官代谢组学研究[J]. 中国水产科学, 2022, 29(6): 792-802.]
- [6] Sashaw J, Nawata M, Thompson S, et al. Rhesus glycoprotein and urea transporter genes in rainbow trout embryos are upregulated in response to alkaline water (pH 9.7) but not elevated water ammonia[J]. Aquatic Toxicology, 2010, 96(4): 308-313.
- [7] Faulk C K, Holt G J. Responses of cobia *Rachycentron canadum* larvae to abrupt or gradual changes in salinity[J]. Aquaculture, 2006, 254(1-4): 275-283.
- [8] Tian L, Tan P, Yang L, et al. Effects of salinity on the growth, plasma ion concentrations, osmoregulation, non-specific immunity, and intestinal microbiota of the yellow drum (*Nibea albiflora*)[J]. Aquaculture, 2020, 528: 735470.

- [9] Wei X F, Liu Y J, Li S W, et al. Stress response and tolerance mechanisms of NaHCO_3 exposure based on biochemical assays and multi-omics approach in the liver of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 253: 114633.
- [10] Zheng T, Tao Y F, Lu S Q, et al. Integrated transcriptome and 16S rDNA analyses reveal that transport stress induces oxidative stress and immune and metabolic disorders in the intestine of hybrid yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco* ♀ × *Pseudobagrus vachellii* ♂)[J]. Antioxidants, 2022, 11(9): 1737.
- [11] Cheng L, Peng F, Li J N, et al. Effect of different carbonate alkalinity and dietary α -ketoglutarate levels on intestinal morphology and activity of digestive enzymes of mirror carp[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(1): 19-24. [程龙, 彭丰, 李晋南, 等. 不同碱度和 α -酮戊二酸水平对松浦镜鲤肠道形态及消化酶活性的影响[J]. 水产学杂志, 2020, 33(1): 19-24.]
- [12] Gao S, Zhao X F, Chang Y M, et al. Effect of different bicarbonate alkalinites on microstructures of kidney and intestine in amur ide *Leuciscus waleckii*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(3): 24-30. [高珊, 赵雪飞, 常玉梅, 等. 不同 NaHCO_3 碱度对瓦氏雅罗鱼肾和肠组织显微结构的影响[J]. 水产学杂志, 2020, 33(3): 24-30.]
- [13] Zhao Y, Wu J W, Wang Y, et al. Role of miR-21 in alkalinity stress tolerance in tilapia[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 471(1): 26-33.
- [14] Tu H Q, Zhao J L, Zhao Y, et al. Study on the timing sequence of two pathway of *Oreochromis niloticus* ammonia metabolism under the stress of carbonate alkalinity[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(3): 25-32. [涂翰卿, 赵金良, 赵岩, 等. 碳酸盐碱胁迫下尼罗罗非鱼氨代谢两种途径时序研究[J]. 淡水渔业, 2018, 48(3): 25-32.]
- [15] Zhao Y, Zhang C S, Zhou H T, et al. Transcriptome changes for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to alkalinity stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics & Proteomics, 2020, 33: 100651.
- [16] Song L Y, Tu H Q, Zhou H T, et al. Evaluation of salinity-alkalinity tolerance of F3, F4 and F5 selected generations of *Oreochromis niloticus*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2019, 46(2): 130-136. [宋凌元, 涂翰卿, 周昊天, 等. 尼罗罗非鱼盐碱选育 F3、F4、F5 代鱼苗盐碱耐受性评估[J]. 广东农业科学, 2019, 46(2): 130-136.]
- [17] Liu W, Xu C, Li Z, et al. Reducing dietary protein content by increasing carbohydrates is more beneficial to the growth, antioxidative capacity, ion transport, and ammonia excretion of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) under long-term alkalinity stress[J]. Aquaculture Nutrition, 2023, 2023: 9775823.
- [18] Abdullah S, Omar N, Yusoff S M, et al. Clinicopathological features and immunohistochemical detection of antigens in acute experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia (*Oreochromis* spp.)[J]. SpringerPlus, 2013, 2: Article No.286.
- [19] Li X J, Li A J, Li S F, et al. Differences of salt-tolerance between *Sarotherodon melanotheron* and the other 8 tilapias [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(7): 1072-1079. [李学军, 李爱景, 李思发, 等. 新引进萨罗罗非鱼与其它 8 种罗非鱼耐盐差异[J]. 水产学报, 2010, 34(7): 1072-1079.]
- [20] Tao Y F, Hua J X, Lu S Q, et al. Ultrastructural, antioxidant, and metabolic responses of male genetically improved farmed Tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) to acute hypoxia stress[J]. Antioxidants, 2024, 13(1): 89.
- [21] Qiang J, Bao W J, Tao F Y, et al. The expression profiles of miRNA-mRNA of early response in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver by acute heat stress[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 8705.
- [22] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. EMBnet Journal, 2011, 17(1): 10.
- [23] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360.
- [24] Zhu W B, Wang L M, Dong Z J, et al. Comparative transcriptome analysis identifies candidate genes related to skin color differentiation in red tilapia[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31347.
- [25] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(5): 511-515.
- [26] Jiang J L, Xu J, Ye L, et al. Identification of differentially expressed genes in gills of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) in response to low-salinity stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology, 2020, 243-244: 110437.
- [27] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [28] Tao Y F, Pan Y F, Wang Q C, et al. Vitamin E ameliorates impaired ovarian development, oxidative stress, and disrupted lipid metabolism in *Oreochromis niloticus* fed with a diet containing olive oil instead of fish oil[J]. Antioxidants, 2023, 12(8): 1524.
- [29] Caipang C M A, Lazado C C, Brinchmann M F, et al. In vivo modulation of immune response and antioxidant defense in Atlantic cod, *Gadus morhua* following oral administration of oxolinic acid and florfenicol[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009,

- 150(4): 459-464.
- [30] Song L Y, Zhao Y, Song Y D, et al. Effects of saline-alkaline water on growth performance, nutritional processing, and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2021, 544: 737036.
- [31] A L L, Zhang H C, Xu B K, et al. Effects of alkalinity stress on serum physiological indexes of *Gymnocypris przewalskii* [J]. Journal of Southern Agriculture, 2023, 54(7): 2164-2174. [阿琳林, 张海琛, 许保可, 等. 碱度胁迫对青海湖裸鲤血清生理生化指标的影响[J]. 南方农业学报, 2023, 54(7): 2164-2174.]
- [32] Xu Y, Mi B H, Zhao X F, et al. Effects of alkalinity stress on blood biochemical indices in *Leuciscus waleckii*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2021, 34(3): 17-21. [徐悦, 米博瀚, 赵雪飞, 等. 碳酸盐胁迫对瓦氏雅罗鱼血液中部分生理生化指标的影响[J]. 水产学杂志, 2021, 34(3): 17-21.]
- [33] Kiela P R, Ghishan F K. Physiology of intestinal absorption and secretion[J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2016, 30(2): 145-159.
- [34] Liu J. Molecular mechanism of intestinal injury induced by NaHCO₃ stress in crucian carp and regulation of synbiotics [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023. [刘佳. NaHCO₃ 胁迫诱导鲫鱼肠道损伤的分子机制及合生元调控作用研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.]
- [35] Kinross J, Warren O, Basson S, et al. Intestinal ischemia/reperfusion injury: Defining the role of the gut microbiome [J]. Biomarkers in Medicine, 2009, 3(2): 175-192.
- [36] Qin Z, Ge Q Q, Wang J J, et al. Comparative transcriptomic and proteomic analysis of *Exopalaemon carinicauda* in response to alkalinity stress[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 759923.
- [37] Iida A, Sano K, Inokuchi M, et al. Cubam receptor-mediated endocytosis in hindgut-derived pseudoplacenta of a viviparous teleost (*Xenotoca eiseni*)[J]. Journal of Experimental Biology, 2021, 224(13): jeb242613.
- [38] de Magalhães C R, Farinha A P, Blackburn G, et al. Gilthead seabream liver integrative proteomics and metabolomics analysis reveals regulation by different prosurvival pathways in the metabolic adaptation to stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 15395.
- [39] Zhang X G, Zhou J, Xu W G, et al. Transcriptomic and behavioral studies of small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) in response to noise exposure[J]. Animals, 2022, 12(16): 2061.
- [40] Rani V, Deep G, Singh R K, et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies [J]. Life Sciences, 2016, 148: 183-193.
- [41] Chang Y M, He Q, Sun Y C, et al. Changes in plasma free amino acid levels in *Leuciscus waleckii* exposed to different environmental alkalinity levels[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 117-124. [常玉梅, 何强, 孙言春, 等. 碳酸盐碱度胁迫下瓦式雅罗鱼血浆游离氨基酸水平的变化[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 117-124.]
- [42] Shang X C, Geng L W, Yang J, et al. Transcriptome analysis reveals the mechanism of alkalinity exposure on spleen oxidative stress, inflammation and immune function of *Luciobarbus capito*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 225: 112748.
- [43] Fan Z, Wu D, Li J N, et al. Phosphorus nutrition in songpu mirror carp (*Cyprinus carpio songpu*) during chronic carbonate alkalinity stress: Effects on growth, intestinal immunity, physical barrier function, and intestinal microflora[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 900793.
- [44] Lupfer C, Kanneganti T D. The expanding role of NLRs in antiviral immunity[J]. Immunological Reviews, 2013, 255(1): 13-24.
- [45] Basu M, Paichha M, Lenka S S, et al. Hypoxic stress: Impact on the modulation of TLR2, TLR4, NOD1 and NOD2 receptor and their down-stream signalling genes expression in catla (*Catla catla*)[J]. Molecular Biology Reports, 2016, 43(1): 1-9.
- [46] Ting J P Y, Willingham S B, Bergstrahl D T. NLRs at the intersection of cell death and immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(5): 372-379.
- [47] Guo L, Wang Y M, Liang S J, et al. Tissue-overlapping response of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) to thermostressing based on transcriptome profiles[J]. Gene, 2016, 586(1): 97-104.
- [48] Runchel C, Matsuzawa A, Ichijo H. Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2011, 15(1): 205-218.
- [49] Bieczynski F, Paineñil J C, Venturino A, et al. Expression and function of ABC proteins in fish intestine[J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 791834.
- [50] Tang W J, Wei Y S, Ni Z X, et al. IgA-mediated control of host-microbial interaction during weaning reaction influences gut inflammation[J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2323220.
- [51] Huo J X, Li X W, Hu X C, et al. Multi-omics analysis of miRNA-mediated intestinal microflora changes in crucian carp *Carassius auratus* infected with *Rahnella aquatilis*[J]. Frontiers in Immunology, 2024, 15: 1335602.
- [52] Zhang S Y, Gan X F, Shen B G, et al. 6PPD and its metabolite 6PPDQ induce different developmental toxicities and phenotypes in embryonic zebrafish[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 455: 131601.

Transcriptomic analysis of stress response and tolerance mechanisms in the intestine of red tilapia (*Oreochromis* spp.) during NaHCO₃ exposure

TAO Yifan¹, CAO Wei², HUA Jixiang¹, LI Zuchen³, JIANG Bingjie¹, ZHANG Huikun³, MA Xuebin⁴, LU Siqi¹, QIANG Jun¹

1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
2. Hebei Key Laboratory of the Bohai Sea Fish Germplasm Resources Conservation and Utilization; Beidaihe Central Experimental Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;
3. Tangshan Aquatic Products Technology Promotion Station, Tangshan 063200, China;
4. Cangzhou Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Cangzhou 061001, China

Abstract: The diminishing availability of freshwater resources in recent years has led to a decrease in suitable areas for freshwater aquaculture, which in turn has prompted the use of saline-alkaline water to meet the growing demands. However, the limited application of saline-alkaline water, threatened by the presence of a single species in saline-alkaline aquaculture, notably impedes the development of saline-alkaline aquaculture. A comprehensive understanding of their physiological and molecular mechanisms of salt-alkaline tolerance is essential to cultivate species suitable for saline-alkaline aquaculture. Red tilapia (*Oreochromis* spp.) has good salinity tolerance; however, the metabolic response of red tilapia under an alkaline environment remains largely unclear. In this study, we compared serum physiological parameters, intestinal histology, and transcriptome in red tilapia between an alkalinity stress group [CA, (35.51±0.17) mmol/L] and a freshwater control group [Con, (1.75±0.08) mmol/L]. Exposure to the alkalinity condition for 40 d resulted in increased serum catalase (CAT) activity, total antioxidant capacity (TAOC), malondialdehyde (MDA), ammonia, and urea nitrogen (BUN) levels ($P<0.05$), indicating an imbalance in ammonia excretion and antioxidant defense occurred in red tilapia under alkalinity stress; notable damage to intestinal fluff, thinning of the intestinal muscle layer, and damage to intestinal epithelial cells were also observed in the CA group, suggesting that alkalinity stress may disrupt normal gut physiological function. To investigate potential regulatory mechanisms associated with the observed biochemical and morphological alterations, we conducted a transcriptome analysis. Principal component analysis (PCA) revealed a clear separation of the samples from each group, suggesting high-quality data. Based on a \log_2 (fold change) of ≥ 1 or ≤ -1 and $P < 0.05$, we identified a total of 2853 differentially expressed genes (CA vs. Con), including 1674 upregulated and 1179 downregulated genes. A total of 234 Gene Ontology (GO) items were found to be significantly enriched, such as signal transduction, transmembrane transport, and membrane. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis revealed 112 key pathways in the intestine of red tilapia in response to alkaline stress, including endocytosis, biosynthesis of amino acids, intestinal immune network for IgA production, and NOD-like receptor signaling pathway. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) confirmed the activation of these four pathways under alkalinity stress. To verify the accuracy and reliability of the RNA-Seq data, a subset of 12 differentially expressed genes was chosen for qRT-PCR analysis. Correlation analysis revealed a strong linear relationship ($R^2 = 0.880$) between the gene transcript level data obtained using the two methodologies, thereby validating the reliability of the transcriptome sequencing data. Overall, our results suggest that alkalinity stress may damage the intestinal structure of red tilapia and induce oxidative stress. The changes in the expression of key genes involved in intestinal transport, metabolism, and immune response are crucial strategies for red tilapia to tolerate high alkaline conditions. Our study provides essential insights into the effects of alkaline water on the health and adaptive functions of red tilapia. Furthermore, it sets a crucial basis for future research on the molecular mechanisms that govern stress responses and tolerance to saline-alkaline exposure in fish.

Key words: red tilapia; alkalinity stress; transcriptome; intestine; saline alkali water

Corresponding author: QIANG Jun. E-mail: qiangj@ffrc.cn