



高温胁迫下黑龙江茴鱼幼鱼肝脏组织结构变化及转录组表达特征



丰超杰, 刘霞飞, 张颖, 吕伟华, 韩世成, 张永泉, 许式见, 马波*

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海201306; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江哈尔滨150076; 3. 大连海洋大学, 辽宁大连116023; 4. 杭州千岛湖鲟龙科技股份有限公司, 浙江衢州324000

前言 黑龙江茴鱼 (*Thymallus arcticus grubei*) 是黑龙江省特有的经济物种。近年来, 由于过度捕捞、环境污染以及栖息地破坏等因素影响, 黑龙江茴鱼的野生资源量急剧下降。随着全球气候变暖和夏季连续高温对鱼类的生存及生长产生诸多不良影响, 作为冷水性鱼类, 黑龙江茴鱼极易受高温胁迫的影响。因此, 本研究以黑龙江茴鱼幼鱼为研究对象, 采用组织病理学和高通量RNA-seq测序技术分析在持续高温胁迫下黑龙江茴鱼肝脏组织结构变化及转录组表达特征, 初步探索黑龙江茴鱼在高温胁迫下的响应机制。

材料和方法 黑龙江茴鱼幼鱼采集于中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海试验基地。选取健康状况良好、体表无明显外伤且个体相近的黑龙江茴鱼幼鱼240尾, 平均体长为 3.56 ± 0.24 cm, 平均体重为 0.54 ± 0.19 g。基于课题组前期的研究结果, 将对照组设为 11°C (control, C) 和高温组 17°C (heat, H)。以 $1^\circ\text{C}/\text{h}$ 的升温速率进行升温, 直至达到目标温度。在达到目标温度后第1、6、12、24、48 h时对高温组和对照组分别进行采样, 每组随机各取18尾, 每个平行6尾。使用麻醉剂 (MS-222) 麻醉, 3尾鱼肝脏组织用于转录组测序, 放置于 -80°C 冰箱保存; 余下3尾鱼肝脏组织固定于Bouin氏固定液中, 于48 h后转入70%酒精中保存。

结果和讨论

1 肝脏组织结构的病理变化

肝脏组织观察如图1所示, 光镜下对照组黑龙江茴鱼的肝脏肝板结构清晰, 排列规则, 肝细胞质均匀, 细胞核呈规则圆形, 位于细胞中央, 肝血窦形态正常分布于肝细胞之间 (图1 a)。随着胁迫时间的增加肝脏表现出不同程度及形式的损伤。与对照组相比, 在胁迫12 h, 少量肝细胞胞质出现空泡化, 肝细胞核萎缩程度加重 (图1 d)。在胁迫24 h, 肝细胞形状不规则, 排列无序, 大量肝细胞胞质空泡化, 较多肝细胞核空泡化, 肝板结构消失 (图1 e)。在胁迫48 h, 肝脏组织结构进一步被破坏 (图1 f)。

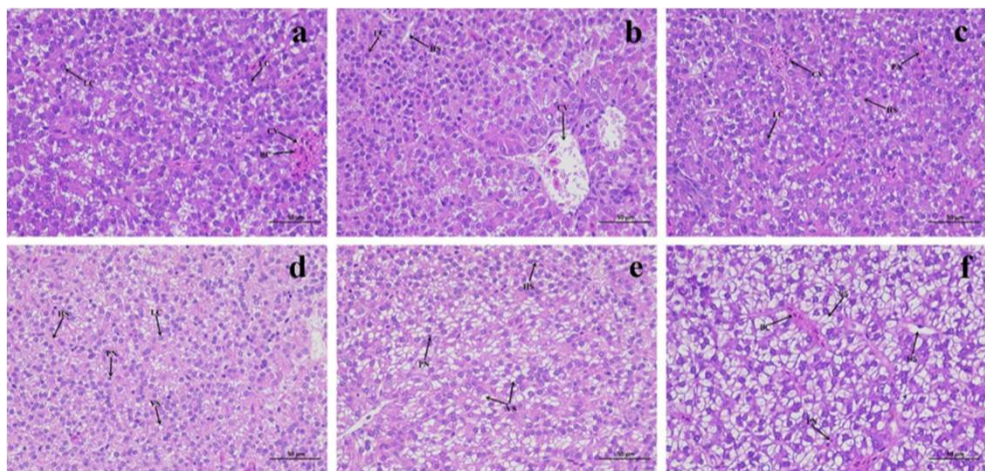


图1 急性高温胁迫对黑龙江茴鱼肝脏组织结构的影响

a. 肝脏(对照组); b. 肝脏(胁迫1 h); c. 肝脏(胁迫6 h); d. 肝脏(胁迫12 h); e. 肝脏(胁迫24 h); f. 肝脏(胁迫48 h); VS. 空泡; PN. 核固缩; CV. 中央静脉; LC. 肝细胞; BC. 红细胞; HS. 肝血窦

2 差异基因表达和聚类分析

以 $q \text{ value} < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 作为阈值来筛选差异表达基因, 不同胁迫时间下差异表达基因火山图 (图2左)。由图可知, 随着胁迫时间的延长黑龙江茴鱼差异表达基因的数量呈先升高后下降的趋势, 且下调的DEGs数多于上调的DEGs。于胁迫24 h时, 差异表达基因数显著高于其他4个时间点。为了验证各处理组三个生物学重复DEGs的可靠性, 对各组差异表达基因进行聚类热图分析。高温组和正常组在不同养殖时间差异表达基因分别聚类, 同组样本不同重复表达相似 (图2右)。

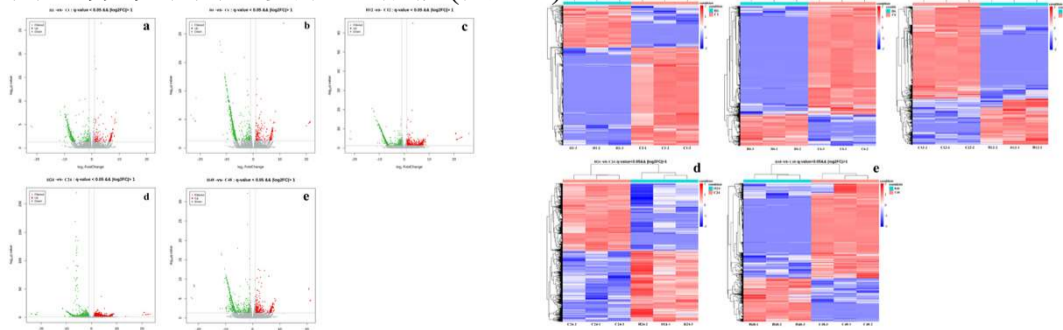


图2 差异表达基因火山图及聚类图

3 差异表达基因GO及KEGG通路富集分析

差异表达基因GO富集分析top30结果见图3左。黑龙江茴鱼高温组与对照组相比, 在不同胁迫时间下DEGs富集在生物过程中的基因数目最多, 参与分子功能的基因数目最少。随着胁迫时间的增加富集到GO数据库的DEGs数呈先升高后下降的趋势, 在胁迫时间24 h时DEGs数最多, 且在不同养殖时间下差异表达下调基因均多于上调基因。

如图3右所示, KEGG通路富集分析结果表明, 在持续高温胁迫下黑龙江茴鱼幼鱼差异表达基因均显著富集在能量代谢 (糖酵解/糖异生、乙醛酸和二羧酸代谢及半胱氨酸和蛋氨酸代谢) 和免疫应激 (内质网中的蛋白质加工、吞噬体及核糖体) 相关通路中。此外, 差异基因在试验胁迫前期主要富集在免疫应激相关通路, 胁迫中期富集在代谢相关通路, 胁迫后期富集在凋亡相关通路中。

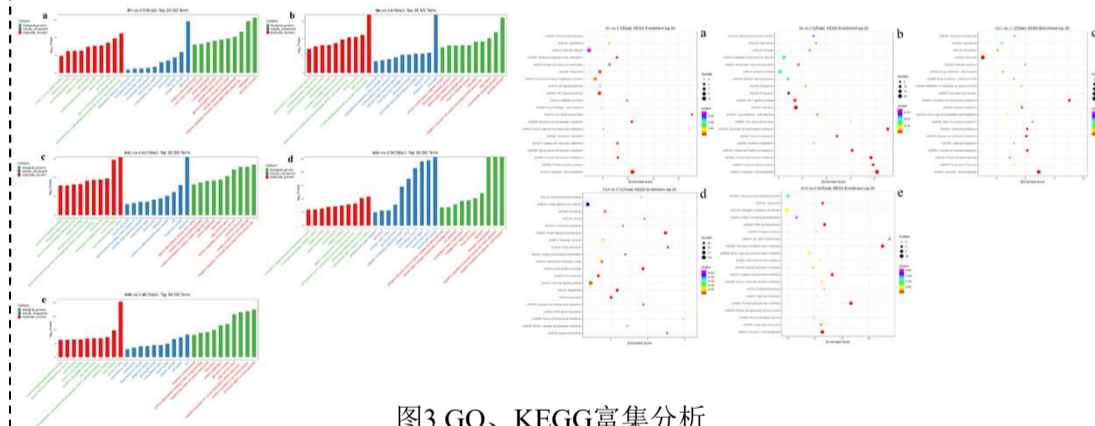


图3 GO、KEGG富集分析

4 RT-qPCR验证

随机选择6个差异表达基因, 利用RT-qPCR相对定量法检测高温组与对照组幼鱼不同养殖时间下的差异基因表达情况。结果显示, 随着养殖时间的增加, 幼鱼的HSP 70、HSP 90a、DNAJ A2及CASP 9基因的mRNA表达水平呈上调的规律, 而GAPDH和MDH1基因的mRNA表达水平则呈下调的变化规律, 其变化趋势与转录组测序分析结果一致, 表明转录组测序分析结果的可靠性 (图4)。

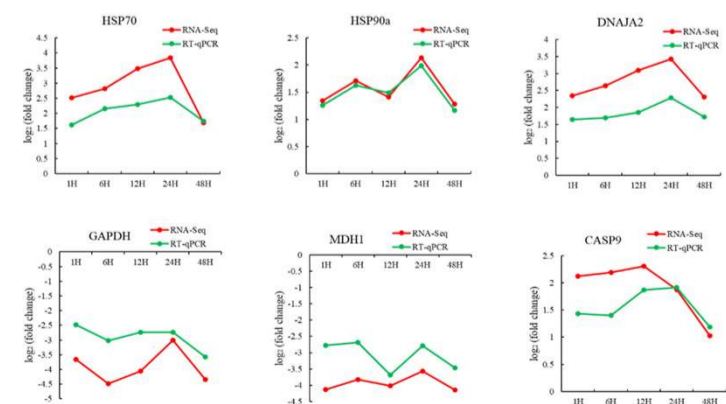


图4 qPCR 检测RNA-Seq结果

结论

- 通过对温度胁迫下黑龙江茴鱼肝脏组织结构进行观察, 发现肝脏组织在高温胁迫12 h后出现不同程度的损伤, 说明急性高温胁迫使黑龙江茴鱼幼鱼肝脏组织结构受损。
- 转录组分析用于研究黑龙江茴鱼肝脏中响应急性高温应激的基因表达变化, 发现差异表达基因主要富集在能量代谢和免疫应激过程相关的多个通路中。
- RT-qPCR试验对随机选取的差异表达基因进行验证, 结果与转录组分析结果相似, 说明转录组测序分析结果的可靠性。
- 高温胁迫不同时间肝脏组织基因表达模式揭示了与能量代谢和免疫应激相关的差异表达基因, 为深入研究黑龙江茴鱼对急性高温胁迫响应的生理调控机制提供基础数据。因此在养殖生产中, 应密切关注温度的变化, 降低温度胁迫对鱼体生理机能的影响。