

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230309001

http://www.yykxjz.cn/

王润, 刘洋, 杨英明, 王婧, 张婷婷, 林梦娇, 王磊, 陈松林. 半滑舌鲷响应急性高温胁迫的生理变化和相关基因表达. 渔业科学进展, 2024, 45(4): 24–33

WANG R, LIU Y, YANG Y M, WANG J, ZHANG T T, LIN M J, WANG L, CHEN S L. Physiological changes and related gene expression of *Cynoglossus semilaevis* in response to acute high temperature stress. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(4): 24–33

半滑舌鲷响应急性高温胁迫的 生理变化和相关基因表达*

王 润^{1,2} 刘 洋² 杨英明² 王 婧¹ 张婷婷^{1,2}
林梦娇^{1,2} 王 磊² 陈松林^{1,2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071)

摘要 夏季高温会引起半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的应激,甚至造成死亡,是工厂化养殖的重要影响因素之一。为探究高温胁迫对半滑舌鲷肝脏氧化损伤及热应激相关基因的影响,本研究选取半滑舌鲷一个全同胞家系为实验对象,通过连续升温达到高温胁迫条件(35℃)后,分别在0、3、6、12和24 h采集肝脏组织,进行苏木精-伊红染色法(HE)和TUNEL染色并观察细胞损伤情况,测定抗氧化酶活性及丙二醛(MDA)含量并检测应激相关基因 heat shock protein family A member 1A (*hspa1a*)、heat shock protein 90 beta family member 1 (*hsp90b1*)和 dual-specificity phosphatase 1 (*dusp1*)的表达变化。结果显示,急性高温胁迫会造成半滑舌鲷肝脏组织发生明显病理变化并出现细胞凋亡;超氧化物歧化酶(SOD)活性在高温胁迫6 h时显著高于对照组($P<0.05$),谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性在高温胁迫12 h时显著高于对照组($P<0.05$),过氧化氢酶(CAT)活性在高温胁迫0 h时显著高于对照组($P<0.05$),MDA含量在高温胁迫24 h时显著高于对照组($P<0.05$);热休克蛋白基因 *hspa1a* 和 *hsp90b1* 分别在高温胁迫0 h和3 h时显著上调表达,热应激相关基因 *dusp1* 在高温胁迫3 h时显著上调表达。综上所述,急性高温胁迫下,半滑舌鲷肝脏发生氧化应激,短期内机体可调动抗氧化系统加速清除活性氧,并激活热应激相关基因表达。该研究可为解析半滑舌鲷对高温胁迫的响应机制、预防夏季高温大规模死亡的发生以及开展耐高温良种的选育等提供参考。

关键词 半滑舌鲷; 急性高温胁迫; 肝脏; 细胞凋亡; 抗氧化酶; 热休克蛋白基因

中图分类号 S968.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)04-0024-10

水温作为水产养殖过程中最重要的生态因素之一,对养殖鱼类的生理生化状态影响巨大(He *et al*, 2014)。水温变化能直接影响养殖鱼类的生长发育、摄食和代谢等(Chen *et al*, 2020)。虽然鱼类能适应水

* 国家重点研发计划(2022YFD2400401)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2022TD20)、国家海水鱼产业技术体系半滑舌鲷育种岗位(CARS-47-G03)、山东省重点研发计划项目-住鲁院士团队支持项目(2023ZLYS02)和山东省泰山学者攀登计划共同资助。王 润, E-mail: wanghrun@163.com

① 通信作者: 陈松林, 中国工程院院士, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2023-03-09, 收修改稿日期: 2023-04-04

温的小幅度波动,但在实际生产过程中,突发的水温变化会引起养殖鱼类产生应激反应,如生理功能障碍、停止摄食和行为异常,甚至会导致鱼类死亡(Liu *et al.*, 2018)。夏季海水升温超过鱼类耐受范围时,会破坏鱼类的消化、免疫和呼吸系统,环境中的致病菌会进一步影响鱼体的正常生理机能(Yanar *et al.*, 2019)。长期高温环境会对鱼体产生不可逆的损伤,破坏鱼体的免疫防御能力,增加鱼体患病的概率,引发鱼类疾病甚至死亡(Xu *et al.*, 2018)。

高温刺激会引起鱼体氧化应激,导致多种毒性作用(Kim *et al.*, 2019)。研究表明,鱼体的抗氧化防御体系包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)等抗氧化酶,以清除体内过多的活性氧(Chen *et al.*, 2020)。研究发现,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (夏斌鹏等, 2017)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (徐冬冬等, 2010)、美洲鲈(*Alosa sapidissima*) (杨明等, 2020)等各种鱼类的抗氧化酶活性变化与高温存在显著相关性。因此,抗氧化酶活性变化可作为鱼体在高温环境中氧化应激状态的重要指示。在抗热应激的过程中,热休克蛋白也会参与(孔祥辉等, 2022)。不同程度热应激下,大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)“优鲈3号”幼鱼肝脏和鳃组织中的 *hsp70* 和 *hsc70* 的 mRNA 表达量随着胁迫温度的升高基本呈先上升后下降的趋势(陆健等, 2021)。近期, Wang 等(2023)研究发现,斑马鱼(*Danio rerio*)敲除双特异性磷酸酶基因(*dusp1*)后,对温度变化极其敏感,主要归因于线粒体功能障碍和鳃中产生过量的活性氧,对 DUSP1-MARK-DRP1 轴研究表明, *dusp1* 可能对维持线粒体功能完整性和氧化还原稳态起到重要作用,而维持细胞氧化还原稳态可能是应对细胞受到热应激的关键机制。因此,推测 *dusp1* 基因也在鱼类抵抗热应激的过程中发挥重要作用。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是一种暖温型底层鱼类,其肉质细腻、味道鲜美,极受消费者欢迎,市场价值很高。然而,在工厂化养殖过程中,夏季高温对半滑舌鳎的生存和生长产生了极大威胁,使机体发生应激反应,甚至导致死亡(Guo *et al.*, 2016)。肝脏作为鱼类解毒代谢及免疫相关的组织,在响应高温胁迫过程中发挥重要作用(Liu *et al.*, 2016)。随着半滑舌鳎全基因组测序的完成(Chen *et al.*, 2014),分子标记辅助育种(Sharifi *et al.*, 2015)、基因组选择(Lu *et al.*, 2021)、基因编辑等技术(Cui *et al.*, 2017)的应用以及高产抗病新品种“鳎优1号”培育的成功(卢昇等, 2022),使用先进分子育种技术培育耐高温良种已经成为下一阶段半滑舌鳎良种培育的新目标。然而,关于急性

高温对半滑舌鳎影响的研究鲜有报道。本研究通过连续升温达到高温胁迫条件(35 ℃)后,分别在 0、3、6、12 及 24 h 采集肝脏组织进行苏木精-伊红染色法(HE)和 TUNEL 染色,观察肝脏组织病理变化及细胞凋亡情况,测定肝脏抗氧化酶活性变化,并检测热应激相关基因 heat shock protein family A member 1A (*hspa1a*)、heat shock protein 90 beta family member 1 (*hsp90b1*)及 dual-specificity phosphatase 1 (*dusp1*)的表达模式。通过研究半滑舌鳎在急性高温胁迫下的组织细胞、生理生化及分子水平变化规律,初步探究半滑舌鳎对高温胁迫的响应及适应机制,以期半滑舌鳎耐高温良种培育和健康养殖提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验用半滑舌鳎幼鱼[(22.6±2.2) cm, (78.7±10.6) g]购于山东省烟台市海阳黄海水产有限公司,个体健壮、无病、活力强。

1.2 实验方案

实验用鱼暂养于大型圆形玻璃钢水槽(1 000 L)内,所用海水为砂滤水,水温 23 ℃。在该条件下驯化、暂养 7 d。

设置对照组和急性高温处理组,其中,对照组(C)在 23 ℃下正常养殖,急性高温处理组在以 2.5 ℃/h 连续升温至水温达到 35 ℃后进行急性高温胁迫实验,2 个组分别设置 3 个平行,每个平行 27 尾鱼。

1.3 样品采集

将水温升至实验温度(35 ℃)的时间记为 0 h,分别在 0、3、6、12 和 24 h 5 个时间点取肝脏组织。对照组和急性高温组的每个平行组分别随机选 2 尾鱼,MS-222 麻醉后,在超净工作台内使用无菌无酶的剪刀、镊子和手术刀采集肝脏组织样品。用于酶活和基因表达检测的样品装入冻存管后立即放进液氮中,然后转移至-80 ℃冰箱保存;用于制作切片的样品使用多聚甲醛保存。动物实验操作遵循中国水产科学研究院黄海水产研究所伦理委员会的要求进行。

1.4 肝脏组织石蜡切片制作及 HE 染色

采集样品时,每条鱼切取一块形状较为完整、约 3 mm×3 mm×3 mm 肝脏组织,在多聚甲醛中固定 24 h,然后转移到 70%乙醇中,经过不同浓度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋、切片和展片等步骤制作肝脏石蜡切片。

将制作好的肝脏组织石蜡切片脱蜡至水, 然后进行 HE 染色, 最后脱水封片, 使用显微镜镜检, 采集图像。

1.5 TUNEL 检测

将制作好的肝脏组织石蜡切片脱蜡至水, 通过蛋白酶 K 修复、破膜、室温平衡、加反应液、细胞核 DAPI 复染、封片等步骤进行 TUNEL 染色, 最后镜检拍照, 采集图像。

1.6 抗氧化酶测定

称取适量肝脏组织, 根据肝脏重量加入 9 倍体积的 1×PBS 缓冲液进行匀浆, 4 ℃下 3 000 r/min 离心 8 min, 取上清液测定抗氧化酶活力。SOD、CAT、谷 GPx 酶活性及丙二醛(MDA)含量使用晶美生物的 ELISA 试剂盒检测。每个样品的总蛋白含量(TP)采用南京建成生物工程研究所的考马斯亮蓝试剂盒测定。吸光度值采用 2800MF 型多功能酶标仪测定。

1.7 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 TRIzol 试剂提取肝脏样品总 RNA, 测定提取的 RNA 浓度和 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值。配制 1%琼脂糖凝

胶进行凝胶电泳验证 RNA 质量, 挑选质量和浓度均合格的 RNA 使用 TaKaRa 试剂盒进行反转录。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测

通过实时荧光定量 PCR(qPCR)检测在高温胁迫不同时间点时 *hspa1a*、*hsp90b1* 和 *duspl* 基因在半滑舌鲷肝脏组织中的表达水平。以 β -actin 作为内参基因, 引物根据 *hspa1a*、*hsp90b1* 和 *duspl* 基因核心片段序列设计。反应体系参照 SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, 日本)说明书, 总体系为 20 μ L: SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 10 μ L, 正反向引物各 1.2 μ L, cDNA 模板 4.0 μ L, RNase-Free 水 3.6 μ L。使用 ABI 7500 Fast Real-Time (Applied Biosystems, 美国)仪器进行定量分析。实验所用引物见表 1。反应程序: 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 3 s, 60 ℃ 33 s, 40 个循环; 95 ℃ 15 s; 60 ℃ 60 s; 95 ℃ 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算和分析 *hspa1a*、*hsp90b1* 和 *duspl* 的相对表达量。

1.9 数据统计分析

实验数据使用 SPSS 26.0 软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.01$ 为差异极显著水平, $P<0.05$ 为差异显著水平。使用 Origin 2022 软件作图。

表 1 本研究用到的引物信息
Tab.1 Information of primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	基因序列号 Gene ID
<i>hsp90b1</i> -F	CCAGTAGGAAGGAGGCGGAGTC	LOC103380288
<i>hsp90b1</i> -R	TCGTCCACGGGCTCTGTCAAG	
<i>hspa1a</i> -F	GCCAGTGCGAACGGAAGGATG	LOC103393458
<i>hspa1a</i> -R	GCTCTTTCTGCTTGCTCTAACTC	
<i>duspl</i> -F	TCTCTGCCCGCTACTACTATGG	LOC103391114
<i>duspl</i> -R	TGGGACGAGTTAAAGGAGAGGAAGG	
β -actin-F	CCTTGGTATGGAGTCCTGTGGC	LOC103393304
β -actin-R	TCCTTCTGCATCCTGTCTGGC	

2 结果

2.1 急性高温胁迫对半滑舌鲷肝脏组织病理和细胞凋亡的影响

急性高温胁迫后, 半滑舌鲷肝脏组织病理变化如图 1 所示。对照组肝脏组织中肝细胞形态近圆形, 排列整齐, 细胞边界清晰, 细胞核位于中央, 无变形、坏死、淤血、出血等现象(图 1A)。高温 0 h 后肝脏细胞基本结构并无明显的异常(图 1B); 3 h 时, 出现红细胞沉积和轻微的细胞水肿(图 1C); 6 h 时, 肝小叶整体结构比较完整, 而中央静脉区域可见放射状的肝

板结构轻微的混乱, 肝板之间的血窦间隙增宽、增多, 肝脏空泡相对减少, 细胞核位于肝细胞的一侧(图 1D); 高温胁迫 12 h 后, 肝脏组织损伤较明显, 肝细胞排列无序, 较多肝细胞均出现空泡化, 细胞间界限杂乱模糊, 细胞核萎缩, 严重的甚至出现溶解, 以血窦扩张、空泡持续减少为特点(图 1E); 高温胁迫 24 h 后, 肝脏组织原有结构遭到破坏, 可以观察到脂质空泡以及肝细胞坏死产生的空洞, 肝细胞出现广泛变性坏死, 出血严重(图 1F)。

急性高温胁迫后半滑舌鲷肝脏细胞凋亡结果如图 2 所示。对照组中肝脏细胞状态良好, 偶有凋亡

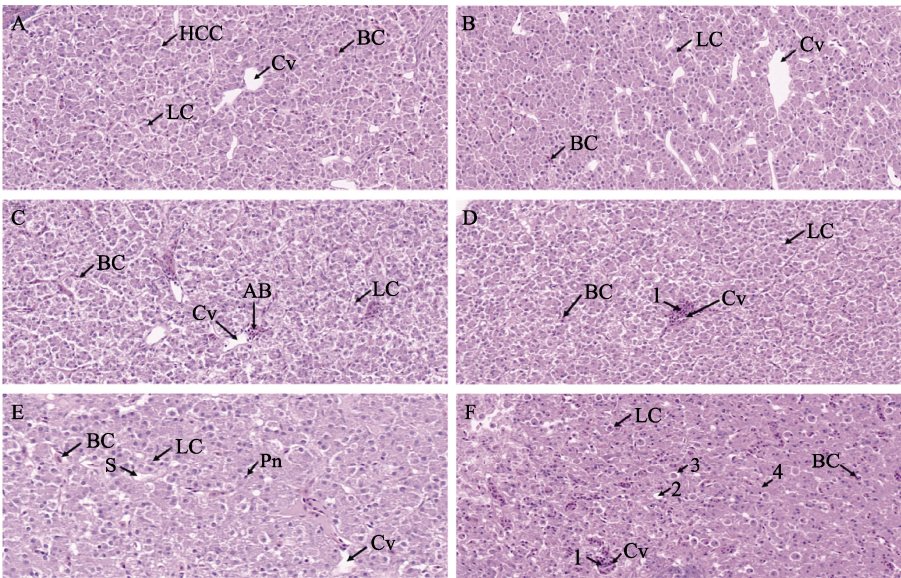


图 1 急性高温胁迫对半滑舌鳎肝脏组织结构的影响

Fig.1 Effects of acute heat stress on liver tissue structure of *C. semilaevis*

A: 对照组; B~F: 高温胁迫组 0、3、6、12 和 24 h。比例尺=20 μm 。HCC: 肝细胞索; Cv: 中央静脉; LC: 肝细胞; BC: 血细胞; AB: 血细胞聚集; S: 空泡; Pn: 细胞核固缩; 1: 淤血; 2: 脂质空泡; 3: 坏死产生的空洞; 4: 肝细胞广泛性坏死。
A: Control group; B~F: High temperature stress group at 0, 3, 6, 12, and 24 h. Scale =20 μm . HCC: Hepatocyte cord; Cv: Central vein; LC: Hepatocyte; BC: Hemocyte; AB: Hemocyte aggregation; S: Vacuole; Pn: Nuclear pyrosis; 1: Congestion; 2: Lipid vacuole; 3: Necrotic cavity; 4: Hepatocyte extensive necrosis.

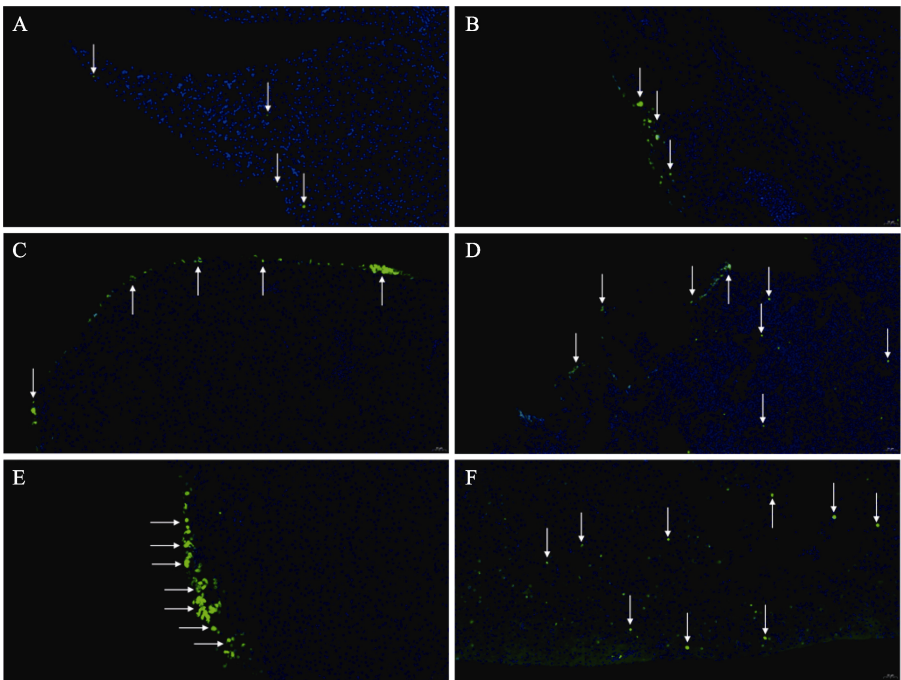


图 2 TUNEL 染色法检测急性高温胁迫处理后半滑舌鳎肝脏细胞凋亡

Fig.2 Apoptosis of liver cell of *C. semilaevis* after acute high temperature stress treatment detected by TUNEL staining

A: 对照组; B~F: 高温胁迫组 0、3、6、12 和 24 h。
蓝色荧光代表正常细胞的细胞核, 绿色荧光代表凋亡细胞的细胞核。比例尺=20 μm 。
A: Control group; B~F: High temperature stress group at 0, 3, 6, 12, and 24 h.
Blue fluorescence represents the nucleus of normal cells, and green fluorescence represents the nucleus of apoptotic cells. Scale =20 μm .

的细胞出现(图 2A)。在高温胁迫 0 h 即在肝脏边缘发现少量凋亡细胞(图 2B);随着高温胁迫时间的增加,肝脏边缘凋亡细胞数量越来越多(图 2C~E);急性高温胁迫 24 h 后,肝脏内部出现大量细胞凋亡(图 2F)。

2.2 急性高温胁迫对半滑舌鲷肝脏抗氧化酶活性的影响

急性高温胁迫后半滑舌鲷肝脏中抗氧化酶 SOD、CAT、GPx 活性及 MDA 含量均出现不同程度的升高,具体结果如图 3 所示。其中,SOD 活性在高温胁迫后 3、6 和 24 h 显著高于对照组($P<0.05$) (图 3A)。CAT 活性在高温胁迫后 0~24 h 均显著高于对照组($P<0.05$)

(图 3B)。GPx 活性在高温胁迫后 0 h 显著低于对照组,在 12 h 显著高于对照组($P<0.05$) (图 3C)。MDA 含量在急性高温胁迫后 0~12 h 与对照组无显著差异,24 h 显著高于对照组($P<0.05$) (图 3D)。

2.3 急性高温胁迫对半滑舌鲷肝脏 *hspa1a*、*hsp90b1* 和 *dusp1* 基因表达的影响

急性高温胁迫后半滑舌鲷肝脏 *hspa1a*、*hsp90b1* 和 *dusp1* 基因表达变化如图 4 所示。*hspa1a* 基因表达在高温胁迫后显著上调表达,0 h 即达到最大值,为对照组的 6 000 倍,3 h 表达量为对照组的 4 000 倍,6、12 和 24 h 时表达趋势虽然下降,但仍显著高于对

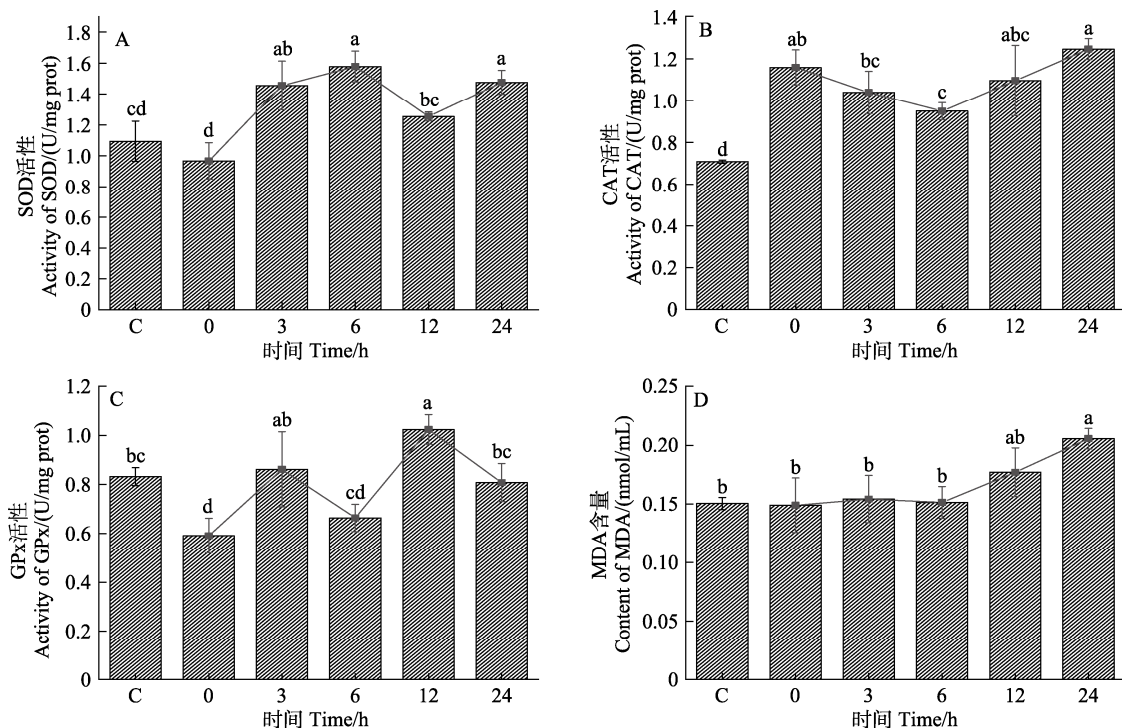


图 3 急性高温胁迫对半滑舌鲷抗氧化酶活性的影响

Fig.3 Effects of acute heat stress on antioxidant enzyme activity of *C. semilaepis*

各时间点不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Different lowercase letters at each time point indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

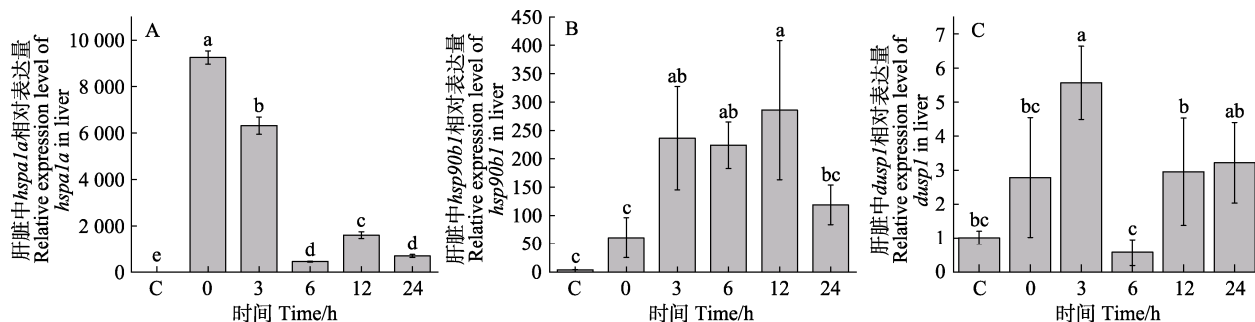


图 4 急性高温胁迫下半滑舌鲷肝脏中 *hspa1a*、*hsp90b1* 和 *dusp1* 基因的表达量变化

Fig.4 The variation of relative expression level of *hspa1a*, *hsp90b1* and *dusp1* in the liver of *C. semilaepis* under acute high temperature stress

照组(图 4A)。*hsp90b1* 表达在高温胁迫后显著上调表达, 在 12 h 达到最大值, 为对照组的 75 倍, 3、6 和 24 h 的表达量分别为对照组的 60、70 和 40 倍(图 4B)。*dusp1* 基因的表达量呈先升高后降低再升高的趋势, 3 h 表达量显著高于对照组, 其他时间点与对照组差异不显著(图 4C)。

3 讨论

肝脏是鱼类维持生命活动和物质代谢的重要组织, 当肝脏受到损伤后会出现肝细胞空泡化、细胞破损、细胞边界模糊等现象(王晓光, 2015)。在 37 °C 急性高温胁迫下, 大口黑鲈“优鲈 3 号”的肝细胞出现空泡化、细胞核溶解、细胞界限杂乱模糊等现象(陆健等, 2021)。在 27 °C 急性高温胁迫时, 许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)的肝脏损伤较明显, 肝细胞排列杂乱, 较多肝细胞出现空泡化、细胞间界限杂乱模糊和细胞核溶解, 而在 5 °C 急性低温胁迫下, 肝脏组织损伤不明显(张思敏等, 2018)。本研究也发现, 随着高温胁迫时间延长, 肝细胞出现明显损伤。细胞凋亡(apoptosis)是由基因控制、细胞自主的有序性死亡, 又称为程序性细胞死亡(programmed cell death), 是真核细胞的一种特殊的死亡形式(管强东等, 2022)。研究表明, 热应激引起细胞线粒体产生过氧化物损伤机体, 从而导致细胞凋亡(Luo et al, 2016)。细胞凋亡的相关研究发现许多对细胞凋亡起到调控作用的基因, 如凋亡基因 *caspase3* (Chu et al, 2023)、*caspase9* (刘恩光等, 2021)、*p38MAPK* 基因(王艺臻等, 2022)等。本研究发现, 高温胁迫后半滑舌鲷肝脏出现明显的细胞凋亡现象, 期望后续进一步探讨细胞凋亡基因在半滑舌鲷响应高温胁迫中的调控作用。

高温胁迫会使鱼类产生氧化应激, 导致氧化损伤。SOD、CAT 和 GPx 是鱼体应对氧化应激的主要抗氧化酶, MDA 作为脂质过氧化的最终产物, 可以反映氧自由基对生物体的应激损伤程度(Zang et al, 2012)。其中, SOD 对氧化剂和抗氧化剂的平衡起到重要作用, 是最基本和最重要的清除剂(徐冬冬等, 2010)。作为一种经典的抗氧化酶, SOD 将超氧化物转化为 H_2O_2 和 O_2 , 再经 CAT 催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 , 从而清除氧自由基, 减轻脂质过氧化损伤(王晓煜等, 2020)。GPx 能催化还原性谷胱甘肽(GSH)变成氧化性谷胱甘肽(GSSG), 促进 H_2O_2 分解, 使有毒的 H_2O_2 还原成无毒的羟基化合物(Ning et al, 2016)。研究人员对虹鳟和硬头鳟(*Salmon gairdneri*)幼鱼进行急性高温胁迫, 发现其肝脏、鳃、肌肉、肾脏、心脏等组

织中 SOD、CAT 和 GPx 活性均升高, 而肝脏组织中的抗氧化酶活性最高(姜旭阳等, 2021)。温度升高也对白梭吻鲈(*Sander lucioperca*)肝脏抗氧化酶影响显著, 升温初期 SOD、CAT 和 GPx 活性均升高(王国成等, 2017)。在其他水产物种中也发现类似结果, 例如, 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)在高温胁迫下, 肝胰腺中的 SOD 和 CAT 活性显著高于对照组, 表明高温诱导使日本沼虾的抗氧化力增强(翟书华等, 2022)。对皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)和虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)进行高温骤变处理, 其 MDA 含量增加, 说明温度急剧改变会激活机体抗氧化系统(姜妮妮, 2017)。同样, 本研究中, SOD、CAT、GPx 活性和 MDA 含量在急性高温胁迫 24 h 内均出现明显的升高。其中, SOD 活性在急性高温胁迫 0 h 显著低于对照组, 3 h 时显著高于对照组($P<0.05$); 而 GPx 活性在高温胁迫 0 h 和 6 h 显著低于对照组, 12 h 后显著高于对照组($P<0.05$)。出现这样的变化趋势, 可能是在急性高温胁迫期间, 活性氧的含量逐渐增加, 同时鱼体内产生炎症, 出现细胞凋亡现象, 需要通过提高抗氧化酶的活性来保护机体不受到损伤。因此, 通过以上研究推测, 高温胁迫可能致使半滑舌鲷体内活性氧增多, 鱼体通过激活肝脏抗氧化系统以清除过多活性氧产生的损害。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一类高度保守的细胞内蛋白家族, 目前在多种生物体中均有发现, 能提高机体应对温度胁迫、饥饿胁迫、低氧胁迫等恶劣环境的能力(张晨光等, 2023)。Hsp70 和 Hsp90 是其中重要的 2 个家族成员, 在鱼类中有较广泛的研究。研究表明, 温度变化会显著影响鱼类热休克蛋白基因的表达(孙旋辉等, 2023)。对银鲟进行 28 °C、30 °C 和 32 °C 的高温胁迫, 肝组织 *hsp70* 基因的表达量随着胁迫时间增加, 在 24 h 内呈先上升后下降的趋势, 并且在不同温度胁迫下的表达量有显著差异(史琛榆等, 2022)。*hsp1a* 即 *hsp70* 基因, 是热休克蛋白家族中极其重要的基因之一, 在高温下能协助蛋白复性及保护生物体免受损伤(Yebra-Pimentel et al, 2019)。本研究中, *hsp1a* 基因在受到高温胁迫后立即呈现极显著上调表达, 迅速响应高温胁迫, 说明 *hsp1a* 基因是半滑舌鲷抵抗热应激的关键基因, 在今后可作为耐高温基因标记在相关研究中应用。

研究表明, *dusp1* 基因是通过介导细胞外信号调节蛋白激酶的去磷酸化作用来发挥功能(郭安宁等, 2018)。研究发现, 在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)受到低温胁迫的大脑组织转录组谱中, *dusp1* 基因主

要在冷胁迫下细胞的生长和凋亡调控中起重要作用 (Shi *et al.*, 2020)。对斑马鱼胚胎成纤维样细胞进行 *dusp1* 敲降, 进行 10 °C 低温处理, 发现低温胁迫下细胞的凋亡比例显著高于对照组, 活细胞数显著低于对照组, 说明 *dusp1* 参与鱼类冷应激过程, 在低温胁迫下能保护细胞 (Niu *et al.*, 2017)。本研究发现, 在急性高温胁迫初期, *dusp1* 基因在肝脏中呈现显著高表达, 这可能是在暗示 *dusp1* 基因能响应高温胁迫; 但在急性高温胁迫 6 h 时其表达量显著下调, 可能是因为此时细胞凋亡的范围开始逐渐扩散, 影响到 *dusp1* 基因的表达。综上结果表明, 半滑舌鳎的 *dusp1* 基因在耐高温功能中可能发挥重要作用, 这为探究暖温性鱼类高温适应性机制提供了新的证据。

4 结 论

本研究通过对半滑舌鳎进行 35 °C 急性高温胁迫, 选取 24 h 内 5 个时间点的肝脏组织, 分析组织细胞、生理生化、基因表达等水平的应激性反应, 结果表明, 急性高温胁迫会造成半滑舌鳎肝脏组织病变和细胞凋亡, 引起机体抗氧化防御系统发生反应, 即 SOD、CAT、GPx 和 MDA 等抗氧化相关指标产生变化以减轻机体损伤, 并激活 *hspa1a*、*hsp90b1* 和 *dusp1* 等热应激相关基因显著表达以尽快适应高温胁迫带来的不利影响。以上结果初步探明了半滑舌鳎在急性高温胁迫下的应激反应, 对其高温适应性分子基础的遗传解析和耐高温良种培育具有指导意义。

参 考 文 献

- CHEN S L, ZHANG G J, SHAO C W, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- CHEN Y N, LIU E G, LI C J, *et al.* Effects of heat stress on histopathology, antioxidant enzymes, and transcriptomic profiles in gills of pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture*, 2020, 534(5): 736277
- CHU P, LUO S, WANG H Z, *et al.* Interactive effects of temperature and salinity on the apoptosis, antioxidant enzymes, and MAPK signaling pathway of juvenile pufferfish (*Takifugu fasciatus*). *Aquaculture Reports*, 2023, 29: 101483
- CUI Z K, LIU Y, WANG W W, *et al.* Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, 2017, 7: 42213
- GUAN Q D, YANG J, LIU Y Q, *et al.* Factors influencing detection of apoptosis by flow cytometry using Annexin V/PI staining. *Biotechnology*, 2022, 32(6): 710–714 [管强东, 杨健, 刘艳青, 等. Annexin V/PI 法流式细胞术检测细胞凋亡的影响因素. *生物技术*, 2022, 32(6): 710–714]
- GUO A N. The molecular mechanism of *bmp10*, *dusp1* by cold stress and construction of *gsdf* transgenic line in zebrafish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [郭安宁. 低温胁迫下斑马鱼 *bmp10*、*dusp1* 分子调控机制的研究及 *gsdf* 转基因品系的构建. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- 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. *Gene*, 2016, 586(1): 97–104
- HE Y F, WU X B, ZHU Y J, *et al.* Effect of rearing temperature on growth and thermal tolerance of *Schizothorax (Racoma) kozlovi* larvae and juveniles. *Journal of Thermal Biology*, 2014, 46: 24–30
- JIANG W W. Effects of temperature variation on physiological activities of scallops and abalone. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences (Institution of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2017 [姜娓娓. 扇贝和皱纹盘鲍对温度变化的生理响应研究. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2017]
- JIANG X Y, HUANG M, YANG X G, *et al.* Antioxidant enzyme activities of juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to acute high-temperature stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(1): 57–65 [姜旭阳, 黄铭, 杨小刚, 等. 急性高温胁迫对虹鳟和硬头鳟幼鱼抗氧化酶活性的影响. *中国水产科学*, 2021, 28(1): 57–65]
- KIM J H, KIM S K, HUR Y B. Temperature-mediated changes in stress responses, acetylcholinesterase, and immune responses of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* in a bio-floc environment. *Aquaculture*, 2019, 506: 453–458
- KONG X H, WANG S S, DONG Y H, *et al.* Analysis of expression characteristics of related genes in response to acute thermal stress in the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 194–203 [孔祥辉, 王莎莎, 董迎辉, 等. 缢蛏急性高温胁迫应答主要候选基因的表达特征分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 194–203]
- 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*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 52: 317–324
- LIU E G. Effects of acute heat stress on liver and gill tissue damage, apoptosis and immune response of pikeperch (*Sander lucioperca*). Master's Thesis of Suzhou University, 2021 [刘恩光. 急性热胁迫对白梭鲈肝脏和鳃组织损伤、细胞凋亡及免疫反应的影响. 苏州大学硕士研究生学

位论文, 2021]

- LIU Z M, ZHU X L, LU J, *et al.* Effect of high temperature stress on heat shock protein expression and antioxidant enzyme activity of two morphs of the mud crab *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2018, 223: 10
- LU J, ZHANG J J, ZHOU G Q, *et al.* Effect of acute high temperature stress on tissue damage and HSPs gene expression of largemouth bass *Micropterus salmoides* "Youlu No.3". *Fisheries Science*, 2021, 40(4): 508–515 [陆健, 张佳佳, 周国勤, 等. 急性高温胁迫对大口黑鲈"优鲈 3 号"组织损伤及 HSPs 基因表达的影响. *水产科学*, 2021, 40(4): 508–515]
- LU S, LI Y Z, WANG L, *et al.* Application of genomic selection in the breeding of new variety of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) "Tayou No.1". *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(8): 1305–1312 [卢昇, 李仰真, 王磊, 等. 基因组选择技术在半滑舌鲷"鲷优 1 号"新品种培育中的应用研究. *水产学报*, 2022, 46(8): 1305–1312]
- LU S, ZHOU Q, CHEN Y D, *et al.* Development of a 38K single nucleotide polymorphism array and application in genomic selection for resistance against *Vibrio harveyi* in Chinese tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Genomics*, 2021, 113: 1838–1844
- LUO S W, WANG W N, SUN Z M, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of (B-cell lymphoma-2 associated X protein) Bax in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after the *Vibrio alginolyticus* challenge. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 60: 66–79
- NING R H, ZHANG M, CHEN Z Y, *et al.* Molecular cloning and expression of GPX gene from *Siniperca chuatsi*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016(53): 53
- NIU H B, HU P, CHENG P L, *et al.* The role of *duspl* downregulation in apoptosis of zebrafish ZF4 cells under cold stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 995–1002
- SHARIFI M, SOURINEJAD I, HOSSEINI S J, *et al.* Application of AFLP molecular marker for genetic analysis of black pomfret *Parastromateus niger* from the Persian Gulf. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 2015, 14(4): 857–875
- SHI C Y, ZHAO C P, HU Y X, *et al.* Effects of high temperature stress on physiology and expression of related gene in *Pampus argenteus*. *Journal of Applied Oceanography*, 2022, 41(1): 1–7 [史琛榆, 赵淳朴, 胡艺潇, 等. 银鲳应对高温胁迫的生理响应及其相关基因表达研究. *应用海洋学学报*, 2022, 41(1): 1–7]
- SHI M J, ZHANG Q X, LI Y M, *et al.* Global gene expression profile under low-temperature conditions in the brain of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *PLoS One*, 2020, 15(9): e0239730
- SUN X H, BING X W, DING W D, *et al.* Effects of high-temperature stress on serum biochemical indexes, liver *sod* gene and heat shock protein gene expression of juvenile *Siniperca chuatsi*. *Journal of Southern Agriculture*, 2022, 53(12): 3539–3547 [孙旋辉, 邴旭文, 丁炜东, 等. 高温应激对鳊鱼血清生化指标及肝脏 *sod* 基因和热休克蛋白基因表达的影响. *南方农业学报*, 2023, 53(12): 3539–3547]
- WANG G C. Effect of high temperature stress on physiology and biochemistry, HSC70 gene cloning and expression of pikeperch (*Sander lucioperca*). Master's Thesis of Suzhou University, 2017 [王国成. 高温胁迫对白梭鲈生理生化的影响及其 HSC70 基因的克隆与表达. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2017]
- WANG X G. Effect of deltamethrin on gills and livers in *Danio rerio*. Master's Thesis of Shandong Normal University, 2015 [王晓光. 溴氰菊酯对斑马鱼鳃、肝脏的影响. 山东师范大学硕士研究生学位论文, 2015]
- WANG X Y, HU C L, CHENG P L, *et al.* Effects of cold acclimation on the apoptosis and ROS of zebrafish ZF4 cells. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(10): 4475–4480 [王晓煜, 胡春兰, 程鹏丽, 等. 低温驯化对斑马鱼 ZF4 细胞凋亡和 ROS 的影响. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(10): 4475–4480]
- WANG Y Z. Expression characteristics of *p38MAPK* and its role in regulating apoptosis under high temperature stress in *Sinonovacula constricta*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2022 [王艺臻. 高温胁迫下缢蛏 *p38MAPK* 基因的表达特征以及对细胞凋亡的调控作用. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2022]
- WANG Y, WANG H M, ZHOU Y, *et al.* *Duspl* regulates thermal tolerance limits in zebrafish by maintaining mitochondrial integrity. *Zoological Research*, 2023, 44(1): 126–141
- XIA B P, LIU Z, ZHOU Y J, *et al.* Effects of chronic heat stress on part of serum non-specific immunity parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(7): 1078–1085 [夏斌鹏, 刘哲, 周彦静, 等. 慢性热应激对虹鳟部分血清非特异性免疫指标的影响. *农业生物技术学报*, 2017, 25(7): 1078–1085]
- XU D D, LOU B, ZHAN W, *et al.* Effect of high temperature stress on growth performance and activities of antioxidant enzymes in liver of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(7): 1099–1105 [徐冬冬, 楼宝, 詹炜, 等. 高温胁迫对褐牙鲆生长及肝脏抗氧化酶活性的影响. *水产学报*, 2010, 34(7): 1099–1105]
- XU D X, ZHOU S, SUN L N. RNA-seq based transcriptional analysis reveals dynamic genes expression profiles and immune-associated regulation under heat stress in *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 78: 169–176
- YANAR M, ERDOĞAN, ERHAN, KUMLU M. Thermal tolerance of thirteen popular ornamental fish species.

- Aquaculture, 2019, 501: 382–386
- YANG M, JIANG F, SHI Y H, *et al.* Effect of high temperature stress on activities of digestive enzymes in *Alosa sapidissima*. Journal of Northwest A&F University (Natural Science), 2020, 48(10): 1–8 [杨明, 蒋飞, 施永海, 等. 高温胁迫对美洲鲈消化酶活性的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(10): 1–8]
- YEBRA-PIMENTEL E S, GEBERT M, JANSEN H J, *et al.* Deep transcriptome analysis of the heat shock response in an Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) cell line. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 88: 508–517
- ZANG Y Q, TIAN X L, DONG S L, *et al.* Growth, metabolism and immune responses to evisceration and the regeneration of viscera in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Aquaculture, 2012, 358/359: 50–60
- ZHAI S H, FU H T, QIAO H, *et al.* Effects of high temperature on heat shock proteins, antioxidant enzyme activity, and histology of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(5): 684–695
- [翟书华, 傅洪拓, 乔慧, 等. 高温胁迫对日本沼虾热休克蛋白基因的表达、抗氧化酶活力及组织结构的影响. 中国水产科学, 2022, 29(5): 684–695]
- ZHANG C G, DING W D, CAO Z M, *et al.* Effects of acute high temperature stress on antioxidant enzymes activity, digestive enzymes activity and gene expression of heat shock proteins in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(3): 815–826 [张晨光, 丁炜东, 曹哲明, 等. 急性高温胁迫对翘嘴鲈幼鱼抗氧化酶和消化酶活性及热休克蛋白基因表达的影响. 南方农业学报, 2021, 52(3): 815–826]
- ZHANG S M, LI J F, WEN H S, *et al.* Effect of acute temperature stress on liver metabolism of black rockfish *Sebastes schlegelii* and associating physiological mechanism. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2018, 48(5): 32–38 [张思敏, 李吉方, 温海深, 等. 急性温度胁迫对许氏平鲉肝脏代谢机能和血液指标的影响及生理机制. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(5): 32–38]

(编辑 冯小花)

Physiological Changes and Related Gene Expression of *Cynoglossus semilaevis* in Response to Acute High Temperature Stress

WANG Run^{1,2}, LIU Yang², YANG Yingming², WANG Jing¹, ZHANG Tingting^{1,2},
LIN Mengjiao^{1,2}, WANG Lei², CHEN Songlin^{1,2①}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract The Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) belonging to Pleuronectiformes, Cynoglossidae, *Cynoglossus*, is distributed in the sea areas of Korea, Japan and China. *C. semilaevis* has limited natural resources and no long-distance migration, which is suitable for the development of aquaculture in coastal areas. After more than ten years of artificial domestication, *C. semilaevis* has become one of the main mariculture species. Water temperature is an important environmental factor affecting the growth and development of fish. High temperature in summer can cause stress and even death of *C. semilaevis*, which is one of the important factors affecting factory farming and the promotion in the southern coast. However, the physiological and molecular changes of *C. semilaevis* in response to acute high temperature stress was still unclear to date.

When fish are stimulated by high temperature, it can cause oxidative stress, resulting in a variety of toxic effects. It has been found that there is a significant correlation between high temperature and the activity of antioxidant enzymes in many aquatic animals. Therefore, changes in the activities of antioxidant enzymes can be used as an important indicator when fish are in a state of oxidative stress

① Corresponding author: CHEN Songlin, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

under high temperature stress. As a tissue related to detoxification metabolism and immunity of fish, liver plays an important role in response to high temperature stress, thus the tissue structure and apoptosis are also important indicators of liver health status after high temperature stress. Heat shock proteins (HSPs) are a class of common biological stress proteins, which have biological functions such as anti-stress, anti-oxidation, and regulation of apoptosis. HSPs are also involved in the resistance of fish to heat stress. Recently, it has been found that zebrafish (*Danio rerio*) is extremely sensitive to temperature changes after knockout of dual-specificity phosphatase 1 (*duspl*) gene, and *duspl* has the possibility of maintaining redox homeostasis, so it was speculated that *duspl* gene may plays an important role in fish resistance to heat stress. In this study, heat shock protein family A member 1A (*hsp1a*) in the heat shock protein HSP70 family, heat shock protein 90 beta family member 1 (*hsp90b1*) in the HSP90 family, and *duspl* gene were selected to study the temporal expression characteristics under high temperature stress.

In order to explore the effects of high temperature stress on physiological and molecular changes in the liver of *C. semilaepis*, a full-sib family of *C. semilaepis* was selected as the experimental object to detect the oxidative damage and heat stress-related gene expressions. After continuous heating to high temperature stress conditions (35 °C), liver tissues were collected at 0 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h, respectively. Hematoxylin and eosin (HE) staining and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) were used to observe cell damage, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde (MDA) content were measured, and the expression changes of stress-related genes *hsp1a*, *hsp90b1* and *duspl* were detected. The results showed that acute high temperature stress could cause obvious pathological changes and apoptosis in the liver tissue of *C. semilaepis*. The activity of antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and the content of MDA in the high temperature stress group was significantly higher than that of the control group at 6 h, 12 h, 0 h and 24 h, respectively ($P<0.05$). The expression of heat shock protein genes *hsp1a* and *hsp90b1* were significantly up-regulated at 0 h and 3 h after high temperature stress, respectively. Heat stress-related gene *duspl* was significantly up-regulated at 3 h after high temperature stress.

In conclusion, oxidative stress occurs in the liver of *C. semilaepis* under acute high temperature stress, in the short term, the body can mobilize the antioxidant system to accelerate the removal of reactive oxygen species and activate the expression of heat stress-related genes. This study provides a reference for analyzing the response mechanism of *C. semilaepis* to high temperature stress, preventing the occurrence of massive death in summer, and carrying out the breeding of high temperature resistant varieties.

Key words *Cynoglossus semilaepis*; Acute heat stress; Liver; Apoptosis; Antioxidant enzymes; Heat shock protein genes