

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20241118002

http://www.yykxjz.cn/

韦涌, 李姣, 骆小年, 段友健, 符先飞, 姜旭. 高温胁迫对鸭绿沙塘鳢早期胚胎发育的影响. 渔业科学进展, 2025, 46(5): 110–119

WEI Y, LI J, LUO X N, DUAN Y J, FU X F, JIANG X. Effects of heat stress on early embryonic development of *Odontobutis yaluensis*. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(5): 110–119

高温胁迫对鸭绿沙塘鳢早期胚胎发育的影响*

韦涌^{1,2} 李姣^{1,2①} 骆小年^{1,2} 段友健^{1,2} 符先飞³ 姜旭³

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023; 2. 辽宁省北方鱼类应用生物学与增养殖重点实验室 辽宁 大连 116023; 3. 大连七水渔业发展有限公司 辽宁 大连 116211)

摘要 鸭绿沙塘鳢(*Odontobutis yaluensis*)是一种特产于中国东北地区的小型底栖鱼类,其早期胚胎发育阶段对温度变化敏感,胚胎发育至原肠期前会出现大量死亡,导致孵化率低下。为研究高温胁迫导致鸭绿沙塘鳢早期胚胎发育高死亡的诱因,本研究在3组不同水温(15℃、20℃和25℃)下,选择2-细胞期胚胎进行24 h温度实验,统计其成活率及胚胎发育情况,并检测抗氧化相关酶活性和生长发育相关基因的表达水平。实验结果显示,在15℃及20℃水温下鸭绿沙塘鳢早期胚胎成活率显著高于25℃组($P<0.05$)。15℃及20℃水温下胚胎中总抗氧化力(T-AOC)显著高于25℃组,而丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)则显著低于25℃组;15℃胚胎中过氧化氢酶(CAT)活性显著高于其他2组,其次是25℃,显著高于20℃($P<0.05$)。在15℃及20℃水温下胚胎中*4e-bpl*表达水平显著低于25℃组;15℃胚胎中*c-myc*表达水平显著高于其他2组,其次是20℃,显著高于25℃;20℃胚胎中*s6kl*和*igf-1r*表达水平显著高于其他2组($P<0.05$)。综上所述,在15~20℃水温条件下,鸭绿沙塘鳢早期胚胎发育的成活率较高,且具有较好的抗氧化应激能力来调节氧化应激水平。鸭绿沙塘鳢早期胚胎受高温胁迫所引发的氧化应激是造成其异常发育及大量死亡的诱因,氧化应激导致胚胎细胞受到氧化损伤;同时,为了制止受损胚胎进行异常发育,其自身降低了胚胎发育和蛋白合成有关基因的表达水平,通过减缓发育速度来抑制异常发育的进行。

关键词 鸭绿沙塘鳢; 胚胎发育; 温度; 氧化应激

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)05-0110-10

鱼类无法用代谢所产生的热能来维持体温,这使它们容易受到温度的影响(Burraco *et al*, 2020)。温度过高或过低会造成温度胁迫,生物体内会出现氧化应激等生理反应(Baker *et al*, 2020)。鱼类无法像哺乳类动物或鸟类一样通过代谢维持体温,而是去寻找更适宜的环境或者适应温度变化。为了适应温度变化,鱼类的行为和生理都发生了改变,在细胞和基因水平上

这种变化更加明显(Angilletta, 2009)。这点在鱼类的胚胎发育阶段中更为明显,温度是影响胚胎发育最重要的变量之一(Rogers *et al*, 1981)。胚胎发育中的器官发生、细胞增殖都受到酶的作用,而温度是影响酶活性的重要因素,导致温度控制着鱼类胚胎发育的生理过程(Ritchie *et al*, 2022)。理论上生物都存在一个可以维持自身最佳生理性能的理想温度(Blaxter, 1991)。研

* 辽宁省自然科学基金(2022-BS-273)、辽宁省教育厅基础研究项目(LJKQZ20222357)和大连市科技人才创新支持政策项目计划(2023RQ058)共同资助。韦涌, Email: weiyong0608@gmail.com

① 通信作者: 李姣, Email: lijiao@dlou.edu.cn

收稿日期: 2024-11-18, 收修改稿日期: 2024-12-23

究发现,适宜的孵化水温可以缩短鱼类胚胎的孵化周期(曾本和等, 2023), 高温胁迫会影响胚胎的正常发育进程(Dowling *et al*, 2009)。

氧化应激是指在外界环境因子的刺激下,生物体内产生的过量 ROS 导致内源性抗氧化系统失衡而被激活的氧化损伤状态(Lushchak *et al*, 2021)。ROS 是生物体内氧代谢过程中产生的超氧阴离子(O_2^-)、 H_2O_2 、羟自由基($HO^\cdot$)、一氧化氮(NO)等活性含氧化化合物的总称,参与机体一系列生理活动,生理水平的 ROS 可促进细胞的存活、增殖分化,在胚胎发育过程中作为重要的信号转导分子参与胚胎发育(Jamil *et al*, 2020)。生物体内具有维持氧化还原平衡的抗氧化酶系统,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化氢酶(GSH-Px)等, SOD 是动物体内最丰富的抗氧化酶,能将 O_2^- 转化成 H_2O_2 和 O_2 来减少生物体内 ROS 造成的损伤(Fukai *et al*, 2011)。CAT 作为适应性最强的抗氧化酶,能分解生物体内的 H_2O_2 , 在抗氧化酶系统中发挥重要作用(Glorieux *et al*, 2017)。GSH-Px 是生物体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶,使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,来保护细胞膜的结构及功能(Deponete, 2013)。如果体内氧化和抗氧化失衡,导致 ROS 过量产生,超出了细胞的抗氧化能力就会造成氧化应激,导致脂质过氧化、细胞信号蛋白氧化修饰,甚至导致 DNA 链断裂等,对生殖细胞或胚胎造成严重损伤,细胞凋亡或坏死,致使受精失败或发育阻滞(Dennery, 2007; Opuwari *et al*, 2016)。发育阻滞会导致早期胚胎发育出现停滞、死亡,这种现象主要出现在卵裂期阶段的胚胎中,异常发育的胚胎无法发育至囊胚期(Mohebi *et al*, 2019)。

鸭绿沙塘鳢(*Odontobutis yaluensis*), 属鲈形目(Perciformes)、虾虎鱼亚目(Gobioidae)、沙塘鳢科(Odontobutidae)、沙塘鳢属(*Odontobutis*), 仅分布于中国东北地区的辽河支流太子河、鸭绿江中下游、大洋河和辽东半岛碧流河(王新荣等, 2013b)。自然条件下鸭绿沙塘鳢的繁殖水温一般在 $8\sim 20^\circ\text{C}$, 孵化水温在 $16\sim 20^\circ\text{C}$ (王新荣等, 2013a)。本研究团队在鸭绿沙塘鳢人工繁殖实验的过程中发现,其早期胚胎发育过程对外界环境敏感,尤其是在炎热天气时胚胎发育至原肠期前会出现大量死亡。已有研究也发现,在鱼类的早期生活史中,高温会对鱼类的早期胚胎的生理活动及胚胎发育造成影响(张廷廷等, 2016; 徐永江等, 2023)。为进一步探究高温胁迫导致鸭绿沙塘鳢早期胚胎出现大量死亡的具体原因,本研究通过观察在高温胁迫下鸭绿沙塘鳢早期胚胎发育中出现的异常现

象,并检测早期胚胎的抗氧化酶活性及基因表达变化,来探究高温胁迫导致早期胚胎高死亡的诱因,进而分析抗氧化酶活性及基因表达的变化规律,为后续有关鸭绿沙塘鳢的早期胚胎发育研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 人工催产

实验所使用的鸭绿沙塘鳢亲本来自于辽宁省丹东凤城暖河地笼捕捞,实验地点为大连七水渔业发展有限公司,圆形水泥池(直径 5 m, 蓄水 0.6 m)中流水暂养(溶氧 $8.0\sim 9.5\text{ mg/L}$, pH $7.0\sim 7.5$, 氨氮 $0.5\sim 0.6\text{ mg/L}$), 投喂适口饵料鱼[泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)和麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)]。

催产药物选择为促黄体素释放激素 A_2 +马来酸地欧酮, 剂量为 $4\text{ }\mu\text{g/kg}+4\text{ mg/kg}$ (王新荣等, 2013a)。使用 1 mL 医用注射器于第一背鳍基部注射, 雄鱼注射剂量减半, 注射完放入提前布置好鱼巢的孵化池内, 孵化池内雌雄比例 1:1。

亲鱼产卵所用鱼巢使用瓦片对拼(长 30 cm, 宽 30 cm)并用塑料扎带固定, 只留一端开口供亲鱼进出, 另一端开口用尼龙网封死(图 1), 并将制作好的鱼巢放置在圆形孵化池中(直径 2 m, 蓄水 0.35 m), 孵化池水温 $14\sim 16^\circ\text{C}$ 。亲鱼自然交配在夜间进行, 生产车间环境明亮, 孵化池须用遮光布盖住。

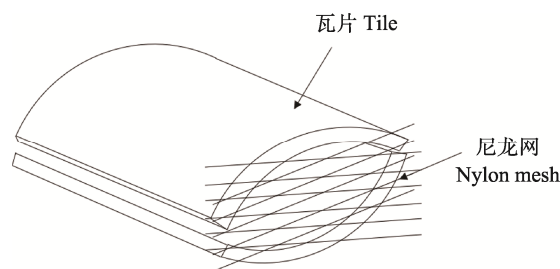


图1 人工鱼巢示意图

Fig.1 Schematic diagram of the artificial fish nest

1.2 实验处理及观察早期胚胎发育

设置 15°C 、 20°C 和 25°C 3 个温度组(溶氧 $7.0\sim 7.5\text{ mg/L}$)对胚胎进行孵化, 每组水温设置 3 个平行组, 每组中有 500 粒鱼卵。实验选择卵裂期(2-细胞期)胚胎进行, 卵裂期的胚胎可以作为成功受精的依据, 避免出现受精失败的胚胎干扰胚胎成活率结果的情况(陈伟兴等, 2013); 同时能观察卵裂期进入到囊胚期的过程中是否出现胚胎发育阻滞现象(Mohebi *et al*, 2019)。实验分 3 个批次进行, 所使用的鱼卵逐

一进行镜检,以保证所有胚胎均处于 2-细胞期。2-细胞期的胚胎进行 24 h 的温度处理(此时间下 3 组温度均可发育至囊胚阶段,以此保证实验中的所有胚胎在 24 h 后都已过渡到囊胚期)。

观察 3 组温度下胚胎的发育情况,每组随机选取 30 粒胚胎,使用显微镜(Olympus CX21, 日本)和体视显微镜(Olympus CX21, 日本)检视胚胎的发育情况。实验结束记录成活率,每组随机选取 15 粒胚胎快速装入冻存管,并放入液氮(-196 ℃)中,后期转移到-80 ℃超低温冰箱中进行保存,以供后续实验。实验中成活率计算公式如下(Nohrman, 1953);

胚胎成活率=(成活胚胎数量/胚胎总数)×100%。

1.3 氧化损伤检测

采用总抗氧化力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化氢酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行检测。将-80 ℃冷冻保存下的胚胎取出,每组取出 3 管胚胎进行酶活测定。称量按质量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水(4 ℃预冷),使用玻璃匀浆器手动匀浆 3~6 min,匀浆后在低温高速离心机 4 ℃、2 500~4 000 r/min 离心 10 min,取上清液待测。后按相关研究中提出的测定方法分别对 T-AOC (Benzie *et al*, 1996)、SOD (Beauchamp *et al*, 1971)、CAT (Aebi, 1984)、MDA (Buege *et al*, 1978)、GSH-Px (Paglia *et al*, 1967)进行测定。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测

每组取出 6 管胚胎样本使用 RNAiso Plus 试剂(TaKaRa, 日本)充分裂解,按说明书步骤提取总 RNA。RNA 浓度和质量检测分别使用 Biodrop uLite+

(Biochrom, 美国)和 1.0%琼脂糖凝胶电泳,总 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间,凝胶显影 2 条清晰明显的亮带,可以进行后续实验。按说明书步骤使用 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本)将 RNA 反转录得到 cDNA。根据转录组序列(NCBI 登录号: SAMN44679878),使用 Primer Premier 5 设计实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)引物,实验选择 2 种管家基因(*GADPH* 和 *β-actin*)进行稳定性比较,最后选择 *β-actin* 作为实验的内参基因。检测真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, *4e-bp1*)、原癌基因 MYC (proto-oncogene, *c-myc*)、核糖体蛋白 S6 激酶 β 1 (ribosomal protein S6 kinase β1, *s6k1*)、胰岛素样生长因子 1 受体(insulin like growth factor 1 receptor, *Igf-1r*)的 mRNA 水平。所使用的 RT-qPCR 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(RT-qPCR 引物信息及序列见表 1)。

在 Light Cycler® 480 II 实时荧光定量 PCR 系统(Roche, 瑞士)中进行检测,最终反应体系:10 μL 2×SYBR Green Pro Taq HS premix (湖南艾科瑞生物工程有限公司),1 μL cDNA 和 0.4 μL 上下游引物及 8.2 μL RNase free water,总体积为 20 μL。PCR 参数:95 ℃预变性 30 s; 95 ℃变性 5 s, 60 ℃退火 30 s,共循环 40 次;熔解曲线(以 0.6 ℃/s 速率从 95 ℃降到 56 ℃,每隔 6 s 采集一次数据信号)。所有 PCR 引物扩增效率为 95.0%到 105.0%。基因相对表达水平使用 2^{-ΔΔCT} 方法计算(Livak *et al*, 2001)。

1.5 数据处理

实验均至少重复 3 次,利用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,使用 GraphPad Prism 9.1 作图。所有数据

表 1 实时荧光定量 PCR 引物信息

Tab.1 Primers used in RT-qPCR

基因名称 Gene	引物 Primers	序列 Sequence (5'~3')	长度 Length/bp	退火温度 T _m /℃
<i>β-actin</i>	β-actin-F	CGACCAAACGCCCAACAA	116	60
	β-actin-R	CGCCAAAAATAACTGAAGCCA		
<i>c-myc</i>	C-myc-F	GACCTCTACCCTGCCTGAT	204	60
	C-myc-R	CTGGGATGAAGAAAACCGA		
<i>4e-bp1</i>	4E-BP1-F	CCAGGAGGAAGAGGGTG	91	60
	4E-BP1-R	AACATTTGCCGAGTGACG		
<i>s6k1</i>	S6K1-F	ATTGTCTTCTTTTCGGTTTTCAC	154	60
	S6K1-R	ACACCTTCTGCGGCACTAT		
<i>Igf-1r</i>	IGF1R-F	ATAAACTCAAACCTCCCGCTCAG	117	60
	IGF1R-R	TCACCCACGCCGCAAC		

通过单样本 *t* 检验、正态性、同质性及方差齐性检验, 使用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较确定差异性。当 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。所有数据均使用平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示。

2 结果

2.1 不同水温下鸭绿沙塘鳢早期胚胎发育

不同孵化温度下鸭绿沙塘鳢胚胎 24 h 的成活率见图 2。鸭绿沙塘鳢胚胎成活率在 20 °C 时达到最高, 其次是 15 °C, 最低是 25 °C。15 °C 和 20 °C 两组水温下胚胎成活率无显著差异, 两组水温的胚胎成活率分别为(75.67 $\pm$ 0.33)% (15 °C)和(77.67 $\pm$ 0.88)% (20 °C), 两组水温均显著高于 25 °C 下的胚胎成活率[(49.00 $\pm$ 0.57)%] ($P < 0.05$)。

通过对早期胚胎的发育过程观察发现, 25 °C 下鸭绿沙塘鳢早期胚胎发育过程中更易出现异常发育现象: 卵裂球大小不同, 卵周隙有卵质溢出(图 3A); 卵裂球脱离卵黄, 卵质充满卵周隙, 卵逐渐发白(图 3B); 膜通透性被破坏, 卵吸水膨胀后出现卵质溢出, 卵膜表面具有水霉菌丝(图 3C)。这些异常发育的胚胎都无法继续发育至囊胚期, 导致 25 °C 下鸭绿沙塘鳢早期胚胎出现大量死亡。

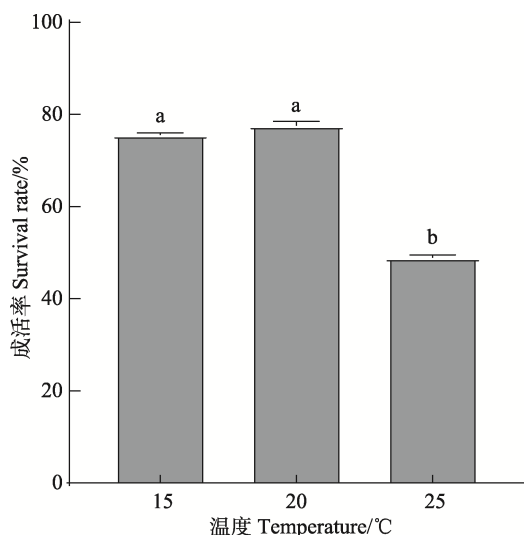


图 2 不同水温下鸭绿沙塘鳢胚胎成活率

Fig.2 Embryo survival rate of *O. yaluensis* at different water temperatures

数据以 3 个重复的平均值 $\pm$ 标准误来表示, 误差线上标不同字母表示不同组间具有显著差异($P < 0.05$)。下同。

Data are presented as Mean $\pm$ SE of three replicates. Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$). The same below.

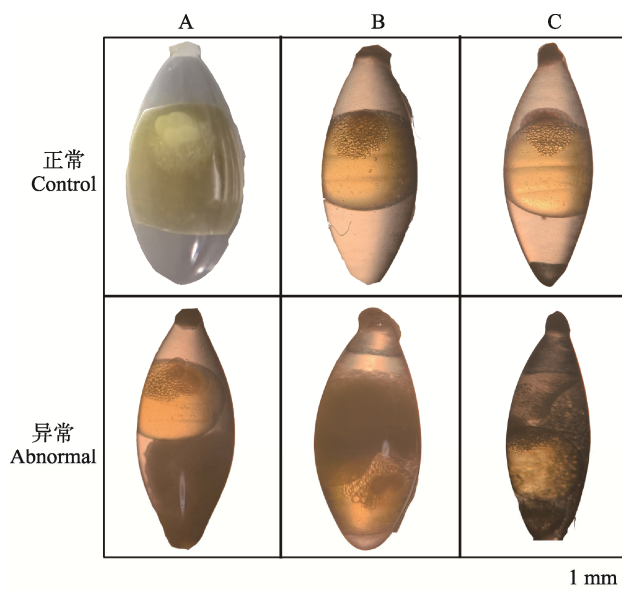


图 3 鸭绿沙塘鳢早期胚胎异常发育

Fig.3 Early embryonic abnormal development of *O. yaluensis*

A: 4-细胞期; B: 64-细胞期; C: 多细胞期。

A: 4-cell stage; B: 64-cell stage; C: Multicellular stage.

2.2 不同水温下早期胚胎 MDA 含量及抗氧化酶活性

在不同水温下鸭绿沙塘鳢胚胎中的 MDA、T-AOC、SOD、CAT、GSH-Px 结果见图 4。MDA 的结果显示, 25 °C 胚胎中的 MDA 含量显著高于其他 2 组($P < 0.05$), 15 °C 与 20 °C 胚胎中的 MDA 含量无显著差异($P > 0.05$) (图 4A)。T-AOC 的结果显示, 25 °C 胚胎中 T-AOC 显著低于其他 2 组($P < 0.05$), 而 15 °C 与 20 °C 胚胎中 T-AOC 无显著差异($P > 0.05$) (图 4B)。CAT 活性的结果显示, 15 °C 胚胎中 CAT 活性最高, 显著高于其他 2 组, 其次是 25 °C, 显著高于 20 °C ($P < 0.05$) (图 4C)。SOD 活性的结果显示, 25 °C 胚胎中 SOD 活性最高, 显著高于其他 2 组, 其次是 15 °C, 显著高于 20 °C ($P < 0.05$) (图 4D)。在 3 组不同水温下, 鸭绿沙塘鳢胚胎中 GSH-Px 活性无显著性差异($P > 0.05$) (图 4E)。

2.3 不同水温对鸭绿沙塘鳢早期胚胎基因表达的影响

在 15 °C 胚胎中 *c-myc* 的相对表达量显著高于其他 2 组, 其次是 20 °C, 显著高于 25 °C ($P < 0.05$) (图 5A)。20 °C 胚胎中的 *igf-1r* 相对表达量显著高于其他 2 组 ($P < 0.05$), 15 °C 和 25 °C 的相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$) (图 5B)。20 °C 胚胎中 *s6k1* 的相对表达量显著高于其他 2 组, 其次是 15 °C, 显著高于 25 °C ($P < 0.05$) (图 5C)。25 °C 胚胎中 *4e-bp1* 的相对表达量显著高于其他 2 组 ($P < 0.05$), 15 °C 和 20 °C 胚胎的相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$) (图 5D)。

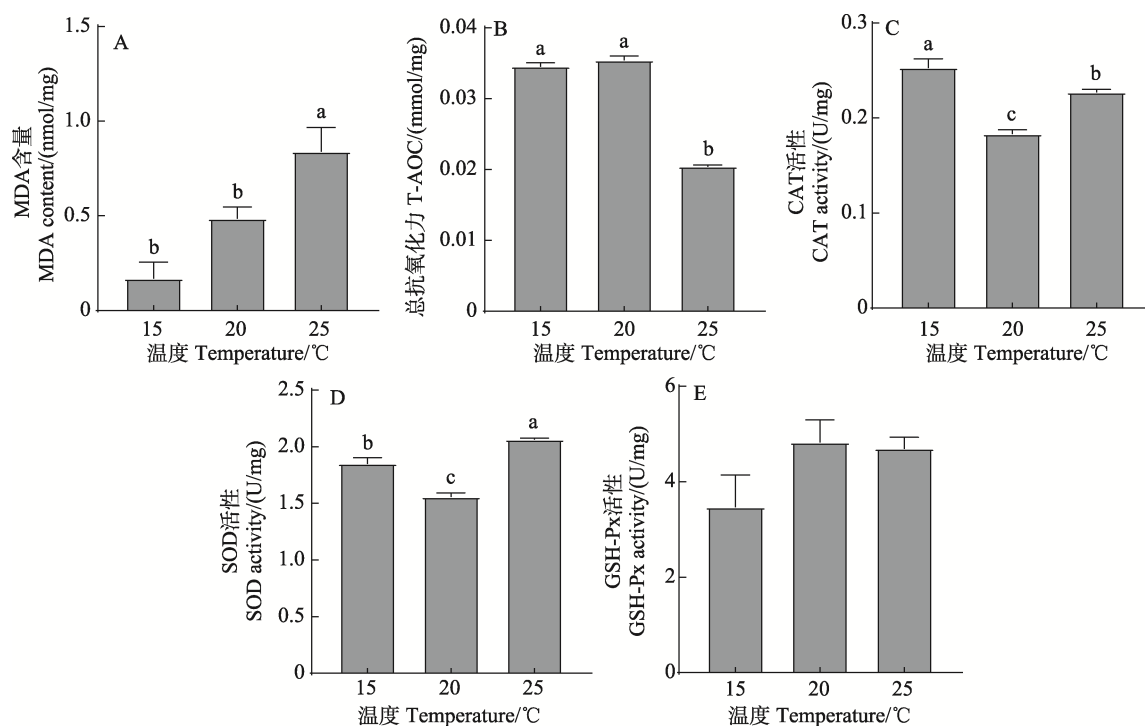


图4 不同水温下鸭绿沙塘鳢早期胚胎生化指标变化

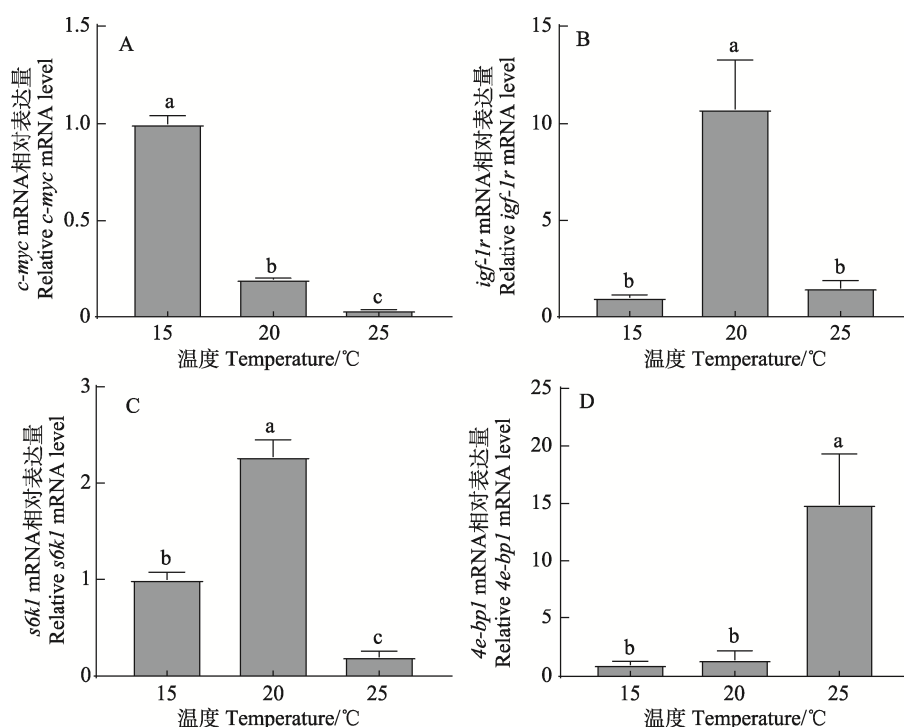
Fig.4 Changes in biochemical parameters of *O. yaluensis* early embryos under different temperatures

图5 不同水温下鸭绿沙塘鳢早期胚胎发育相关基因相对表达量

Fig.5 Relative expression of genes related to early embryonic development of *O. yaluensis* under different water temperatures

3 讨论

鱼类胚胎发育受到多种环境因素影响,温度是重要的环境因素之一(Güralp *et al*, 2017)。温度是贯穿鱼

类生活史中一个基本的物理调节因素,从胚胎的产生和孵化再到仔稚鱼的发育和存活过程中都受到温度的影响(Pankhurst *et al*, 2011)。本研究发现,鸭绿沙塘鳢早期胚胎死亡前均会出现卵质溢出、卵裂球大小

异常等发育现象, 高温胁迫更容易导致异常发育现象的出现。这可能是由于高温胁迫导致胚胎发生氧化应激, 胚胎细胞中的线粒体功能受损, 为了避免异常发育或受损胚胎的继续发育, 胚胎发生了发育阻滞(Betts *et al.*, 2008)。发育阻滞的发生使胚胎无法进一步发育至囊胚期, 导致胚胎在卵裂期阶段出现大量死亡。本研究中, 在 15 °C 及 20 °C 下鸭绿沙塘鳢的胚胎成活率较高, 这与王新荣等(2013a)在鸭绿沙塘鳢人工繁殖实验中得到的结果类似; 而当水温在 25 °C 时胚胎成活率减半, 仅为 49%。类似的结果也在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)及真白鲑(*Coregonus lavaretus*)的研究中发现(Melendez *et al.*, 2021; Cingi *et al.*, 2010), 过高的孵化温度会导致高死亡率和高畸形率。

高温胁迫会引发胚胎活性氧增加, 胚胎内抗氧化系统失衡, 造成氧化应激(Birnie *et al.*, 2017)。MDA 和 T-AOC 分别反映了生物体内脂质过氧化的程度和总抗氧化能力(Madeira *et al.*, 2016)。在本研究中, 15 °C 和 20 °C 水温下, 鸭绿沙塘鳢早期胚胎内的 MDA 含量与 T-AOC 均无显著差异, 说明胚胎在 15 °C 和 20 °C 水温下并未出现明显的氧化损伤。而在 25 °C 水温时, 鸭绿沙塘鳢早期胚胎内 MDA 含量显著上升, 同时总抗氧化能力显著下降。类似的结果在大西洋鲷(*Sparus aurata*)及大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)的研究中被发现, 在二者的温度胁迫实验中生物体内的 MDA 含量随着温度的升高而上升(Madeira *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2025); 高温胁迫导致胚胎内产生过量 ROS, 造成脂质过氧化及氧化损伤, 这也同时降低了胚胎的总抗氧化能力。在氧化应激过程中, SOD、CAT 和 GSH-Px 3 种抗氧化酶主要承担分解 O₂ 和 H₂O₂ 的作用(Jimenez *et al.*, 2019)。本研究中, SOD 与 CAT 活性随着温度的升高均呈现先下降后上升的趋势, 25 °C 胚胎中 SOD 与 CAT 活性的提高是为了应对胚胎发生的氧化应激。过高的温度会使杂色鲮(*Cyprinodon variegatus*)体内的 SOD 活性显著提升来应对氧化应激(Jimenez *et al.*, 2019); 在鼠龙斑鱼[*Cromileptes altivelis Valenciennes* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂]中, CAT 含量随着抗氧化系统的启动, 逐渐回升来抵御氧化应激的进一步加深(刘玲等, 2018), 这都与本结果类似。这可能是由于温度胁迫所诱导的氧化应激在最初阶段并不会激活抗氧化系统, 直到生物体内的氧化应激达到一定阈值时, 生物体内的抗氧化应激系统才会被激活, 以此来达到消除氧化应激的目的。鱼类接近或超过临界温度会导致鱼类出现氧化应激, 此时鱼体中的抗氧化酶活性与 MDA 含量都会出现显著上升

(Madeira *et al.*, 2013)。

S6K1 和 4E-BP1 是在 mTOR 通路中 mTORC1 复合物的下游效应因子。4E-BP1 作为 mRNA 翻译起始的调控因子, 与 eIF4E 结合来阻止 eIF4F 的形成, 从而抑制翻译起始(Fingar *et al.*, 2002)。S6K1 可以促进胚胎发育及 mRNA 翻译的启动(Dorrello *et al.*, 2006; 孔祥会等, 2007)。本研究的结果表明, 当水温达到 20 °C 时胚胎内 *s6k1* 的表达提高将加快其胚胎发育及蛋白合成, 而在 25 °C 时 *s6k1* 的表达降低则影响胚胎发育及蛋白合成。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的研究中发现, 温度会影响 *s6k1* 与 *4e-bp1* 的表达水平, 温度过高会导致 *s6k1* 表达量降低(Wu *et al.*, 2024), 这与本研究得到的结果类似。*4e-bp1* 在 15 °C 和 20 °C 水温下表达水平无显著变化, 而当水温上升至 25 °C 时 *4e-bp1* 表达量显著提高, 这可能是由于 25 °C 水温下胚胎出现氧化应激, 导致早期胚胎细胞内线粒体受损, 影响了细胞的能量代谢, 最终导致蛋白的翻译起始受到抑制(Filomeni *et al.*, 2015; Duan *et al.*, 2015)。

igf-1 是调节胚胎发育、细胞生长和分化的重要基因, *igf-1r* 是其信号级联的关键调节因子(Werner, 2023)。本研究中, 水温在 20 °C 时鸭绿沙塘鳢早期胚胎的 *igf-1r* 表达水平显著高于其他 2 组, 而在 25 °C 时其早期胚胎中 *igf-1r* 表达水平急剧降低, 这可能是由于高温胁迫引发的氧化应激所导致的胚胎受损, 为防止胚胎受损所引发的异常发育, 受损胚胎降低了 *igf-1r* 表达水平来减缓发育的进行(Eivers *et al.*, 2004); 研究发现, *igf-1r* 在脊椎动物的早期阶段中, 参与器官形成及生长发育(盛中伟等, 2020; 安天虎等, 2024), 这与本研究的结果类似。*c-myc* 是参与调节多种细胞功能的转录因子, 包括细胞周期、细胞分化、细胞生长和细胞凋亡等(Marandel *et al.*, 2012); 在脊椎动物的早期发育阶段中, 器官形成及组织分化的过程均需要 *c-myc* 进行调节(Hurlin *et al.*, 2013)。本研究中, 随着温度的升高, 鸭绿沙塘鳢早期胚胎中 *c-myc* 的表达逐渐降低。在凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)的温度实验中也有类似结果(Dong *et al.*, 2022)。本研究中, 25 °C 水温过度抑制了鸭绿沙塘鳢早期胚胎中 *c-myc* 的表达, 进而影响到胚胎细胞系的细胞命运, 过低的 *c-myc* 表达水平会影响胚胎细胞系的分化能力, 造成胚胎发育异常(Naz *et al.*, 1994; Harmelink *et al.*, 2013)。

综上所述, 高温胁迫所引发的氧化应激是导致鸭绿沙塘鳢早期胚胎大量死亡的诱因; 氧化应激会造成鸭绿沙塘鳢早期胚胎出现发育阻滞, 导致其早期胚胎

无法继续发育至囊胚期,进而造成了早期胚胎发育过程中的大量死亡。而有关氧化应激如何引发鸭绿沙塘鳢早期胚胎发育阻滞的机理还有待进一步研究。

4 结论

鸭绿沙塘鳢的早期胚胎发育过程中适宜温度范围为 15~20 ℃。结果表明,15 ℃和 20 ℃水温可显著提高胚胎成活率,且不易受到氧化应激的影响。在 25 ℃时胚胎受高温胁迫影响成活率显著下降,胚胎内的 T-AOC 降低,无法有效清除累积的 ROS,进而引发细胞膜上的脂质过氧化,导致 MDA 含量升高,最终出现氧化应激现象。高温胁迫所诱发的氧化应激是造成鸭绿沙塘鳢早期胚胎大量死亡的原因;氧化应激会导致早期胚胎出现发育阻滞现象,导致其卵裂期胚胎无法正常发育至囊胚期,从而出现高死亡现象。

参 考 文 献

- AEBI H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 1984, 105: 121–126
- AN T H, HAN X X, LIU L Y, *et al.* Effects of starter diets with different *NDF* levels on the development of small intestine and the expression of *IGF-1* and *IGF-1R* genes in lambs. *Feed Industry*, 2024, 45(10): 59–64 [安天虎, 韩晓霞, 柳丽芸, 等. 不同 *NDF* 水平开食料对羔羊小肠发育及 *IGF-1*、*IGF-1R* 基因表达的影响. *饲料工业*, 2024, 45(10): 59–64]
- ANGILLETTA M J Jr. Thermal adaptation: A theoretical and empirical synthesis. Oxford University Press, Oxford, 2009, 289
- BAKER B P, WIE I V, BRAUN E, *et al.* Thermal stability vs. variability: Insights in oxidative stress from a eurytolerant fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2020, 249: 110767
- BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1971, 44(1): 276–287
- BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70–76
- BETTS D H, MADAN P. Permanent embryo arrest: Molecular and cellular concepts. *Molecular Human Reproduction*, 2008, 14(8): 445–453
- BIRNIE-GAUVIN K, COSTANTINI D, COOKE S J, *et al.* A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish and Fisheries*, 2017, 18(5): 928–942
- BLAXTER J H S. The effect of temperature on larval fishes. *Netherlands Journal of Zoology*, 1991, 42(2/3): 336–357
- BUEGE J A, AUST S D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1978, 52: 302–310
- BURRACO P, ORIZAOLA G, MONAGHAN P, *et al.* Climate change and ageing in ectotherms. *Global Change Biology*, 2020, 26(10): 5371–5381
- CHEN W X, ZHENG J X, FAN Z T. Study on calculation method of fertilized rate in *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2013, 44(9): 127–132 [陈伟兴, 郑金霞, 范兆廷. 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)受精率计算方法研究. *东北农业大学学报*, 2013, 44(9): 127–132]
- CINGI S, KEINÄNEN M, VUORINEN P J. Elevated water temperature impairs fertilization and embryonic development of whitefish *Coregonus lavaretus*. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76(3): 502–521
- DENNERY P A. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Research Part C, Embryo Today*, 2007, 81(3): 155–162
- DEPONTE M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2013, 1830(5): 3217–3266
- DONG W N, LIAO M Q, ZHUANG X Q, *et al.* MYC drives autophagy to adapt to stress in *Penaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 126: 187–196
- DORRELLO N V, PESCHIAROLI A, GUARDAVACCARO D, *et al.* S6K1- and BTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, 2006, 314(5798): 467–471
- DOWLING D K, SIMMONS L W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings Biological Sciences*, 2009, 276(1663): 1737–1745
- DUAN Y H, LI F N, TAN K R, *et al.* Key mediators of intracellular amino acids signaling to mTORC1 activation. *Amino Acids*, 2015, 47(5): 857–867
- EIVERS E, MCCARTHY K, GLYNN C, *et al.* Insulin-like growth factor (IGF) signalling is required for early dorso-anterior development of the zebrafish embryo. *The International Journal of Developmental Biology*, 2004, 48(10): 1131–1140
- FILOMENI G, DE ZIO D, CECCONI F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, 2015, 22(3): 377–388
- FINGAR D C, SALAMA S, TSOUC, *et al.* Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes & Development*, 2002, 16(12): 1472–1487
- FUKAI T, USHIO-FUKAI M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 15(6): 1583–1606
- GLORIEUX C, CALDERON P B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 2017, 398(10): 1095–1108

- GÜRALP H, POCHERNIAIEVA K, BLECHA M, *et al.* Development, and effect of water temperature on development rate, of pikeperch *Sander lucioperca* embryos. *Theriogenology*, 2017, 104: 94–104
- HARMELINK C, PENG Y, DEBENEDITTIS P, *et al.* Myocardial Mycn is essential for mouse ventricular wall morphogenesis. *Developmental Biology*, 2013, 373(1): 53–63
- HURLIN P J. Control of vertebrate development by MYC. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013, 3(9): a014332
- JAMIL M, DEBBARH H, ABOULMAOUAHIB S, *et al.* Reactive oxygen species in reproduction: Harmful, essential or both? *Zygote*, 2020, 28(4): 255–269
- JIMENEZ A G, BRAUN E, TOBIN K. How does chronic temperature exposure affect hypoxia tolerance in sheepshead minnows' (*Cyprinodon variegatus*) ability to tolerate oxidative stress? *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(2): 499–510
- KONG X H, WANG X Z, GAN X N, *et al.* Phylogenetic relationship and intron 1Indel locus analysis of Cyprinidae based on partial sequence of S6K1 gene. *Science in China (Series C Life Sciences)*, 2007, 37(4): 427–434 [孔祥会, 王绪祺, 甘小妮, 等. 基于 S6K1 基因部分序列的鲤科鱼类系统发育关系及内含子 1Indel 位点分析. *中国科学(C 辑: 生命科学)*, 2007, 37(4): 427–434]
- LIU L, CHEN C, LI Y L, *et al.* Effects of short-term temperature stress on antioxidant and digestive enzymes of hybrid progeny (*Cromileptes altivelis* Valenciennes ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 59–66 [刘玲, 陈超, 李炎璐, 等. 短期温度胁迫对驼背鲈(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代幼鱼抗氧化及消化酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 59–66]
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta^{CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- LUSHCHAK V I, STOREY K B. Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI Journal*, 2021, 20: 956–967
- MA S B, LV Y B, HOU L, *et al.* Effect of acute temperature stress on energy metabolism, immune performance and gut microbiome of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture and Fisheries*, 2025, 10(2): 260–270
- MADEIRA D, NARCISO L, CABRAL H N, *et al.* Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 166(2): 237–243
- MADEIRA D, VINAGRE C, DINIZ M S. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. *Ecological Indicators*, 2016, 63: 324–331
- MARANDEL L, LABBE C, BOBE J, *et al.* Evolutionary history of c-myc in teleosts and characterization of the duplicated c-myca genes in goldfish embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 2012, 79(2): 85–96
- MELLENDEZ C L, MUELLER C A. Effect of increased embryonic temperature during developmental windows on survival, morphology and oxygen consumption of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2021, 252: 110834
- MOHEBI M, GHAFOURI-FARD S. Embryo developmental arrest: Review of genetic factors and pathways. *Gene Reports*, 2019, 17: 100479
- NAZ R K, KUMAR G, MINHAS B S. Expression and role of c-myc protooncogene in murine preimplantation embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1994, 11(4): 208–216
- NOHRMAN B A. Survival rate calculation. *Acta Radiologica*, 1953, 39(1): 78–82
- OPUWARI C S, HENKEL R R. An update on oxidative damage to spermatozoa and oocytes. *BioMed Research International*, 2016(1): 9540142
- PAGLIA D E, VALENTINE W N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1967, 70(1): 158–169
- PANKHURST N W, MUNDAY P L. Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Marine and Freshwater Research*, 2011, 62(9): 1015
- RITCHIE D J, FRIESEN C R. Invited review: Thermal effects on oxidative stress in vertebrate ectotherms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2022, 263: 111082
- ROGERS B A, WESTIN D T. Laboratory studies on effects of temperature and delayed initial feeding on development of striped bass larvae. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1981, 110(1): 100–110
- SHENG Z W, JI G G, LIU Y F, *et al.* Study on mRNA expression pattern of IGF-1R gene in chicken skeletal muscles during early development. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020, 32(7): 1160–1165 [盛中伟, 姬改革, 刘一帆, 等. 鸡生长发育早期骨骼肌 IGF1R mRNA 表达规律研究. *浙江农业学报*, 2020, 32(7): 1160–1165]
- WANG X R, XU Z Y, LUO X N, *et al.* Artificial propagation and fry rearing of sleeper *Odontobutis yaluensis*. *Fisheries Science*, 2013a, 32(11): 662–667 [王新荣, 徐忠源, 骆小年, 等. 鸭绿沙塘鳢人工繁殖和苗种培育试验. *水产科学*, 2013a, 32(11): 662–667]
- WANG X R, XU Z Y, LUO X N, *et al.* Study on biology of *Odontobutis anatis*. *China Fisheries*, 2013b(4): 70–72 [王新荣, 徐忠源, 骆小年, 等. 鸭绿沙塘鳢生物学研究. *中国水产*, 2013b(4): 70–72]
- WERNER H. The IGF1 signaling pathway: From basic concepts

- to therapeutic opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(19): 14882
- WU D, FAN Z, ZHENG X H, *et al.* Evaluation of four novel non-grain protein sources completely replacing soybean meal on growth performance, serum biochemistry, amino acid transport and intestinal health of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) at different water temperatures. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024, 153: 109807
- XU Y J, CUI A J, JIANG Y, *et al.* The ecological and physiological responses of embryonic development and early larval growth of *Seriola aureovittata* to temperature and salinity. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(4): 45–54 [徐永江, 崔爱君, 姜燕, 等. 黄条鲷胚胎发育和早期仔鱼生长的温盐适应特性. *渔业科学进展*, 2023, 44(4): 45–54]
- ZENG B H, GONG J H, LIU H P, *et al.* Suitable water temperature for incubating *Schizothorax waltoni* eggs. *Journal of Hydroecology*, 2023, 44(2): 96–103 [曾本和, 龚君华, 刘海平, 等. 拉萨裂腹鱼胚胎适宜孵化水温研究. *水生态学杂志*, 2023, 44(2): 96–103]
- ZHANG T T, CHEN C, SHI Z H, *et al.* Effects of temperature on the embryonic development and larval activity of *Epinephelus moara*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 28–33 [张廷廷, 陈超, 施兆鸿, 等. 温度对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)胚胎发育和仔鱼活力的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 28–33]

(编辑 冯小花)

Effects of Heat Stress on Early Embryonic Development of *Odontobutis yaluensis*

WEI Yong^{1,2}, LI Jiao^{1,2①}, LUO Xiaonian^{1,2}, DUAN Youjian^{1,2}, FU Xianfei³, JIANG Xu³

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Key Laboratory of Fish Applied Biology and Aquaculture in North China, Dalian 116023, China;

3. Dalian Qishui Fisheries Development Co. Ltd, Dalian 116211, China)

Abstract *Odontobutis yaluensis* is a small benthic fish endemic to northeastern China. In its natural habitat, the fish breeds within a temperature range of 8 °C to 20 °C, with optimal embryo hatching occurring at 16–20 °C. The development and utilization of *O. yaluensis* fishery resources have faced significant challenges due to the vulnerability of their fertilized eggs to external factors, leading to low hatching rates. In previous artificial breeding experiments, we observed that excessively high water temperatures caused substantial mortality before the embryos reached the gastrula stage, contributing to low hatching rates. Elevated temperatures can impair tissue differentiation and organogenesis in a fish's early embryonic developmental stages, affecting physiological activity and development. When organisms are subjected to environmental stress, excessive production of reactive oxygen species can surpass the capacity of the antioxidant defense system, resulting in oxidative stress. This induces lipid peroxidation and DNA damage. In vertebrates, oxidative stress has been implicated in embryonic damage and is potentially associated with developmental arrest.

To further investigate the mechanisms underlying high-temperature stress-induced mass mortality of early embryos in *O. yaluensis*, we examined the causes of high embryonic mortality by observing abnormal development in early embryos under high-temperature stress and analyzing changes in antioxidant enzyme activities and growth-related gene expression. The experiment was conducted using three water temperatures (15 °C, 20 °C, and 25 °C). Embryos at the 2-cell stage were selected for a 24-hour temperature treatment. After the experiment, the embryonic development was monitored microscopically for abnormalities, survival rates were recorded, and antioxidant-related enzyme activities

① Corresponding author: LI Jiao, Email: lijiao@dlou.edu.cn

were measured. Additionally, the mRNA levels of key growth-related genes, including the eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (*4e-bp1*), MYC proto-oncogene (*c-myc*), ribosomal protein S6 kinase B1 (*s6k1*), and insulin-like growth factor 1 receptor (*igf-1r*), were quantified.

We found that *O. yaluensis* embryos were more prone to abnormal development at 25 °C than at the other temperatures. The observed abnormalities included uneven blastomere size, cytoplasmic extrusion into the perivitelline space, blastomere detachment from the yolk, and cytoplasm filling the perivitelline space as the eggs gradually turned opaque. Disruption of membrane permeability led to water absorption and egg swelling, followed by cytoplasmic extrusion. These abnormally developed embryos failed to progress to the blastocyst stage. The survival rate of *O. yaluensis* embryos was significantly higher at 15 and 20 °C than at 25 °C ($P < 0.05$). Embryos at 15 °C and 20 °C had higher total antioxidant capacity and lower malondialdehyde content and superoxide dismutase activity than those at 25 °C ($P < 0.05$). The catalase activity was in the order of 15 °C > 25 °C > 20 °C ($P < 0.05$). Glutathione peroxidase activity did not differ significantly among the three groups ($P > 0.05$). Temperatures of 15–20 °C favored early embryonic development in *O. yaluensis*. However, as temperature increased, oxidative stress occurred, activating the embryonic antioxidant system and mitigating the damage caused by oxidative stress. The expression level of *4e-bp1* was significantly lower in embryos at 15 and 20 °C than at 25 °C, whereas *c-myc* expression was highest at 15 °C, followed by the 20 °C group, both significantly higher than at 25 °C ($P < 0.05$). The expression levels of *s6k1* and *igf-1r* were significantly higher in embryos at 20 °C than in the other two groups ($P < 0.05$). The genes *s6k1* and *igf-1r* are associated with accelerated development and improved protein synthesis efficiency. Identified as a rapid-response gene during early embryogenesis, *c-myc* has low expression levels that may lead to developmental arrest. Additionally, the increased expression of *4e-bp1* has been shown to inhibit the initiation of protein translation in embryos.

In summary, at 15–20 °C water temperatures, *O. yaluensis* embryos exhibited higher survival rates and enhanced antioxidant capacity to regulate oxidative stress levels than at 25 °C. Oxidative stress induced by high temperatures has been identified as a key factor causing oxidative damage to embryonic cells and leading to abnormal development and significant mortality in *O. yaluensis* embryos. Additionally, the expression of genes related to embryonic development and protein synthesis is downregulated to prevent the progression of abnormal development in damaged embryos, thereby slowing the developmental process and suppressing further abnormalities.

Key words *Odontobutis yaluensis*; Embryonic development; Temperature; Oxidative stress