

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220608001

http://www.yykxjz.cn/

朱理光, 刘志峰, 马爱军, 王新安, 孙志宾, 常浩文, 刘圣聪, 包玉龙, 马得友. 红鳍东方鲀低温胁迫应答主效 QTL 候选基因的表达特征分析. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 74-82

ZHU L G, LIU Z F, MA A J, WANG X A, SUN Z B, CHANG H W, LIU S C, BAO Y L, MA D Y. Evaluating the transcriptional regulation of six major QTL candidate genes during low temperature stress in *Takifugu rubripes*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(6): 74-82

红鳍东方鲀低温胁迫应答主效 QTL 候选基因的表达特征分析*

朱理光^{1,2,3} 刘志峰^{2,3} 马爱军^{2,3①} 王新安^{2,3}
孙志宾^{2,3} 常浩文^{2,3} 刘圣聪⁴ 包玉龙⁴ 马得友¹

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 山东 青岛 266071; 3. 海洋生物学与生物技术功能实验室 山东 青岛 266071; 4. 唐山牧海水产养殖有限公司 河北 唐山 063200)

摘要 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)为暖温性、广温性鱼类,低温的冬季海水会对其生存造成很大影响,因此,选育具有抗寒性状的品系对其产业发展具有重要意义。本研究在利用 QTL (quantitative trait locus)定位分析筛选出6个与红鳍东方鲀耐低温相关的候选基因(*tacc2*、*fsip1*、*exoc4*、*arhgap44a*、*pde10a*和*unc5b*)的基础上,通过 Real-time PCR 检测这6个基因在低温胁迫下在肝脏、心脏和肾脏中表达量的变化。实验用鱼为课题组建立的同一家系的8月龄鱼,共设置3个温度梯度(8℃、13℃和18℃),8℃和13℃为低温组,18℃为对照组。结果显示,6个基因在不同温度下的3个组织中均有不同程度的表达。其中,*pde10a*基因在3个组织中的表达均呈先升高后下降的趋势;*tacc2*和*exoc4*基因在8℃组肝脏、肾脏以及心脏中的表达分别呈先下降再趋于稳定、先升高再趋于稳定和先上升后下降的趋势;*unc5b*基因在肝脏和心脏中的表达量较低,在低温组实验前期的肾脏中呈现高表达;*arhgap44a*基因在肝脏中的表达呈上升趋势,在心脏和肾脏中整体表达无明显变化;*fsip1*基因在肝脏中的表达呈下降趋势,在心脏和肾脏中的表达呈先上升后下降的趋势。这6个基因在红鳍东方鲀组织中均随着时间和温度变化具有差异性表达,在低温胁迫下呈现积极响应,表明这6个 QTL 候选基因在红鳍东方鲀低温适应中具有潜在的重要作用。本研究可为红鳍东方鲀耐低温相关信号通路研究以及耐低温品种选育提供理论依据。

关键词 红鳍东方鲀; *pde10a* 基因; *tacc2* 基因; *unc5b* 基因; *exoc4* 基因; *arhgap44a* 基因; *fsip1* 基因; 低温胁迫

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)06-0074-09

* 国家重点研发计划子课题(2018YFD0900301-12)、国家重点研发计划子课题(2018YFD0900102-5)、国家自然科学基金基金项目(32002362)、山东省自然科学基金(ZR2019BC089)和中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD25)共同资助。朱理光, E-mail: zhulg1998@126.com

① 通信作者: 马爱军, 研究员, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-06-08, 收修改稿日期: 2022-07-19

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)是我国重要的养殖经济鱼类,属于暖温性、广温性鱼类,其适宜生长水温为 14~27 °C,最适水温为 16~23 °C(马爱军等, 2014)。水温在鱼类生存条件中占有重要位置,水温的变化会影响鱼类的新陈代谢,超出适宜水温会导致鱼类出现应激反应,对鱼类的生长和繁育造成不良影响,甚至会造成死亡(Atkinson *et al*, 1997; Barton, 2002; Jesus *et al*, 2013)。红鳍东方鲀主要在我国北方养殖,其越冬过程需要转移到室内,在转移过程中遇到外界刺激会立即出现应激反应,同时,捕捞过程中相互接触会相互攻击,造成一定损失(张迪等, 2017)。室内越冬也需要将海水加热至适宜的水温,增加了养殖成本,因此,选育具有耐低温性状品系的红鳍东方鲀对其产业发展极其重要。由于红鳍东方鲀在中国养殖的起步时间较晚,耐低温遗传选育研究也处于初期阶段,通过研究抗寒相关基因的功能,能够不断完善红鳍东方鲀耐低温的分子机制,为耐低温新品种选育和红鳍东方鲀产业发展提供理论依据。

随着水产养殖业的发展,水产动物温度耐受相关的分子标记筛选和基因的研究在不断推进。在红鳍东方鲀(袁晨浩等, 2022)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (马爱军等, 2011)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (池信才等, 2007)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (高国强等, 2010; 陈小明等, 2017; 穆方申等, 2017)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (胡志国等, 2016)中都筛选出了与温度耐受相关的分子标记。常玉梅等(2012)克隆了鲤(*Cyprinus carpio*)脑组织中 stearoyl-CoA desaturase (*CcSCD*)基因的全长 cDNA 序列,并预测其编码蛋白功能与鱼类的低温适应性有关,但该基因在鱼类抗寒中的分子作用机制目前仍不清楚。李伟业等(2021)通过荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)证实了金属硫蛋白基因 *MT*、水通道蛋白基因 *AQP1*、HSP60 蛋白基因 *TCPI* 在大黄鱼低温适应过程中发挥重要作用,是潜在的研究大黄鱼耐寒机制的候选基因。刘晓菲等(2019)对大菱鲆耐高温 QTL (quantitative trait locus)定位获得的 4 个候选基因 *p53*、*UBE2H*、*ZNF469* 和 *MAGI2* 进行 RT-PCR 检测,发现 4 个基因在高温胁迫中均呈现积极响应。温度耐受相关的分子标记筛选和基因的研究为耐温分子机制和选育发展奠定了基础,也为其他水产动物耐温选育提供了借鉴依据。鱼类低温胁迫相关基因的功能和控制机制的研究也在不断助推水产动物耐低温选育的发展。大黄鱼在急性低温胁迫下糖皮质激素受体基因表达水平升高,介导糖皮质激素的生理功能,有 88 个基因的转录始终受大脑中糖皮质激素的调节,能够抑制炎症、提高能

量生产效率以及去除不必要或故障的细胞成分,以在应激反应期间保存能量和维持营养供应(Liu *et al*, 2021; Juszczak *et al*, 2018)。Cheng 等(2018)在饲料中添加牛磺酸,发现其能提高暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)在低温胁迫下的生长性能,并能增强抗氧化能力和非特异性免疫反应,降低低温应激诱导的氧化应激、细胞毒性和细胞凋亡。Qiang 等(2013)研究发现,低温胁迫会对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼红细胞、白细胞及血红蛋白浓度产生显著影响。

本课题组在红鳍东方鲀耐低温性状改良工作中,通过 QTL 定位获得多个与耐低温相关的单核苷酸多态性(SNP)位点,并通过比对全基因组信息,筛选出 6 个候选基因(袁晨浩, 2021)。本实验以红鳍东方鲀为研究对象,利用 qRT-PCR 技术对 6 个候选基因不同温度下在不同组织中的表达进行分析,初步了解 6 个候选基因在红鳍东方鲀应对低温胁迫时发挥的作用,以期对红鳍东方鲀低温应答的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用红鳍东方鲀来自课题组在唐山牧海水产养殖有限公司建立的同一家系(全同胞)、体表无损伤、活跃的 8 月龄鱼,体重为(106.6±23.6) g,体长为(15.00±0.05) cm。

1.2 实验设计

实验设置 3 组恒温循环水养殖系统,每组系统有 3 个实验桶(1000 L)。挑选 270 尾鱼,平均放到 9 个实验桶中,实验开始前 18 °C 暂养 1 周。设置 3 个温度梯度(18 °C、13 °C 和 8 °C),18 °C 为对照组,13 °C 和 8 °C 为低温组,每个温度梯度设 3 个平行,每个平行 30 尾幼鱼。实验开始后分别将 2 个低温组系统水温在 12 h 内调节至 8 °C 和 13 °C,对照组系统水温保持在 18 °C,在自然光条件下恒定水温养殖 4 周,溶解氧保持在 8 mg/L 以上。分别在实验开始时、14 d、28 d 3 个时间点取样,每桶取 3 尾鱼,在 200 mg/L 的 MS-222 溶液中快速麻醉,在冰上迅速完成解剖,每尾鱼取肝脏、心脏和肾脏组织,立即放入冻存管中,置于液氮中速冻,之后放入-80 °C 中保存。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

利用 RNAsimple Total RNA 试剂盒提取样品中的总 RNA,并使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 纯度。利用 FastKing RT 试剂盒进行 cDNA 第一条链的合成,放入-20 °C 供后续实验使用。

1.4 引物合成

根据6个候选基因的GeneID,在NCBI上找到对应序列的ORF区,利用Primer 5.0软件设计引物,合成后进行PCR检验引物的有效性,qRT-PCR标准曲线检验引物效率。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。 β -actin为内参引物。引物序列见表1。

表1 6个候选基因qRT-PCR引物序列
Tab.1 Primers of six candidate genes in qRT-PCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')
<i>pde10a</i> F	ACTTCAACAACCACCAGCAGC
<i>pde10a</i> R	CTTCAICTCATCTCCCTCAGCC
<i>tacc2</i> F	GGAGTGGAAGAGGAAGTATGAGG
<i>tacc2</i> R	TGGTGTGGTGC GAAAGAGAC
<i>fsip1</i> F	AAGCAAGAAGAGGCAGAAGGA
<i>fsip1</i> R	CTGACAGGAAGCAGAAGGTG
<i>exoc4</i> F	CCTCAAGGCATTCTTCACTAAC
<i>exoc4</i> R	CTCTCTGCTCCTCTCACTCTCAC
<i>arhgap44a</i> F	CGCAAACGCTTCACCTCTTTACATC
<i>arhgap44a</i> R	TCGCTCTCGGATACATGGACAGG
<i>unc5b</i> F	GCAGCCTCGGTTTTGACAG
<i>unc5b</i> R	AACCAGCACCTCGCTTTTG
β -actin F	GAGACCTTCAACACCCCTGC
β -actin R	AGAGCGTAGCCCTCGTAGATG

1.5 qRT-PCR

以反转录得到的cDNA为模板,使用TOROGreen qPCR Master Mix试剂盒(QST-100)在Applied Biosystems StepOnePlus PCR仪上进行qRT-PCR。反应体系为20 μ L: Master Mix 10.0 μ L,无RNase水6.4 μ L,上下游引物各0.8 μ L,模板2.0 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性60 s;95 $^{\circ}$ C变性10 s;60 $^{\circ}$ C退火30 s,循环40次。

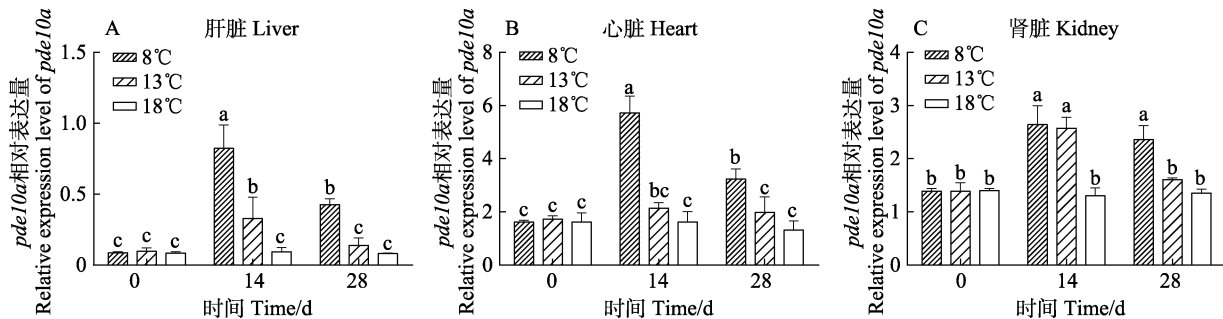


图1 低温胁迫下红鳍东方鲀肝脏、心脏和肾脏中*pde10a*基因在各时间点的表达量变化

Fig.1 Changes of *pde10a* gene expression in liver, heart and kidney of turbot under low temperature stress at different time points

不同字母代表组间差异显著($P < 0.05$)。下同。

Different letters represent significant differences between groups ($P < 0.05$). The same as below.

1.6 数据分析

qRT-PCR后,导出数据分别获得目的基因和内参基因的 C_t 值并计算平均值。使用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算平均表达量和方差。采用SPSS 18.0软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),检验各组平均表达量之间差异是否显著($P < 0.05$ 表示存在差异显著)。用GraphPad Prism 6软件作图。

2 结果

2.1 *pde10a*基因在不同温度下的表达变化

利用qRT-PCR检测不同温度下*pde10a*基因在肝脏、心脏和肾脏中表达量的变化,结果如图1所示。在肝脏中,低温组中*pde10a*的表达量呈先升高后下降的趋势,且同一温度在不同时间的表达量差异显著($P < 0.05$)。8 $^{\circ}$ C组表达量显著高于13 $^{\circ}$ C组和对照组($P < 0.05$),13 $^{\circ}$ C组的表达量显著高于对照组($P < 0.05$)。在心脏中,低温组*pde10a*的表达量均呈先升高后下降的趋势,8 $^{\circ}$ C组各时间点的表达量差异显著($P < 0.05$),且表达量均显著高于13 $^{\circ}$ C组和对照组($P < 0.05$)。在肾脏中,低温组*pde10a*的表达量均呈先升高后下降的趋势,13 $^{\circ}$ C组各时间点的表达量差异显著($P < 0.05$)。14 d时,低温组的表达量均显著高于对照组($P < 0.05$)。28 d时,8 $^{\circ}$ C组的表达量显著高于13 $^{\circ}$ C组和对照组($P < 0.05$)。

2.2 *tacc2*基因在不同温度下的表达变化

利用qRT-PCR检测不同温度下*tacc2*基因在肝脏、心脏、肾脏中表达量的变化,结果见图2。在肝脏中,低温组*tacc2*基因的表达量呈先下降再趋于稳定的趋势,同一温度在不同时间的表达量差异显著($P < 0.05$)。对照组表达量显著高于低温组($P < 0.05$),

13 °C 组的表达量显著高于 8 °C 组 ($P < 0.05$)。在心脏中, *tacc2* 基因的表达量无明显变化趋势, 14 d 时, 8 °C 组的表达量显著高于 13 °C 组和对照组 ($P < 0.05$); 28 d 时, 13 °C 组的表达量显著高于 8 °C 组和对照组 ($P < 0.05$)。在肾脏中, 低温组 *tacc2* 基因的表达量呈先升高再趋于稳定的趋势, 且低温组的表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.3 *unc5b* 基因在不同温度下的表达变化

利用 qRT-PCR 检测不同温度下 *unc5b* 基因在肝脏、心脏和肾脏中表达量的变化, 结果如图 3 所示。*unc5b* 主要在肾脏中高表达, 肝脏和心脏中表达量较低。在肝脏中, *unc5b* 基因的表达量无明显变化趋势,

13 °C 组的表达量显著高于 8 °C 组和对照组 ($P < 0.05$), 对照组的表达量显著高于 8 °C 组 ($P < 0.05$)。在心脏中, 低温组 *unc5b* 基因的表达量呈现缓慢上升趋势, 8 °C 组表达量显著高于 13 °C 组和对照组 ($P < 0.05$)。在肾脏中, *unc5b* 基因的表达量无明显变化趋势, 14 d 时, 低温组的表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 28 d 时, 8 °C 组的表达量显著高于 13 °C 组和对照组 ($P < 0.05$)。

2.4 *exoc4* 基因在不同温度下的表达变化

利用 qRT-PCR 检测不同温度下 *exoc4* 基因在肝脏、心脏和肾脏中表达量的变化, 结果见图 4。在肝脏中, 低温组 *exoc4* 基因的表达量均呈先下降再趋于稳定的趋势, 对照组表达量显著高于低温组 ($P < 0.05$)。

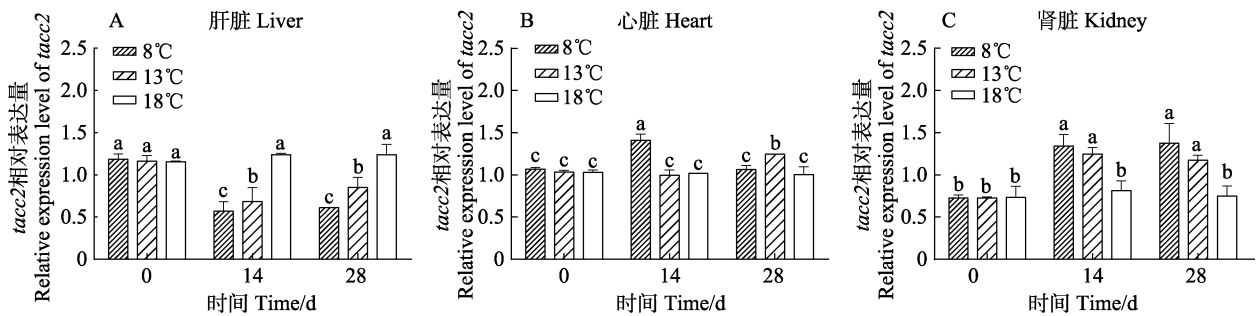


图 2 低温胁迫下红鳍东方鲀肝脏、心脏和肾脏中 *tacc2* 基因在各时间点的表达量变化

Fig.2 Changes of *tacc2* gene expression in liver, heart and kidney of turbot under low temperature stress at different time points

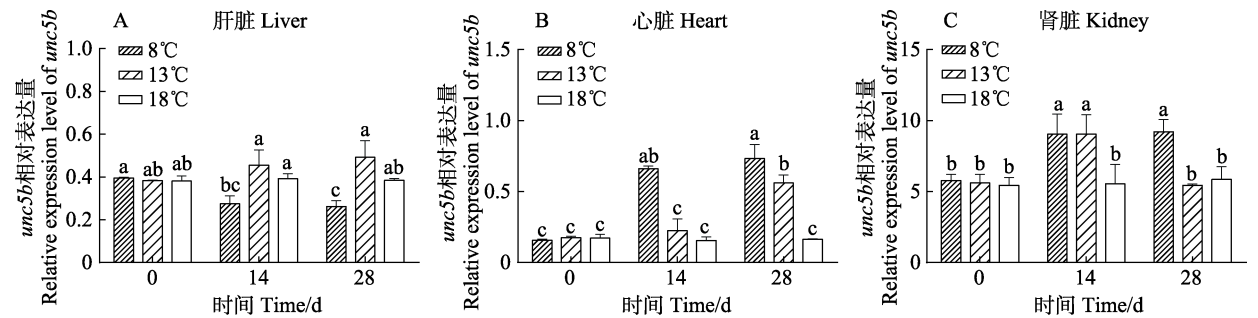


图 3 低温胁迫下红鳍东方鲀肝脏、心脏和肾脏中 *unc5b* 基因在各时间点的表达量变化

Fig.3 Changes of *unc5b* gene expression in liver, heart and kidney of turbot under low temperature stress at different time points

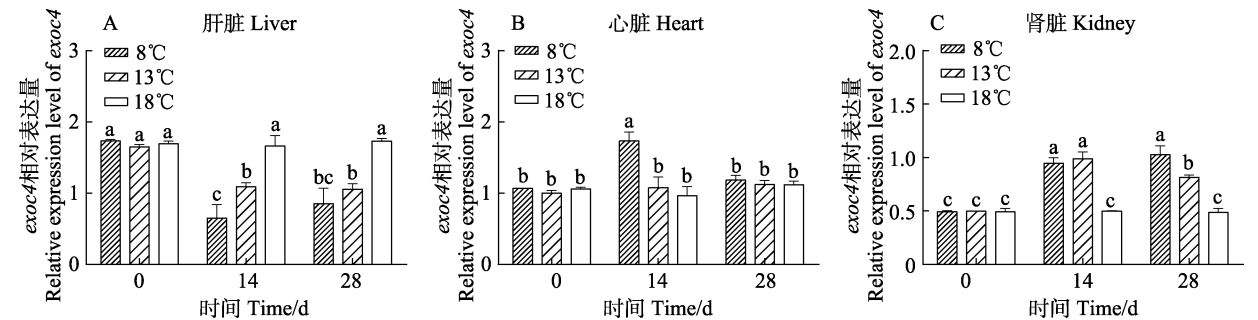


图 4 低温胁迫下红鳍东方鲀肝脏、心脏和肾脏中 *exoc4* 基因在各时间点的表达量变化

Fig.4 Changes of *exoc4* gene expression in liver, heart and kidney of turbot under low temperature stress at different time points

在心脏中, 8 °C组 *exoc4* 基因的表达量呈先上升后下降的趋势, 14 d时, 8 °C组表达量显著高于13 °C组和对照组($P<0.05$)。在肾脏中, 对照组 *exoc4* 基因的表达量均呈上升趋势。14 d时, 低温组表达量均显著高于对照组($P<0.05$); 14 d时, 8 °C组表达量显著高于13 °C组和对照组($P<0.05$), 13 °C组表达量显著高于对照组($P<0.05$)。

2.5 *arhgap44a* 基因在不同温度下的表达变化

利用 qRT-PCR 检测不同温度下 *arhgap44a* 基因在肝脏、心脏和肾脏中表达量的变化, 结果如图5所示。在肝脏中, 低温组 *arhgap44a* 基因的表达量均呈上升趋势, 且同一温度在不同时间的表达量差异显著($P<0.05$), 8 °C组的表达量显著高于13 °C组和对照组($P<0.05$), 13 °C组表达量显著高于对照组($P<0.05$)。

在心脏中, 仅8 °C组 *arhgap44a* 基因的表达量呈先上升后下降的趋势, 14 d时, 8 °C组表达量显著高于13 °C组和对照组($P<0.05$)。在肾脏中, 各温度表达量无明显差异。

2.6 *fsip1* 基因在不同温度下的表达变化

利用 qRT-PCR 检测不同温度下 *fsip1* 基因在肝脏、心脏和肾脏中表达量的变化, 结果如图6所示。在肝脏中, 低温组 *fsip1* 基因的表达量呈现下降趋势, 14 d时, 13 °C组和对照组的表达量显著高于8 °C组($P<0.05$); 28 d时, 对照组的表达量显著高于低温组($P<0.05$)。在心脏和肾脏中, 低温组 *fsip1* 基因的表达量均呈先上升后下降的趋势, 且同一温度在不同时间的表达量差异显著($P<0.05$), 各时间点8 °C组表达量显著高于13 °C组和对照组($P<0.05$)。

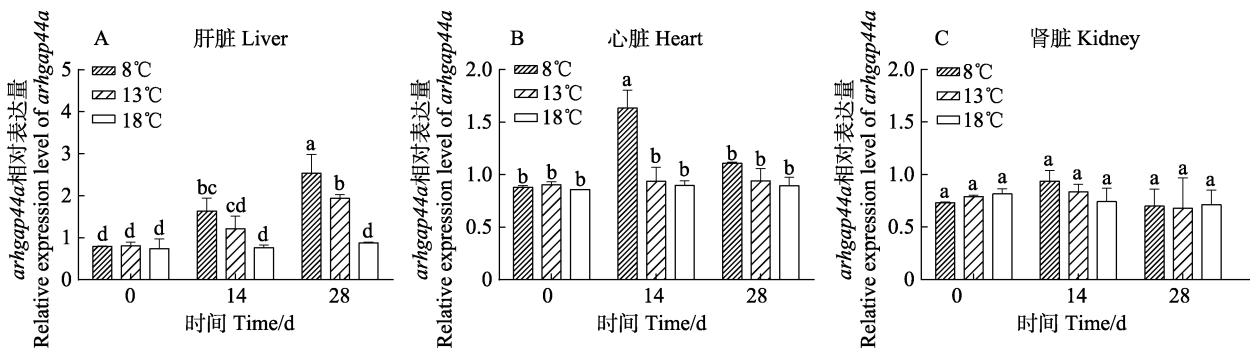


图5 低温胁迫下红鳍东方鲀肝脏、心脏和肾脏中 *arhgap44a* 基因在各时间点的表达量变化

Fig.5 Changes of *arhgap44a* gene expression in liver, heart and kidney of turbot under low temperature stress at different time points

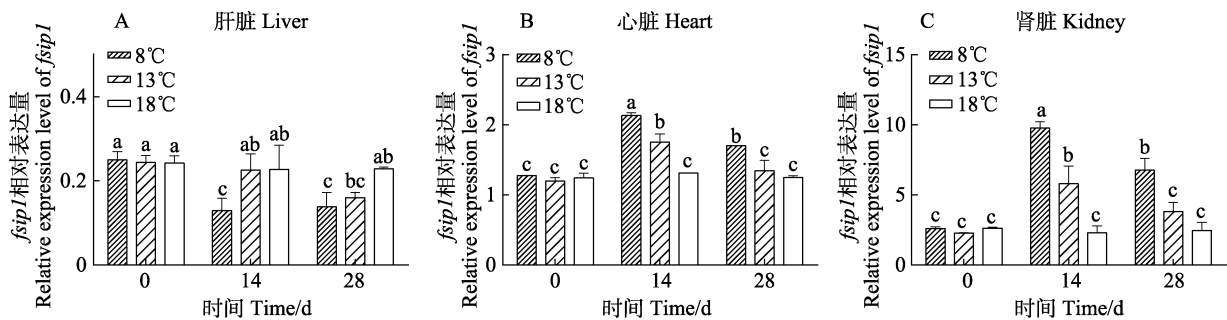


图6 低温胁迫下红鳍东方鲀肝脏、心脏和肾脏中 *fsip1* 基因在各时间点的表达量变化

Fig.6 Changes of *fsip1* gene expression in liver, heart and kidney of turbot under low temperature stress at different time points

3 讨论

良好的水环境是鱼类生存的必要条件, 适宜的水温是其中一个极为重要的因素。低温胁迫会引起鱼的各种应激反应, 也会影响鱼体内的抗逆性和抗感染等生物分子活性、免疫应答、抗氧化和脂质代谢等能力

(潘霞等, 2020; Wen *et al.*, 2021)。本研究对从耐低温相关的 QTL 中筛选出了的 6 个与耐低温相关的基因进行了低温胁迫下的表达分析, 结果显示, 6 个基因在低温胁迫下均在组织中呈现不同程度的表达, 并呈现一定的表达规律, 表明这些基因在红鳍东方鲀低温适应中发挥了潜在的调控功能。

3.1 *pde10a* 基因在低温胁迫下的表达分析

本研究中, 随着温度和时间变化, *pde10a* 在肝脏、心脏和肾脏低温组中的表达均呈先升高后降低的趋势。磷酸二酯酶 10A (phosphodiesterase 10A, PDE10A) 能够参与水解第二信使环核苷酸—磷酸腺苷(cAMP)和鸟苷酸(cGMP) (Gross-Langenhoff *et al.*, 2006; Jger *et al.*, 2012), 而第二信使具有广泛的参与调节细胞增殖、分化、迁移和凋亡等功能(闫军浩等, 2015)。同样, 在鱼类研究中, PDE 活性与 cAMP、Ca²⁺、细胞钙调蛋白(cellular calmodulin, CaM)之间存在明显的相关性, 细胞 Ca²⁺浓度的增加导致 CaM 的增加, 而 CaM 反过来刺激 PDE 活性, 从而影响 cAMP 的降解(Mukhopadhyay *et al.*, 1997)。据此可以推测, 低温胁迫在前期导致鱼体内 *pde10a* 的表达量不断升高, 抑制了 cAMP 和 cGMP 的生物传导和机体能量的消耗, 造成鱼的行动和反应迟缓。随着时间的增加, 鱼体在对低温环境不断适应后通过增加能量消耗来提升自己的生存能力, 所以 *pde10a* 表达量开始降低。*pde10a* 在鱼类中表达变化的调控机制还没有报道, 但 Hankir 等(2016)研究发现, 通过抑制剂 MP-10 抑制 PDE10A 的表达会增加小鼠和人类机体能量的消耗, 因此, *pde10a* 在鱼类中的表达变化可能也是通过某种抑制剂的表达来实现的。目前, 鱼类低温胁迫 *pde10a* 基因的相关研究还很少, 通过找出调控 *pde10a* 表达的信号通路和关键因子, 控制 *pde10a* 基因的表达, 会在很大程度上提升红鳍东方鲀在低温环境下的生存能力。

3.2 *unc5b* 基因在低温胁迫下的表达分析

UNC5 同源蛋白家族共有 UNC5A~UNC5D 四种蛋白, 是神经导向因子 Netrin-1 的受体, 在神经发育、细胞运动和凋亡以及血管生成中发挥重要作用(Arakawah, 2004; Larrivee *et al.*, 2007; 张佳润等, 2017)。结果显示, *unc5b* 基因主要在肾脏中呈现高表达。研究表明, Netrin-1 可通过作用于 UNC5B 减少肾缺血再灌注损伤及其相关的肾脏炎症(沈丕杰等, 2015)。因此, 在本研究中, 鱼体在低温胁迫下可能出现了炎症反应, 为了减轻炎症带来的损伤, 提高了 *unc5b* 在肾脏组织中的表达量。另外, 28 d 时, 8 °C 组中 *unc5b* 基因仍保持高表达, 13 °C 组中的表达量显著回落, 可能的原因是鱼体在 8 °C 环境下肾脏会产生持续的炎症反应, 13 °C 下鱼体经过长时间的适应, 炎症反应会逐渐消失。在本实验各时期, 心脏和肝脏中 *unc5b* 基因的表达量较低, 其中, 在心脏中表现出低温诱导表达的现象, 这可能是低温对红鳍东方鲀心

脏血管产生了损伤, 为了促进了心脏血管生成而提高 *unc5b* 基因在心脏中的表达。*unc5b* 基因在红鳍东方鲀体内表达变化的作用机制可能与哺乳动物类似, 由神经导向因子 Netrin-1 在接受低温信号刺激后控制的, 但由于 *unc5b* 在鱼类的研究中还未见报道, 在红鳍东方鲀各组织中的作用机制还需进一步研究验证。

3.3 *exoc4* 基因在低温胁迫下的表达分析

本研究结果显示, 低温组肝脏中 *exoc4* 的表达均呈先下降再趋于稳定的趋势。蛋白质组学研究证实, 所有的 EXOC 蛋白均在人类和小鼠血小板中表达, EXOC4 的缺失可能会促进止血并加速动脉血栓形成(Walsh *et al.*, 2021)。Sharda 等(2020)的研究也证实, EXOC4 的缺失增强了凝血酶诱导的血管性血友病因子从 Weibel-Palade 小体(WPB)中的释放。我们推测, 低温胁迫会造成红鳍东方鲀鱼体和肝脏出血, 而鱼类肝脏能够合成凝血酶原、调节凝血因子合成(钱云霞, 2003), 因此, 为了促进止血, 肝脏通过合成凝血因子来抑制 *exoc4* 的表达。在 8 °C 组前期心脏中 *exoc4* 的高表达可能是因为造成了心脏损伤而导致, 而 13 °C 组的表达量相对对照组无明显变化, 可能是该温度下不足以对心脏产生明显负面影响。肾脏作为鱼类的泌尿器官(温龙岗等, 2007), 当血糖中葡萄糖升高, 会促进肾脏排出葡萄糖, 增加尿量。同时, *exoc4* 的表达可能会影响葡萄糖刺激的胰岛素释放以及胰岛素参与诱导的细胞葡萄糖摄取(Laramie *et al.*, 2008)。据此我们推测, 红鳍东方鲀在低温环境下会通过减少细胞葡萄糖的摄取来减少尿量, 从而减少鱼体热量损失, 提升红鳍东方鲀在低温下的生存能力, 因此, *exoc4* 在低温下的肾脏中会呈现高表达。

3.4 *tacc2*、*arhgap44a* 和 *fsip1* 基因在低温胁迫下的表达分析

我们在 *tacc2*、*arhgap44a* 和 *fsip1* 相关研究中发现, 这 3 种基因都与细胞的增殖和凋亡相关。TACC2 的 RNA 干扰可显著降低 MCF-7 和 MDA-MB-453 乳腺癌细胞系的增殖活性(Onodera *et al.*, 2016)。ARHGAPs 通过 RHO 蛋白失活抑制细胞的增殖和迁移(陶丽等, 2018)。纤维鞘相互作用蛋白 1 (fibrous sheath interacting protein 1, FSIP1) 在肿瘤的发生和进展中起着至关重要的作用(Gamallat *et al.*, 2021), FSIP1 能够促进乳腺癌细胞增殖和存活(Yan *et al.*, 2019)。因此, *tacc2* 和 *fsip1* 基因能够促进细胞的增殖, 而 *arhgap44a* 基因抑制细胞的增殖。本研究结果显示, 在心脏和肾脏中, *tacc2* 和 *fsip1* 基因在低温胁迫后的表达均显著升高, 二者表达规律相似, 可能是

低温胁迫会造成心脏和肾脏的损伤,引起细胞凋亡,为了在低温下维持正常的细胞和组织功能,需要促进细胞增殖来应对细胞凋亡的产生,因此,这 2 个基因会在低温下的心脏和肾脏中呈现高表达。随着时间的延长,2 个基因都呈下降趋势,这可能是鱼体逐渐适应低温环境后凋亡现象减轻的结果。在肝脏中,2 个基因在低温胁迫后均呈下降趋势,同时, *arhgap44a* 基因呈相反趋势,这也与 3 个基因的不同功能相吻合,说明 3 个基因在肝脏组织中并不发挥促进细胞增殖的作用,也从侧面反映低温胁迫可能不会造成肝脏细胞强烈的凋亡现象。由于这 3 个基因在鱼类中鲜有研究,其中, *arhgap44a* 在哺乳动物中都尚未有报道,因此,3 个基因在低温应答中具体的调控方式还需要进一步研究。

本研究通过 qRT-PCR 检测了红鳍东方鲀肝脏、心脏和肾脏中 6 个与低温相关的基因。结果显示,6 个基因在各组织中均有不同程度的表达,说明这 6 个基因都在红鳍东方鲀耐低温过程中发挥着重要作用。*pde10a* 可能与红鳍东方鲀在低温中耗能的相关通路存在密切联系, *unc5b* 可能会在低温下抑制红鳍东方鲀组织炎症和损伤的发生, *exoc4* 可调节低温中红鳍东方鲀鱼体代谢, *tacc2*、*arhgap44a*、*fsip1* 与红鳍东方鲀耐低温机制中细胞的增殖与凋亡密切相关。未来在红鳍东方鲀耐低温筛选和新品种选育中,这 6 个基因可以作为响应低温胁迫的潜在标志物,用来评价选育子代的耐低温能力。

参 考 文 献

- ARAKAWA H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 2004, 4(12): 978–987
- ATKINSON D, SIBLY R M. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends in Ecology and Evolution*, 1997, 12(6): 235–239
- BARTON B A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 2002, 42(3): 517–525
- CHANG Y M, XU L H, LI S G, *et al.* Isolation and characterization of full length cDNA sequence of a stearyl-CoA desaturase gene responding to low temperature from common carp (*Cyprinus carpio*). *Chinese Journal of Fisheries*, 2012, 25(3): 1–6 [常玉梅, 徐丽华, 李世国, 等. 鲤耐低温候选基因 *CeSCD* 全长 cDNA 的克隆及功能预测. *水产学杂志*, 2012, 25(3): 1–6]
- CHEN X M, LI J K, WANG Z Y, *et al.* Genome-wide association study of thermal tolerance in large yellow croaker *Larimichthys crocea* based on SLAF-seq technology. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(4): 735–740 [陈小明, 李佳凯, 王志勇, 等. 基于简化基因组测序的大黄鱼耐高温性状全基因组关联分析. *水生生物学报*, 2017, 41(4): 735–740]
- CHENG C H, GUO Z X, WANG A L. The protective effects of taurine on oxidative stress, cytoplasmic free-Ca²⁺ and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under low temperature stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 77: 457–464
- CHI X C, WANG J, SONG S Y, *et al.* Study on breeding selection of thermal tolerance flounder (*Paralichthys olivaceus*) by a molecular marker. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2007, 46(5): 693–696 [池信才, 王军, 宋思扬, 等. 耐温牙鲆分子标记辅助选育研究. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2007, 46(5): 693–696]
- GAMALLAT Y, FANG X, MAI H, *et al.* Bi-allelic mutation in *Fsip1* impairs acrosome vesicle formation and attenuates flagellogenesis in mice. *Redox Biology*, 2021, 43: 101969
- GAO G Q, CHANG Y M, HAN Q X, *et al.* Screening of microsatellite markers associated with cold tolerance of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *Hereditas (Beijing)*, 2010, 32(3): 248–253 [高国强, 常玉梅, 韩启霞, 等. 大黄鱼耐低温性状相关卫星标记的筛选. *遗传*, 2010, 32(3): 248–253]
- GROSS-LANGENHOFF M, HOFBAUER K, WEBER J, *et al.* cAMP is a ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(5): 2841–2846
- HANKIR M K, KRANZ M, GNAD T, *et al.* A novel thermoregulatory role for PDE10A in mouse and human adipocytes. *EMBO Molecular Medicine*, 2016, 8(7): 796–812
- HU Z G, LIU J Y, YUAN R P, *et al.* Analysis of combining ability of survival of imported *Litopenaeus vannamei* populations under temperature and salinity stress. *Marine Sciences*, 2016, 40(1): 25–31 [胡志国, 刘建勇, 袁瑞鹏, 等. 3 个凡纳滨对虾引进群体对温度和盐度耐受力的配合力分析. *海洋科学*, 2016, 40(1): 25–31]
- JESUS T F, INACIO A, COELHO M M. Different levels of *hsp70* and *hsc70* mRNA expression in Iberian fish exposed to distinct river conditions. *Genetics and Molecular Biology*, 2013, 36(1): 61–69
- JGER R, RUSSWURM C, SCHWEDE F, *et al.* Activation of PDE10 and PDE11 phosphodiesterases. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(2): 1210–1219
- JUSZCZAK G R, STANKIEWICZ A M. Glucocorticoids, genes and brain function. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2018, 82: 136–168
- LARAMIE J M, WILK J B, WILLIAMSON S L, *et al.* Polymorphisms near EXOC4 and LRGUK on chromosome 7q32 are associated with Type 2 diabetes and fasting glucose; the NHLBI Family Heart Study. *BMC Medical Genetics*, 2008, 9: 46
- LARRIVEE B, FREITAS C, TROMBE M, *et al.* Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting

- angiogenesis. *Genes and Development*, 2007, 21(19): 2433–2447
- LI W Y, LUO H Z, YIN X L, *et al.* Effects of low temperature stress on expression of MT, AQP1, and TCP1 genes in low temperature-resistant and non-low temperature-resistant strains of large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(1): 38–43 [李伟业, 罗海忠, 殷小龙, 等. 低温胁迫对耐低温和非耐低温品系大黄鱼 MT、AQP1、TCP1 基因表达的影响. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(1): 38–43]
- LIU C, DING J, GAO X M, *et al.* Effects of acute low temperature stress on the hormones and gene expression of glucocorticoid receptor of large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Journal of Thermal Biology*, 2021, 99: 103018
- LIU X F, MA A J, HUANG Z H, *et al.* Expression characteristics analysis of major QTL candidate genes in response to high temperature stress in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(6): 1407–1415 [刘晓菲, 马爱军, 黄智慧, 等. 大菱鲆高温胁迫应答主效 QTL 候选基因的表达特性分析. *水产学报*, 2019, 43(6): 1407–1415]
- MA A J, LI W Y, WANG X A, *et al.* Research progress and outlook of *Takifugu rubripes* culture techniques. *Marine Sciences*, 2014, 38(2): 116–121 [马爱军, 李伟业, 王新安, 等. 红鳍东方鲀养殖技术研究现状及展望. *海洋科学*, 2014, 38(2): 116–121]
- MA A J, XU K, HUANG Z H, *et al.* Screening of microsatellite molecular marker associated with heat-resistance of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Advances in Marine Science*, 2011, 29(3): 370–378 [马爱军, 许可, 黄智慧, 等. 大菱鲆与耐高温性状相关的微卫星标记筛选. *海洋科学进展*, 2011, 29(3): 370–378]
- MU F S, MIAO L, LI M Y, *et al.* Screening of microsatellite markers associated with cold tolerance of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Journal of Biology*, 2017, 34(1): 34–38 [穆方申, 苗亮, 李祥云, 等. 微卫星技术筛选大黄鱼耐低温标记. *生物学杂志*, 2017, 34(1): 34–38]
- MUKHOPADHYAY B, CHATTERIEE A, BHATTACHARYA S, *et al.* Intracellular events in response to GnRH causing gonadotropin release from pituitary cells of a channid fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology*, 1997, 118(2): 129–136
- ONODERA Y, TAKAGI K, MIKI Y, *et al.* TACC2 (transforming acidic coiled-coil protein 2) in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with cell proliferation. *Cancer Medicine*, 2016, 5(8): 1973–1982
- PAN X, XU Y J, NING Y, *et al.* Effects of temperature stress on genes transcription and expression in juvenile *Hippocampus kuda* Bleeker. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, 34(7): 1421–1431 [潘霞, 徐永健, 宁燕, 等. 温度胁迫对幼体大海马基因转录表达的影响. *核农学报*, 2020, 34(7): 1421–1431]
- QIAN Y X. Nutritional effects of vitamin K on fish. *Reservoir Fisheries*, 2003, 23(6): 58–59 [钱云霞. 维生素 K 对鱼类的营养作用. *水利渔业*, 2003, 23(6): 58–59]
- QIANG J, YANG H, WANG H, *et al.* Interacting effects of water temperature and dietary protein level on hematological parameters in Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* (L.) and mortality under *Streptococcus iniae* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 8–16
- SHARDA A V, BARR A M, HARRISON J A, *et al.* VWF maturation and release are controlled by 2 regulators of Weibel-Palade body biogenesis: Exocyst and BLOC-2. *Blood*, 2020, 136(24): 2824–2837
- SHEN P J, YAN R L, WANG C M, *et al.* Role of Netrin-1 in inflammation-based diseases. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015(3): 551–553, 568 [沈丕杰, 颜荣林, 王长明, 等. Netrin-1 在炎症相关疾病中的作用. *现代生物医学进展*, 2015(3): 551–553, 568]
- TAO L, ZHU Y J, GU Y, *et al.* Research progress of the relationship between ARHGAPs and the invasion and metastasis of colorectal cancer. *Journal of Modern Oncology*, 2018, 26(9): 1450–1454 [陶丽, 朱莹杰, 顾纓, 等. ARHGAPs 分子与结直肠癌侵袭及转移关系的研究进展. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(9): 1450–1454]
- WALSH T G, YONG L, WILLIAMS C M, *et al.* Loss of the exocyst complex component EXOC3 promotes hemostasis and accelerates arterial thrombosis. *Blood Advances*, 2021, 5(3): 674–686
- WEN L L, WANG Z J. Preliminary study on organic fish's urinary system. *Journal of Zunyi Normal University*, 2007, 9(2): 61–65 [温龙岚, 王志坚. 鱼类泌尿系统组织学研究概况. *遵义师范学院学报*, 2007, 9(2): 61–65]
- WEN X, CHU P, XU J J, *et al.* Combined effects of low temperature and salinity on the immune response, antioxidant capacity and lipid metabolism in the pufferfish (*Takifugu fasciatus*). *Aquaculture*, 2021, 531: 735866
- YAN J H, SHENG Q C, WANG Z. Research progresses of phosphodiesterase 10A. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2015, 35(12): 1904–1910 [闫军浩, 沈倩诚, 王争. 磷酸二酯酶 10A 及其研究进展. *上海交通大学学报(医学版)*, 2015, 35(12): 1904–1910]
- YAN M S, WANG J S, REN Y L, *et al.* Over-expression of FSIP1 promotes breast cancer progression and confers resistance to docetaxel via MRP1 stabilization. *Cell Death and Disease*, 2019, 10(3): 204
- YUAN C H, LIU Z F, MA A J. Screening and identification of microsatellite markers related to low temperature tolerance in *Takifugu rubripes*. *Marine Sciences*, 2022, 46(2): 97–104 [袁晨浩, 刘志峰, 马爱军. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)耐低温相关微卫星标记的初步筛选. *海洋科学*, 2022, 46(2): 97–104]
- YUAN C H. Screening of low temperature tolerance markers and transcriptome analysis of *Takifugu rubripes*. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2021 [袁晨浩. 红鳍东方鲀耐低温标记筛选及转录组分析. 浙江海洋大学硕士研究生学位论文, 2021]

ZHANG D, YANG Z Y, ZHANG Y L. Development status and countermeasures of Chinese puffer fish culture industry. *Scientific Fish Farming*, 2017(12): 1–3 [张迪, 杨正勇, 张英丽. 中国河鲀养殖产业发展现状与发展对策. *科学养鱼*, 2017(12): 1–3]

ZHANG J R, KONG C Z, GAO Z P. The research of carcinoma biological function of UNC5B. *Journal of Modern Oncology*, 2017, 25(18): 3023–3026 [张佳润, 孔垂泽, 高植鹏. UNC5B 癌生物学功能的研究进展. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(18): 3023–3026]

(编辑 冯小花)

Evaluating the Transcriptional Regulation of Six Major QTL Candidate Genes During Low Temperature Stress in *Takifugu rubripes*

ZHU Liguang^{1,2,3}, LIU Zhifeng^{2,3}, MA Aijun^{2,3}①, WANG Xin'an^{2,3}, SUN Zhibin^{2,3},
CHANG Haowen^{2,3}, LIU Shengcong⁴, BAO Yulong⁴, MA Deyou¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding, Qingdao Key Laboratory of Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao 266071, China;
4. Tangshan Muhai Aquaculture Co. Ltd., Tangshan 063200, China)

Abstract *Takifugu rubripes* are warm temperate fish, suggesting that the reduced seawater temperatures in winter are likely to have a substantial impact on their survival. Considering this, there is likely to be some industrial value in breeding extremely low-temperature tolerant varieties of this fish. Here, we evaluate the expression changes in six major QTL candidate genes (*tacc2*, *fsip1*, *exoc4*, *arhgap44a*, *pde10a*, and *unc5b*) in response to reduced temperature in an effort to understand cold tolerance in *T. rubripes*. The expression changes of these six genes in the liver, heart, and kidney were detected using real-time quantitative PCR. This study used three groups of 8-month-old fish, all from the same family established by our research group, exposed to three different temperature gradients, where 8 °C and 13 °C acted as the minimum in the low temperature groups and 18 °C acted as the minimum in the control group. Our results showed that all six genes were expressed at different levels across each of these three tissues at different temperatures. The relative expression of *pde10a* first increased and then decreased in all three tissues, whereas the relative expression of *tacc2* and *exoc4* were distinctly different in the liver, kidney, and heart at 8 °C. In this case, these transcripts first decreased and then stabilized in the liver, increased and then stabilized in the kidneys, and increased and then decreased in the heart. The relative expression of *unc5b* was low in the liver and heart, but high in the kidney following a second week of low-temperature growth, whereas *arhgap44a* expression was slightly upregulated in the liver and stable in the kidney and heart. *fsip1* expression demonstrated a downward trend in the liver but seemed to first increase and then decrease in the heart and kidney. Taken together, these results demonstrate that all six of these genes are differentially expressed in different tissues of *T. rubripes*, with these differences exhibiting dynamic changes with respect to tissue origin and temperature. In addition, this data clearly revealed a positive correlation between cold stress and the expression of these QTL candidate genes. Thus, we can conclude that these six QTL candidate genes may play a substantial role in the low temperature adaptation of *T. rubripes*. This is significant because although low temperature is known to be an important factor limiting the development of the industrial utility of *T. rubripes*, there are still relatively few reports describing their cold stress response. This study provides a theoretical basis for the study of signaling pathways related to the low temperature tolerance response of *T. rubripes* and the development of low temperature tolerant varieties.

Key words *Takifugu rubripes*; *pde10a*; *tacc2*; *unc5b*; *exoc4*; *arhgap44a*; *fsip1*; Low temperature stress

① Corresponding author: MA Aijun, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn