

汤保贵, 蔡润佳, 张静. 低温胁迫下军曹鱼幼鱼肝脏转录组测序分析[J]. 海洋学报, 2025, 47(1): 63–73, doi:10.12284/hyxb2025010
Tang Baogui, Cai Runjia, Zhang Jing. Transcriptome analysis of liver of juvenile *Rachycentron canadum* under low temperature stress[J]. Haiyang Xuebao, 2025, 47(1): 63–73, doi:10.12284/hyxb2025010

低温胁迫下军曹鱼幼鱼肝脏转录组测序分析

汤保贵^{1,2}, 蔡润佳¹, 张静^{1,2*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江, 524088; 2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江, 524088)

摘要: 为研究低温胁迫对军曹鱼幼鱼的影响, 将军曹鱼幼鱼饲养于常温 [$(30.5 \pm 1.0) ^\circ\text{C}$] 和低温 [$(20.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$] 7 d 后对军曹鱼肝脏进行有参转录组测序, 每组 3 个生物学重复。结果显示, 6 个测序样品共检测到约 243 694 134 个 raw reads, 所有样品 Q30 均超过 94%, GC 在 47.65%~48.16% 范围内。共筛选出 4 362 个差异表达基因, 其中 2 793 个基因上调, 1 569 个基因下调。KEGG 通路富集分析结果显示, 在脂质代谢中, 大量差异基因富集在脂代谢过程、脂质生物合成过程、甘油磷脂代谢过程、磷脂代谢过程和甘油酯代谢过程等生物过程中, PPAR 信号通路中 *ppara*、*ppar β* 、*scd1*、*cpt1* 和 *cpt2* 等多个脂代谢相关基因对军曹鱼幼鱼应对低温胁迫具有关键作用; 在糖代谢中, 大量基因富集于糖酵解/糖异生、半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化等生物过程, 其中 *g6pc*、*eno* 等基因在军曹鱼幼鱼应对低温胁迫时发挥重要调节作用。

关键词: 低温胁迫; 军曹鱼; 转录组; 脂代谢; 糖代谢

中图分类号: Q959.4

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2025)01-0063-11

1 引言

水温作为影响鱼类生存的最重要环境因子之一, 深刻影响着鱼类的多种生命活动。即使不同物种之间的适温范围存在差异, 但是一旦水温过低, 都会对鱼类生长、代谢等产生影响^[1-2]。低温胁迫对鱼类的脂代谢调节具有显著影响, 如 He 等研究表明, 低温胁迫会显著提高吉富罗非鱼 (GIFT *Oreochromis niloticus*) 肌肉脂肪酸的不饱和度^[3]; Sun 等研究发现, 斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 通过抑制肝脏 *cpt1*、*fabp10* 等脂代谢相关基因的表达来响应低温胁迫^[4]; Mininni 等应用转录组测序技术对低温胁迫下的金头鲷 (*Sparus aurata*) 进行肝脏转录组分析, 发现肝脏在低温下产生的大量差异基因富集在脂代谢的相关通

路上^[5]。近年来, 测序技术不断更新换代, 组学技术的发展为很多生物学机制分析提供了重要的研究手段。转录组测序通过监测生物体在不同条件下的基因变化来分析基因响应情况, 已应用于多个物种对低温胁迫或低温适应机制的研究中, 如鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 等, 并筛选出较多关于应对低温胁迫的关键基因^[6-8]。虽然目前已对多种鱼类应对低温胁迫的机制展开研究, 但对军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 脂代谢在低温胁迫下的分子调节机制仍不清楚。

军曹鱼是鲈形目、军曹鱼科、军曹鱼属鱼类, 属于暖水广盐性鱼类, 适宜温度为 21~31 $^\circ\text{C}$, 适宜盐度为 8~35, 一直被认为是具有巨大潜力的海洋水产养

收稿日期: 2024-01-15; 修订日期: 2024-11-11。

基金项目: 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)项目(ZJW-2019-06); 湛江市海洋经济创新发展示范市项目(XM-202008-03); 国家海水鱼产业技术体系项目(CARS-47-G08)。

作者简介: 汤保贵(1975—), 男, 湖北省襄阳市人, 副教授, 主要研究方向为鱼类养殖与遗传育种。E-mail: zjtbg@163.com

* 通信作者: 张静, 副教授, 主要研究方向为渔业生态环境与保护。E-mail: zjouzj@126.com

殖品种,随着种苗生产技术的发展已成为我国南方沿海一带的重要海水网箱养殖对象之一^[9],但其应对低温的适应能力较差,而培育耐低温品种能有效地提高军曹鱼的耐低温能力。肝脏是脊椎动物代谢调控的主要器官,也是分析鱼类生理活动变化时的重要组织^[7],本研究以军曹鱼幼鱼肝脏为实验材料进行转录组测序,了解和分析军曹鱼幼鱼在 20℃ 低温条件下肝脏脂代谢调节网络,为军曹鱼应对低温胁迫关键基因的挖掘和耐低温品种的培育提供参考。

2 材料和方法

2.1 实验动物与管理

实验动物为广东海洋大学鱼类种子工程与养殖实验室人工繁殖的军曹鱼幼鱼(211.17 ± 9.51) g,将 90 尾军曹鱼幼鱼随机均分为常温对照组和低温组,每组 3 个平行,每天饱食投喂两次(08:00 和 16:00),暂养 7 d 后开始正式实验。常温对照组水温为自然水温[(30.5 ± 1.0) °C],低温实验组采用密封瓶装冰块按照 0.5 °C/h 匀速降温,并维持在(20.0 ± 0.5) °C,间隔 30 min 检测一次水温,静水养殖且每天更换 50% 等温新鲜海水。预实验过程中发现军曹鱼幼鱼在 20 °C 时完全无食欲,为避免残余饲料污染水质故低温组不投喂,对照组保持每天两次正常喂食。低温组和对照组采样后适当降低水位以保持鱼密度相对一致,且均维持溶氧在 5 mg/L 以上,pH 值在 7.4~7.8 范围内,氨氮小于 0.02 mg/L,亚硝酸盐小于 0.01 mg/L。

2.2 样品采集

由预实验结果可知,军曹鱼幼鱼在 20 °C 低温下半致死时间为 7 d,所以在第 7 天时随机采集低温组和常温对照组各 3 尾幼鱼的肝脏作为转录组分析样品,采样时每尾鱼用丁香酚麻醉后取大约 100 mg 的肝脏样品放入冻存管中并用液氮速冻。采样结束后将所有肝脏样品保存于-80 °C 冰箱中。

2.3 RNA 提取和 cDNA 文库构建

采用北京全式金生物技术有限公司的 RNA 提取试剂盒(TransZOL Up Plus RNA Kit)提取每个样品的总 RNA,操作过程严格按照说明书进行。RNA 提取后采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的降解程度,RNA 定量采用 Nano Drop 2000 分光光度计对 RNA 做初步分析并使用 Agilent 2100 RNA 6000 Nano kit 做精确分析。总 RNA 提取后采用常规试剂盒去除 rRNA,用带 Oligo(dT) 的磁珠对 mRNA 进行富集。将富集得到的 mRNA 用超声波打断作为模板,随机寡核苷酸作为引物,利用 M-MuLV 逆转录酶体系合成第一链

cDNA。降解 RNA 链后以第一链为模板,以 dNTP 为合成原料,利用 DNA polymerase I 体系合成第二链 cDNA。修复双链 cDNA 末端、加上 Poly A 尾和测序接头,用 AMPure XP beads 把 200 bp 左右的 cDNA 筛选出来进行 PCR 扩增,最后再次利用 AMPure XP beads 纯化产物,完成文库构建。

2.4 转录组数据质控与参考基因组比对

将含 adapter、含 N 比例大于 10%、全部为 A 碱基和质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占整条 read 的 50% 以上的 reads 定义为低质量数据,对下机的 raw reads 利用 fastp 进行质控,过滤低质量数据得到 clean reads,再进行碱基组成和质量分布分析,利用 bowtie2 软件将 clean reads 比对到该物种的核糖体数据库,去除比对上核糖体的 reads,再利用 HISAT2 软件,开展基于参考基因组(未公布)的比对分析。参考基因组(575.35 Mb)由广东海洋大学鱼类种子工程与健康养殖实验室提供。

2.5 基因表达分析

根据 HISAT2 软件的比对结果,利用 Stringtie 重构转录本,并利用 RSEM 计算每个样本中所有基因的表达量。对测序深度、转录本长度进行校正后得到基因的 FPKM 值,再进一步分析各基因的表达分布情况。把基因表达水平分析中得到的表达矩阵数据利用 DESeq2 软件进行差异基因分析。基于差异分析结果,筛选 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ 的基因作为显著差异基因。

2.6 差异基因 GO 富集和 KEGG 富集分析

将差异基因向 GO 数据库(<http://www.geneontology.org/>)的条目映射,统计每个 term 的差异基因数量,再应用超几何检验找出显著富集的 GO 条目。将差异基因注释到 KEGG 数据库得到注释信息,再以 KEGG Pathway 为单位,同样应用超几何检验完成 Pathway 显著性富集分析。该假设检验的 p -value 计算公式为

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

式中: N 为所有背景蛋白中具有 GO 注释的蛋白数目; n 为 N 中差异表达蛋白的数目; M 为所有背景蛋白中注释为某特定 GO term 的蛋白数目; m 为注释为某特定 GO term 的差异表达蛋白数目。

2.7 qRT-PCR 验证

通过对表达量高且差异性大的基因进行背景调

查,筛选出以下几个基因进行 qRT-PCR 验证。根据 *acc*、*cpt1*、*fas*、*hsl*、*mgl*、*ppara* 等基因和肌动蛋白 (β -*actin*) 基因,用 primer 5.0 设计各个基因的引物(引物

序列如表 1 所示),再用实时荧光定量 PCR 仪检测基因表达量,以 β -*actin* 基因表达量为内参使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因的相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of genes used for RT-qPCR

基因名称	基因编号	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>acc</i>	Rca011875	TCGCCAGTCTCCCAACTCCTAT	ACCTGTCCACCTCCTCCTTCAT
<i>fas</i>	Rca019519	AGCATCCTGTATCGCCCGTTTGA	GTCGGTCTGTGGGTCTCCTTGT
<i>hsl</i>	Rca015361	AGCAGTCTGGTTTGGGTTTGGC	AGGTTCTGGGTAATGCGTTCA
<i>cpt1</i>	Rca009591	TACCGCTTGGCTATGACTGGAC	TTGCTGGAGATGTGGAAGTTGATG
<i>mgl</i>	Rca013017	CACTGCGACCTTTGACCTCTTTG	AACCATCCTTCTGGGCGTAATC
<i>ppara</i>	Rca010067	GAGTTCTCATCTTCTCTCATCGC	GGCACTTGTGCGGTTCTTCTTT
β - <i>actin</i>	GU584189	AGGAAATTGTGCGTGAC	AGGCAGCTCGTAGCTCTT

注: *acc*表示acetyl-CoA carboxylase, 乙酰辅酶A羧化酶; *fas*表示fatty acid synthase, 脂肪酸合成酶; *hsl*表示hormone-sensitive triglyceride lipase, 激素敏感性脂肪酶; *cpt1*表示carnitine palmitoyl transferase I, 肉碱脂酰转移酶 I; *mgl*表示monoacylglycerol lipase, 单酰甘油脂肪酶; *ppara*表示peroxisome proliferators-activated receptor, 过氧化物酶体增殖物激活受体 α 。

3 结果

3.1 转录组测序与比对

通过对军曹鱼肝脏进行转录组测序,6个样品(常温对照组和低温组各3个生物学重复)的下机 raw datas 及过滤后各质量指标如表 2 所示,各样品 clean reads 数占 raw reads 的 98% 以上,过滤后各样品 GC

含量在 47.65%~48.16% 之间,较为一致,Q20 超过 98%,Q30 超过 94%,表明本次测序结果的有效数据量占比高且质量较好。将获得的 clean reads 去除比对上核糖体 RNA (rRNA) 后,进行参考基因组比对,结果如表 3 所示,各样品 reads 在基因组上的总比对率均在 92% 以上,比对率在不同处理组之间无显著差异且较为一致。

表 2 样品过滤后测序质量评估统计表

Table 2 Statistical table of sequencing quality evaluation after sample filtering

处理	样品	Raw reads	Clean reads (Ratio)	Clean data/bp	GC/%	Q20/%	Q30/%
对照	GC-1	41 052 194	40 443 694 (98.52%)	6 033 805 581	47.91	98.36	94.96
	GC-2	39 405 242	38 872 552 (98.65%)	5 802 795 648	47.66	98.24	94.66
	GC-3	38 277 454	37 694 004 (98.48%)	5 623 819 502	48.03	98.30	94.85
低温	LG-1	41 764 832	41 190 146 (98.62%)	6 148 615 460	47.65	98.23	94.74
	LG-2	42 025 156	41 532 498 (98.83%)	6 206 078 195	47.94	98.19	94.63
	LG-3	41 169 256	40 660 388 (98.76%)	6 075 783 071	48.16	98.33	94.90

3.2 差异表达分析

为了消除基因长度和测序深度差异对分析基因表达的影响,采用基因的 FPKM 值对不同样品间的基因表达差异情况进行比较。基于差异分析结果,筛选出差异表达基因。差异表达分析结果如图 1 所示,本次分析共获得 4 362 个差异表达基因,其中 2 793 个基因表达上调,1 569 个基因表达下调。

3.3 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

Gene Ontology (GO) 共有 3 个 ontology (本体),分别描述基因的分子功能 (molecular function)、细胞组分 (cellular component)、参与的生物过程 (biological process)。将富集前 20 的 GO term 进行统计 (图 2),发现有 4 个 term 属于分子功能条目,7 个 term 属于细胞组分条目、9 个 term 属于生物过程条目。在分子功

表 3 测序结果比对基因组情况统计表

Table 3 Statistics table of sequencing results compared to the genome

处理	样品	Unmapped (Ratio)	Unique_Mapped (Ratio)	Multiple_Mapped (Ratio)	Total_Mapped (Ratio)
对照	GC-1	2 505 363 (6.20%)	35 435 211 (87.67%)	2 477 732 (6.13%)	37 912 943 (93.80%)
	GC-2	2 677 482 (6.89%)	34 013 307 (87.56%)	2 154 317 (5.55%)	36 167 624 (93.11%)
	GC-3	2 784 477 (7.39%)	32 773 501 (87.02%)	2 103 880 (5.59%)	34 877 381 (92.61%)
低温	LG-1	2 918 520 (7.10%)	36 014 174 (87.60%)	2 177 240 (5.30%)	38 191 414 (92.90%)
	LG-2	2 690 715 (6.49%)	36 329 768 (87.62%)	2 440 121 (5.89%)	38 769 889 (93.51%)
	LG-3	2 159 254 (5.32%)	35 571 430 (87.60%)	2 875 492 (7.08%)	38 446 922 (94.68%)

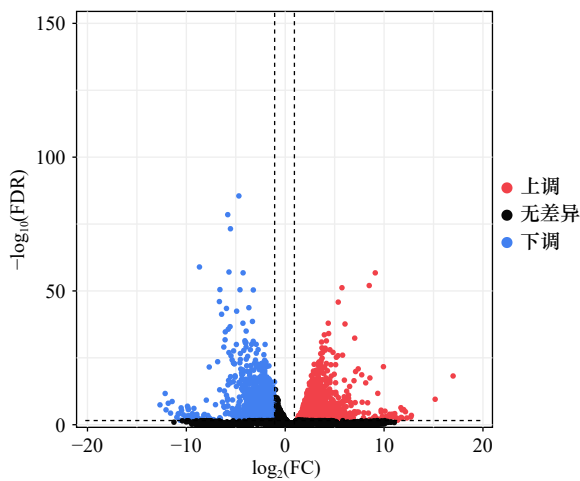


图 1 CG vs LG 火山图

Fig. 1 CG vs LG volcano plot

能条目中, 差异基因主要富集在催化活性(GO:0003824)、RNA 结合(GO:0003723)、小分子结合(GO:0036094)、核苷结合(GO:0001882); 在细胞组分条目中, 差异基因富集在细胞器部分(GO:0044422)、膜结合细胞器(GO:0043227)、细胞内膜结合细胞器(GO:0043231)、细胞内细胞器部分(GO:0044446)、细胞器膜(GO:0031090)、细胞器(GO:0043226)、细胞内细胞器(GO:0043229); 在生物过程条目中, 差异基因主要富集在草酸代谢过程(GO:0043436)、有机酸代谢过程(GO:0006082)、羧酸代谢过程(GO:0019752)、单生物代谢过程(GO:0044710)、小分子代谢过程(GO:0044281)、细胞酮代谢过程(GO:0042180)、调节细胞酮代谢过程(GO:0010565)、细胞周期阶段(GO:0022403)、一元羧酸代谢过程(GO:0032787)。统计富集到各个 term 的基因表达情况发现, 在富集前 20 的 term 中上调基因的数量均多于下调基因的数量(见图 2 第三圈)。

KEGG 是有关 Pathway 的主要公共数据库, 通过通路显著性富集来确定差异基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。统计富集差异基因最多

的前 20 个通路(图 3), 主要富集的通路有蛋白酶体(ko03050)、代谢途径(ko01100)、内质网中的蛋白质加工(ko04141)、吞噬体(ko04145)、类固醇生物合成(ko00100)、柠檬酸循环(ko00020)、真核生物核糖体生物发生(ko03008)、碳代谢(ko01200)、脂肪酸降解(ko00071)、PPAR 信号通路(ko03320)、戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化(ko00040)等。

3.4 脂代谢相关生物过程与通路

与脂代谢相关生物过程与通路富集结果如表 4 所示, 低温胁迫产生的差异基因主要富集到脂质代谢过程(GO:0006629)、细胞脂质代谢过程(GO:0044255)、脂质生物合成过程(GO:0008610)等生物过程以及与类固醇生物合成(ko00100)、脂肪酸降解(ko00071)、类固醇激素的合成(ko00140)、初级胆汁酸生物合成(ko00120)、脂肪酸生物合成(ko00061)等通路上。

3.5 PPAR 信号通路富集结果

分析 KEGG 富集前 20 的通路中, PPAR 信号通路(ko03320)对军曹鱼脂代谢在低温条件下的调节具有重要作用(如图 4 所示)。在该通路中共检测到 83 个基因, 其中 36 个基因表达显著。军曹鱼肝脏中极低密度脂蛋白 VLDL、乳糜微粒 chylomicron 通过脂肪酸转运蛋白 *fatp* 将信号传递至脂肪酸结合蛋白 *fabp*, 活化后的脂肪酸结合蛋白 *fabp* 在细胞核内促进 *ppary* 转录表达同时抑制 *ppara* 表达, 使下游基因中 *scd1*、*fabp3*、*lpl*、*pgar*、*cpt1*、*cpt2* 等基因上调, *cyp7a1*、*cyp27*、*ap2* 等基因下调。

3.6 糖代谢相关生物过程与通路

与糖代谢相关生物过程与通路富集结果如表 5 所示, 低温胁迫产生的差异基因主要富集到单糖代谢过程(GO:0005996)、己糖代谢过程(GO:0019318)等生物过程以及糖酵解/糖异生(ko00010)、半乳糖代谢(ko00052)、淀粉和蔗糖代谢(ko00500)、戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化(ko00040)等通路上。

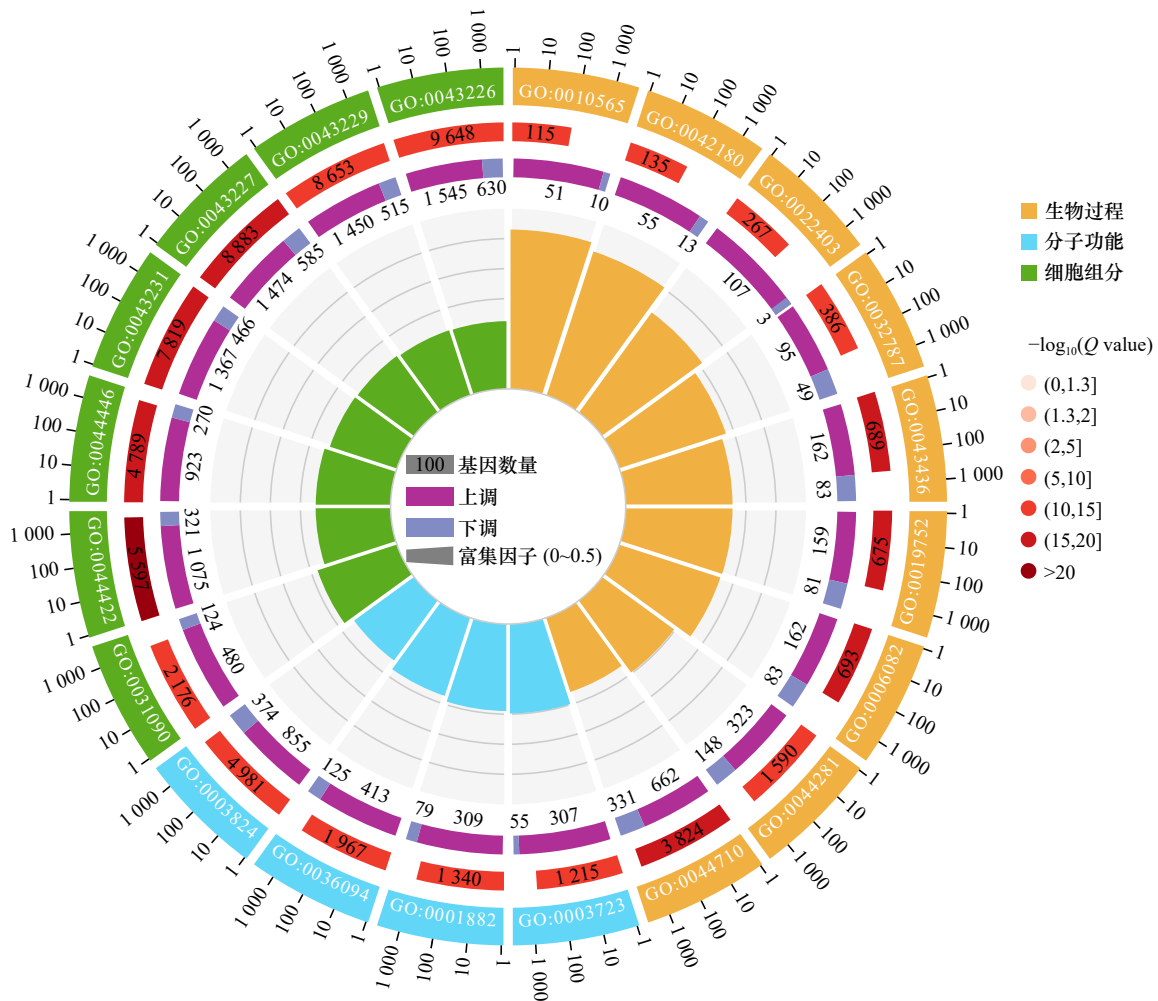


图2 富集前20的GO terms

Fig. 2 The first 20 enriched GO terms

第一圈: 富集前20的GO term, 圈外为基因数目的坐标尺, 不同的颜色代表不同的Ontology; 第二圈: 背景基因中该GO term的数目以及 Q 值, 基因越多条形越长, Q 值越小颜色越红; 第三圈: 上下调基因比例条形图, 深紫色代表上调基因比例, 浅紫色代表下调基因比例, 下方显示具体的数值; 第四圈: 各GO term的RichFactor值(该GO term中差异基因数量除以所有数量), 背景网格线每一格代表0.1

The first circle: the first 20 enriched GO terms, outside the circle is the coordinate ruler of gene number, and different colors represent different Ontology. The second circle: the number and Q value of the GO term in the background gene, the more genes, the longer the bars, and the smaller the Q value, the redder the color. The third circle: bar chart of the proportion of up and down genes, dark purple represents the proportion of up genes, light purple represents the proportion of down genes, and specific values are displayed below. The fourth circle: RichFactor value of each GO term (the number of differential genes in the GO term divided by all the numbers), and each grid line of the background represents 0.1

3.7 转录组结果验证

为了验证转录组结果, 选取了 *acc*、*cpt1*、*fas*、*hsl*、*mgl*、*ppara* 6个基因进行 qRT-PCR 检测, 并从转录组中调取上述基因的检测结果进行对比。结果如图5所示, 各基因在 qRT-PCR 和转录组中的表达变化趋势一致, 说明转录组结果可靠。

4 讨论

转录组是生物体的器官、组织或细胞在特定时空条件下所有转录产物的合集, 转录组学研究不仅能够

揭示生物在不同条件下的分子调节机理, 也能从转录水平上分析基因的结构和功能^[10]。本研究通过对常温条件和低温条件下军曹鱼肝脏的转录组分析, 获得了大量的差异表达基因, 为从整体上了解军曹鱼对低温的响应机制提供了资料, 为培育军曹鱼耐低温品种奠定了基础。

4.1 脂质代谢

4.1.1 脂代谢相关生物过程差异表达基因

在鱼类研究中, 脂肪既是机体最关键的能量来源, 也是组成生物细胞膜的重要原料^[11], 这两个生物

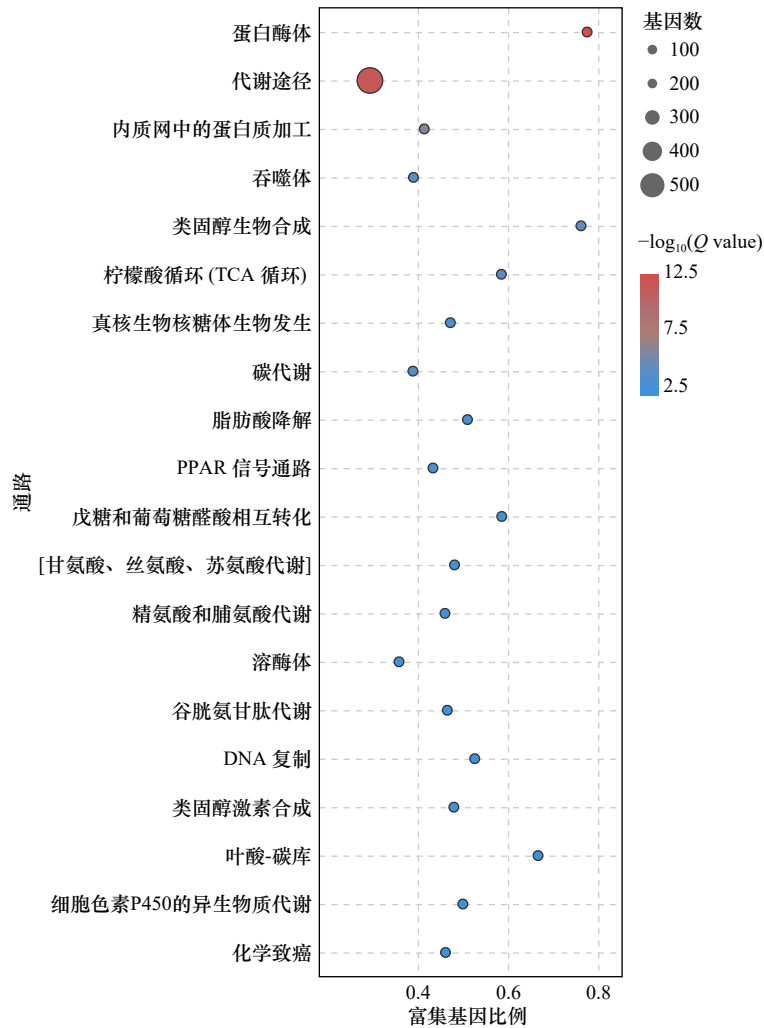


图3 富集前20的通路

Fig. 3 The first 20 enriched pathways

功能均对鱼体抵抗低温环境具有重要作用,但目前对鱼类低温下脂代谢相关分子调节机制的认识仍然不够清晰。本研究通过对军曹鱼肝脏在低温和常温条件下的差异表达基因进行富集分析,结果发现共有294个差异基因富集到脂质代谢过程(GO:0006629),表明低温胁迫会显著影响军曹鱼幼鱼肝脏脂代谢活动。

除了发现脂代谢过程有较多基因被显著富集之外,还发现细胞脂质代谢过程(218)、脂质生物合成过程(82)、甘油酯代谢过程(79)和磷脂代谢过程(82)等也富集到较多的差异基因。脂质是生物体内三大营养物质之一,除了为机体提供能量外,还是部分功能分子的合成原料^[12]。脂质生物合成过程被显著富集可能跟军曹鱼在低温下停食有关,停食导致脂质代谢的平衡状态被打破,而提高脂质生物合成相关基因的表达可以一定程度上补偿脂质摄入减少的部分。

甘油磷脂主要包括磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺两种物质,甘油磷脂和鞘磷脂是生物膜的重要成分,

细胞正常功能的行使依赖磷脂规律的结构,磷脂还是机体内脂类催化过程中的重要物质^[13]。甘油作为生物体内良好的低温保护剂,具有防止体内的水分形成结晶,对维持低温条件下的正常生理功能具有较大的作用^[14]。

值得注意的是,本研究中KEGG富集分析结果显示,类固醇生物合成和类固醇激素合成等两个途径分别富集到较多差异基因。类固醇生物合成途径中,*lss*、*ebp*、*hsd17b7*、*dhcr24*、*fdft1*、*sqle*等基因在低温环境中显著上调。而类固醇激素合成途径中*ugt2a2*、*ugt2b1*、*akr1d1*、*dhcr11*、*cyp7a1*、*comtb*、*cyp3a27*等较多基因显著下调,上调基因如*sult2b1*、*cyp11b*等基因数量较少。从军曹鱼肝脏转录组测序结果上看,低温虽然促进了类固醇生物合成,但是抑制了类固醇激素生物合成。在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)应对低温胁迫的肝脏转录组研究结果中发现,类固醇激素生物合成中相关酶的基因表达显著下调^[15],与本研究结果一致。类

表 4 脂代谢相关生物过程及通路的差异基因富集分析

Table 4 Differential gene enrichment analysis of lipid metabolism-related biological processes and pathways

数据库	功能/通路	基因数	编号
GO	脂质代谢过程 (lipid metabolic process)	294	GO:0006629
	细胞脂质代谢过程 (cellular lipid metabolic process)	218	GO:0044255
	脂质生物合成过程 (lipid biosynthetic process)	82	GO:0008610
	细胞脂质分解代谢过程 (cellular lipid catabolic process)	26	GO:0044242
	脂质分解代谢过程 (lipid catabolic process)	30	GO:0016042
	中性脂质代谢过程 (neutral lipid metabolic process)	38	GO:0006638
	脂质稳态 (lipid homeostasis)	23	GO:0055088
	脂质定位 (lipid localization)	60	GO:0010876
	蛋白-脂质复合物亚基组织 (protein-lipid complex subunit organization)	11	GO:0071825
	脂质贮藏的积极调节 (positive regulation of lipid storage)	7	GO:0010884
	脂质储存的调节 (regulation of lipid storage)	14	GO:0010883
	脂质储存 (lipid storage)	15	GO:0019915
	脂质代谢过程的正向调节 (positive regulation of lipid metabolic process)	13	GO:0045834
	脂质代谢过程的调节 (regulation of lipid metabolic process)	55	GO:0019216
	甘油酯代谢过程 (glycerolipid metabolic process)	79	GO:0046486
	磷脂代谢过程 (phospholipid metabolic process)	82	GO:0006644
	脂质转运 (lipid transport)	48	GO:0006869
	脂质过氧化氢反应 (response to lipid hydroperoxide)	2	GO:0006982
KEGG	类固醇生物合成 (Steroid biosynthesis)	16	ko00100
	脂肪酸降解 (Fatty acid degradation)	25	ko00071
	类固醇激素的合成 (Steroid hormone biosynthesis)	24	ko00140
	初级胆汁酸生物合成 (Primary bile acid biosynthesis)	11	ko00120
	脂肪酸生物合成 (Fatty acid biosynthesis)	10	ko00061
	花生四烯酸代谢 (Arachidonic acid metabolism)	19	ko00590

固醇激素属于四环脂肪烃化合物, 包括有糖皮质激素、孕激素、盐皮质激素、雌激素和雄激素等 5 类^[16]。其中, 糖皮质激素主要包括皮质醇和皮质酮^[17], 而皮质醇是鱼类应对环境应激时用于维持生理平衡的重要激素之一^[18], 也是衡量应激强弱程度的常用指标^[19]。类固醇激素合成受到抑制是否导致皮质醇分泌不足, 以及是否与军曹鱼低温耐受性较差有关, 则有待进一步分析论证。

4.1.2 PPAR 信号通路差异表达基因

作为与动物体脂代谢具有密切关系的三大途径之一^[20], 过氧化物酶体增殖激活受体 *ppars* (peroxisome proliferator-activated receptors, *ppars*) 信号通路对

分泌脂肪因子、调控脂肪细胞的分化等过程都具有重要作用^[21]。*ppars* 具有 *ppara*、*pparβ/δ* 和 *pparγ* 三种亚型, 均属于亲和力较高的内源性配体, 且可被脂肪酸或者脂肪酸衍生物所激活, 在中介代谢调控中作为脂质传感器与靶基因特异性结合并开启相关转录过程^[22]。在低温胁迫后的肝脏转录组结果中, 差异基因富集到 PPAR 信号通路的物种有金头鲷^[5]、暗纹东方鲀^[8]、大黄鱼^[15]等, 在本研究中, PPAR 信号通路也在军曹鱼肝脏中被显著富集, 说明 PPAR 信号通路对多种鱼类应对低温具有关键调节作用。Tsai 等指出军曹鱼 *pparγ* 表达水平跟组织脂肪含量具有显著的正相关性^[23]。在本实验的前期研究中, 通过油红 O 染

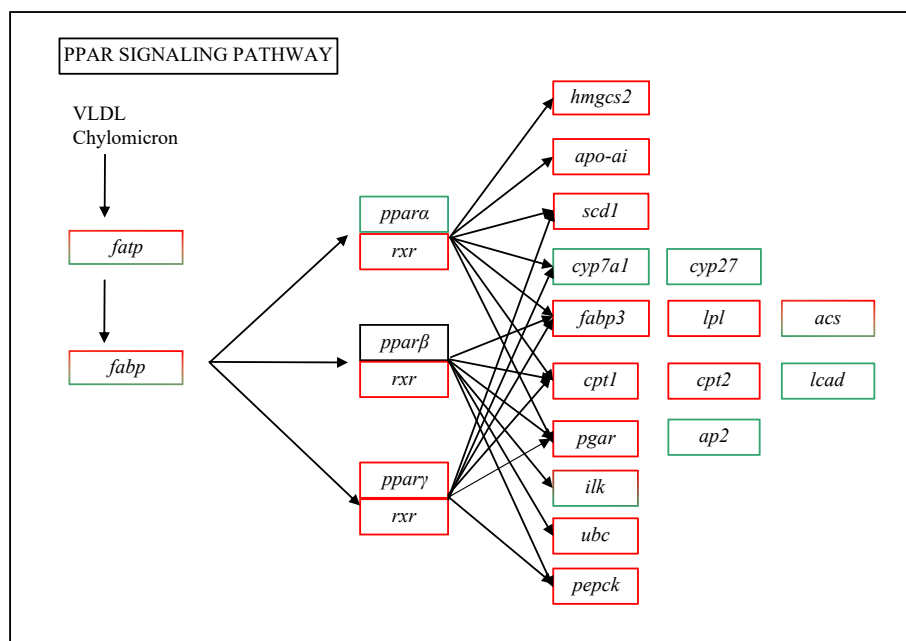


图 4 PPAR 信号通路

Fig. 4 PPAR signaling pathway

红色框线表示: 该框中的基因对比对照组, 表达上调; 绿色框线表示: 该框中的基因对比对照组, 表达下调; 红-绿框线表示: 该框中的基因对比对照组, 部分表达上调, 部分下调

The red box indicates that the genes in this box are up-regulated compared with the control group; the green box indicates that the genes in this box are down-regulated compared with the control group; the red-green box indicates that some genes in this box are up-regulated and some are down-regulated compared with the control group

表 5 糖代谢相关生物过程及通路的差异基因富集分析

Table 5 Differential gene enrichment analysis of glucose metabolism-related biological processes and pathways

数据库	功能/通路	基因数	编号
GO	单糖代谢过程	78	GO:0005996
	己糖代谢过程	71	GO:0019318
KEGG	糖酵解/糖异生	30	ko00010
	半乳糖代谢	15	ko00052
	淀粉和蔗糖代谢	16	ko00500
	戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化	17	ko00040

色切片观察发现低温胁迫下军曹鱼肝脏脂滴面积显著增加^[24], 这可能与肝脏 *pparγ* 显著上调有关。军曹鱼肝脏 *PPAR_α* 显著下调, 与对金头鲷的研究结果一致^[5], 但与大黄鱼和卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 等物种的研究结果相反^[15, 25], 说明 PPAR 信号通路在不同物种应对低温过程的调控模式具有差异性。

在 PPAR 信号通路下游基因中, *scd1* 受调控后显著上调, 而 *scd1* 高表达可增加细胞膜中不饱和脂肪酸的比例^[26], 这与前期发现军曹鱼肝脏脂肪酸不饱和度在低温下显著提高的研究结论相一致, 草鱼

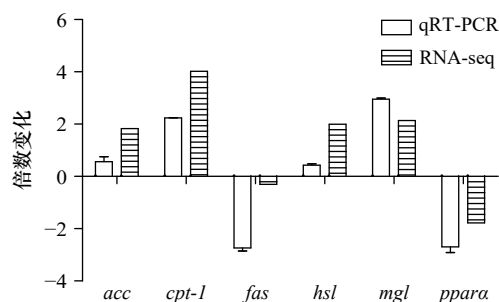


图 5 转录组结果验证

Fig. 5 Verification of transcriptome results

(*Ctenopharyngodon idellus*)^[27]、尼罗罗非鱼^[28]、大黄鱼^[29]等物种也发现在应对低温下 *scd1* 基因的表达显著上调, 表明提高 *scd1* 基因表达对多个物种应对低温胁迫具有关键作用。PPAR 信号通路下游基因 *cpt1* 和 *cpt2* 也显著上调, *cpt1* 和 *cpt2* 是脂酰肉碱转移系统的两个重要成员^[30], 也是脂肪酸 β 氧化过程中的关键酶, 说明低温胁迫下军曹鱼肝脏通过 PPAR 信号通路增强脂类合成代谢的同时也增强了脂类分解代谢。

4.2 糖代谢

葡萄糖是鱼体内供能的重要物质之一。在糖异生中, *g6pc* 基因在低温环境中表达显著上调。该基因编码的葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase) 可以

将肝脏中的葡糖-6-磷酸转化为葡萄糖, 此时暗示葡萄糖含量可能增加, 这一观点与 Melis 等研究一致^[31]。在持续的低温环境中, 肝脏葡萄糖含量会缓慢回升, 即血糖升高, 使军曹鱼提高了机体的御寒能力。

而在糖酵解提供能量的环节中, 基因 *ENO* 编码的烯醇化酶表达下调, 该酶可催化生成磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP)。磷酸烯醇式丙酮酸是一个高能磷酸分子, 通过丙酮酸激酶的催化作用, 它能够转化为丙酮酸, 并在此过程中生成大量的 ATP, 为细胞提供能量^[32], 同时它也是糖代谢进入三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA) 的关键物质。三羧酸循环是三大营养素 (糖、氨基酸和脂质) 的最终代谢途径, 是氧化供能最有效的途径^[33]。此时其含量降低, 即暗示着以糖代谢供能的途径被抑制。

参考文献:

- [1] 张宇航, 高扬, 李文红, 等. 低温停食和复温后投喂频率对奥尼罗非鱼幼鱼生长的影响[J]. 西南农业学报, 2020, 33(9): 2125–2131.
Zhang Yuhang, Gao Yang, Li Wenhong, et al. Effects of feeding frequency after food deprivation with low temperature and rewarming on growth of hybrid tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*)[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(9): 2125–2131.
- [2] Li A J, Leung P T Y, Bao V W W, et al. Temperature-dependent physiological and biochemical responses of the marine medaka *Oryzias melastigma* with consideration of both low and high thermal extremes[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2015, 54: 98–105.
- [3] He Jie, Qiang Jun, Yang Hong, et al. Changes in the fatty acid composition and regulation of antioxidant enzymes and physiology of juvenile genetically improved farmed tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), subjected to short-term low temperature stress[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2015, 53: 90–97.
- [4] Sun Zhenzhu, Tan Xiaohong, Liu Qingying, et al. Physiological, immune responses and liver lipid metabolism of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) under cold stress[J]. *Aquaculture*, 2019, 498: 545–555.
- [5] Mininni A N, Milan M, Ferrarasso S, et al. Liver transcriptome analysis in gilthead sea bream upon exposure to low temperature[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 765.
- [6] Gracey A Y, Fraser E J, Li Weizhong, et al. Coping with cold: an integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(48): 16970–16975.
- [7] Zhou Tao, Gui Lang, Liu Mingli, et al. Transcriptomic responses to low temperature stress in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 1145–1156.
- [8] 文鑫. 暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 应对低温胁迫的生理响应和分子机制研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2019.
Wen Xin. Physiological responses and molecular mechanisms of the pufferfish (*Takifugu fasciatus*) to low-temperature stress[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2019.
- [9] 王维政, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼抗氧化、免疫能力及能量代谢的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(5): 12–18.
Wang Weizheng, Zeng Zeqian, Huang Jiansheng, et al. Effects of hypoxia stress on antioxidation, immunity and energy metabolism of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(5): 12–18.
- [10] 刘生茂. 微量样本的高通量 RNASeq 方法研究和应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
Liu Shengmao. Research and application of high throughput RNASeq method for micro sample[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.
- [11] Tocher D R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2003, 11(2): 107–184.
- [12] 林超, 柳军, 孙宏斌. 脂质生物合成的转录调控、相关靶标确证及新药发现[J]. *中国科学: 化学*, 2015, 45(9): 923–936.
Lin Chao, Liu Jun, Sun Hongbin. Transcriptional regulation of lipid biosynthesis, related target validation and drug discovery[J]. *SCIENTIA SINICA Chimica*, 2015, 45(9): 923–936.
- [13] 高正松, 王保成, 徐松泉, 等. 磷脂的合成研究进展[J]. 广州化工, 2020, 48(19): 1–6.
Gao Zhengsong, Wang Baocheng, Xu Songquan, et al. Research progress on the synthesis of phospholipids[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2020, 48(19): 1–6.
- [14] Leather S R, Walters K F A, Bale J S. *The Ecology of Insect Overwintering*[M]. New York: Cambridge University Press, 1993.

5 结论

通过对转录组中的差异基因进行富集分析, 发现大量差异基因富集在能量代谢中。在脂代谢方面, 大量基因集中富集于脂代谢过程、脂质生物合成过程、甘油磷脂代谢过程、磷脂代谢过程和甘油酯代谢过程等生物过程中; PPAR 信号通路中 *ppara*、*pparβ*、*scd1*、*cpt1* 和 *cpt2* 等多个脂代谢相关基因对军曹鱼幼鱼应对低温胁迫具有关键作用。在糖代谢方面, 大量基因富集于糖酵解/糖异生、半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化等生物过程, 其中 *g6pc*、*eno* 等基因在军曹鱼幼鱼应对低温胁迫时发挥重要调节作用。

- [15] Qian Baoying, Xue Liangyi. Liver transcriptome sequencing and *de novo* annotation of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under heat and cold stress[J]. *Marine Genomics*, 2016, 25: 95–102.
- [16] Streck G. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(6): 635–652.
- [17] 李鑫, 杨蕊, 臧强, 等. 糖皮质激素的药理作用机制研究进展[J]. 国际药理学研究杂志, 2009, 36(1): 27–30.
Li Xin, Yang Rui, Zang Qiang, et al. Pharmacological actions of glucocorticoids: progress in mechanisms[J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2009, 36(1): 27–30.
- [18] Bernier N J, Van Der Kraak G, Farrell A P, et al. Fish Physiology[M]//Bernier N J, Van Der Kraak G, Farrell A P, et al. Fish Neuroendocrinology. Salt Lake City: Academic Press, 2009: 235–311.
- [19] Bernier N J, Peter R E. The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 129(2/3): 639–644.
- [20] 马瑶, 程海东. PPAR 基因多态性的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(9): 6–9.
Ma Yao, Cheng Haidong. Research advances in PPAR genetic polymorphisms[J]. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 2007, 15(9): 6–9.
- [21] 钱伦, 钱云霞, 童丽娟. 大黄鱼 PPAR β 全长 cDNA 的克隆和组织表达[J]. 生物学杂志, 2010, 27(6): 1–4.
Qian Lun, Qian Yunxia, Tong Lijuan. Cloning of full-length cDNA and RT-PCR expression analysis of PPAR β in *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Biology*, 2010, 27(6): 1–4.
- [22] 徐世文, 樱桃, 李术. PPAR- γ 功能的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(9): 1–6.
Xu Shiwen, Ying Tao, Li Shu. Advance on PPAR- γ function[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(9): 1–6.
- [23] Tsai M L, Chen H Y, Tseng M C, et al. Cloning of peroxisome proliferators activated receptors in the cobia (*Rachycentron canadum*) and their expression at different life-cycle stages under cage aquaculture[J]. *Gene*, 2008, 425(1-2): 69–78.
- [24] 蔡润佳, 张静, 黄建盛, 等. 低温胁迫对军曹鱼幼鱼脂代谢相关生理生化的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(3): 123–130.
Cai Runjia, Zhang Jing, Huang Jiansheng, et al. Effects of low temperature stress on physiology and biochemistry of lipid metabolism of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2021, 41(3): 123–130.
- [25] 方玲玲. 卵形鲳鲹 PPAR α 及 CPT1 基因的克隆及不同条件对其表达影响的分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2016.
Fang Lingling. Molecular cloning and expression under the different conditions of peroxisome proliferator activated receptors- α and carnitine palmitoyl transferase in *Trachinotus ovatus*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2016.
- [26] Zhang Haibo, Zhang Xiangfei, Wang Zhisheng, et al. Effects of dietary energy level on lipid metabolism-related gene expression in subcutaneous adipose tissue of Yellow breed \times Simmental cattle[J]. *Animal Science Journal*, 2015, 86(4): 392–400.
- [27] Hsieh S L, Kuo C M. Stearoyl-CoA desaturase expression and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during cold acclimation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 141(1): 95–101.
- [28] Zerai D B, Fitzsimmons K M, Collier R J. Transcriptional response of delta-9-desaturase gene to acute and chronic cold Stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 41(5): 800–806.
- [29] Xu Hao, Zhang Dongling, Yu Dahui, et al. Molecular cloning and expression analysis of scd1 gene from large yellow croaker *Larimichthys crocea* under cold stress[J]. *Gene*, 2015, 568(1): 100–108.
- [30] 萧培珍. 日粮中添加水飞蓟素对草鱼脂质代谢的影响及其机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
Xiao Peizhen. Effect of dietary silymarin on lipid metabolism of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017.
- [31] Melis R, Sanna R, Braca A, et al. Molecular details on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) sensitivity to low water temperatures from ^1H NMR metabolomics[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2017, 204: 129–136.
- [32] 李志艳, 张小燕, 唐海林, 等. M2 型丙酮酸激酶调控肿瘤细胞能量代谢的研究进展[J]. 广东医学, 2016, 37(18): 2829–2831.
Li Zhiyan, Zhang Xiaoyan, Tang Hailin, et al. Progress in the regulation of energy metabolism in tumor cells by M2-type pyruvate kinase[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2016, 37(18): 2829–2831.
- [33] Yang Erjun, Amenyo E, Zhang Jiandong, et al. Integrated transcriptomics and metabolomics analysis of the intestine of cobia (*Rachycentron canadum*) under hypoxia stress[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 25: 101261.

Transcriptome analysis of liver of juvenile *Rachycentron canadum* under low temperature stress

Tang Baogui^{1,2}, Cai Runjia¹, Zhang Jing^{1,2}

(1. Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: To investigate the effect of low temperature stress on juvenile cobia (*Rachycentron canadum*), the fish were reared under normal temperature [$(30.5 \pm 1.0)^\circ\text{C}$] and low temperature [$(20.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$] for 7 days, followed by genome-based transcriptome sequencing of their liver tissues. Each group included 3 biological replicates. The results showed that a total of approximately 243 694 134 raw reads were obtained from the 6 sequencing samples, with Q30 scores exceeding 94% for all samples and GC content ranging between 47.65% and 48.16%. A total of 4 362 differentially expressed genes (DEGs) were identified, including 2 793 up-regulated and 1 569 down-regulated genes. KEGG pathway enrichment analysis revealed that in lipid metabolism, a significant number of DEGs were enriched in biological processes such as lipid metabolism, lipid biosynthesis, glycerophospholipid metabolism, phospholipid metabolism and glycerideid metabolism. Key lipid metabolism-related genes, including *ppara*, *ppar β* , *scd1*, *cpt1*, and *cpt2* in the PPAR signaling pathway, played crucial roles in the response of juvenile cobia to low temperature stress. In glucose metabolism, numerous genes were enriched in pathways such as glycolysis/gluconeogenesis, galactose metabolism, starch and sucrose metabolism, and pentose and glucuronate interconversions. Among these, genes such as *g6pc* and *eno* were found to play important roles in the adaptation of juvenile cobia to low temperature stress.

Key words: low temperature stress; *Rachycentron canadum*; transcriptome; lipid metabolism; glucose metabolism