

DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2025.04.002

引用格式: 许星鸿, 席晨宵, 于航, 等. 海水酸化对矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃组织转录组的影响[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2025, 34(4): 7-18.

海水酸化对矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃组织转录组的影响

许星鸿¹, 席晨宵¹, 于航¹, 李百玉¹, 叶冠然¹, 万文杰²

(1. 江苏海洋大学 海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005;
2. 连云港赣榆正大水产苗种有限公司, 江苏 连云港 222000)

摘要: 海水酸化是由于海水吸收空气中的二氧化碳形成碳酸, 使海水酸度上升, 可对海洋生物的生长和繁殖产生一定影响。随着工农业的发展, 海水酸化现象日趋明显。为探究海水酸化对矛尾复鰕虎鱼(*Synechogobius hasta*) 幼鱼鳃基因转录表达的影响, 以体质量为(9.0±0.5) g的矛尾复鰕虎鱼为研究对象, 设置pH 8.0为对照组, pH 7.5和pH 7.0为试验组。酸化处理14 d后, 采用高通量测序技术对对照组和试验组的矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃组织进行转录组测序和分析。结果表明, pH 7.0组筛选到570个差异表达基因, 其中339个基因表达上调, 231个基因表达下调; pH 7.5组筛选到888个差异表达基因, 其中556个基因表达上调, 332个基因表达下调。KEGG通路富集分析结果显示, 与免疫相关的信号通路主要有细胞粘附分子、MAPK信号通路和IgA产生的肠道免疫网络等; 与代谢相关的信号通路主要有氨基酸生物合成、类固醇生物合成和氮代谢等。酸化海水促进了热休克蛋白70(HSP70)、主要组织相容性复合体I类(MHC-I)和细胞色素P450亚酶1A1(CYP1A1)等免疫相关基因的表达。在海水酸化条件下, 磷酸甘油酸变位酶(PGAM)、核苷二磷酸激酶(NDPK)和P型钙离子转运蛋白2A型(ATP2A)等基因表达上调, 而肌醇-1-磷酸合酶(MIPSI)、羟甲基戊二酰辅酶a合酶(HMGCS)和酪氨酸氨基转移酶(TAT)等基因表达下调。海水酸化对矛尾复鰕虎鱼鳃的免疫和代谢产生一定影响, 可为研究矛尾复鰕虎鱼幼鱼对酸化水体的响应机制提供参考。

关键词: 海水酸化; 矛尾复鰕虎鱼; 幼鱼; 鳃; 转录组

中图分类号: S947.9 文献标志码: A 文章编号: 2096-8248(2025)04-0007-12

Effects of seawater acidification on the transcriptome of gill tissues of juvenile *Synechogobius hasta*

XU Xinghong¹, XI Chenxiao¹, YU Hang¹, LI Baiyu¹, YE Guanran¹, WAN Wenjie²

(1. School of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2. Lianyungang Ganyu Zhengda Aquatic Seedlings Co., Ltd., Lianyungang 222000, China)

Abstract: Seawater acidification is caused by seawater absorbing carbon dioxide in the air to form carbonic acid, which makes the acidity of seawater rise, which can have a certain impact on the growth and reproduction of marine life. With the development of industry and agriculture, seawater acidification is becoming more and more obvious. In order to explore the effect of seawater acidification on the transcription and expression of gill genes of *Synechogobius hasta*, the *S. hasta* with a body weight of (9.0±0.5) g was taken as the research object, with pH 8.0 as the control group and pH 7.5 and 7.0 as the experimental groups.

收稿日期: 2025-04-09; 修订日期: 2025-06-21

基金项目: 江苏省科技厅苏北科技专项(SZ-LYG202124, LYG-SZ201814); 连云港市花果山英才计划(KK20100)

作者简介: 许星鸿, 教授, 博士, 研究方向为海洋生物资源与环境, (E-mail) xhxu119@163.com.

After 14 days of acidification, high-throughput sequencing technique (RNA-Seq) was used to sequence and analyze the transcriptome of the gill tissue of the control group and the experimental group. The results showed that the number of differentially expressed genes was 570 in pH 7.0 group, of which 339 genes were up-regulated and 231 genes were down-regulated. The number of differentially expressed genes screened in pH 7.5 group was 888, of which 556 genes were up-regulated and 332 genes were down-regulated. The enrichment analysis of KEGG pathway showed that the signal pathways related to immunity mainly included cell adhesion molecules, MAPK signal pathway and intestinal immune network produced by IgA. The signal pathways related to metabolism mainly included amino acid biosynthesis, steroid biosynthesis and nitrogen metabolism. Acidified seawater promoted the expression of immune-related genes such as Heat shock protein 70 (*HSP70*), Major histocompatibility complex I (*MHC-I*) and Cytochrome P450 subunit 1A1 (*CYP1A1*), suggesting that these genes may be involved in the immune response of the body. Under the condition of seawater acidification, the expressions of Phosphoglycerate mutase (*PGAM*), Nucleoside diphosphate kinase (*NDPK*) and P-type Ca^{2+} transporter 2A (*ATP2A*) were up-regulated, while the expressions of Myo-inositol-1-phosphate synthase (*MIPSI*), Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (*HMGCS*) and Tyrosine aminotransferase (*TAT*) were down-regulated. Seawater acidification has a certain effect on the immunity and metabolism of the gill of the pike-tailed tiger fish, which provides a reference for studying the response mechanism of the young pike-tailed tiger fish to acidified water.

Key words: seawater acidification; *Synechogobius hasta*; juvenile; gill; transcriptome

海水 pH 是影响海洋生物生存、发育和繁殖的重要环境因素之一^[1-2]。从工业革命开始,海水 pH 降低即海洋酸化现象日趋显著^[3]。在酸性水环境下,鱼类会表现出一些异常的行为,从而导致摄食效率以及生长速率的降低^[4-5]。

矛尾复鰕虎鱼 (*Synechogobius hasta*) 隶属于鲈形目 (Perciformes)、鰕虎鱼科 (Gobiidae)、复鰕虎鱼属 (*Synechogobius*), 俗称沙光鱼、虾虎鱼。其广泛分布于我国黄渤海、东海以及朝鲜、日本等地的沿海区域,为鰕虎鱼科中个体较大的种类^[6]。其口味鲜美且肉质细嫩、肌间刺少,有“十月沙光赛羊汤”的美称,具有较高的经济价值^[7]。目前关于矛尾复鰕虎鱼的研究多集中于生殖^[8]、病原菌感染^[9]和金属离子胁迫^[10]等方面,而有关海水酸化对矛尾复鰕虎鱼鳃组织转录组的影响迄今尚未见报道。

高通量测序技术 (RNA sequencing, RNA-Seq) 能够准确获取特定组织在某一状态下转录组基因的全面信息,是目前研究各种因子对生物转录组影响的有效方法^[11]。黄昇^[12]对酸化海水引起中华乌塘鳢 (*Bostrychus sinensis*) 皮肤溃烂病进行了转录组分析,发现无菌酸化海水对中华乌塘鳢体内细胞骨架类基因的表达有一定抑制作用,但是会促进免疫相关因子的表达。Wang 等^[13]研究了海洋酸化对亚洲鲈

鱼 (*Lates calcarifer*) 幼鱼转录组的影响,结果表明亚洲鲈鱼幼鱼的生长和行为未出现明显变化,但海洋酸化对其神经系统产生了不利影响。本研究利用 RNA-Seq 测序技术对不同 pH 下的矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃组织进行转录组测序,分析海水酸化对矛尾复鰕虎鱼幼鱼生长情况的影响,以期为深入探究海水酸化对水产养殖鱼类的影响机制提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用的矛尾复鰕虎鱼幼鱼采集于连云港赣榆正大水产苗种有限公司。选取健康、活力较好的个体作为试验对象,体质量 (9.0 ± 0.5) g,体长 (6.0 ± 0.5) cm。用 $41 \text{ cm} \times 28.5 \text{ cm} \times 22 \text{ cm}$ 的养殖箱暂养 7 d,每个养殖箱 12 L 海水、20 尾幼鱼,暂养条件为:水温 (18 ± 2) °C,盐度 25 ± 1 ,pH 8.0 ± 0.1 ,水体进行充分曝气,按体质量的 0.5% 每天投喂 2 次颗粒饲料,换水 1/2 体积。

1.2 试验方法

以 pH 8.0 为对照组,试验组 pH 分别设置为 7.0 和 7.5,每组 3 个重复。试验鱼养殖水体 pH 在 12 h 内由 8.0 逐渐降至 7.5 和 7.0。各组盐度均为 25,水温为 22 °C,配制 0.1 mol/L 的盐酸 (HCl) 和 0.1 mol/L 的氢氧化钠 (NaOH) 调节水体 pH,使用 pH 计 (S20,

梅特勒托利多仪器有限公司)测定海水 pH。分别在上述规格的 9 个养殖箱中进行试验,养殖密度均为 1 尾/L。每组各放入 9 尾活力较好、个体差异较小的幼鱼,体质量(9.5±0.5)g,体长(6.5±0.5)cm,试验时间 14 d。试验期间养殖方法同暂养,换水后调节各组 pH。试验结束后每组随机选取 3 尾幼鱼,取其鳃组织置于液氮中速冻,-80 °C 保存备用。

1.3 转录组测序与组装

采用 Trizol 法提取矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃组织的总 RNA。RNA 质量和纯度分别使用 Bioanalyzer 2100 和 Agilent 2100 进行分析。由北京百迈客生物科技有限公司进行测序,采用 Illumina HiSeq 高通量测序平台构建 cDNA 文库。对测序所得原始数据进行质控,筛选掉接头序列及短序列后,用 Trinity 软件进行组装,获得矛尾复鰕虎鱼幼鱼的单基因序列(Unigene)库^[14]。

1.4 差异表达基因分析及富集分析

采用 DESeq2 进行样品组间的差异表达基因

(differently expressed genes, DEGs)分析,筛选条件为 |Fold Change|≥2 且 FDR<0.01,对筛选出的 DEGs 进行 GO 富集分析、COG 分类和 KEGG 通路富集分析。

1.5 qRT-PCR 验证

随机挑选 4 个上调表达基因和 4 个下调表达基因,共 8 个 DEGs 进行验证。量化实时聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)又称实时荧光定量 PCR 或定量 PCR,反应体系总体积 20 μL,包含 SYBR Premix Ex Taq 10 μL、Rox Reference Dye (50×) 0.4 μL、cDNA 模板 2 μL、正反向特异性引物(20 μmol/L)各 0.8 μL 及 ddH₂O 6 μL。引物使用 Primer Premier 6.0 设计,将 *β-actin* 作为内参基因。反应程序为:95 °C 预变性 1 min,94 °C 10 s,60 °C 30 s,共 40 个循环;溶解曲线分析:95 °C 15 s,60 °C 1 min。实验重复 3 次,结果运用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算,通过 GraphPad Prism 9.5 进行数据统计分析,所用引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences used in qRT-PCR

基因	引物序列(5'~3')	表达趋势
内参基因(<i>β-actin</i>)	F: GTGCGTGACATCAAGGAGAAG R: GGACATCTAAGGGCATCACA	—
磷酸甘油酸变位(Phosphoglycerate mutase, <i>PGAM</i>)	F: TCATCGTTCCAGAAGGGCAGGG R: ATCAGCAAGGAGCGGCGGTA	上调
核苷二磷酸激酶(Nucleoside diphosphate kinase, <i>NDPK</i>)	F: CCGCAGCTCGTCTTCAAGT R: ATCTCGCCGCACAGTCCTCT	上调
肌醇-1-磷酸合酶(Myoinositol-1-phosphate synthase, <i>MIPSI</i>)	F: TGCCTGAAGAATGCGTTGACCA R: AGCGTGTGAGTGTGCGTGTG	下调
热休克蛋白 70(Heat shock protein 70, <i>HSP70</i>)	F: GCTGCGAGTCGTTGAAGTAGG R: GGCGAGACCAAGGCGTTCTA	上调
细胞色素 b5 还原酶(Cytochrome-b5 reductase, <i>CYB5R</i>)	F: ATAGCCGCCTCATCCACAAG R: AATGGACGCCAATGACACAGC	下调
乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase, <i>LDH</i>)	F: GGAGACTCTAGTGTGCCTGTGT R: CCTGTTTGTGAACCGCTTCCA	上调
酪氨酸氨基转移酶(Tyrosine aminotransferase, <i>TAT</i>)	F: TCTGAGGCGTGTGTTGAGGAT R: TGGATGGCGGTTGGGATGGAT	下调
羟甲基戊二酰辅酶 a 合酶(Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, <i>HMGCS</i>)	F: GCCACCATAGCACGCATTAGTT R: TGGAGGTTGGGACAGAGACGAT	下调

2 结果

2.1 转录组测序与组装

完成 9 个样品的转录组测序,去除掉低质量

和含有接头的数据后,共获得 68.7 GB 高质量数据。各样品数据均达到 6.96 GB,样品 GC 含量为 42.93%~45.91%,Q30 碱基百分比在 93.40% 及以上(见表 2)。

表 2 样品测序数据评估统计
Table 2 Evaluation statistics of sample sequencing data

组别	读数	总碱基数	GC 含量/%	Q30/%
pH 7.0 组	24 448 426±1 155 914	7 308 104 060±343 443 096	44.895±1.015	93.865±0.465
pH 7.5 组	25 918 208±292 898.5	7 749 864 733±85 423 217.5	44.220±1.220	94.050±0.340
pH 8.0 组	26 133 548±1 835 888	7 812 859 409±546 309 209.5	44.205±1.275	94.015±0.145

注:Q30 是指 Clean data 质量值≥30 的碱基所占的百分比。

2.2 差异表达基因分析

2.2.1 差异表达基因筛选

如图1所示,将矛尾复鰕虎鱼幼鱼试验组的鳃组织转录组文库与对照组进行比较分析。如图1a所示, pH 7.0组和pH 8.0组对比得到339个上调表达基因和231个下调表达基因,共570个DEGs。其中有449个DEGs得到注释,包括COG 126个,GO 396个,KEGG 402个。如图1b所示, pH 7.5组和pH 8.0组对比结果得到556个上调表达基因和332个下调表达基因,共888个DEGs。其中有861个DEGs得到注释,包括COG 182个,GO 765个,KEGG 779个。

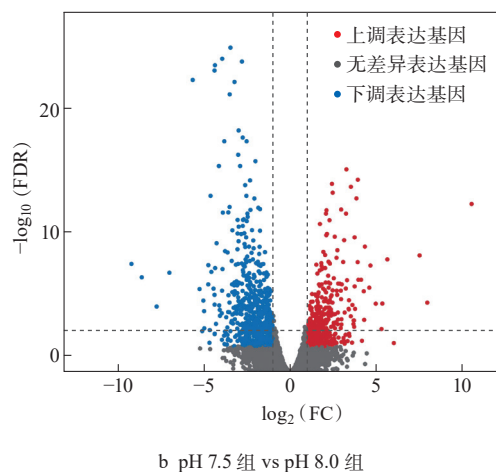
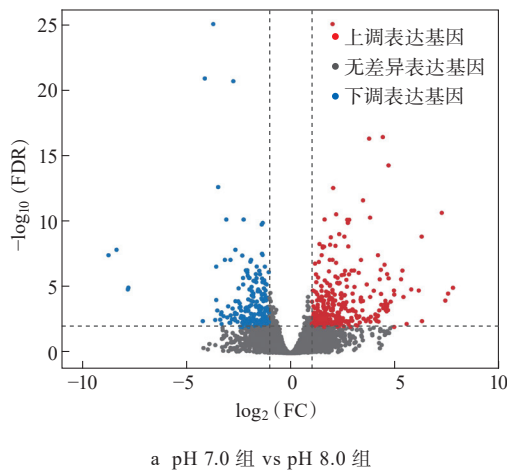


图1 差异表达基因火山图

Fig. 1 Volcanic diagram of differentially expressed genes

2.2.2 差异表达基因GO分类

将基因注释结果在GO数据库的1级分类水平上对DEGs进行分类统计,结果表明GO分类显著富集于生物学功能、分子功能和细胞组分。pH 7.0组中共有396个DEGs被归类到2级功能分类中,其

中生物学功能主要富集在细胞过程(276)、生物调节(209)、代谢过程(183)以及应激反应(156);在分子功能中主要富集在结合(265)、催化活性(164)、转运活性(33)以及分子功能调节剂(33);在细胞组分中主要富集在细胞解剖实体(323)、细胞内(218)以及含蛋白质的复合物(63)等功能(见表3)。

表3 pH 7.0组与对照组鱼体差异表达基因GO分类
Table 3 GO classification of differentially expressed genes in fish between pH 7.0 group and control group

1级分类	2级分类	注释基因总数	差异基因数	登录号
生物学功能	细胞过程	16 667	276	GO: 0009987
	生物调节	11 197	209	GO: 0065007
	代谢过程	10 828	183	GO: 0008152
	应激反应	6 761	156	GO: 0050896
分子功能	结合	15 060	265	GO: 0005488
	催化活性	8 270	164	GO: 0050896
	转运蛋白活性	1 335	33	GO: 0005215
	分子功能调节剂	1 656	33	GO: 0098772
细胞组分	细胞解剖实体	17 660	323	—
	细胞内	14 032	218	GO: 0005622
	含蛋白质的复合物	5 684	63	GO: 0032991

注:“—”表示基因在该数据库无注释。

在pH 7.5组中共有765个DEGs被归类到2级功能分类中,其中生物学功能主要富集在细胞过程(547)、生物调节(457)、代谢过程(329)以及应激反应(313);在分子功能中主要富集在结合(502)、催化活性(275)、分子功能调节剂(69)以及分子传感器活性(66);在细胞组分中主要富集在细胞解剖实体(617)、细胞内(404)以及含蛋白质的复合物(112)等功能(见表4)。

表4 pH 7.5组与对照组鱼体差异表达基因GO分类
Table 4 GO classification of differentially expressed genes in fish between pH 7.5 group and control group

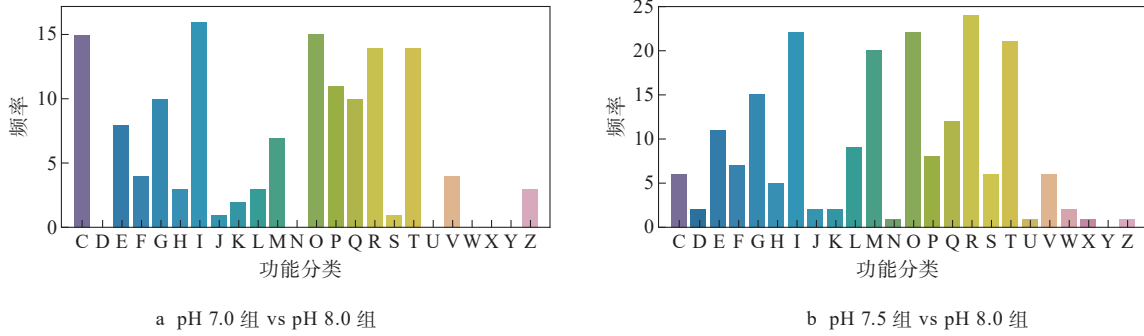
1级分类	2级分类	注释基因总数	差异基因数	登录号
生物学功能	细胞过程	16 667	547	GO: 0009987
	生物调节	11 197	457	GO: 0065007
	代谢过程	10 828	329	GO: 0008152
	应激反应	6 761	313	GO: 0050896
分子功能	结合	15 060	502	GO: 0005488
	催化活性	8 270	275	GO: 0003824
	分子功能调节剂	1 656	69	GO: 0098772
	分子传感器活性	884	66	GO: 0060089
细胞组分	细胞解剖实体	17 660	617	—
	细胞内	14 032	404	GO: 0005622
	含蛋白质的复合物	5 684	112	GO: 0032991

2.2.3 差异表达基因COG分类

利用COG数据库将矛尾复鰕虎鱼幼鱼的pH 7.0组、pH 7.5组分别和pH 8.0组的DEGs进行直

系同源分类 (见图 2)。在 pH 7.0 组和 pH 8.0 组的对比中共获得 126 个注释信息, 其中富集基因数量较多的功能有: 脂质运输和代谢 (16), 翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣蛋白 (15), 能源生产和转换 (15) 以及信号传导机制 (14) (见图 2a)。在 pH 7.5 组和 pH

8.0 组的对比中共获得 206 个注释信息, 其中富集基因数量较多的功能有: 仅限一般功能预测 (24), 翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣蛋白 (22), 脂类运输和代谢 (22), 信号传导机制 (14) 以及细胞壁 / 膜 / 外被生物合成 (20) (见图 2b)。



注: C—能源生产和转换, D—细胞周期调控、细胞分裂、染色体分离, E—氨基酸运输和代谢, F—核酸运输和代谢, G—碳水化合物运输和代谢, H—辅酶转运和代谢, I—脂类转运和代谢, J—翻译、核糖体结构和生物合成, K—转录, L—复制、重组和修复, M—细胞壁 / 膜 / 外被生物合成, N—细胞运动, O—翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣蛋白, P—无机离子转运和代谢, Q—次级代谢物的合成、转运和分解, R—仅限一般功能预测, S—未知功能, T—信号传导机制, U—胞内运输、分泌和膜泡转运, V—防御机制, W—细胞外结构, X—移动: 前吞噬体、转座子, Y—核结构, Z—细胞骨架。

图 2 差异表达基因 COG 功能分类
Fig. 2 COG functional classification of differentially expressed genes

2.2.4 差异表达基因 KEGG 富集分析

为了明确 DEGs 的生物学功能, 选取富集显著的 20 个信号通路进行 KEGG 富集分析。在 pH 7.0 组和 pH 8.0 组的对比中, 共有 214 个 DEGs 注释到 182 个代谢通路中。其中富集到细胞粘附分子信号通路中的差异表达基因数量最多为 17 个, 其次是细胞因子 - 细胞因子受体相互作用 (14)、氨基酸生物

合成 (11)、糖酵解 / 糖异生 (10)、PPAR 信号通路 (8) 和类固醇生物合成 (8) 等信号通路。上调表达基因主要富集于细胞粘附分子、热生成以及 D- 精氨酸和 D- 鸟氨酸代谢等信号通路; 下调表达基因主要富集于氨基酸的生物合成、类固醇生物合成、细胞因子 - 细胞因子受体相互作用以及糖酵解 / 糖异生等信号通路 (见图 3)。

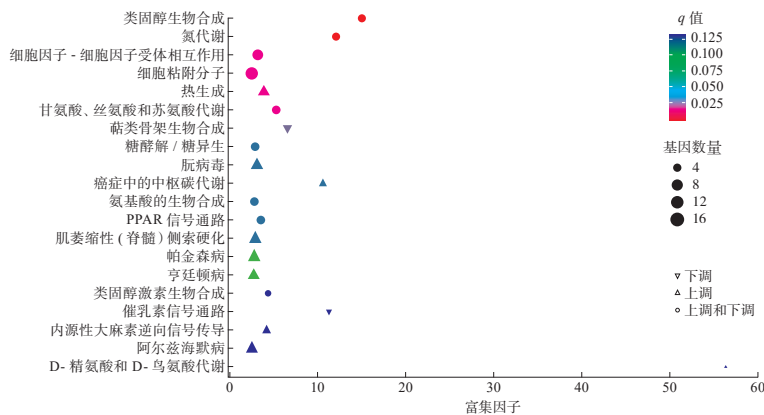


图 3 pH 7.0 组与对照组鱼体差异表达基因 KEGG 通路富集分析
Fig. 3 Enrichment analysis of KEGG pathway of differentially expressed genes in fish between pH 7.0 group and control group

在 pH 7.5 组和 pH 8.0 组的对比中, 共有 393 个 DEGs 注释到 164 个代谢通路中。其中富集到细胞粘附分子信号通路中的差异表达基因数量最多为 31

个, 其次是细胞因子 - 细胞因子受体相互作用 (31)、MAPK 信号通路 (25)、C 型凝集素受体信号通路 (13)、类固醇生物合成 (12)、IgA 产生的肠道免疫

网络(12)及 ErbB 信号通路(10)等信号通路。上调表达基因主要富集在细胞粘附分子、IgA 产生的肠道免疫网络以及细胞因子-细胞因子受体相互作用等

信号通路;下调表达基因主要富集在类固醇生物合成、MAPK 信号通路以及萜类骨架生物合成等信号通路(见图4)。

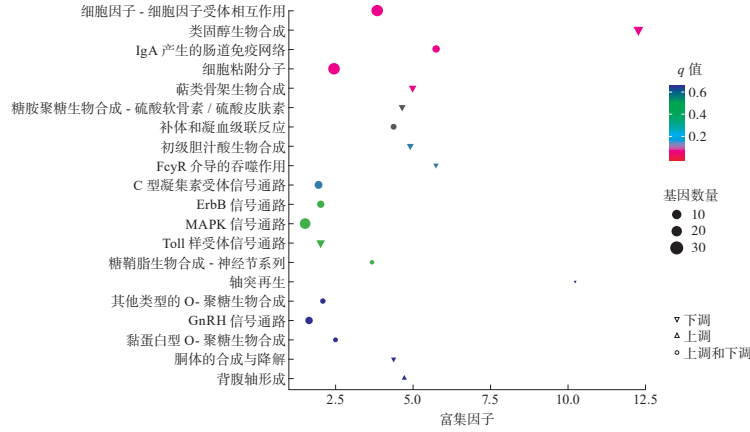
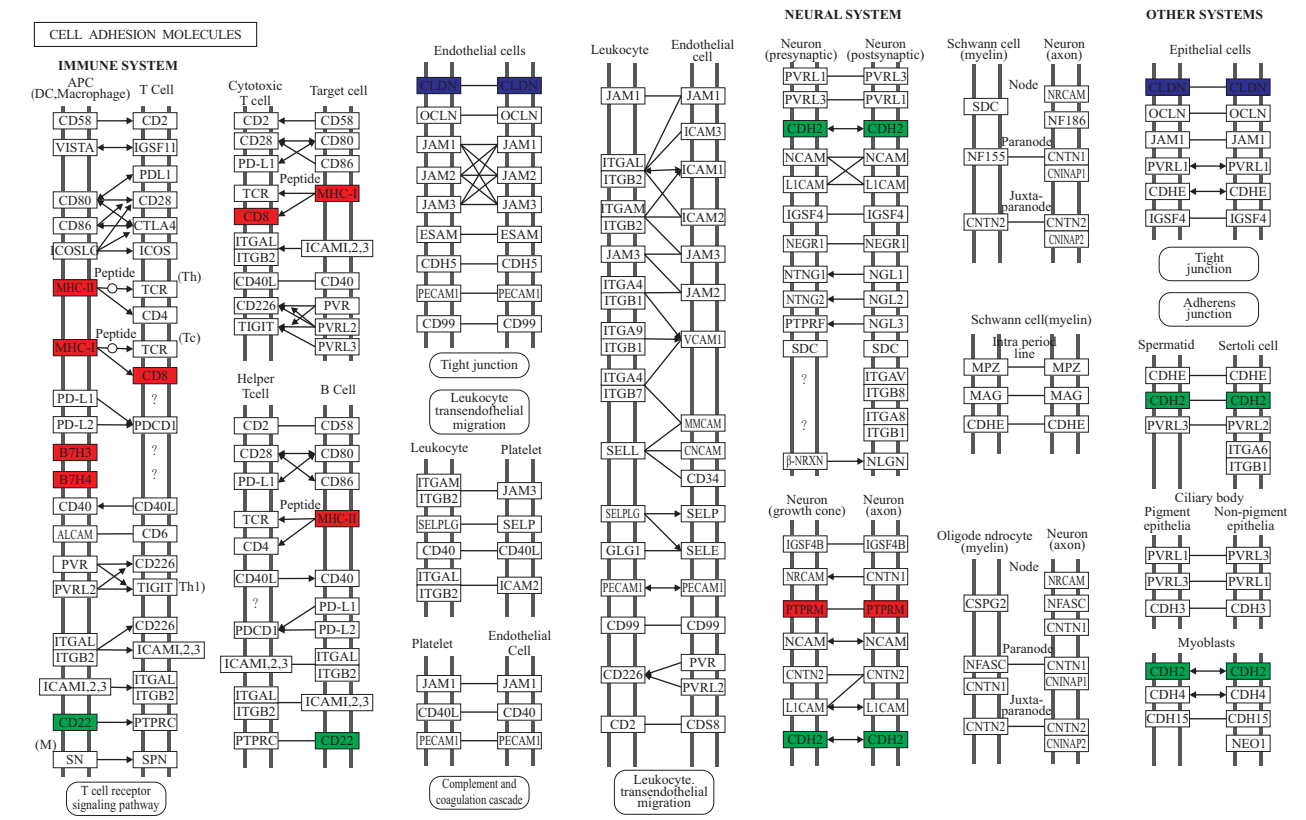


图4 pH 7.5 组与对照组鱼体差异表达基因 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of KEGG pathway of differentially expressed genes in fish between pH 7.5 group and control group

根据显著富集的 20 个 KEGG 信号通路显示,海水酸化对矛尾复鰕虎鱼幼鱼影响较大的免疫相关通路主要有细胞粘附分子、MAPK 信号通路以及 ErbB 信号通路等;代谢相关的通路主要有氨基酸生

物合成、类固醇生物合成以及糖酵解/糖异生等,其中氨基酸生物合成通路的富集因子最为突出。细胞粘附分子通路分析结果见图5。



04514 4/10/20 (c) Kanehisa Laboratories

注:红色代表基因表达上调,绿色代表基因表达下调,蓝色代表两种均有。

图5 细胞粘附分子通路分析

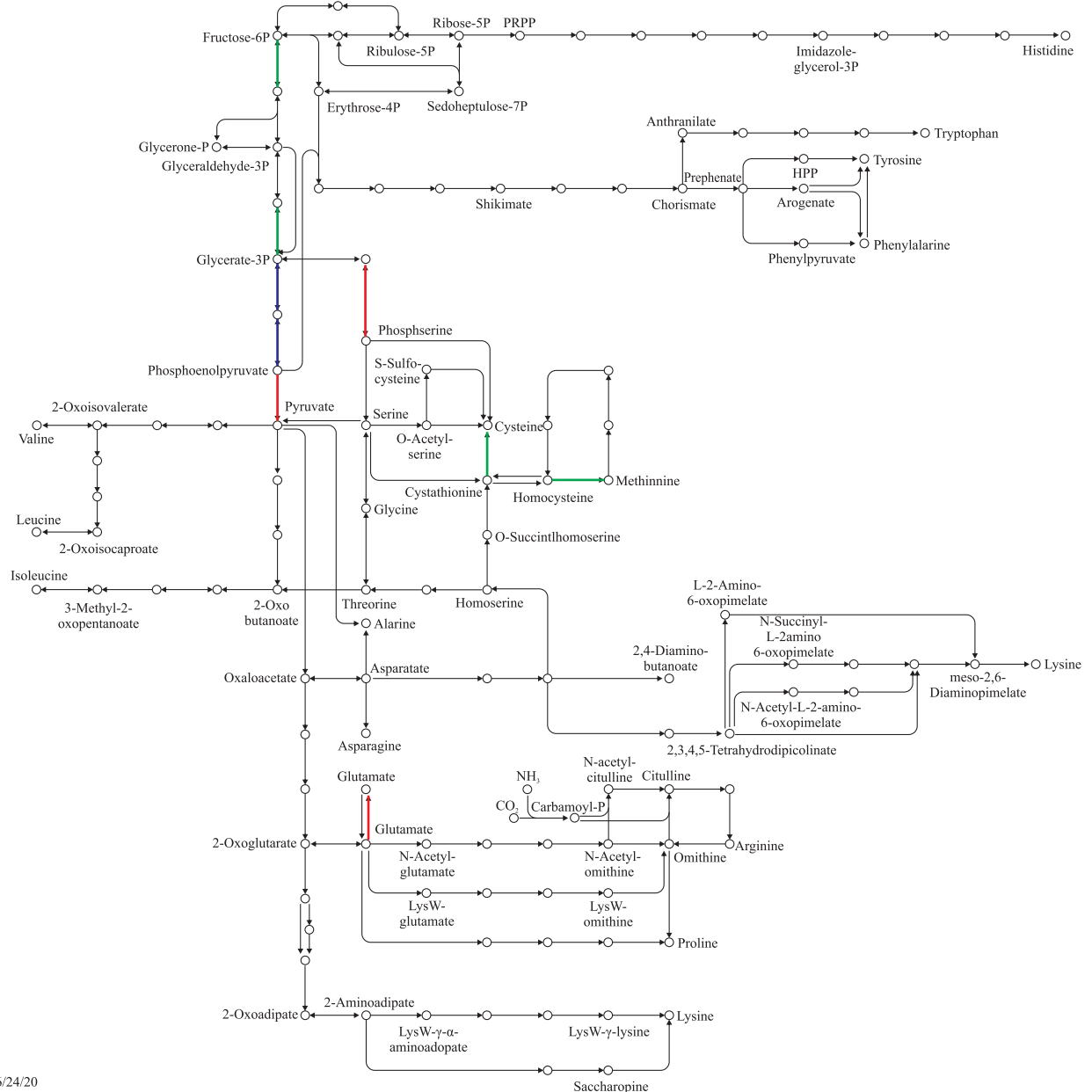
Fig. 5 Analysis of cell adhesion molecular pathway

海水酸化可引起矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃主要组织相容性复合体 I 类 (Major histocompatibility complex I, *MHC-I*)、主要组织相容性复合体 II 类 (Major histocompatibility complex II, *MHC-II*)、M 型蛋白酪氨酸磷酸酶受体 (Protein tyrosine phosphatase receptor type M, *PTPRM*) 和白细胞分化抗原 8 (Cluster of

differentiation 8, *CD8*) 等基因表达显著上调; 细胞分化抗原 22 (Cluster of differentiation 22, *CD22*)、神经钙黏蛋白 (Neural-cadherin/cadherin-2, *CDH2*) 和细胞分化抗原 34 (Cluster of differentiation 34, *CD34*) 等基因表达显著下调。

氨基酸生物合成通路分析结果见图 6。

BIOSYNTHESIS OF AMINO ACIDS



01230 6/24/20
(c)Kanehisa Laboratories

注: 红色代表基因表达上调, 绿色代表基因表达下调, 蓝色代表两种均有。

图 6 氨基酸生物合成通路分析
Fig. 6 Analysis of amino acid biosynthesis pathway

pH 降低引起矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃的磷酸丝氨酸氨基转移酶 (Phosphoserine aminotransferase,

PSAT)、谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, *GS*) 和丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, *PK*) 等基因表达显

著上调。6-磷酸果糖激酶1(6-phosphofructokinase 1, *PFK-1*)、胱硫醚 γ -裂解酶(Cystathionine gamma-lyase, *CSE*)、磷酸甘油酸激酶(Phosphoglycerate kinase, *PGK*)和5-甲基四氢叶酸-高半胱氨酸甲基转移酶(5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase, *MTR*)等基因表达显著下调。

海水酸化条件下, 矛尾复鰕虎鱼幼鱼主要 DEGs 筛选结果见表 5。表达上调的 DEGs 主要有磷酸甘油酸变位酶(Phosphoglycerate mutase, *PGAM*)、核苷二磷酸激酶(Nucleoside diphosphate kinase,

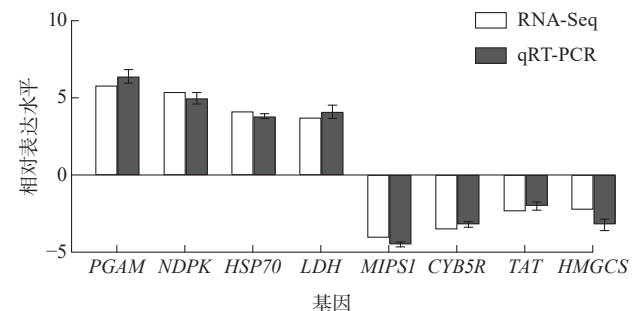
NDPK)、P型钙离子转运蛋白2A型(P-type Ca^{2+} transporter type 2A, *ATP2A*)、热休克蛋白70(Heat shock protein 70, *HSP70*)和乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, *LDH*)等基因; 表达下调的 DEGs 主要有肌醇-1-磷酸合酶(Myoinositol-1-phosphate synthase, *MIPS1*)、细胞色素b5还原酶(Cytochrome b5 reductase, *CYB5R*)、酪氨酸氨基转移酶(Tyrosine aminotransferase, *TAT*)和羟甲基戊二酰辅酶a合酶(Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, *HMGCS*)等基因。

表 5 海水酸化下矛尾复鰕虎鱼幼鱼的主要 DEGs
Table 5 Main DEGs of young *Synechogobius hasta* under seawater acidification

基因编号	基因名称	COG 分类注释	KOG 分类注释	差异倍数对数值
TRINITY_DN363_c0_g1	磷酸甘油酸变位酶(<i>PGAM</i>)	碳水化合物的运输和代谢	碳水化合物的运输和代谢	+5.80
TRINITY_DN117_c0_g2	核苷二磷酸激酶(<i>NDPK</i>)	核苷酸转运和代谢	核苷酸转运和代谢	+5.38
TRINITY_DN9478_c0_g1	P型钙离子转运蛋白2A型(<i>ATP2A</i>)	无机离子转运和代谢	无机离子转运和代谢	+4.69
TRINITY_DN4262_c0_g4	烯醇化酶(<i>ENO</i>)	碳水化合物的运输和代谢	碳水化合物的运输和代谢	+4.46
TRINITY_DN54904_c2_g1	磷脂酶D(<i>PLD1/2</i>)	—	细胞周期控制、细胞分裂、染色体分割	+4.21
TRINITY_DN6074_c0_g1	热休克蛋白70(<i>HSP70</i>)	翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣蛋白	翻译后修饰、蛋白质周转和伴侣蛋白	+4.14
TRINITY_DN286_c0_g2	乳酸脱氢酶(<i>LDH</i>)	能源生产和转换	能源生产和转换	+3.74
TRINITY_DN22073_c0_g1	细胞色素P450亚酶1A1(<i>CYP1A1</i>)	次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢; 防御机制	次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢	+3.40
TRINITY_DN3894_c0_g2	肌醇-1-磷酸合酶(<i>MIPS1</i>)	脂质运输和代谢	脂质运输和代谢	-4.09
TRINITY_DN6546_c0_g2	细胞色素b5还原酶(<i>CYB5R</i>)	—	辅酶转运和代谢; 能源生产和转换	-3.55
TRINITY_DN6793_c3_g1	δ^7 -甾醇5-去饱和酶(<i>ERG3</i>)	脂质运输和代谢	脂质运输和代谢	-2.41
TRINITY_DN5260_c0_g1	酪氨酸氨基转移酶(<i>TAT</i>)	氨基酸运输和代谢	氨基酸运输和代谢	-2.37
TRINITY_DN6264_c0_g1	法呢基二磷酸合酶(<i>FDPS</i>)	辅酶转运和代谢	辅酶转运和代谢	-2.30
TRINITY_DN12380_c0_g1	羟甲基戊二酰辅酶a合酶(<i>HMGCS</i>)	脂质运输和代谢	脂质运输和代谢	-2.26

2.3 差异表达基因 qRT-PCR 验证结果

为验证海水酸化下矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃组织转录组测序结果的准确性, 排除测序技术可能存在的系统性误差, 以广泛使用的 β -actin 作为内参, 对随机选择的 8 个 DEGs 进行 qRT-PCR 验证, 8 个 DEGs 包括 pH 7.0 组的 *PGAM*, *NDPK*, *MIPS1*, *CYB5R* 以及 pH 7.5 组的 *HSP70*, *LDH*, *TAT*, *HMGCS*。实验结果表明, 基因表达水平测定的上调与下调结果与高通量测序所得结果趋势一致, 表明转录组测序结果准确(见图 7)。



注: 红色代表基因表达上调, 绿色代表基因表达下调, 蓝色代表两种都有。

图 7 差异表达基因 qRT-PCR 验证

Fig. 7 qRT-PCR verification of differentially expressed genes

3 讨论

3.1 海水酸化对矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃组织转录组的影响

GO 功能分类结果显示在海水酸化条件下, 矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃组织中的 DEGs 显著富集于细胞过程、生物调节、代谢过程以及应激反应等功能; COG 功能分类显示 DEGs 富集在脂质运输和代谢、能源生产和转换、信号传导机制以及翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣蛋白等方面。这些功能与生物自身免疫、调节、代谢等方面密切相关, 表明酸化海水可使矛尾复鰕虎鱼幼鱼的免疫功能和物质代谢、运输等功能受到较大影响, 从而促使其免疫调节因子参与到机体的免疫应答过程; 与代谢相关的基因表达变化导致脂质、氨基酸和碳水化合物等物质的代谢均受到一定程度影响。

曾蛟^[15]对水体酸化后的大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 幼鱼的肝脏组织进行了转录组分析, 共筛选出 828 个差异表达基因, 包括 450 个上调表达基因和 378 个下调表达基因。Lee 等^[16]报道在酸化条件 (pH 7.6) 下, 在南极大理石花纹岩鳉鱼 (*Notothenia rossii*) 的头肾组织中筛选出 75 个差异表达基因, 包括 39 个上调表达基因和 36 个下调表达基因。Horng 等^[17]从酸化水体 (pH 5) 下的斑马鱼胚胎中筛选出 114 个差异表达基因, 包括 74 个上调表达基因和 40 个下调表达基因。本试验在矛尾复鰕虎鱼幼鱼 pH 7.0 组中, 共筛选到 570 个差异表达基因。其中, 339 个上调表达基因, 231 个下调表达基因; 在 pH 7.5 组中, 共筛选出 888 个差异表达基因。其中, 556 个上调表达基因, 332 个下调表达基因。其中多数的 DEGs 与免疫防御功能以及物质代谢有关, 主要涉及环境变化引起的应激反应, 包括 *HSP70* 和 *CYP1A1* 等免疫相关基因的表达上调, 以及 *MIPSI*, *HMGCS* 和 *TAT* 等代谢相关基因的表达下调。

3.2 海水酸化对矛尾复鰕虎鱼幼鱼免疫与代谢的影响

本研究发现, 矛尾复鰕虎鱼幼鱼在海水酸化条件下, *HSP70*, *ENO*, *LDH*, *PGAM* 和 *CYP1A1* 等基因表达显著上调, 表明这些基因在幼鱼体内应对海水酸化现象具有一定作用。*HSP70* 具有高度的保守性, 且广泛分布于真核及原核生物中^[18]。正常情况下, *HSP70* 在细胞中的表达水平较低, 在生物体受到外界刺激 (如重金属污染、盐度和 pH 波动)

下, 表达会上调, 含量将会显著增加, 从而提高机体抗应激的能力^[19]。Kou 等^[20]在敲除凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 仔虾体内的 *HSP70* 后, 发现其对 pH 和盐度的耐受性降低、存活率下降。丛岩懿等^[21]发现海洋线虫 (*Litodititis marina*) 体内的 *HSP70* 在低 pH 下的表达量显著升高, 与本试验结果一致。*ENO* 是一种金属结合酶且是糖酵解过程中的关键酶之一, 常见于原核和真核细胞的表面^[22], 其主要功能是催化 2-磷酸甘油酯转化为磷酸烯醇式丙酮酸^[23]。有研究表明, 酸化水体可能导致鱼类的免疫系统功能下降, 从而增加鱼类感染细菌病毒的可能^[24], 而 *ENO* 在鱼类感染链球菌方面有一定的免疫功能^[25]。根据研究结果推测海水酸化可能导致矛尾复鰕虎鱼幼鱼的免疫系统功能受到一定程度的影响, 机体促进 *HSP70* 和 *ENO* 等免疫和代谢相关基因的表达从而提高机体对海水酸化的适应能力。

LDH 广泛存在于植物、微生物、软体动物及哺乳动物细胞内, 是一种重要的糖酵解酶。当生物体内缺乏葡萄糖时, *LDH* 可以将乳酸氧化生成丙酮酸并经葡萄糖异生作用转变为葡萄糖^[26-27]。陶易凡等^[28]在克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的低 pH 胁迫实验中发现, 克氏原螯虾鳃中的 *LDH* 的活力随胁迫时间 (≤ 96 h) 的增加而呈现上升趋势; *LDH* 的表达上调对葡萄糖的生成存在一定的促进作用。*PGAM* 是一种分布广泛的糖酵解酶, 可以使 3-磷酸甘油酸和 2-磷酸甘油酸在糖酵解和糖异生过程中相互转化^[29], 并在生长发育、新陈代谢、碳水化合物转运以及催化活性等过程中起重要作用^[30]。崔国岐^[31]在低氧胁迫试验中得出 *PGAM* 表达上调, 可能与生物的生长发育和新陈代谢等方面有一定影响。*CYP1A1* 在鱼类体内主要参与外源物质的代谢转化过程^[32], 杨志刚等^[33]在试验中明确指出, 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 肝胰腺中 *CYP1A1* 基因的表达量随 pH 的降低而升高, 并且在 pH 5.5 时表达量达到最高。*CYP1A1* 的表达上调可能促进鱼鳃对水体中外源物质的代谢能力。

海水酸化条件下, 矛尾复鰕虎鱼幼鱼体内与碳水化合物、核苷酸和无机离子代谢相关的 *PGAM*, *NDPK* 和 *ATP2A* 等基因的表达被促进, 而与脂质以及氨基酸的运输和代谢相关的 *MIPSI*, *HMGCS* 和 *TAT* 等基因的表达则被抑制, 表明酸化海水对矛尾复鰕虎鱼幼鱼的物质代谢可产生一定影响。

3.3 海水酸化对矛尾复鰕虎鱼幼鱼免疫与代谢相关通路分析

本研究通过 KEGG 富集通路分析,发现多个与免疫相关的信号通路,包括细胞粘附分子、MAPK 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、胞吞作用和溶酶体等通路。值得注意的是差异表达基因在细胞粘附分子和细胞因子-细胞因子受体相互作用信号通路中显著富集,表明矛尾复鰕虎鱼幼鱼在海水酸化条件下,机体的免疫系统可通过细胞的活化、增殖和分化等途径进行免疫应答。细胞粘附分子信号通路中的主要组织相容性复合体(MHC)在脊椎动物的适应性免疫功能中有着非常关键的作用^[34]。MHC-I 位于有核的细胞上,在机体出现受感染细胞时,MHC-I 会在细胞表面将内源性衍生的蛋白质呈递给细胞毒性 CD8⁺T 细胞,CD8⁺T 细胞则会破坏受感染细胞^[35]。而 MHC-II 则是能够激活 B 细胞分化为浆细胞,并且能够产生对入侵病原体和记忆细胞具有特异性的抗体,从而保留过去的感染记录^[36]。留存的 B 细胞和 CD4⁺T 细胞能够使生物机体更快地对相同病症做出反应,并增强机体的免疫保护能力^[37]。Landis 等^[38]发现虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)在感染病毒后,鱼体内 MHC-I 类 B 基因的表达量上升;大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)感染鳃弧菌 96 h 后,MHC-II 类 B 基因在肝脏、脾脏和头肾 3 个组织中的表达量均上升^[39]。MHC 在免疫方面有较强的作用,且对鱼类生长起辅助作用^[40]。MHC-I 和 MHC-II 基因在海水酸化下表达上调,推测细胞粘附分子信号通路可能在矛尾复鰕虎鱼幼鱼的免疫应答过程中起一定作用,也可能与试验所用材料为幼鱼有关。

本研究中,DEGs 显著富集的代谢相关信号通路主要有氨基酸生物合成、碳代谢、类固醇生物合成和氧化磷酸化等,以氨基酸生物合成信号通路中 DEGs 富集最多。氨基酸与生物骨骼肌的生长、骨骼、内脏器官的发育、免疫功能以及代谢和生理途径息息相关^[41]。对于鱼类而言,存在 10 种其本身不能合成或合成速率不能满足自身要求的必需氨基酸,氨基酸的缺乏会影响鱼体的正常生长^[42]。氨基酸生物合成通路中的磷酸甘油酸激酶(PGK)是糖酵解途径中的关键酶,通过 1,3-二磷酸甘油酸(1,3-DPG)转化为 3-磷酸甘油酸(3-PGA)来产生三磷酸腺苷(ATP)^[43]。碳水化合物是机体产生 ATP 的主要来源之一。在机体缺乏能量时,6-磷

酸果糖激酶 1(PKF-1)会被激活使糖酵解反应的速率提升,从而增加 ATP 的生成^[44]。氨基酸生物合成通路中 PGK 的表达下调会抑制 ATP 的产生,而 PKF-1 的表达下调会降低 ATP 的生产。与碳水化合物运输与代谢相关的酶,如 PGAM 和 ENO 表达上调,这表明海水酸化会在一定程度上促进碳水化合物的运输和代谢。本试验过程中,海水酸化下鱼体内碳水化合物的代谢增加,而 PGK 的表达下调以及 PKF-1 的表达下调均会抑制能量的产生。表明在酸化水体中,矛尾复鰕虎鱼幼鱼能量的消耗有所上升,但能量的合成以及与脂质的运输和代谢相关的基因表达被抑制。

4 结论

在海水酸化条件下,矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃组织 DEGs 主要涉及代谢、防御及信号传导等功能,对机体中的氨基酸和能量等物质的代谢方面有一定抑制作用。海水酸化会促进矛尾复鰕虎鱼幼鱼鳃组织中 PGAM,NDPK,ENO,HSP70,LDH 和 CYP1A1 等基因的表达,抑制 MIPS1,CYB5R,ERG3,FDPS 和 HMGCS 等基因的表达。本试验结果可为矛尾复鰕虎鱼幼鱼对海水酸化的响应机制研究提供基础资料,也为探究海水酸化对水产养殖动物的影响机制提供参考依据。

参考文献:

- [1] SUN Bingyan, LAN Xukai, BOCK C, et al. Effects of ocean acidification and warming on apoptosis and immune response in the mussel *Mytilus coruscus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2025, 158: 110134.
- [2] 卢健民, 卢玲, 蔺玉华, 等. 低 pH 水平对鱼类生理生化效应的影响研究 [J]. *水产学杂志*, 2000, 13 (2): 47-53.
- [3] CUI Liang, CHENG Chen, LI Xiaoguang, et al. Comprehensive assessment of copper's effect on marine organisms under ocean acidification and warming in the 21st century [J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 927: 172145.
- [4] 王晓杰, 宋佳坤, 范纯新, 等. 海洋酸化对鱼类感觉和行为影响的研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2015, 10 (6): 13-20.
- [5] TEGOMO F A, ZHONG Zhiwen, NJOMOUE A P, et al. Experimental studies on the impact of the projected ocean

- acidification on fish survival, health, growth, and meat quality; black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*), physiological and histological studies [J]. *Animals*, 2021, 11 (11): 3119.
- [6] 许星鸿, 亓鲁, 王迅, 等. 矛尾复鰕虎鱼生物学特性及人工增殖技术研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2023 (4): 163-166.
- [7] 许星鸿, 刘翔, 阎斌伦, 等. 连云港海域野生矛尾复鰕虎鱼肌肉营养成分分析与品质评价 [J]. *江苏农业科学*, 2012, 40 (1): 261-265.
- [8] 李春岭, 王振怀, 王继芬, 等. 渤海矛尾复鰕虎鱼生殖力的研究 [J]. *河北渔业*, 2012 (3): 5-7.
- [9] 张晓君, 毕可然, 阎斌伦, 等. 矛尾复鰕虎鱼病原哈氏弧菌的鉴定及特异性检测方法建立 [J]. *水产科学*, 2011, 30 (12): 758-763.
- [10] 宫春光, 殷蕊, 孙桂清, 等. Fe^{2+} 急性胁迫对斑尾复鰕虎鱼组织结构的影响 [J]. *河北渔业*, 2018 (6): 1-4.
- [11] 黄勇, 龚望宝, 陈海刚, 等. 基于 RNA-Seq 高通量测序技术的大口黑鲈转录组分析 [J]. *南方水产科学*, 2019, 15 (1): 106-112.
- [12] 黄昇. 酸化海水引起中华乌塘鳢皮肤溃烂病的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2018.
- [13] WANG Le, SUN Fei, WEN Yanfei, et al. Effects of ocean acidification on transcriptomes in Asian seabass juveniles [J]. *Marine Biotechnology*, 2021, 23: 445-455.
- [14] 王思婕, 许星鸿, 涂丁颖, 等. 鳃弧菌感染单环刺螠体腔细胞转录组分析 [J]. *江苏海洋大学学报 (自然科学版)*, 2024, 33 (2): 5-16.
- [15] 曾姣. 大黄鱼幼鱼对酸化 - 低氧胁迫的生理响应 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.
- [16] LEE S, SHIN S C, KIM J H. Transcriptomic insights into the antagonistic responses of Antarctic marbled rockcod, *Notothenia rossii*, to elevated temperature and acidification [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2024, 287: 117249.
- [17] HORNG J L, LEE K Y, LIN L Y. Sublethal effects of acidified water on sensorimotor responses and the transcriptome of zebrafish embryos [J]. *Chemosphere*, 2025, 370: 143984.
- [18] PIANO A, VALBONESI P, FABBRI E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals [J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2004, 9 (2): 134.
- [19] CUI Wenting, LIU Jinhu, CAO Liang, et al. Toxicological effects of cadmium on the immune response and biomineralization of larval flounder *Paralichthys olivaceus* under seawater acidification [J]. *Chemosphere*, 2022, 291: 132919.
- [20] KOU Aishi, SINNASAMY S, MACRAE T H, et al. Hsp70 knockdown reduced the tolerance of *Litopenaeus vannamei* post larvae to low pH and salinity [J]. *Aquaculture*, 2019, 512: 734346.
- [21] 丛岩懿, 谢玉素, 张留所. 海洋线虫 *Litoditis marina* 酸性 pH 胁迫响应的转录组分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2020, 51 (6): 1472-1482.
- [22] TANG Jun, LIU Zhimin, DENG Xi, et al. Immunisation with the glycolytic enzyme enolase inhibits dissemination of *Treponema pallidum* in C57BL/6 mice [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 184: 106374.
- [23] WANG Jun, WANG Kaiyu, CHEN Defang, et al. Cloning and characterization of surface-localized α -Enolase of *Streptococcus iniae*, an effective protective antigen in mice [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16 (7): 14490-14510.
- [24] 许友卿, 张仁珍, 丁兆坤. pH 对鱼类繁育及生长发育的影响 [J]. *水产科学*, 2014 (2): 133-136.
- [25] LIU Jia, CAO Ye, MA Haixiang, et al. Enolase-based nanovaccine immersion immunization induces robust immunity and protection against *Streptococcus* infection in tilapia [J]. *Aquaculture*, 2023, 576: 739849.
- [26] 周静. 乳酸脱氢酶的分离纯化及其性质的研究 [J]. *赤峰学院学报 (自然科学版)*, 2009, 25 (9): 111-113.
- [27] 吴新宇. 乳酸脱氢酶高产菌株的筛选及其酶的分离纯化 [D]. 镇江: 江苏大学, 2010.
- [28] 陶易凡, 强俊, 王辉, 等. 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃和肝胰腺酶活力及组织结构的影响 [J]. *中国水产科学*, 2016, 23 (6): 1279-1289.
- [29] SONG Linxia, XU Zhenbiao, YU Xinbing. Molecular cloning and characterization of a phosphoglycerate mutase gene from *Clonorchis sinensis* [J]. *Parasitology Research*, 2007, 101: 709-714.
- [30] 余浪, 彭军. 磷酸甘油酸变位酶 5 与坏死样凋亡 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32 (2): 377-380.
- [31] 崔国岐. PGAM1 在肺动脉高压中的作用与机制研究

- [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2021.
- [32] GOKSØYR A. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution [C]// Toxicology in Transition: Proceedings of the 1994 EUROTOX Congress Meeting Held in Basel, Switzerland, 1994.
- [33] 杨志刚, 江青青, 房余程, 等. pH 和非协同效应对中华绒螯蟹幼蟹的毒性效应 [J]. 南方水产科学, 2023, 19 (6): 142-149.
- [34] OSBORNE M J, TURNER T F. Isolation and characterization of major histocompatibility class II β genes in an endangered North American cyprinid fish, the Rio Grande silvery minnow (*Hybognathus amarus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30 (6): 1275-1282.
- [35] HUANG Zhenyu, YU Yongyao, DONG Shuai, et al. Major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*): molecular cloning and expression analysis in response to bacterial and parasitic challenge [J]. Aquaculture, 2019, 500: 359-369.
- [36] WILSON A B. MHC and adaptive immunity in teleost fishes [J]. Immunogenetics, 2017, 69 (8): 521-528.
- [37] AHMED R, GRAY D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation [J]. Science, 1996, 272 (5258): 54-60.
- [38] LANDIS E D, PURCELL M K, THORGAARD G H, et al. Transcriptional profiling of MHC class I genes in rainbow trout infected with infectious hematopoietic necrosis virus [J]. Molecular Immunology, 2008, 45 (6): 1646-1657.
- [39] ZHANG Yuxi, CHEN Songlin. Molecular identification, polymorphism, and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and B genes of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Marine Biotechnology, 2006, 8: 611-623.
- [40] 李春梅, 张全启, 齐洁, 等. 鱼类 MHC 基因的研究概况 [J]. 海洋湖沼通报, 2009 (4): 39-50.
- [41] MOLINARI G S, WOJNO M, KWASEK K. Effects of dietary indispensable amino acid deficiencies on feed intake in stomachless fish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2024, 298: 111742.
- [42] 高煜霞, 田丽霞, 刘永坚. 鱼类氨基酸研究进展 [J]. 广东饲料, 2012, 21 (S1): 53-57.
- [43] LIU V M, VANDER HEIDEN M G. The role of pyruvate kinase M2 in cancer metabolism [J]. Brain Pathology, 2015, 25 (6): 781-783.
- [44] CHAUDHARY C, SAEEDI H, COSTELLO M J. Bimodality of latitudinal gradients in marine species richness [J]. Trends in Ecology & Evolution, 2016, 31 (9): 670-676.

(责任编辑: 李琴)