



低温胁迫对暗纹东方鲀肠道氧化应激、细胞凋亡及肠道微生物组成的影响

付东勇, 张艺然, 褚鹏, 王浩哲, 张凯,
毕宜慧, 孙亦如, 王涛*, 尹绍武*

(南京师范大学海洋科学与工程学院, 江苏省特色水产育种与绿色高效养殖技术工程研究中心, 江苏 南京 210023)

摘要: 为了探究低温胁迫对暗纹东方鲀肠道氧化应激、细胞凋亡及肠道微生物组成的影响, 实验测定了3个处理温度(25、19和13 °C), 4个取样时间点(0、6、24和96 h)下氧化应激、细胞凋亡与肠道微生物相关指标。结果显示, 与对照组相比, 随着温度降低肠道绒毛发生坏死、增生和杯细胞肿大。总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性以及丙二醛(MDA)含量显著增加。肠道微生物组成多样性降低。肠道微生物丰度发生改变, 如黄色杆菌属、副球菌属、乳球菌属和双歧杆菌属的丰度随温度降低而上升, 梭菌属、气单胞菌属和嗜热芽孢杆菌属的丰度随温度上升而下降。细胞凋亡相关基因(*caspase-3*、*caspase-7*、*caspase-9*、*p53*、*Bax*和*Bcl-2*)的表达随温度降低升高。此外, 实验发现副球菌属和嗜热芽孢杆菌属丰度的改变与肠道氧化应激、细胞凋亡均具有Pearson相关性, 其可作为潜在微生物用来反映暗纹东方鲀是否处于氧化应激和细胞凋亡状态。本研究结果可为暗纹东方鲀健康养殖提供基础资料。

关键词: 暗纹东方鲀; 低温; 肠道微生物; 氧化应激; 细胞凋亡

中图分类号: S 965.225

文献标志码: A

暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)隶属于鲀形目(Tetraodontiformes)鲀科(Tetraodonidae)东方鲀属(*Takifugu*), 广泛分布在南海、东海、中国内陆水域和朝鲜半岛并具有溯河洄游习性, 在中国长江中下游地区具有悠久的消费历史^[1-2]。除此之外, 暗纹东方鲀肉质鲜嫩, 蛋白质和脂肪的含量丰富, 在日本和韩国作为一种生鱼片的原材料, 广受欢迎, 是一种高经济价值的养殖鱼类。

水温是一种重要的环境因子, 对于洄游的暗纹东方鲀更为重要, 在自然水体和养殖水体中,

均会遇到低温情况。已有研究表明, 低温胁迫对暗纹东方鲀肝脏和肌肉的氧化应激、细胞凋亡^[3-5]和肠道微生物多样性^[6]均有影响, 但低温胁迫下暗纹东方鲀肠道氧化应激和细胞凋亡, 以及二者与肠道微生物组成的改变之间的联系未被探究。

氧化应激是体内氧化和抗氧化作用失衡, 产生自由基导致的负面作用。当氧化应激产生时, 鱼体为维持稳态产生应答。低温会诱导暗纹东方鲀肌肉产生活性氧(ROS), 扰乱细胞质稳态, 导致氧化应激和细胞凋亡^[7], 例如, 以往的研究发

收稿日期: 2021-09-28 修回日期: 2022-03-31

资助项目: 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目 [JBGS(2021)034]; 国家自然科学基金(32172948, 31800436); 江苏省农业科技自主创新项目 [CX(22)2029]; 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”(2018YFD0900301); 江苏省自然科学基金(BK20180728, BK20210563)

第一作者: 付东勇(照片), 从事水生动物种质资源与遗传育种研究, E-mail: 15651780675@163.com

通信作者: 王涛, 从事水生动物抗逆调控机制研究, E-mail: seawater88@126.com;

尹绍武, 从事水生动物种质资源与遗传育种研究, E-mail: yinshaowu@163.com



现, 低温胁迫导致总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性增加, 丙二醛 (MDA) 含量增加, SOD、CAT 和 GSH-Px 的 mRNA 表达量相应提高^[8-9]。此外, 产生的活性氧增加, SOD 和 GSH-Px 活性增加, 以补偿过 CAT 的消耗^[10-11], 这些都表明低温胁迫会产生氧化应激, 并且低温可以激活一种保护性的抗氧化防御反应。低温胁迫同样会诱导细胞凋亡基因表达, 细胞凋亡是一种细胞的自主死亡, 可以去除不需要或异常的细胞, 从而维持内环境的稳定。在小鼠 (*Mus musculus*) 的海马体中已经被证明冷暴露与细胞凋亡有关^[12], 其中含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (caspase) 家族、BCL2-Associated X 的蛋白质 (BCL2-Associated X, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (*Bcl-2*) 和 *p53* 基因均与细胞凋亡相关^[5, 13-14]。

肠道菌群是一个复杂的生态系统, 能不断适应宿主环境, 发挥调节宿主免疫、从食物中获取能量、防止病原体定殖等功能^[15]。肠道微生物功能是微生物群-宿主共同进化的结果, 并且冷暴露导致微生物群组成的显著变化, 称为冷微生物群^[16]。肠道通过改变其菌群组成的多样性和微生物的丰度而达到应对低温胁迫的目的。例如, 降低肠道微生物的多样性, 以达到减缓了饮食发酵并削弱能量需求的目的, 或者通过刺激其精氨酸和脯氨酸代谢途径, 在促进宿主对低温胁迫的抵抗力方面发挥着至关重要的作用^[17-20]。

本研究目的在于探讨低温胁迫对暗纹东方鲀肠道氧化应激、细胞凋亡及肠道微生物组成的影响, 以及肠道微生物组成的变化与氧化应激和细胞凋亡的相关性, 以期为暗纹东方鲀健康养殖和培育抗寒新品种提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验对象

暗纹东方鲀由江苏中洋集团股份有限公司提供。鱼在正式实验前驯化了 14 d, 期间喂食商业饲料 (江苏中洋股份有限公司提供, 蛋白质 42.0%、脂肪 8.0%、Ca 0.35%~0.50%、P 1.2%、NaCl 0.3%~2.5%) 每天 2 次, 直到正式实验处理前 24 h。将 270 尾暗纹东方鲀幼鱼 [体长 (13.00±1.55) cm, 体重 (25.00±1.85) g] 随机转移到 9 个有生物过滤的循环水养殖水族箱 (配备冷却和加热功能, 体积为

80 L, 流速为 2 L/min), 每个水族箱中 30 尾。单个水族箱的温度为 (25.0±0.5) °C, 盐度约为 3, 溶解氧 >7 mg/L, 光周期为 12 h/12 h, pH 值为 7.0±0.5。盐度使用 AZ 8372 盐度计 (衡欣科技股份有限公司) 进行测量。温度、溶解氧含量和氢离子浓度使用 8631 AZ IP67 复合水表 (衡欣科技股份有限公司) 测量。

1.2 实验设计和样本处理

暗纹东方鲀的最适温度为 23~32 °C, 摄食率在 19 °C 开始下降, 13 °C 出现冻伤和静止现象, 但在实验过程中不存在冻死情况, 因此, 参照前期研究^[21], 设计了一个温度和时间双因素实验 (温度: 25、19 和 13 °C, 时间: 0、6、24 和 96 h), 其中 13 和 19 °C 作为实验处理温度, 每个处理重复 3 次。本实验中, 水温以 0.85 °C/h 的速率从 25 °C 分别下降到 19 和 13 °C, 以防鱼体因温度快速降低而出现急性应激反应, 其中 19 °C 处理组在 13 °C 处理组由 25 °C 降到 19 °C 后同时降温, 以保证 13、19 和 25 °C 的 0 h 在同一时间进行取样。每个处理组的 9 尾鱼从 3 个平行循环水养殖水箱中随机抽取 (每个平行 3 尾), 用 MS-222 (10 mg/L) 麻醉, 立即收集暗纹东方鲀肠道中肠组织, 然后用预冷的 0.86% 生理盐水冲洗 2 次去除血液, 收集后储存在 -80 °C, 用于分子实验。另取每组处理的 3 尾鱼中肠, 保存于 4% 的多聚甲醛溶液中, 用于显微结构观察。本研究获得了南京师范大学实验动物伦理委员会批准 (SYXK2015-0028), 实验过程中操作人员严格遵守南京师范大学实验动物伦理规范, 并按照南京师范大学实验动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.3 氧化应激酶活性测定

肠组织按照 1 : 9 (质量体积比) 在生理盐水中匀浆, 4 °C、2 500 r/min 离心 10 min, 静止取上清液, 分装保存在 -20 °C。T-SOD、CAT、GSH-Px 的活性以及 MDA 的含量使用商业试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 进行测定, 匀浆的蛋白质浓度使用 Bradford 的方法^[20]。

1.4 肠道组织病理观察

根据 Al-Bairuty 等^[22]报道的方法进行肠道显微结构的观察, 即 4% 多聚甲醛中 24 h 后用不同浓度的乙醇 (75%、85%、90%、95% 和 99.5%) 脱

水。然后将脱水的组织包埋在石蜡中。将样品制备成 7 μm 厚度, 并用苏木精-伊红 (H.E) 染色。图像使用 Nikon Eclipse E100 显微镜和 NIKON DS U3 成像系统获得。使用 Pan noramic Viewer 软件 (3DHISTECH Ltd., 匈牙利) 捕获摄影图像。

1.5 细胞凋亡相关基因的表达测定

使用高纯度 RNA 快速提取试剂 (BioTeke, 中国) 提取总 RNA。使用 HiScript[®] Reverse Transcriptase (Vazyme, 美国) 将纯化的 RNA 逆转录成 cDNA, 然后立即储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以进行后续实时定量 PCR (qRT-PCR), 测定细胞凋亡相关基因 (*caspase-3*、*caspase-7*、*caspase-9*、*Bcl-2*、*Bax* 和 *p53*) 的表达量。 β -*actin* 用作对照基因^[20], 每个实验重复 3 次。每个基因的相对表达水平由 $2^{-\Delta\Delta C}$ 方法确定。用于 qRT-PCR 的引物见表 1。

表 1 引物列表

Tab. 1 List of primers used in this study

引物名称 primers name	引物序列 primer sequences (5'-3')
<i>caspase-3</i> -F	GACAACAGTCGGGTTCTGCTCT
<i>caspase-3</i> -R	CCGAGGCTCGAGAACAACCTTT
<i>caspase-7</i> -F	AGGGATGAATGTACGCAACGG
<i>caspase-7</i> -R	TTAGCAGGATGCAGGCGAAAC
<i>caspase-9</i> -F	ACTTTGGTTGAGTTACTTCAGGATG
<i>caspase-9</i> -R	ACTGGGATGACAGGTGCTTTA
<i>Bcl-2</i> -F	ACTTGTGCTTTCAGTGACCTG
<i>Bcl-2</i> -R	TTGACTCCATCCCTAAATACCT
<i>Bax</i> -F	TTTACTTTGCCTGTGCGCTCG
<i>Bax</i> -R	CCTTACCCATCCACCTGCT
<i>p53</i> -F	CCTGGGTAATCGGTGGTAA
<i>p53</i> -R	ATCTGTGGGAGAATGTGGC
β - <i>actin</i> -F	AAGCGTGCCTGACATCAA
β - <i>actin</i> -R	TGGGCTAACGGAACCTCT

1.6 16S rRNA 二代测序

根据 Zheng 等^[20] 报道的实验方法, 使用商业试剂盒 QIAamp[®] Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, 德国) 从肠道内容物中提取细菌 DNA。总 DNA 浓度用 NanoDrop 分光光度计 (Thermo Scientific Inc., Waltham, 美国), OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比率为 1.8~2.0, 并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以提取的 DNA 为模板扩增细菌 16S rRNA 的 V3~V4 区。使用引物 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCA) 和 806R (GGACTACHVGGGTATTCTAAT) 扩增该区域。Phusion

High-Fidelity PCR Master Mix 和来自商业试剂盒 New England Biolabs (Ipswich, 美国) 的 GC 缓冲液用于 PCR: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 27 个循环; 最后 68 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。然后使用 Qiagen 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, Hilden, 德国) 纯化 PCR 产物。

16S rRNA 的 Illumina HiSeq[™] 2500 测序由 GENE Denovo (武汉) 在 PCR 扩增子文库中进行。基于之前的研究^[20], 将测序数据经过去引物、拼接、质量过滤等步骤, 聚类形成操作分类单元 (OTU)。使用基于 SILVA 数据库 (<https://www.arb-silva.de/>) 的 RDP 分类器 (2.2 版), 使用原生贝叶斯模型对暗纹东方鲀肠道菌群的代表性序列进行分类, 置信度阈值为 0.8 和 1.0。使用 Krona (2.6 版) 可视化每个分类学分类的丰度统计数据。使用 R Core Team (2017) 计算并绘制了基于加权 Uni-frac 距离的组间 alpha 指数和主坐标分析 (PCoA) 的比较。使用 Welch 的 *t* 检验、Wilcoxon 秩检验、Tukey 氏的 HSD 检验、Kruskal-Wallis *H* 检验以及 R 中 Adonis 和 Anosim 检验进行数据的统计分析。

1.7 数据分析

实验所得数据均使用平均值 \pm 标准差的方式表示, 所有数据均用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。利用方差分析 (One-Way ANOVA) 进行显著性检验, 用最小显著性差异法 (LSD) 分析差异。

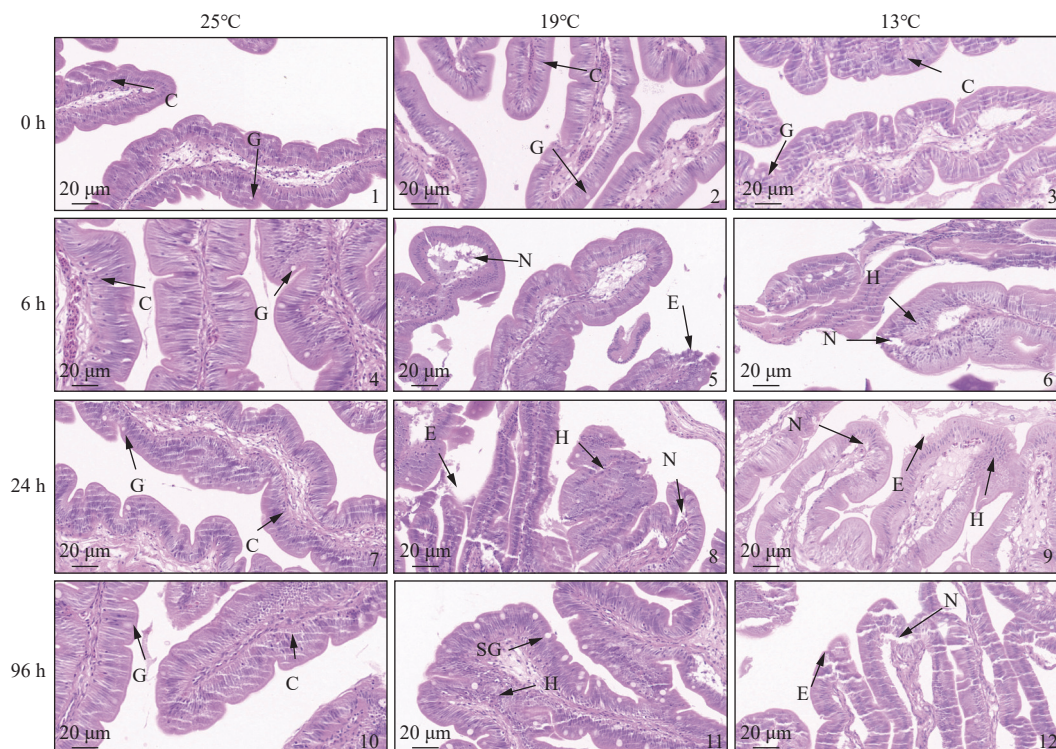
2 结果

2.1 暗纹东方鲀肠道 H.E 染色切片

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 0、6、24 和 96 h 肠道没有明显损伤。但在 13 和 19 $^{\circ}\text{C}$ 时, 肠道发生明显损伤, 包括杯状细胞肿胀 (SG)、细胞增生 (H)、黏膜层肿胀 (N)、绒毛糜烂 (E) 和绒毛断裂 (F), 且随着温度的降低, 损伤加重, 在 13 $^{\circ}\text{C}$ 下的 24 和 96 h 最严重 (图版)。

2.2 暗纹东方鲀肠道氧化应激指标

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, T-SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性以及 MDA 的含量随着时间的变化没有产生显著影响 (图 1)。与对照组相比, T-SOD 的活性在 19 和 13 $^{\circ}\text{C}$ 显著提升, 在 13 $^{\circ}\text{C}$ 24 h 达到最高。MDA 含量在 13 $^{\circ}\text{C}$ 时显著升高, 并且在 24 h 达到最高。GSH-Px 的活性在 13 $^{\circ}\text{C}$ 时显著升高, 并且分别在 19 $^{\circ}\text{C}$ 24 h 和 13 $^{\circ}\text{C}$ 96 h 达到最高。CAT 的



图版 低温胁迫对暗纹东方鲀肠道显微结构的影响

C. 柱状细胞, G. 杯状细胞, SG. 杯状细胞肿胀, H. 细胞增生, N. 黏膜层坏死, E. 绒毛糜烂。

Plate Effects of low temperature stress on the intestinal microstructure of *T. fasciatus*

C. columnar cells, G. goblet cells, SG. swelling of goblet cells, H. hyperplasia, N. necrosis in the mucosal layer, E. erosion of villi.

活性在 13 °C 时显著升高, 并且在 13 °C 24 h 达到最高 (图 1)。

2.3 细胞凋亡相关基因表达

参与细胞凋亡的 *caspase-3*、*caspase-7*、*caspase-9*、*p53*、*Bcl-2* 和 *Bax* 的 mRNA 表达水平。在对照组 (25 °C) 的 4 个时间段内没有显著差异。与对照组相比, 19 和 13 °C 表达量显著升高, *caspase-3*、*caspase-9*、*Bcl-2*、*Bax* 和 *p53* 在 13 °C 24 h 表达量达到最高, *caspase-7* 的表达量在 13 °C 96 h 达到最高 (图 2)。

2.4 肠道微生物组成

肠道微生物的主成分会随着温度和时间的变化而发生改变。不同温度下的肠道具有独特的肠道微生物组成和部分相同的肠道微生物组成, 其中相同肠道微生物种类为 67 种。且随着温度的降低, 微生物多样性呈下降趋势。肠道微生物的门水平中, 变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 相对丰度较高, 随着温度的降低, 厚壁菌门与拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的比值降低 (图 3)。

2.5 肠道微生物属水平丰度变化与氧化应激、细胞凋亡间的 Pearson 相关性分析

肠道微生物属水平丰度随着时间和温度的变化而变化。与对照组相比, 19 和 13 °C, 黄色杆菌属 (*Xanthobacter*)、副球菌属 (*Paracoccus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 呈现显著上升; 梭菌属 (*Clostridium*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*) 和嗜热芽孢杆菌属 (*Geobacillus*) 呈现显著下降。其中副球菌属、乳球菌属和双歧杆菌属在 13 °C 96 h 达到最高, 乳球菌属在 13 °C 24 h 达到最高, 气单胞菌属和嗜热芽孢杆菌属在 13 °C 24 h 达到最低, 梭菌属在 13 °C 6 h 之后丰度为 0 (表 2)。在测定的氧化应激、细胞凋亡等相关基因表达量与肠道微生物丰度的 Pearson 相关性中, 双歧杆菌属仅与 MDA 含量无显著相关性。乳球菌属仅与 CAT、MDA 和 *caspase3* 具有 Pearson 相关性。嗜热芽孢杆菌属和副球菌属与氧化应激和细胞凋亡所有测定基因均具有 Pearson 相关性, 黄色杆菌属和气单胞菌属与 MDA 含量和 *caspase-3* 无相关性, 梭菌属与 T-SOD 活性和 MDA 含量无显著相关性 (图 4)。

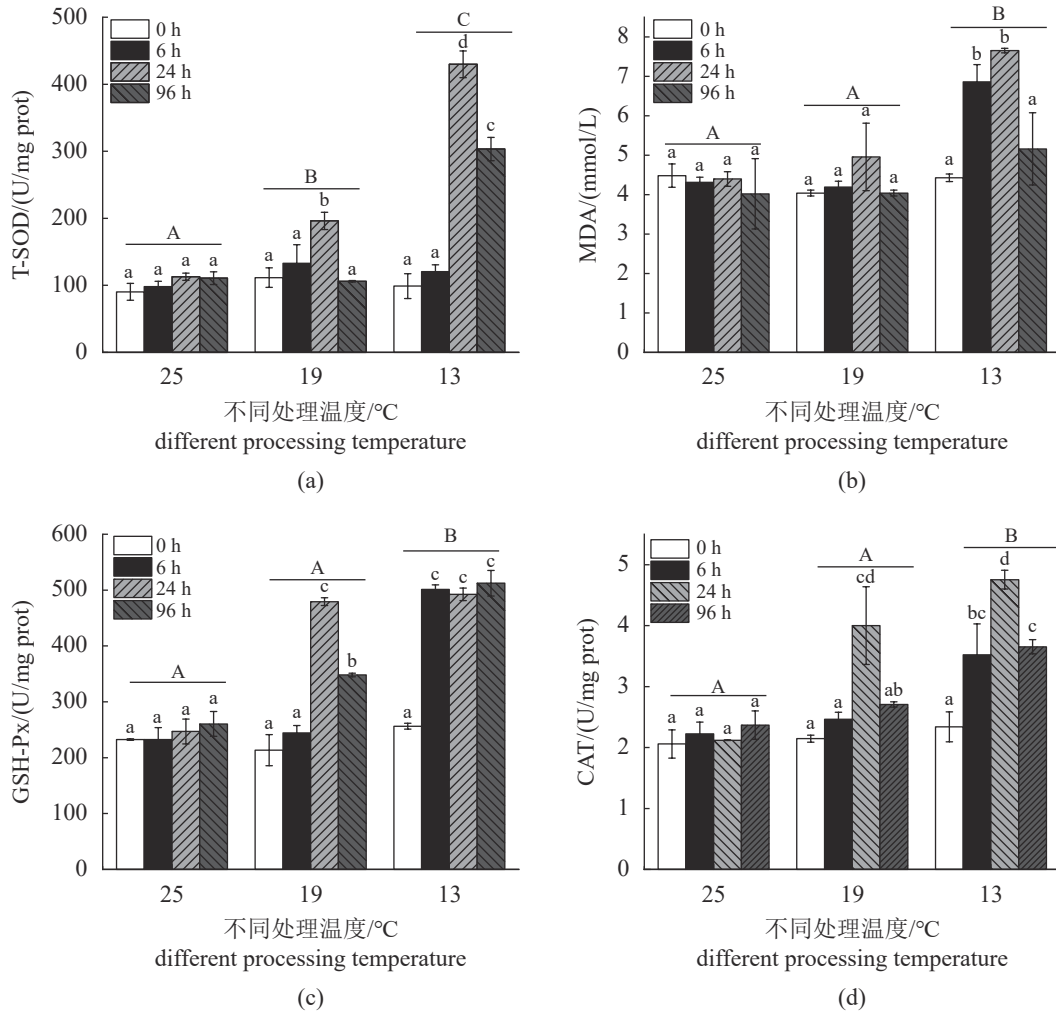


图1 低温胁迫对暗纹东方鲀肠道氧化应激的影响

(a) T-SOD, (b) MDA, (c) GSH-Px, (d) CAT; 不同小写字母代表各处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母代表不同温度间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 1 Effects of low temperature stress on the intestinal oxidative stress of *T. fasciatus*

(a) T-SOD, (b) MDA, (c) GSH-Px, (d) CAT; different lowercase letters represent significant differences among treatments ($P < 0.05$), and different uppercase letters indicate significant differences between treatments at different temperatures ($P < 0.05$), the same below.

3 讨论

3.1 低温诱导暗纹东方鲀肠道损伤和氧化应激

H.E 染色切片结果显示, 与正常的对照组相比, 随着温度降低和时间延长, 肠道发生生理损伤并且加重, 如杯状细胞肿胀、细胞增生、黏膜层坏死和绒毛糜烂^[22-23]。已知杯状细胞主要分布在消化道, 是一种黏液细胞, 具有酸性和中性黏蛋白, 可润滑上皮并帮助消化, 当上皮细胞受损和免疫防御时, 可以参与警报信号^[24]。而低温应激会使杯状细胞发生肿胀, 损害肠道功能。此外, 肠道黏膜层发挥着吸收水分的作用, 绒毛起着增大肠道吸收面积的功能, 黏膜层和肠道绒毛的损

坏, 会破坏肠道的完整性和损害肠道的免疫功能和吸收功能。已有的研究表明, 细胞凋亡在维持肠黏膜细胞稳态中也起到重要作用^[23], 本实验的研究结果也显示, 低温胁迫会对肠道的显微结构产生影响, 破坏肠道完整性。

低温会诱导 ROS 产生过量, 扰乱细胞质稳态, 导致氧化应激。而过量的 ROS 受 ROS 清除系统的调节, 以此保持平衡。在以往的研究中发现, 低温胁迫诱导凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 肝胰腺的 SOD、CAT、MDA 和 GSH-Px 表达量增加^[10], 这和本研究结果类似, 与对照组相比, 在低温实验中氧化应激升高。其中, SOD 是已知使用自由基作为底物并催化超氧阴离子歧化的酶,

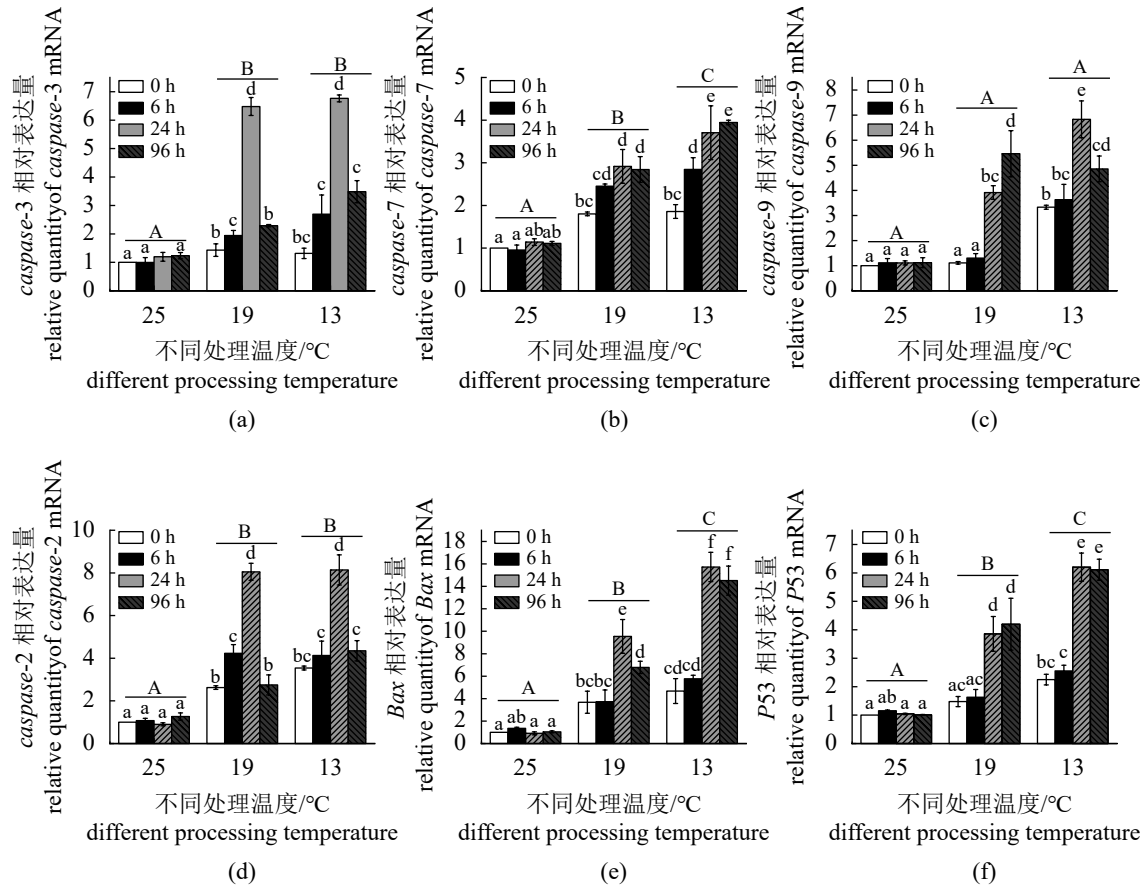


图2 低温胁迫对暗纹东方鲀肠道细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of low temperature stress on the apoptosis of intestinal cells of *T. fasciatus*

(a) caspase-3, (b) caspase-7, (c) caspase-9, (d) Bcl-2, (e) Bax, (f) p53.

同时谷胱甘肽过氧化物酶的生理功能主要是催化谷胱甘肽 (GSH) 参与过氧化反应, 在体内协同 CAT 参与过氧化氢分解为 H_2O 和 O_2 , 从而降低不饱和脂肪酸的氧化程度, 保持细胞膜的稳定性^[25]。并且低温诱导 MDA 含量升高, 表明造成了脂质过氧化作用, 产生的超氧自由基更多^[20]。而氧化的终产物为 MDA^[20], 与 SOD 的变化吻合。实验表明, 在低温应激的早期, SOD、CAT、MDA 和 GSH-Px 显著升高, 但在更长期低温 96 h 时, 会有下降趋势。推测肠道在低温应激时产生大量 ROS, 所以需要更多的 SOD 来消除氧化应激, SOD 作为酶保护系统的第一道防线, 活性增加也被证实是一种抵抗寒冷的重要机制^[26-27]。与此同时, CAT 和 GSH-Px 的活性提高辅助氧化应激的消除, 氧化的最终产物 MDA 也会增高。但在长期低温 (96 h) 应激下, 鱼体会修复机制, 导致仍处于氧化应激, 但程度降低^[21]。本实验结果表明, 与对照组相比, 实验组中 SOD、CAT、MDA 和 GSH-Px 活性显著上升, 在 96 h 有所降低,

但是暗纹东方鲀依然处于氧化应激状态。

3.2 低温诱导暗纹东方鲀肠道细胞凋亡

氧化应激与细胞凋亡是密切相关的生理现象^[28]。已有报道, 低温应激会诱导暗纹东方鲀肝脏和血液中发生细胞凋亡^[29]。在细胞凋亡的路径中, Bcl-2 是细胞凋亡的关键调节剂, 能抑制细胞凋亡, 对发育、组织稳态和抵御病原体至关重要^[30]。而 Bax 在体内与 Bcl-2 发生同源二聚体并形成异源二聚体, 过度表达的 Bax 还对抗 Bcl-2 抑制活性。而且 Bax/Bcl-2 是一个细胞凋亡的主要参数, 它们之间的平衡决定了细胞的生存和凋亡^[31]。它们通过控制线粒体膜的通透性来调节细胞凋亡激活物如细胞色素 C 的释放, 从而调节细胞凋亡。在本研究中, 与对照组相比, Bax 和 Bcl-2 的表达含量增高, Bax/Bcl-2 的比值升高。推测, 比值的升高是 Bcl-2 的表达相对 Bax 被抑制, 因为形成的二聚体减少, 导致了细胞凋亡加剧, 此结果与布氏田鼠 (*Lasiopodomys brandtii*) 心肌细胞中的研究报道一致^[14]。在以往的研究中, 包括 p53、caspase 家

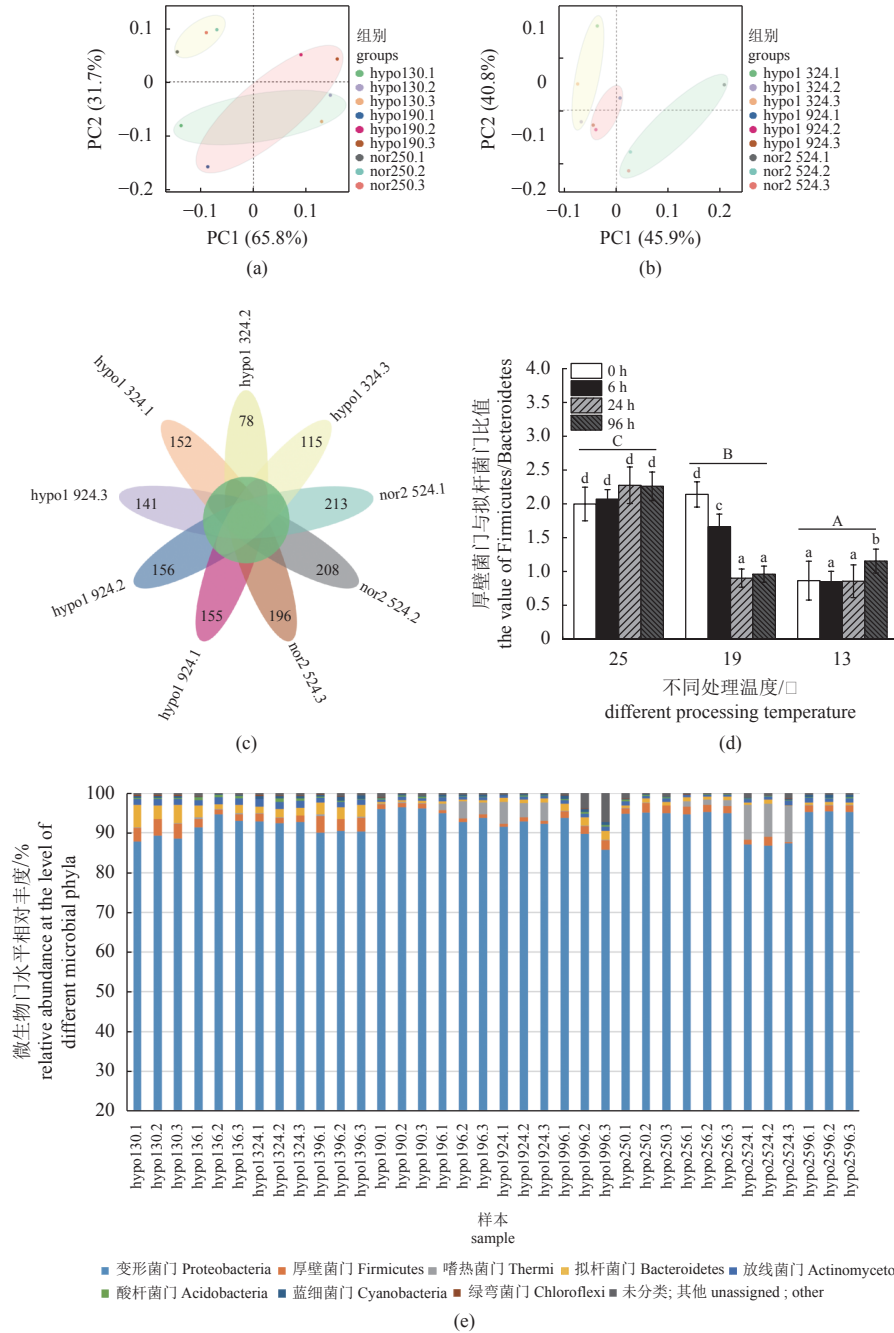


图 3 低温胁迫对暗纹东方鲀肠道微生物组成的影响

(a) 0 h 肠组织的主坐标分析 (PCoA), (b) 24 h 肠组织的主坐标分析 (PCoA), (c) 肠道微生物组成多样性, (d) 图 e 中, 厚壁菌门与拟杆菌门之间的比值, 不同小写字母代表各个处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母代表不同温度之间差异显著 ($P < 0.05$); (e) 不同微生物门水平的相对丰度。hypo 代表低温处理, nor 代表常温处理, 13、19 和 25 代表处理温度 ($^{\circ}\text{C}$), 0 代表时间为 0 h, 24 代表时间为 24 h, 1~3 代表生物学重复。

Fig. 3 Effects of low temperature stress on the intestinal microbial composition of *T. fasciatus*

(a) principal coordinate analysis (PCoA) of intestinal tissue at 0 h, (b) PCoA of intestinal tissue at 24 h, (c) diversity of gut microbial composition, (d) in panel e, the ratio between Firmicutes and Bacteroidetes, different lowercase letters represent significant differences among treatments ($P < 0.05$), and different uppercase letters indicate significant differences between treatments at different temperatures ($P < 0.05$), (e) relative abundance at the level of different bacterial phyla. hypo stands for low temperature treatment groups, nor for normal temperature, 13, 19 and 25 for treatment temperature ($^{\circ}\text{C}$), 0 for 0 hour, 24 for 24 hour, 1-3 stand for biological replicates.

表 2 暗纹东方鲀肠道微生物属水平相对丰度
Tab. 2 Relative abundance of the intestinal microbial genus in *T. fasciatus* %

属 genus	25 °C 0 h	25 °C 6 h	25 °C 24 h	25 °C 96 h	19 °C 0 h	19 °C 6 h	19 °C 24 h	19 °C 96 h	13 °C 0 h	13 °C 6 h	13 °C 24 h	13 °C 96 h
黄色杆菌属 <i>Xanthobacter</i>	0.26±0.1 ^a	0.23±0.1 ^a	0.24±0.04 ^a	0.25±0.13 ^a	0.23±0.09 ^a	0.24±0.06 ^a	2.77±0.83 ^b	2.64±0.65 ^b	1.08±0.1a ^b	1.13±0.8 ^{ab}	5.77±0.46 ^c	8.7±0.28 ^d
梭菌属 <i>Clostridium</i>	0.1±0.01 ^b	0.2±0.06 ^b	0.23±0.1 ^b	0.22±0.04 ^b	0.21±0.03 ^b	0.04±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0.21±0.1 ^b	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	0.07±0.03 ^{ab}	0.08±0.01 ^{ab}	0.09±0.04 ^b	0.09±0.01 ^b	0.05±0.02 ^{ab}	0.05±0.01 ^{ab}	0.06±0 ^{ab}	0.03±0 ^a	0.05±0.01 ^{ab}	0.05±0.01 ^{ab}	0.03±0.01 ^a	0.03±0.01
嗜热芽孢杆菌属 <i>Geobacillus</i>	0.05±0 ^{bc}	0.05±0.03 ^c	0.05±0.01 ^{bc}	0.05±0.01 ^{bc}	0.03±0.01 ^{bc}	0.02±0 ^{bc}	0.02±0.01 ^{bc}	0.02±0.01 ^{bc}	0.03±0 ^{bc}	0.01±0 ^{bc}	0.01±0 ^{bc}	0.01±0 ^a
副球菌属 <i>Paracoccus</i>	0.01±0 ^a	0.01±0 ^a	0.01±0 ^a	0.01±0 ^a	0.02±0 ^{ab}	0.02±0.01 ^{ab}	0.03±0.01 ^{ab}	0.04±0.02 ^{ab}	0.03±0 ^{ab}	0.04±0.01 ^{ab}	0.04±0.03 ^{ab}	0.05±0.02 ^b
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0.01±0.01 ^a	0±0 ^a	0.01±0.01 ^a	0.02±0.01 ^b	0.03±0 ^b	0±0 ^a
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	0.01±0 ^a	0.01±0 ^a	0.01±0 ^a	0.01±0 ^a	0.02±0 ^a	0.04±0.01 ^{cd}	0.04±0 ^{bcd}	0.02±0 ^{bc}	0.02±0.01 ^{ab}	0.02±0 ^{bc}	0.04±0.01 ^{cd}	0.05±0.01 ^d

注：不同小写字母表示具有显著差异(P<0.05)。
 Notes: Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).

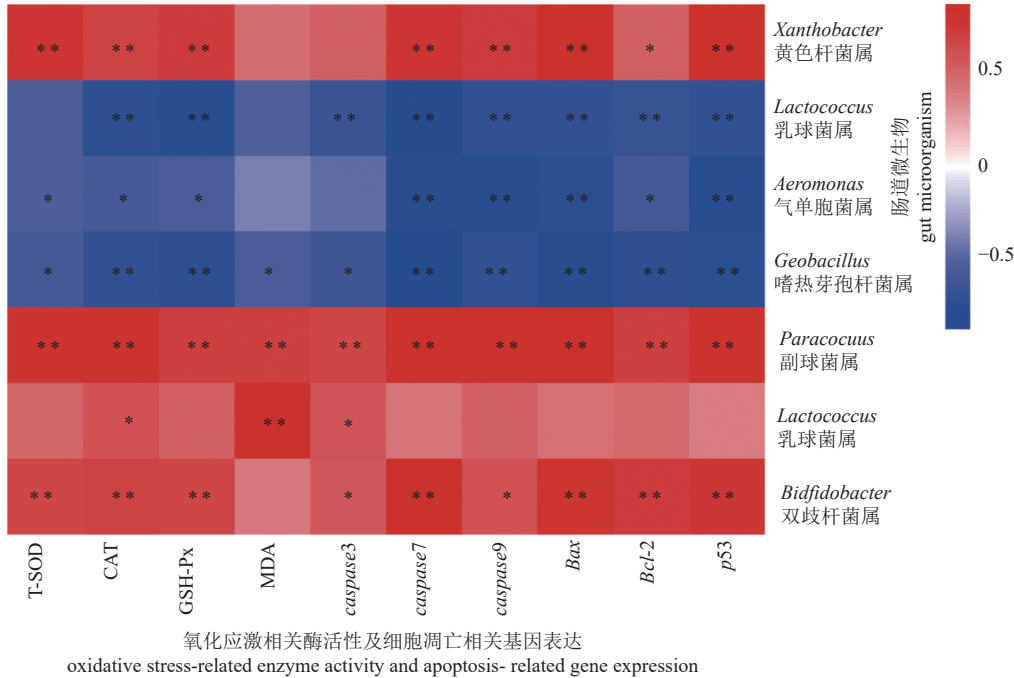


图 4 暗纹东方鲀肠道微生物组成与细胞凋亡、氧化应激之间的 Pearson 相关性分析

相关系数为正表示正相关，为负表示负相关。* P<0.05, ** P<0.01。

Fig. 4 Pearson correlation analysis between intestinal microbes, apoptosis and oxidative stress of *T. fasciatus*

A positive correlation coefficient indicates a positive correlation, and a negative correlation indicates a negative correlation. * P<0.05, ** P<0.01.

族在内的凋亡相关基因在应对低温应激时也往往表达上调^[29, 32]。Caspase9 参与细胞凋亡，在细胞凋亡途径中，前凋亡信号启动后，将激活下游的 caspase，从而导致 DNA 修复的抑制并启动 DNA 降解^[33]。p53 作为一种核转录因子，调节许多参与细胞凋亡的基因，主要通过 Bcl-2 家族蛋白相互作用并拮抗来介导线粒体凋亡途径，而 Bcl-2 家

族蛋白可以激活随后的 caspase 级联^[34]。例如，在小鼠角膜内皮细胞 (CEC) 冷冻损伤后 caspase3 被激活^[32]。瘤背石磺 (*Onchidium reevesii*) 冷应激条件下肝胰腺中 caspase9 和 caspase3 的表达水平均显著上调^[35]。低温胁迫诱导暗纹东方鲀肝脏和血液中包括 p53、caspase9 和 caspase3 在内的凋亡相关基因表达上调^[29]。此次肠道实验结果中观察到

的现象也一致, 呈现低温胁迫导致 *caspase9*、*caspase3*、*caspase7* 和 *p53* 的表达量随着温度下降而升高。此外, 除 *caspase3*, 在 19 或 13 °C 的 0 h 时, 低温胁迫后与细胞凋亡相关的基因也出现了表达量上升的情况, 推测外界低温诱导肠道发生了细胞凋亡, 并且启动了 *caspase* 和 *p53* 途径, 这可能是暗纹东方鲀应对低温胁迫的一种调控机制。这些现象在其他物种中也有所发现, 例如斑马鱼 (*Danio rerio*) 调节细胞凋亡和 *p53* 信号通路来抵御低温胁迫^[5]; 遮目鱼 (*Chanos chanos*) 肝细胞在低温胁迫下 *caspase3* 活性上调, 进而诱导细胞凋亡^[13]; 低温胁迫诱导布氏田鼠心肌线粒体 Bax/Bcl-2 蛋白含量升高^[14]。这些都可以说明细胞凋亡被低温胁迫所诱导。

3.3 低温胁迫改变暗纹东方鲀肠道微生物的组成

本研究的主坐标分析结果表明, 与对照组相比, 13 和 19 °C 组的暗纹东方鲀肠道微生物的组成发生改变, 而且不同温度的暗纹东方鲀肠道微生物构成不同。在前期研究中发现, 冷应激会降低凡纳滨对虾微生物群落的组成, 总体上改变细菌群落并降低对病原体的免疫力和抗菌活性^[36]。此外, 体重 200 g 左右的暗纹东方鲀在低温下肠道微生物的群落组成也发生改变, 多样性呈下降趋势^[6], 这与体重为 25 g 左右的暗纹东方鲀幼鱼中的研究结果一致。花瓣图也表明, 微生物的多样性随着温度的降低而降低。这种现象可能是因为低温 (19 和 13 °C) 胁迫导致。而且, 较少的微生物组成群落也会有较低的能量需求。结果显示, 微生物门水平相对丰度表达也发生变化, 其肠道中拟杆菌门和放线菌门丰富^[37], 这与小鼠在低温胁迫下的研究结果相似。厚壁菌门/拟杆菌门在肠道中是一个重要的比值, 往往与肠道中的代谢和短链脂肪酸相关^[38-40]。在本研究中, 暗纹东方鲀肠道中厚壁菌门和拟杆菌门是优势菌, 且厚壁菌门/拟杆菌门比值随着温度的降低而降低。有研究表明, 厚壁菌门/拟杆菌门比例下降导致机体产生短链脂肪酸含量下降^[41], 结合本研究结果, 可以推测暗纹东方鲀肠道减少了短链脂肪酸的产生, 从而应对低温胁迫。

3.4 暗纹东方鲀在低温胁迫下的肠道微生物与氧化应激和细胞凋亡相关性

在肠道中有许多微生物与机体的肠道正常功能和健康状况息息相关, 在以往的研究中可以看

出, 黄色杆菌属、气单胞菌属和副球菌属是致病菌, 双歧杆菌属、乳球菌属、嗜热芽孢杆菌属和梭菌属是益生菌^[17-20]。暗纹东方鲀低温胁迫下, 肠道中属水平微生物相对丰度也发生改变, 如致病菌黄色杆菌属和副球菌属相对丰度上升, 气单胞菌属下降; 益生菌双歧杆菌属和乳球菌属上升, 嗜热芽孢杆菌属和梭菌属下降。并且, 在低温胁迫时肠道氧化应激和细胞凋亡发生。随着肠-脑轴概念的提出^[42], 发现肠道微生物发挥着多种关键功能, 包括调节宿主免疫、从食物中获取能量、防止病原体定殖等^[15]。在实验测定的所有氧化应激和细胞凋亡指标中, 双歧杆菌属仅与 MDA 含量无 Pearson 相关性; 乳球菌属仅与 CAT 活性、MDA 含量和 *caspase3* 表达量具有 Pearson 相关性; 黄色杆菌属和气单胞菌属仅与 MDA 含量和 *caspase3* 无 Pearson 相关性; 梭菌属仅与 T-SOD 活性和 MDA 含量无 Pearson 相关性。其中嗜热芽孢杆菌属和副球菌属与氧化应激和细胞凋亡所有测定基因均具有 Pearson 相关性。推测嗜热芽孢杆菌属和副球菌属可能与暗纹东方鲀肠道氧化应激和细胞凋亡的发生具有密切联系。

4 结论

低温胁迫会导致暗纹东方鲀肠道发生损伤, 诱导氧化应激和细胞凋亡, 改变肠道微生物组成, 并且肠道微生物的改变与氧化应激、细胞凋亡存在 Pearson 相关性。其中, 副球菌属和嗜热芽孢杆菌属可能是一种可用来反映暗纹东方鲀是否处于氧化应激和细胞凋亡状态的潜在微生物。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] McClelland J. Description of a collection of fishes made at Chusan and Ningpo in China, by Dr. G. R. Playfair, Surgeon of the Phlegethon, war steamer, during the late military operations in that country[J]. *Calcutta Journal of Natural History*, 1844, 4(4): 390-413.
- [2] Wang T, Wei X Z, Chen T Q, et al. Studies of the mechanism of fatty liver formation in *Takifugu fasciatus* following copper exposure[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 181: 353-361.
- [3] Wen X, Zhang X Y, Hu Y D, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Takifugu fasciatus* liver in

- response to low-temperature stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2019, 201: 27-36.
- [4] Qiang J, Zhong C Y, Bao J W, *et al.* The effects of temperature and dissolved oxygen on the growth, survival and oxidative capacity of newly hatched hybrid yellow catfish larvae (*Tachysurus fulvidraco*♀ × *Pseudobagrus vachellii*♂)[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 86: 102436.
- [5] Ren J, Long Y, Liu R, *et al.* Characterization of biological pathways regulating acute cold resistance of zebrafish[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(6): 3028-3028.
- [6] 汪倩, 翟万营, 韩爽, 等. 低温胁迫对不同品系暗纹东方鲀肠道微生物群落结构的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37(1): 80-87.
- Wang Q, Zhai W Y, Han S, *et al.* Effects of low temperature stress on gut microbial community structure of different strains of obscure puffer *Takifugu fasciatus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(1): 80-87 (in Chinese).
- [7] 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[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 77: 457-464.
- [8] Tseng Y C, Chen R D, Lucassen M, *et al.* Exploring uncoupling proteins and antioxidant mechanisms under acute cold exposure in brains of fish[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18180.
- [9] Pe P P W, Naing A H, Chung M Y, *et al.* The role of antifreeze proteins in the regulation of genes involved in the response of *Hosta capitata* to cold[J]. *3 Biotech*, 2019, 9(9): 335.
- [10] Xu Z H, Regenstein J M, Xie D D, *et al.* The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low temperature and air exposure[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 564-571.
- [11] Wen B, Jin S R, Chen Z Z, *et al.* Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 640-641: 1372-1381.
- [12] Xu B, Lian S, Guo J R, *et al.* Activation of the MAPK signaling pathway induces upregulation of pro-apoptotic proteins in the hippocampi of cold stressed adolescent mice[J]. *Neuroscience Letters*, 2019, 699: 97-102.
- [13] Chang C H, Wang Y C, Lee T H. Hypothermal stress-induced salinity-dependent oxidative stress and apoptosis in the livers of euryhaline milkfish, *Chanos chanos*[J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736280.
- [14] Wang Z, Xu J H, Mou J J, *et al.* Novel ultrastructural findings on cardiac mitochondria of huddling Brandt's voles in mild cold environment[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2020, 249: 110766.
- [15] Singh R, Zogg H, Wei L, *et al.* Gut microbial dysbiosis in the pathogenesis of gastrointestinal dysmotility and metabolic disorders[J]. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 2021, 27(1): 19-34.
- [16] Chevalier C, Stojanović O, Colin D J, *et al.* Gut microbiota orchestrates energy homeostasis during cold[J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1360-1374.
- [17] 张水波. 几种主要细菌性鱼病的防治(一)[J]. 渔业致富指南, 2011(1): 58-59.
- Zhang S B. Prevention and treatment of several major bacterial fish diseases[J]. *Fisheries Getting Rich Guide*, 2011(1): 58-59 (in Chinese).
- [18] Lu J T, Bu X Y, Xiao S S, *et al.* Effect of single and combined immunostimulants on growth, anti-oxidation activity, non-specific immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 732-742.
- [19] Meng Z, Quanyuan W, Sarath B V, *et al.* Bacterial features in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and environments in a goose-tilapia polyculture model[J]. *Aquaculture*, 2018, 497: 313-319.
- [20] Zheng X, Fu D, Cheng J, *et al.* Effects of hypoxic stress and recovery on oxidative stress, apoptosis, and intestinal microorganisms in *Pelteobagrus vachelli*[J]. *Aquaculture*, 2021, 543: 736945.
- [21] Chu P, Wang T, Sun Y R, *et al.* Effect of cold stress on the MAPK pathway and lipidomics on muscle of *Takifugu fasciatus*[J]. *Aquaculture*, 2021, 540: 736691.
- [22] Al-Bairuty G A, Shaw B J, Handy R D, *et al.* Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 126:

- 104-115.
- [23] 商宏伟, 肖颖彬, 刘梅, 等. 体外循环早期小肠粘膜细胞凋亡的实验研究[J]. *中国体外循环杂志*, 2005, 3(2): 87-89,92.
- Shang H W, Xiao Y B, Liu M, *et al.* An experimental study on the apoptosis of intestinal mucosa cells during early stage after cardiopulmonary bypass[J]. *Chinese Journal of Extracorporeal Circulation*, 2005, 3(2): 87-89,92 (in Chinese).
- [24] Matheus V A, Faccioli C K, Chedid R A, *et al.* Morphological and histochemical features of the digestive tract of *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870)[J]. *Journal of Fish Biology*, 2021, 99(5): 1622-1631.
- [25] Wang L, Zhang J L, Liu C, *et al.* Antioxidant activity of potato seedlings at different storage temperatures[J]. *International Journal of Chemical Engineering*, 2021, 2021: 5573644.
- [26] 冯建灿, 张玉洁, 杨天柱. 低温胁迫对喜树幼苗SOD活性、MDA和脯氨酸含量的影响[J]. *林业科学研究*, 2002, 15(2): 197-202.
- Feng J C, Zhang Y J, Yang T Z. Effect of low temperature stress on the membrane-lipid peroxidation and the concentration of free proline in *Camptotheca acuminata* seedling[J]. *Forest Research*, 2002, 15(2): 197-202 (in Chinese).
- [27] Zhu A M, Zhang Q X, Du X Y, *et al.* Responses of the physiological and biochemical characteristics of alfalfa roots with different root collar diameters to low temperatures under simulated winter irrigation[J]. *Europe PMC plus*, 2021, doi: 10.21203/rs.3.rs-583000/v1.
- [28] Kannan K, Jain S K. Oxidative stress and apoptosis[J]. *Pathophysiology*, 2000, 7(3): 153-163.
- [29] Cheng C H, Ye C X, Guo Z X, *et al.* Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 64: 137-145.
- [30] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1322-1326.
- [31] Oltval Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609-619.
- [32] Zhao S J, Fei X F, Liu T, *et al.* Low temperature induces cryoinjury in mouse corneal endothelial cells by stimulating the Stk11-p53 signal pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(5): 6612-6616.
- [33] Kumar S. Caspase function in programmed cell death[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2007, 14(1): 32-43.
- [34] Wei H D, Qu L Z, Dai S Y, *et al.* Structural insight into the molecular mechanism of p53-mediated mitochondrial apoptosis[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2280-2280.
- [35] Zhao F S, Shen H D. Analyses of the differential expression of cloned Caspase-3 and Caspase-9 genes, of *Onchidium reevesii*, exposed to extreme hot and cold conditions[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2021, 6(6): 583-592.
- [36] Wang Z L, Zhou J, Li J Y, *et al.* The immune defense response of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to temperature fluctuation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 103: 103-110.
- [37] Yi W Z, Cheng J, Wei Q N, *et al.* Effect of temperature stress on gut-brain axis in mice: regulation of intestinal microbiome and central NLRP3 inflammasomes[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 772: 144568.
- [38] Yang Q, Liang Q, Balakrishnan B, *et al.* Role of dietary nutrients in the modulation of gut microbiota: a narrative review[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 381.
- [39] Zhou X L, Xiang X W, Zhou Y F, *et al.* Protective effects of Antarctic krill oil in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 79: 104394.
- [40] 孟晓林, 聂国兴. 鱼类肠道菌群与机体脂质代谢关系研究进展[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(6): 1221-1229.
- Meng X L, Nie G X. Advances of intestinal microbiota and lipid metabolism of fish[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(6): 1221-1229 (in Chinese).
- [41] 曹永长. 鱼类低温适应机制的研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 1989.
- Cao Y C. Study on the adaptation mechanism of fish to low temperature[D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 1989 (in Chinese).
- [42] Muller P A, Schneeberger M, Matheis F, *et al.* Microbiota modulate sympathetic neurons via a gut-brain circuit[J]. *Nature*, 2020, 583(7816): 441-446.

Effects of low temperature stress on the oxidative stress, apoptosis and intestinal microbial composition in intestine of *Takifugu fasciatus*

FU Dongyong, ZHANG Yiran, CHU Peng, WANG Haozhe, ZHANG Kai,
BI Yihui, SUN Yiru, WANG Tao*, YIN Shaowu*

(Jiangsu Province Engineering Research Center for Aquatic, Animals Breeding and Green Efficient Aquacultural Technology,
College of Marine Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: In order to explore the effects of low temperature stress on intestinal oxidative stress, apoptosis and intestinal microbial composition of *Takifugu fasciatus*, experiments were conducted to measure oxidative stress, apoptosis and intestinal microbe-related indicators at 3 treatment temperatures (25, 19 and 13 °C) and 4 sampling time periods (0, 6, 24 and 96 h). Compared with the control group, the results showed that as the temperature decreased, intestinal villi underwent necrosis, hyperplasia and enlargement of goblet cells, the enzymatic activities of total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malondialdehyde (MDA) increased significantly, while the diversity of gut microbial composition decreased. Changes in gut microbial abundance, such as *Xanthobacter*, *Paracoccus*, *Lactococcus*, and *Bifidobacter* increased with decreasing temperature, *Clostridium*, *Aeromonas* and *Geobacillus* decreased with increasing temperature, and the expression of apoptosis-related genes (*caspase3*, *caspase7*, *caspase9*, *p53*, *Bax*, *Bcl-2*) increased with the decrease of temperature. In addition, we found that the alterations in the abundance of *Paracoccus* and *Geobacillus* had Pearson correlations with intestinal oxidative stress and apoptosis, which may be potential microbes to reflect whether the *T. fasciatus* is in a state of oxidative stress and apoptosis. The results of this study provide reference for the healthy breeding of *T. fasciatus*.

Key words: *Takifugu fasciatus*; low temperature; intestinal microbes; oxidative stress; apoptosis

Corresponding authors: WANG Tao. E-mail: seawater88@126.com;

YIN Shaowu. E-mail: yinshaowu@163.com

Funding projects: the "JBGS" Project of Seed Industry Revitalization in Jiangsu Province [JBGS(2021)034]; National Natural Science Foundation of China (32172948, 31800436); Jiangsu Agriculture Science and Technology Innovation Fund [CX(22)2029]; National Key Research and Development Program "Blue Granary Technology Innovation" (2018YFD0900301); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20180728, BK20210563)