

热应激对大菱鲆心肌损伤及细胞凋亡的影响

郭晓丽^{1,2,3}, 黄智慧^{2,3}, 马爱军^{2,3*}, 王庆敏^{2,3},
徐荣静⁴, 李明⁵, 陈志信⁵

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 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. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071;

4. 烟台开发区天源水产有限公司, 山东 烟台 264006;

5. 威海市中孚水产养殖有限责任公司, 山东 威海 264329)

摘要: 为解析热应激对大菱鲆心脏损伤及其机制, 实验从组织形态、生理生化反应及凋亡基因表达等多个水平, 分别使用 H.E 染色法、电镜观察法、酶活性检测法、qPCR 检测基因表达法开展了本研究。结果显示, 随着温度升高, 心肌纤维肿胀, 断裂, 间质宽度增加, 炎性细胞浸润, 线粒体结构破坏等组织损伤现象加重, 但在 24 °C-24 h 时组织损伤明显减轻; CK 活性随着热应激加剧显著升高; LDH、SOD 活性, MDA 含量在 24 °C 时达到峰值, 表明大菱鲆遭受到热应激, 心肌防御酶发挥抵抗作用, 维持机体稳态。qPCR 显示, 大菱鲆心肌细胞 *Bax* 基因和 *Caspase-3* 基因变化趋势一致, 随着热应激的加剧, 表达量降低, 而 *Bcl-2* 基因逐渐升高。表明在热应激程度较轻时, 大菱鲆心肌通过降低 *Bax*、*Caspase-3* 基因表达, 促进抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达, 减少心肌细胞丢失来减少热应激损伤。当热应激加剧至 28 °C 时, 热应激超过自身生理调节阈值, 损伤加重, 机体防御系统自身也受损, 造成大菱鲆心脏结构严重损伤甚至机体死亡。研究表明, 随着温度升高, 大菱鲆心肌损伤加重, 机体通过调节心肌防御酶活性以及使细胞凋亡, 最大限度维持稳态, 减少组织损伤。超过 24 °C 时, 则会造成机体损伤不可逆地持续加重。本研究为后续大菱鲆及其他鱼类心脏对热应激的生理适应性机制研究提供理论基础, 同时为海洋鱼类耐高温性状选育提供更多的性状指标, 提高选育精确性。

关键词: 大菱鲆; 热应激; 心肌细胞; 心脏; 凋亡

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

近年来, 全球气候变化引起的热应激已经增加^[1-2], 由于温度对所有生理过程的直接影响, 水温已成为影响水生生物养殖和生长的关键环境因素。因此养殖水温的任何变化都可能影响硬骨鱼的存活、生理功能和免疫防御^[3-4]。已有研究表明,

热应激直接影响生物的代谢, 导致代谢紊乱和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累^[5-6], 对生物体产生不利影响。

心脏被认为是具有循环系统的动物中对温度最敏感的器官^[7-8]。有学者推测心脏是热应激期间

收稿日期: 2020-11-18 修回日期: 2021-01-18

资助项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-47-G01); 国家自然科学基金 (41706168); 山东省良种工程 (2019LZGC013); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2020TD25); 烟台市科技计划项目 (2018ZDCX021)

第一作者: 郭晓丽 (照片), 从事鱼类养殖生物学与遗传育种研究, E-mail: 2536086829@qq.com

通信作者: 马爱军, 从事海水鱼类繁育与遗传育种研究, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn



第一个失效的器官^[7,9-11],一旦心脏功能无法正常发挥,则会直接限制生物的生存、生长及繁殖;并有学者证实心脏功能是设定鱼类上限热范围的重要因素,心脏可塑性的分子机制的研究可解决海洋变暖影响鱼类的生理和分布问题^[11]。在南极鱼类中也已经报道了心脏性能和代谢的热适应性^[12-13]。且越来越多的证据表明,心肌细胞的凋亡是造成心脏损伤的主要原因,进而造成鱼类死亡,而氧化应激是造成细胞凋亡的重要原因。

众所周知,热应激会使细胞中产生大量 ROS,ROS 的过度产生会破坏生物体内重要的生物分子,一旦抗氧化系统被破坏,ROS 的产生增加,导致细胞膜的脂质过氧化,这可能导致组织损伤,并最终导致重要生理过程的损害^[14]。生理表型的变化,是对包括热应激在内的外部刺激的重要反应。研究表明,热应激可能会对鱼类产生组织学损伤,并影响其正常的生理功能^[15-16]。为抵御氧化应激,心脏中也有大量心肌酶和抗氧化酶维持生物体稳态平衡,因此,通过检测生理生化指标,可指示心肌细胞在热应激下的损伤程度^[17-18]。更有证据表明,活性氧会导致心脏凋亡,并激活一些不良的级联反应,进而导致心肌细胞功能障碍^[19]。研究表明热应激诱导的氧化损伤可通过调控各种细胞类型中与凋亡相关的基因表达来影响细胞凋亡^[20-23]。在凋亡信号传导过程中,肿瘤抑制基因 *p53*、*Bax*、*Bcl-2* 和 *Caspase* 家族是重要的凋亡相关分子,这些细胞凋亡相关基因表达的动态变化可在热应激下维持细胞功能稳态。

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 是一种低温适应冷水性海洋鱼类,自 20 世纪 90 年代从欧洲引进以来,一直是中国重要的海水养殖鱼类,养殖年平均产量为 50 000~60 000 t,约占世界水产养殖大菱鲆总产量的 80%^[24]。其最适生长温度为 14~17 °C,最高生长温度为 21~22 °C,最高致死温度为 28~30 °C。雷霖林等^[25-26] 研究指出,23 °C 以上的水温条件将影响大菱鲆成活率及生长。在现代集约化工厂养殖模式下,加之全球变暖,特别是在夏季,高水温通常会持续很长时间,这会导致鱼的 ROS 和氧化应激反应达到最高值,从而造成重大的经济损失。

近年来学者研究内容大多集中在水体理化因子及各种应激对鱼类生理生化、行为影响等方面,主要研究组织为鳃、肌肉、肝脏和肾脏等,在心脏方面的研究较少,有关大菱鲆心脏对高温胁迫

的生理反应的信息更是知之甚少。因此,探究热应激对大菱鲆心脏损伤及心肌细胞凋亡的影响可更好地理解其对热应激的生理适应性的机制,为海洋鱼类耐高温性状选育提供更多的指标,提高选育精确性。本研究评估了热应激下心脏组织病理学变化(心肌结构损伤),包括:①心肌酶活性[肌酸激酶(creatine kinase, CK)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LD 或 LDH)];②抗氧化酶活性[超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)]、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量;③心肌细胞凋亡率和凋亡相关基因(*caspase-3*、*bax* 和 *bcl2*)的表达水平变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用鱼选择个体正常、健康,体质量规格为(78.0±5.6)g的大菱鲆幼鱼,来自烟台天源水产有限公司,在圆形水池(1 m 直径,1 m 深)中暂养 1 周,确保每日充气正常,盐度 30,温度恒定[(14±0.5) °C],监测实验鱼每日活力,保持鱼的正常生存,暂养期间每日投喂 1 次人工饵料,早晚各换 1 次水。

1.2 实验设计

挑选平均体质量为(78.0±5.6)g(平均值±标准差)的大菱鲆在正常条件下(14 °C,盐度 30)暂养 10 d。根据预实验结果,共设计 3 个热应激实验温度点:(14.0±0.5) °C(常温)、(24.0±0.5) °C 和 (28.0±0.5) °C;2 个时间点:12 和 24 h。根据 Ndong 等^[27] 的升温方法稍作改动:即从正常水温(14.0±0.5) °C 按每 12 个小时增加 1 °C 的速率升高至实验水温,每个温度组设置 3 个平行试验缸,每缸投放 15 尾大菱鲆幼鱼。采用静水法,恒温加热器恒定控温。实验期间不投饵,实验条件完成后,到达实验温度后 12 和 24 h 两个时间点时分别取 4 尾鱼。在每条鱼取样前立即用 MS-222 (100 mg/L) (Sigma, USA) 将鱼深度麻醉,麻醉时间约为 60 s。采用无菌方法从鱼体获取心脏组织,将其用于后续实验。

1.3 样品采集

高温处理后 12 h 时,每个温度组随机取 16 尾鱼无菌采集心脏组织,并通过以下几种方法保存:用于 H.E 染色实验的样品,保存于 4% 多聚

甲醛中；用于电镜检测的样品，用 2.5% 的戊二醛磷酸缓冲液固定；用于测定心肌酶及氧化应激指标的的心脏组织装入无酶冻存管，并快速放入液氮中；用于 q-PCR 实验检测凋亡基因表达的样品快速放入液氮中。所有实验均在冰板上进行。

1.4 实验方法

H.E 染色 将心脏组织浸没在 4% 多聚甲醛中固定约 24 h 后，换 75% 乙醇可 4 °C 长期保存。常规石蜡包埋经过脱水，再经常规脱蜡、H.E 染色，历经展片，烘片 (37 °C, 2 h)，切片风干后中性树胶封片，光学显微镜下观察显微结构。

透射电镜观察 将取出的心脏组织修成体积为 1 mm³ 左右的小块，每个样品准备 3 块，放入含 2.5% 的戊二醛固定液的 2 mL 圆底离心管内，低温 (4 °C) 固定，送至青岛大学医学部电镜室完成切片制作，透射电镜下进行超微结构观察。

酶活性测定 心脏组织 CK 活性采用紫外分光光度计，LDH、SOD 活性和 MDA 含量采用生化酶标仪进行测定，检测程序按照南京建成生物工程研究所各试剂盒步骤完成。

实时荧光定量 PCR 检测凋亡基因表达 用总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取冻存的心脏组织总 RNA，然后按照南京诺唯赞生物公司 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 说明书操作合成 cDNA，并根据基因 *Bax*、*Bcl-2* 和 *Caspase-3* 的序列，用 Premier 5.0 软件设计引物荧光定量 PCR，测定 *Bax*、*Bcl-2* 和 *Caspase-3* 的表达变化，所用引物列于表 1，按照北京全式金生物有限公司 TransStart Top Green qPCR SuperMix 说明书操作配置荧光定量体系，荧光定量 PCR 采用两步法在仪器 Step One Plus Real-Time PCR System 中进行，反应体系列于表 2。

1.5 数据分析

实验数据利用 Excel 2007 和 SPSS 20.0 统计软件进行处理，以平均值±标准误表示，采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 法分析， $P < 0.05$ 为差异显著， $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 热应激下心脏组织显微结构变化

利用 H.E 染色方法观察热应激对心脏组织的影响，结果显示，正常温度 14 °C 下，心肌纤维较细，排列较为正常，整齐、纹理清晰，无碰撞

表 1 荧光定量引物序列

引物名称 primer name	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')
<i>Bax</i> -F1	catcattgagcgggtcgg
<i>Bax</i> -R1	gcttctgtggtggggtc
<i>Bcl-2</i> -F1	attgtgaaaagtacatctgcc
<i>Bcl-2</i> -R1	catcttcatctcgacatc
<i>Caspase-3</i> -F1	aagtgaaggtttacaatgaccagac
<i>Caspase-3</i> -R1	acagaacgcacacgaacgag
18S-F1 ^[28]	GTGGAGCGATTTGTCTGGTT
18S-R1 ^[28]	CTCAATCTCGTGTGGCTGAA

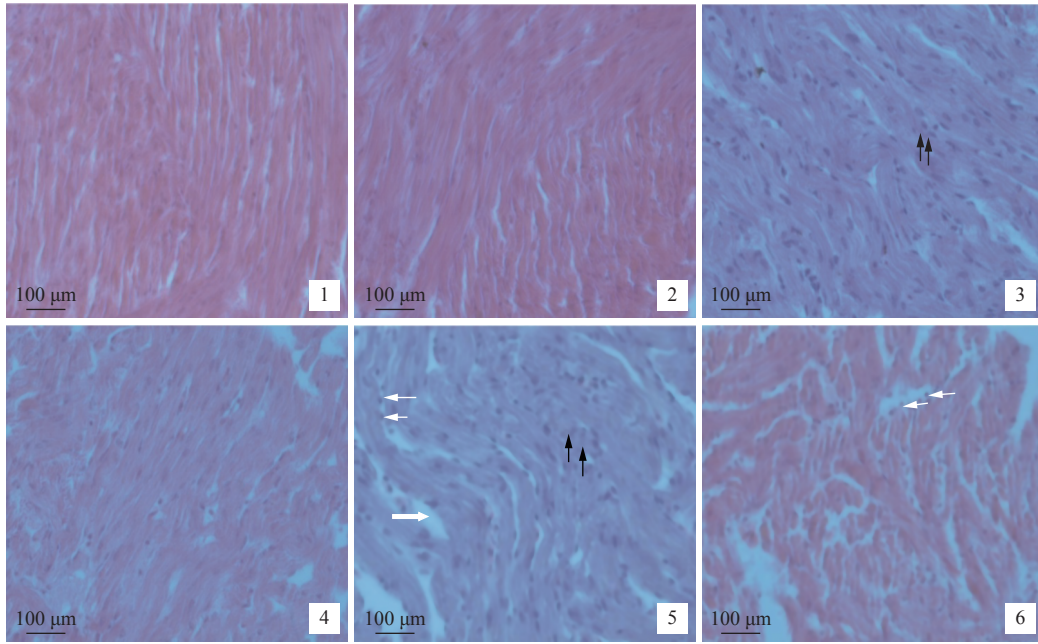
表 2 荧光定量 PCR 反应体系

组分 component	用量/ μ L dosage
热启动酶 2 \times TransStart top green qPCR Super Mix	10.0
上游引物 F(10 μ mol/L) forward primer	0.4
下游引物 R(10 μ mol/L) reverse primer	0.4
染料 passive reference dye(50 \times)	0.4
模板 c DNA	2.0
蒸馏水 ddH ₂ O	6.8
总反应体积 total volume	20.0

断裂现象，尚可见细胞核 (图版 I，图版 II-2)。在 24 °C 热应激下，12 h 时，大部分心肌细胞正常，心肌纤维加粗，细胞核明显突出可见，核膜和染色质固缩，染色加深，可见少量肌纤维水变性和透明样变，心肌间距变宽，并可见血管扩张充血 (图版 I-3)；24 h 时，可观察到心肌细胞和心肌纤维与对照组相比变化不显著 (图版 I-4)。在 28 °C 热应激下，12 h 时，细胞核突出可见，间质空间进一步扩张，肌纤维断裂和排列紊乱现象加重，有少量炎细胞浸润 (图版 I-5)；24 h 时，心肌纤维断裂及样变现象、炎细胞浸润现象均明显加重 (图版 I-6)。

2.2 热应激下心脏组织超微结构变化

利用透射电镜方法观察热应激对心脏组织超微结构的影响，结果显示，正常温度 14 °C 下，可见排列整齐的肌节，肌丝，大量线粒体，以及结构完整、嵴发育良好以及清晰可见的糖原颗粒分布 (图版 I，图版 II)。在 24 °C 热应激下，12 h 时，少数心脏线粒体出现线粒体膜肿胀，嵴部分溶解、空泡化现象 (图版 II-3)；24 h 时，心脏线



图版 I 热应激下大菱鲆心脏组织光学显微结构变化

1. 14 °C-12 h, 2. 14 °C-24 h, 3. 24 °C-12 h, 细胞核染色加深, 明显突出 (向上黑色箭头); 4. 24 °C-24 h, 5. 28 °C-12 h, 白色向左箭头指向为炎细胞, 白色右箭头指向为肌质间距, 细胞核染色加深并明显突出 (向上黑色箭头); 6. 28 °C-24 h, 白色向左箭头指向为炎性细胞浸润

Plate I Light micrographs of heart tissue of *S. maximus* under thermal stress

1. 14 °C-12 h, 2. 14 °C-24 h, 3. 24 °C-12 h, nucleus (upward black arrow); 4. 24 °C-24 h; 5. 28 °C-12 h, the white thin arrow points to inflammatory cells, the white thick arrow points to the sarcoplasmic distance, nucleus (upward black arrow); 6. 28 °C-24 h, the white arrow points to infiltration of inflammatory cells

粒体空泡化减轻, 变形现象加重, 糖原颗粒聚集在变形线粒体周围 (图版 II -4)。在 28 °C 热应激下, 12 h 时, 心脏线粒体空泡化数目增多 (图版 II -5); 24 h 时, 线粒体嵴断裂, 线粒体破坏和塌陷, 出现完全空泡化的现象 (图版 II -6)。

2.3 热应激下心脏组织生化指标变化

热应激下心脏心肌酶指标的变化 随着温度的升高, CK 活性总体呈上升趋势, 差异显著。而 LDH 活性变化趋势为先升高后降低, 差异显著 (图 1)。

热应激下心脏组织氧化应激指标的变化

结果显示, 热应激下, 大菱鲆心脏 SOD 水平先升高后降低, 在 24 °C, 12 h 达到最高水平, 然后呈下降趋势, 差异显著, 与对照组水平相当, 总体呈先上升后下降趋势。MDA 含量总体变化与 SOD 变化水平一致。在 24 °C, 12 h 时, MDA 含量达到最高值, 然后下降 (图 2)。

2.4 热应激下心脏中 *Bax*、*Bcl-2* 及 *Cas-3* 基因的表达变化

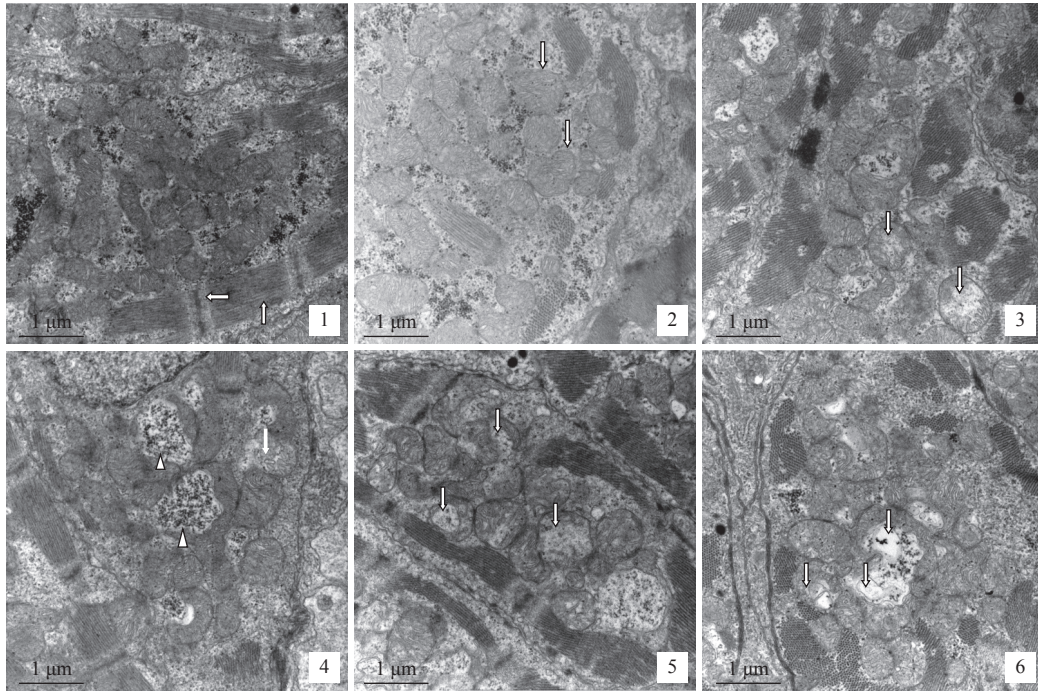
采用实时荧光定量 PCR 方法测定了热应激下

大菱鲆心脏相关凋亡基因 *Bax*、*Bcl-2* 及 *Caspase-3* 的 mRNA 表达水平 (图 3)。随着温度的升高, 促凋亡基因 *Bax* 表达量明显降低, 至 24 °C 时显著减少。抗凋亡基因 *Bcl-2* 表达水平随着温度升高而升高, 至 24 °C 达到最大值, 随后保持恒定。*Caspase-3* 基因的表达趋势则与 *Bax* 基因变化趋势保持一致。

3 讨论

3.1 热应激对大菱鲆心肌结构的影响

心脏主要是由心肌细胞行使其功能, 心肌细胞的完整性是实现心脏不断收缩和泵血进而行使心脏功能的重要前提^[29]。心脏线粒体代谢提供了心肌收缩运动所需的 90% 的 ATP^[30]。功能失调的线粒体将停止提供足够的能量供应, 导致心力衰竭进而导致机体死亡^[31]。结果表明, 在 24 °C 热应激下 12 h 内, 心肌细胞随着热应激时间延长, 心肌纤维出现加粗、肿胀、透明样变、染色质固缩, 表明心肌细胞在热应激下收缩能力增强, 增加机体散热以维持生理活动, 线粒体出现空泡化指示其结构受到轻微损伤。而在 24 °C 热应激下



图版 II 热应激下大菱鲂心肌细胞透射电镜超微结构变化

1. 14 °C-12 h, 向上的白色箭头指向为肌节, 向左白色箭头指示为肌丝; 2. 14 °C-24 h, 向下白色箭头指向为正常线粒体; 3. 24 °C-12 h, 向下白色箭头指向为线粒体膜肿胀, 嵴部分溶解和线粒体空泡化; 4. 24 °C-24 h, 白色三角形标志为糖原颗粒聚集, 白色箭头指向为线粒体膜溶解, 线粒体变形; 5. 28 °C-12 h, 白色箭头指向为大面积空泡化线粒体; 6. 28 °C-24 h, 白色箭头指向破坏, 塌陷, 完全空泡化的线粒体

Plate II Transmission electron micrographs of cardiomyocyte of *S. maximus* under thermal stress

1. 14 °C-12 h, the upward white arrow points to sarcomere, white arrow to the left points to myofibril; 2. 14 °C-24 h, the downward white arrow points to normal mitochondria; 3. 24 °C-12 h, the downward white arrow points to the swelling mitochondrial membrane, partially dissolution of cristae and vacuolation mitochondrial; 4. 24 °C-24 h, the white triangle marks the aggregation of glycogen particles, the white arrow points to the distortion of mitochondrial membrane and ill-differentiated mitochondrial; 5. 28 °C-12 h, white arrow points to large area vacuolated mitochondria; 6. 28 °C-24 h, white arrow points to damaged, collapsed and fully vacuolated mitochondria

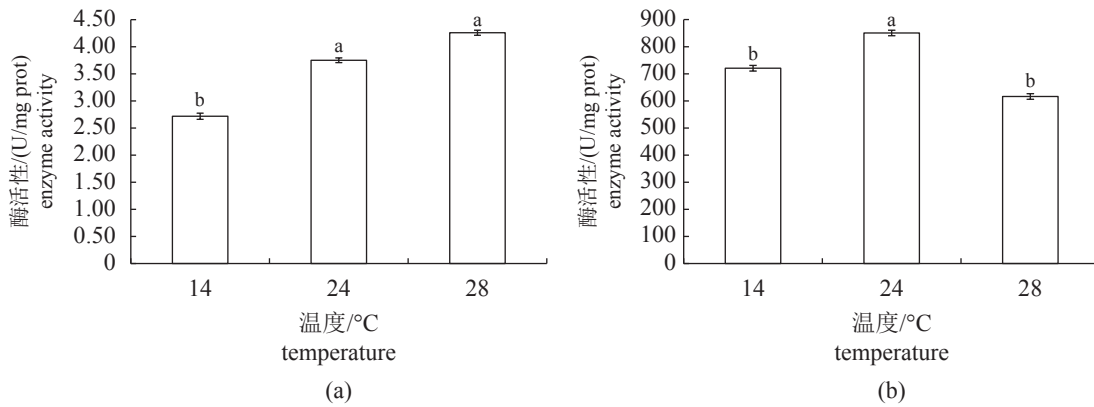


图 1 热应激下 12 h 时大菱鲂心脏 CK (a) 和 LDH (b) 的变化

不同字母代表差异显著, $P < 0.05$, 下同

Fig. 1 Changes of heart CK (a) and LDH (b) activities in *S. maximus* under thermal stress

Different lowercases indicate significant difference, $P < 0.05$, the same below

24 h 时, 心肌纤维的粗细、细胞核颜色深浅及间质宽距与对照组相比无明显变化, 且无可见线粒体结构破坏现象, 推测是大菱鲂在该条件下由于

机体自身的稳态平衡机制可维持其稳态, 是一种维持机体稳态的生理反应。而在 28 °C 下, 12~24 h, 心肌间质宽距进一步加大, 炎细胞浸润现象明显

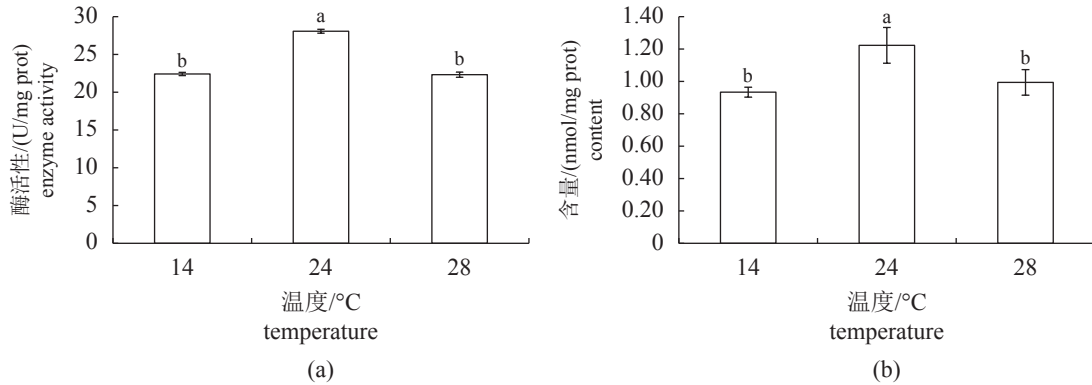


图 2 热应激下 12 h 时大菱鲆心脏 SOD (a) 和 MDA (b) 的变化

Fig. 2 Changes of heart SOD (a) and MDA (b) activities in *S. maximus* under thermal stress

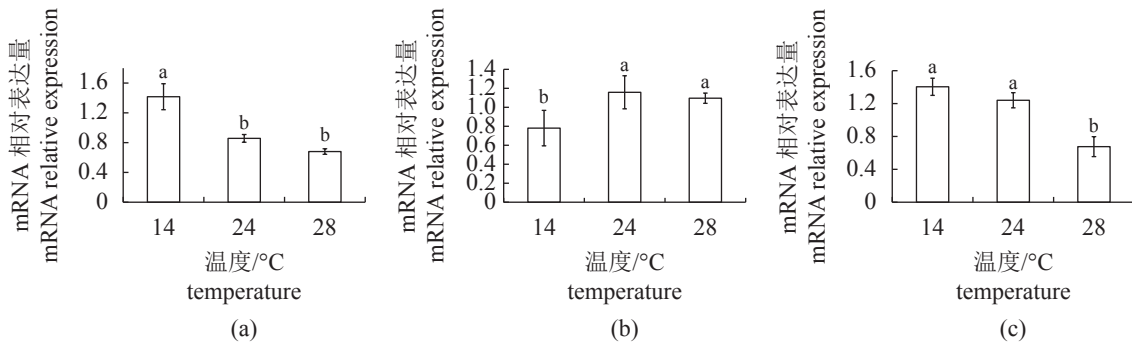


图 3 热应激下 12 h 时大菱鲆心脏细胞凋亡相关基因 Bax (a)、Bcl-2 (b) 及 Caspase-3 (c) 的表达量

Fig. 3 mRNA expression changes of apoptosis related gene Bax (a), Bcl-2 (b) and Caspase-3 (c) under thermal stress in *S. maximus* heart

加重, 心肌纤维排列紊乱, 断裂数目增加, 线粒体破坏, 塌陷面积增加, 空泡化加重, 表明心脏组织受到严重的热应激损伤, 线粒体供能与能量代谢利用出现明显障碍。这与吴鑫杰等^[32]研究中低氧胁迫导致团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 心脏组织结构损伤一致; 此外, 大鼠心肌在高温下也表现出心肌纤维断裂, 排列紊乱的损伤现象^[33]。因此, 适应条件下的高温环境会使大菱鲆心肌自身调节以维持稳态, 严重的高温环境则会使心肌线粒体结构破坏, 心肌细胞能量利用障碍, 舒张能力减弱, 导致心肌受损, 机体各器官缺血缺氧, 最终可能会导致器官障碍甚至机体死亡。

3.2 热应激对大菱鲆心脏 CK、LDH、SOD 和 MDA 的影响

为抵消热应激引起的氧化应激, 维持细胞自身的氧化还原状态平衡, 细胞已进化出各种抗氧化剂防御作用, 包括 SOD、CAT 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 等^[34], SOD 是其中有效、关键的抗氧化酶, 可清除活性

氧, 维持细胞内氧化还原状态平衡和体内稳态, 是指示氧化应激水平的可靠氧化应激指标。由此过度的应激引发脂质过氧化作用导致细胞膜的氧化损伤, 产生有毒物质 MDA, 亦被认为是反映氧化应激水平的生物标志物^[35]。同时心脏组织中含有丰富的心肌酶, 其中的 LDH、CK 与心肌组织的收缩装置紧密结合, 在心脏能量代谢中起关键作用, 对鱼类的生存至关重要。这些酶的水平是用于反映受损心肌功能状态的公认标志物^[36]。随着温度升高, 热应激加剧, CK 活性总体呈上升趋势, 表明热应激确实造成了大菱鲆心脏损伤, 发挥抵抗作用。这与低氧应激导致鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 心脏 CK 活性升高趋势一致, 表明氧化应激的加剧导致心脏器官损伤^[18]。LDH 是糖酵解途径的末端酶, 其可逆地催化乳酸转化为丙酮酸, 是无氧呼吸的关键代谢酶, 其亦被认为是评估环境压力的潜在标志物。可以看出, LDH 活性随着热应激加剧, 至 24 °C 呈升高趋势, 表示心脏在热应激下有氧利用得到限制, 无氧呼吸加强, 在 28 °C 时明显降低可能是由于除细胞呼

吸外, 发酵急性热应激也抑制了无氧条件下 ATP 产生的过程, 而后鱼体在此时最后还可以最大程度调节 LDH, 维持机体稳态。这与罗氏南极鱼 (*Notothenia rossii*) 在 8 °C 热应激下 LDH 随着热应激加剧变化的趋势一致^[37]。与此结合, 机体通过升高 SOD 活性以降低 ROS 对机体的损伤, 但当达到严重高温 28 °C 下, 随着时间延长, SOD 活性降低, MDA 水平已降低至对照组水平, 表明机体可能已受到严重损伤, 无法调节抗氧化酶以维持机体稳态, 产生的 MDA 也较少。SOD 的升高与先前高温应激对项带重牙鲷 (*Diplodus vulgaris*)^[38]、博氏南冰鲱 (*Pagothenia borchgrevinkii*)^[39]、暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*)^[23]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[40]、吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[41] 的研究结果一致, 表明抗氧化酶的升高可以有效防治热应激引起的氧化损伤。但在本研究中, 心脏 MDA 的水平变化与已报道的罗氏南极鱼和南极鳕 (*N. coriiceps*) 的研究结果相反, 推测其原因是南极鱼类心脏具有更高水平的抗氧化酶活性^[42-44]。因此, 该研究表明随着热应激加剧, ROS 产生过多, 机体会调节关键抗氧化酶、心肌酶以抵御应激带来的损伤, 在严重高温下, 酶本身也会遭受破坏而导致无法调节。

3.3 热应激诱导凋亡调控基因 *Bax*、*Bcl-2* 及 *Caspase-3* 的表达变化

细胞凋亡是一个高度组织化的过程, 其特征在于精确途径的逐渐激活, 导致特定的生化和形态学改变^[45], 更是鱼类体内细胞稳态、免疫防御和发育过程的关键调节因子^[21, 46]。热应激诱导的氧化损伤可通过调控各种细胞类型中与凋亡相关的基因表达来影响细胞凋亡^[20, 47-50]。*Bax* 是一种凋亡蛋白, 位于线粒体的外膜, 可诱导细胞色素 *c* 释放到细胞质中。抗凋亡蛋白 *Bcl2* 抑制线粒体中细胞色素 *c* 的释放^[51]。半胱天冬酶 3 是主要的“效应半胱天冬酶”, 其在外在的 (死亡受体介导的) 和固有的 (线粒体来源的) 凋亡途径中执行凋亡的最后步骤^[52]。*bax/bcl-2* 比值的降低是与凋亡或细胞死亡相关的决定性因素^[53-54]。本研究 q-PCR 结果显示, 随着温度升高, *Bax* 基因表达量随着热应激加剧, 表达水平显著降低, *Bcl-2* 基因表达自 14 °C 后开始升高, 至 24 °C 达到最大值而后趋于稳定, *Caspase-3* 基因表达变化趋势则与 *Bax* 表达变化趋势一致。这与 Jia 等^[55] 研究的大菱鲆幼鱼、暗纹

东方鲀^[23]肝细胞在高温胁迫下 *p53*、*bax* 和 *Caspase-3* 的上调趋势相反, 推测可能为心脏是生物体面对热应激的核心, 由于心肌细胞是终末分化细胞, 不再有再生能力, 即使轻微的损伤也会导致心肌细胞丢失而造成心脏泵功能不可逆地降低^[29]。作为一特殊器官, 其凋亡通路通过降低促凋亡基因 *Bax* 及效应凋亡基因 *Caspase-3* 的表达, 升高抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达, 尽量保证心肌细胞的完整性与数量以维持心脏稳态, 但可表明 *p53*-*Bax*-*Bcl2* 和 *Caspase* 依赖的凋亡途径参与了高温胁迫诱导机体细胞凋亡。这表明热应激诱导了凋亡途径的激活, 在心脏中促凋亡基因表达降低, 效应凋亡基因同时发挥作用, 超出耐受阈值的氧化应激, 导致负面的生理反馈; 抗凋亡基因表达的升高可能是由于机体遭受应激, 为保证心肌细胞不会大量死亡, 从而发挥抗凋亡作用。

综上所述, 热应激可诱导大菱鲆心脏组织的形态和生化变化。实验发现热应激引起其心脏不同程度的组织学改变, 线粒体结构遭到破坏, 影响氧化防御酶和心肌功能酶 (SOD、CK、LDH) 的活性, 并增加心脏中 MDA 的含量。通过降低促凋亡基因 *Bax*、凋亡效应基因 *Caspase-3* 的表达, 升高抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达来减少心肌细胞凋亡损失, 这些结果意味着大菱鲆心脏对热应激敏感, 表明大菱鲆心脏在热应激下受到氧化应激损伤, 可通过调节防御酶的活性, 调控凋亡通路中的关键基因表达等来维持体内稳态。当机体处于热应激 24 °C 时, 组织损伤明显减轻, 机体以最大限度维持稳态; 当温度超过 24 °C, 热应激胁迫加剧, 当超过心脏耐热应激阈值, 机体防御机制也会自身受损, 心肌损伤加重, 心脏性能受到严重破坏, 造成负生理反馈, 可能导致器官障碍, 造成鱼类死亡。本研究结果可为了解大菱鲆心脏在热应激下的生理生化适应性和分子机制提供依据, 提供更多生理生化耐热性指标, 从而提高大菱鲆耐高温性状选择性育种的精确性, 以便制定长期的可持续策略, 对其进行有效管理, 也为研究其他鱼类在热应激下的心脏生理适应性机制提供参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Jentsch A, Kreyling J, Beierkuhnlein C. A new generation of climate-change experiments: events, not
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- trends[J]. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2007, 5(7): 325-374.
- [2] Maulvault A L, Barbosa V, Alves R, *et al.* Ecophysiological responses of juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to increased temperature and dietary methylmercury[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 586: 551-558.
- [3] Bowden T J. Modulation of the immune system of fish by their environment[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(4): 373-383.
- [4] Lee S, Ji K, Choi K. Effects of water temperature on perchlorate toxicity to the thyroid and reproductive system of *Oryzias latipes*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 108: 311-317.
- [5] Bhat S, Desai P V. Effect of thermal and salinity stress on *Perna viridis* heart (L.) [J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1998, 36(9): 916-919.
- [6] Rajagopal S, Van der Gaag M, Van der Velde G, *et al.* Upper temperature tolerances of exotic brackish-water mussel, *Mytilopsis leucophaea* (Conrad): an experimental study[J]. *Marine Environmental Research*, 2005, 60(4): 512-530.
- [7] Farrell A P. Effects of temperature on cardiovascular performance[M]//Wood C M, McDonald D G. *Global warming: implications for freshwater and marine fish*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997: 135-158.
- [8] Farrell A P, Jones D R. *The heart*[M]//Hoar WS, Randall D J, Farrell A P. *Fish physiology*. San Diego: Academic Press, 1992: 1-88.
- [9] Farrell A P. Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: insights into cardiovascular design limitations in fishes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 132(4): 797-810.
- [10] Somero G N. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2002, 42(4): 780-789.
- [11] Iftikar F I, Morash A J, Cook D G, *et al.* Temperature acclimation of mitochondria function from the hearts of a temperate wrasse (*Notolabrus celidotus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2015, 184: 46-55.
- [12] Seebacher F, Davison W, Lowe C J, *et al.* A falsification of the thermal specialization paradigm: compensation for elevated temperatures in Antarctic fishes[J]. *Biology Letters*, 2005, 1(2): 151-154.
- [13] Franklin C E, Davison W, Seebacher F. Antarctic fish can compensate for rising temperatures: thermal acclimation of cardiac performance in *Pagothenia borchgrevinkii* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2007, 210(17): 3068-3074.
- [14] Manduzio H, Rocher B, Durand F, *et al.* The point about oxidative stress in molluscs[J]. *Invertebrate Survival Journal*, 2005, 2(2): 91-104.
- [15] Rojas L M, Mata C, Oliveros A, *et al.* Histology of gill, liver and kidney in juvenile fish *Colossoma macropomum* exposed to three temperatures[J]. *Revista de Biología Tropical*, 2013, 61(2): 797-806.
- [16] Liu Y F, Ma D Y, Zhao C Y, *et al.* Histological and enzymatic responses of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and its hybrids (*P. olivaceus* ♀ × *P. dentatus* ♂) to chronic heat stress[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(4): 1031-1041.
- [17] 胡利双. 低氧对鲢生理生化指标和心肌细胞凋亡的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- Hu L S. Effects of hypoxia on physiological and biochemistry indexes and cardiomyocyte apoptosis in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [D]. Chongqing: Southwest University, 2017 (in Chinese).
- [18] 丁晨雨, 胡利双, 李云, 等. 低氧胁迫对鲢心肌细胞凋亡及其调控基因 *Bax*、*Bcl-2* 表达的影响[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(2): 10-15.
- Ding C Y, Hu L S, Li Y, *et al.* Effects of hypoxia stress on cardiomyocyte apoptosis and the control for *Bax*, *Bcl-2* expressions in *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(2): 10-15 (in Chinese).
- [19] Liu J J, Li D L, Zhou J, *et al.* Acetylcholine prevents angiotensin II-induced oxidative stress and apoptosis in H9c2 cells[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(1): 94-103.
- [20] Cheng C H, Yang F F, Liao S A, *et al.* High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2015, 53: 172-179.
- [21] Sun J L, Zhao L L, Liao L, *et al.* Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 923-936.
- [22] Wang J, Dong B, Yu Z X, *et al.* The impact of acute thermal stress on green mussel *Perna viridis*: oxidative

- damage and responses[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2018, 222: 7-15.
- [23] Cheng C H, Guo Z X, Luo S W, *et al.* Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 150: 190-198.
- [24] Jia Y D, Lei J L. Molecular function of gonadotrophins and their receptors in the ovarian development of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 277: 17-19.
- [25] 雷霖霖. 大菱鲆养殖技术 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- Lei J L. Culture technology of turbot [M]. Second edition. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2005 (in Chinese).
- [26] 雷霖霖, 刘新富. 大菱鲆 *Scophthalmus maximus* L. 引进养殖的初步研究[J]. *现代渔业信息*, 1995, 10(11): 1-3.
- Lei J L, Liu X F. An primary study on culture of turbot, *Scophthalmus maoticus* L.[J]. *Modern Fisheries Information*, 1995, 10(11): 1-3 (in Chinese).
- [27] Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H, *et al.* The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(6): 686-694.
- [28] Cui W X, Ma A J, Huang Z H, *et al.* myo-inositol facilitates salinity tolerance by modulating multiple physiological functions in the turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Aquaculture*, 2020, 527: 735451.
- [29] 雷雯雯. 镉对长江化溪蟹心脏组织器官的毒性作用及机制研究 [D]. 太原: 山西大学, 2012.
- Lei W W. Effects of cadmium on the heart of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2012 (in Chinese).
- [30] Christen F, Desrosiers V, Dupont-Cyr B A, *et al.* Thermal tolerance and thermal sensitivity of heart mitochondria: mitochondrial integrity and ROS production[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 116: 11-18.
- [31] Neubauer S. The failing heart—an engine out of fuel[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2007, 356(11): 1140-1151.
- [32] 吴鑫杰, 陈楠, 黄春筱, 等. 低氧对团头鲂心肌细胞凋亡及抗氧化酶活性的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(3): 108-113.
- Wu X J, Chen N, Huang C X, *et al.* Effects of hypoxia on cardiomyocyte apoptosis and activity of antioxidant enzymes in *Megalobrama amblycephala* heart[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2016, 35(3): 108-113 (in Chinese).
- [33] 高俊涛, 万朋, 王春艳, 等. 高温环境对大鼠心功能的损伤作用[J]. *环境与职业医学*, 2016, 33(3): 243-246.
- Gao J T, Wang P, Wang C Y, *et al.* Cardiac injury to rat in high temperature environment[J]. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 2016, 33(3): 243-246 (in Chinese).
- [34] Jing L L, Li Q, He L, *et al.* Protective effect of tempol against hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in H9c2 cells[J]. *Medical Science Monitor Basic Research*, 2017, 23: 159-165.
- [35] Liu X L, Xi Q Y, Yang L, *et al.* The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 495-500.
- [36] Jovanović S, Jovanović A. Models of cardioprotection[J]. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2007, 4(4): 185-190.
- [37] de Souza M R D P, Herrerias T, Zaleski T, *et al.* Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: carbohydrate metabolism and antioxidant defence[J]. *Biochimie*, 2018, 146: 43-55.
- [38] Madeira D, Narciso L, Cabral H N, *et al.* Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 166(2): 237-243.
- [39] Almroth B C, Asker N, Wassmur B, *et al.* Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2015, 468: 130-137.
- [40] 姜旭阳, 黄铭, 杨小刚, 等. 急性高温胁迫对虹鳟和硬头鳟幼鱼抗氧化酶活性的影响[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(1): 57-65.
- Jiang X Y, Huang M, Yang X G, *et al.* Antioxidant enzyme activities of juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to acute high-temperature stress[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(1): 57-65 (in Chinese).
- [41] 杨洪帅, 王辉, 刘加慧, 等. 高温对吉富罗非鱼幼鱼生

- 长及超氧化物歧化酶、乳酸脱氢酶活力的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2014, 34(1): 15-20.
- Yang H S, Wang H, Liu J H, *et al.* Effect of high temperature on the growth and enzyme activities of superoxide dismutase and lactate dehydrogenase of GIFT Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2014, 34(1): 15-20 (in Chinese).
- [42] Machado C, Zaleski T, Rodrigues E, *et al.* Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 172-173: 21-28.
- [43] Grim J M, Simonik E A, Semones M C, *et al.* The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 164(2): 383-390.
- [44] Enzor L A, Place S P. Is warmer better? Decreased oxidative damage in notothenioid fish after long-term acclimation to multiple stressors[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(18): 3301-3310.
- [45] Gao D, Xu Z E, Zhang X Y, *et al.* Cadmium triggers kidney cell apoptosis of purse red common carp (*Cyprinus carpio*) without caspase-8 activation[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 728-737.
- [46] Galluzzi L, Maiuri M C, Vitale I, *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2007, 14(7): 1237-1243.
- [47] Cui Z G, Piao J L, Rehman M U R, *et al.* Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by withaferin A[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 723: 99-107.
- [48] Bettaieb A, Averill-Bates D A. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 °C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2015, 1853(1): 52-62.
- [49] Lecchi C, Rota N, Vitali A, *et al.* *In vitro* assessment of the effects of temperature on phagocytosis, reactive oxygen species production and apoptosis in bovine polymorphonuclear cells[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2016, 182: 89-94.
- [50] Anderso K, Luckenbach J A, Yamamoto Y, *et al.* Impacts of Fsh, Igf1, and high temperature on the expression of genes involved in steroidogenesis, cell communication, and apoptosis in isolated coho salmon previtellogenic ovarian follicles[J]. *Aquaculture*, 2019, 506: 60-69.
- [51] Maes M E, Schlamp C L, Nickells R W. BAX to basics: how the *BCL2* gene family controls the death of retinal ganglion cells[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2017, 57: 1-25.
- [52] AnvariFar H, Amirkolaie A K, Jalali A M, *et al.* Environmental pollution and toxic substances: cellular apoptosis as a key parameter in a sensible model like fish[J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 204: 144-159.
- [53] Kim B S, Jung S J, Choi Y J, *et al.* Effects of different light wavelengths from LEDs on oxidative stress and apoptosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) at high water temperatures[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 460-468.
- [54] Kim H G, Song H, Yoon D H, *et al.* *Cordyceps pruinosa* extracts induce apoptosis of HeLa cells by a caspase dependent pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 128(2): 342-351.
- [55] Jia Y D, Chen X T, Wang Z Y, *et al.* Physiological response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*. L) during hyperthermal stress[J]. *Aquaculture*, 2020, 529: 735645.

Effects of thermal stress on turbot (*Scophthalmus maximus*) myocardial injury and apoptosis

GUO Xiaoli^{1,2,3}, HUANG Zhihui^{2,3}, MA Aijun^{2,3*}, WANG Qingmin^{2,3},
XU Rongjing⁴, LI Ming⁵, CHEN Zhixin⁵

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China;

3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology,

Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China;

4. Tianyuan Fisheries Co., Ltd., Yantai 264006, China;

5. Weihai Zhongfu Aquaculture Co., Ltd., Weihai 264329, China)

Abstract: *Scophthalmus maximus* is an economic fish adapted to cold water at low temperature and high temperature severely affects its growth and survival. Scholars have confirmed that heart function is an important factor in setting the upper limit of heat range for fish. The present study aimed to investigate the damage of thermal stress on turbot heart and its mechanism in terms of physiologic, biochemical response and apoptosis gene expression levels. In this study, we investigated the characterization and mechanism response to thermal stress in the heart, using H.E staining, electron microscopic observation, enzyme activity detection and qPCR. The results showed that the aggravated degrees of swelling and breakage of myocardial fiber, dilatation of interstitial space, inflammatory cell infiltration, mitochondrial structure destruction and other tissue damage with the elevated temperature, but the tissue damage was significantly reduced at 24 °C-24 h. CK activity increased significantly with the escalation of thermal stress; LDH, SOD activity and MDA content reached their peak at 24 °C. Expression levels of *Bax* and *Caspase-3* decreased significantly after thermal stress, while, the expression level of *Bcl-2* gradually increased. These results indicated that the myocardium could reduce the expression of *Bax* and *Caspase-3* genes and promote the expression of the anti-apoptotic gene *Bcl-2* to reduce the loss of myocardial cells to reduce thermal stress damage when it suffered a lesser degree of heat stress. This suggested that thermal stress causes the heart defense enzymes to exert resistance to maintain body homeostasis. The organism defense system itself is damaged because the heat stress exceeds its own physiological regulation threshold when the heat stress intensifies to 28 °C, causing severe damages of heart structure and even leads to death in turbot. The results showed that thermal stress causes myocardial damage of turbot, and the body maintains homeostasis via regulating the activity of defense enzymes and apoptosis pathway related genes. This study provides a theoretical basis for subsequent research of the physiological adaptation mechanism of turbot's and other fishes' heart against thermal stress. At the same time, it provides more trait indicators for the high temperature tolerance traits to improve the breeding accuracy of marine fish.

Key words: *Scophthalmus maximus*; thermal stress; cardiomyocytes; heart; apoptosis

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

Funding projects: Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-47-G01); National Natural Science Foundation of China (41706168); Agricultural Fine Breed Project of Shandong (2019LZGC013); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD25); Scientific and Technological Project of Yantai (2018ZDCX021)