



低温对四川华鲮卵巢发育的影响及调控

刘楠楠, 程新凯, 杨洋, 刘娟, 辜浩然, 王志坚*

(西南大学生命科学学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室,

水产科学重庆市重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 为探究低温对四川华鲮卵巢发育的影响及调控方式, 实验对其产卵后雌鱼进行了 11 °C 的低温饲养 (LT 组), 为期 2 周, 并与 26 °C 条件下 (OT 组) 其卵巢发育状况进行对比。通过形态学和组织学观察发现, LT 组卵巢发育被抑制, 发生退化, 卵母细胞明显发育不良, 出现典型闭锁卵泡的特征。对雌鱼血清中的激素水平及卵巢中相应受体基因的表达水平进行测定, 发现低温使 FSH 和 DHP 水平显著下降, 并严重抑制激素受体基因 *fshr*、*lhcg*、*pgr*、*esr1* 和 *ar* 的表达。通过转录组测序和分析发现, 在低温处理过程中, 类固醇激素合成、细胞生长增殖以及凋亡和自噬相关通路被显著富集, 与低温的影响显著相关。低温使类固醇激素合成和卵母细胞发育相关基因 (*StAR*、*cyp17a1*、*hsd3b*、*cyp19a2*、*hsd17b1*、*vtg1*、*zp4*、*mmp9* 和 *mmp15*), 以及细胞生长增殖和抗凋亡相关基因 (*ccni*、*cdk16*、*igf1r*、*egfr*、*nobox* 和 *bcl2*) 的表达下调, 促凋亡基因 (*bax*、*tnf* 和 *tp53*) 的表达上调。研究表明, 低温之所以导致四川华鲮卵泡闭锁, 一方面可能是由于低温抑制生殖激素的合成和受体基因的表达, 使卵巢发育和卵母细胞生长增殖受限; 另一方面, 可能是由于低温促使卵泡发生自噬凋亡, 最终导致卵泡发生退化闭锁。此研究为四川华鲮的保护生物学研究和人工繁殖提供了理论基础。

关键词: 四川华鲮; 低温; 卵泡闭锁; 生殖激素; 凋亡和自噬

中图分类号: S 965.1

文献标志码: A

四川华鲮 (*Sinibrama taeniatus*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鲃亚科 (Cultrinae) 华鲮属 (*Sinibrama*), 是长江上游特有的一种小型经济鱼类。由于其分布范围狭窄、人为捕捞和水利设施修建等原因, 部分地区的野生种群已经出现小型化趋势^[1]。人工增殖放流是改善鱼类野生资源下降的有效手段。四川华鲮抗病性强、耐受温度广, 人工饲养和繁殖已经取得初步成功。前期研究发现, 四川华鲮在 26 °C 的水温条件下其繁殖周期大约为 14 d, 但是在自然环境中其 1 年仅在春季和秋季各繁殖 1 次^[2], 其中低温是限制

其在冬季繁殖的主要因素。本实验室在饲养四川华鲮时, 发现低温会使产卵后雌鱼性腺成熟指数 (gonadosomatic index, GSI) 增长变慢, 尤其当温度低于 11 °C 以后, 会使其 GSI 不断下降。但目前低温抑制四川华鲮雌鱼繁殖的原因及其内在机制还有待进一步研究。

鱼类作为一种变温动物, 温度对其繁殖有显著影响。适当提高温度可以促进卵巢发育^[3], 但是应存在一个适宜的温度^[4]。温度过高则不利于卵巢发育, 会使卵巢发生退化闭锁^[5-6]。温度过低也会抑制卵巢发育, 在库达海马 (*Hippocampus kuda*)

收稿日期: 2021-01-08 修回日期: 2021-02-18

资助项目: 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项 (cstc2017shms-zdyf0201)

第一作者: 刘楠楠 (照片), 从事鱼类生理学研究, E-mail: 2840602492@qq.com

通信作者: 王志坚, 从事资源动物学研究, E-mail: wangzj1969@126.com



中, 幼鱼在 18 和 20 °C 条件下饲养时, 卵巢发育停滞于 II 期或 III 期状态^[3]。研究发现, 水温可以通过影响生殖激素的分泌进而对鱼类卵巢的发育产生影响, 在一定范围内, 随着温度升高, 性类固醇激素水平会不断升高^[7]。但过高的温度会抑制芳香化酶的表达^[8-9], E₂ 水平会下降。在对许氏平鲷 (*Sebastes schlegelii*) 进行急性高温和低温胁迫时发现, 类固醇激素 E₂ 和 P4 以及生殖相关基因 *foxl2*、*cyp19a1a* 和 *cyp19a1b* 对高温胁迫表现出更剧烈的反应^[10], 但在有些鱼类中温度不会对性类固醇激素水平产生显著影响^[6-11]。综合目前温度对于鱼类卵巢发育影响的相关研究发现, 低温对这方面影响的描述相对缺乏, 相关研究未成为关注的重点, 具体机制尚不清晰。

因此本研究以四川华鲮为对象, 采用形态学、组织学和酶联免疫反应等手段研究了低温对其卵巢发育及血清中多种生殖激素水平的影响, 并运用转录组测序技术探究其调控机制, 以期丰富低温影响鱼类卵巢发育内在机制的研究资料。

1 材料与方法

1.1 鱼类样本

实验用四川华鲮 2018 年 4 月采集于长江上游岷江眉山段, 于实验室大棚网箱 (3 m×1 m×1.5 m) 驯养至 2019 年 9 月, 实验用水为充分曝气的循环过滤水 (溶解氧含量大于 7 mg/L, pH 为 7.5±0.5), 自然光照, 不控温。每日于上午 9: 00 投喂 1 次饲料 (直径为 2 mm 的新希望六和淡水鱼浮性配合饲料, 粗蛋白含量≥36%)。正式实验开始于 2019 年 9 月, 选取大棚网箱养殖的大小相近的四川华鲮雌鱼 200 尾 [体质量 (24.40±1.66) g, 体长 (9.95±0.21) cm] 于实验室养殖系统驯养 15 d, 每日更换 1/2 充分曝气的循环过滤水 (溶解氧含量大于 7 mg/L, pH 为 7.5±0.5), 光照 L : D=12 : 12, 温度控制于 (26±1) °C, 每日于 8: 00 和 18: 00 投喂 2 次, 使用直径为 2 mm 的饲料 (山东升索饲料科技有限公司), 饲料粗蛋白含量≥48%。

驯化后雌鱼用促黄体生成素释放激素 A2 (LHRHA2) 和人绒毛膜促性腺激素 (HCG) (每 0.2 mL 生理盐水中 LHRHA2 为 1.25 μg, HCG 为 200 IU, 每尾雌鱼注射约 0.2 mL) 进行人工催产, 10 h 后人工挤卵, 顺利产卵的雌鱼挤尽卵子后, 立即进行取样 (取样前用 MS 222 麻醉), 取鱼 9 尾作

为初始对照 (control, C), 测量体质量和体长, 并取尾静脉血液离心 (4 000 r/min, 10 min) 后留血清保存于 -80 °C 冰箱用于后续激素水平测定。每尾鱼剖取卵巢组织, 称重, 切取部分卵巢组织固定于 Smith 氏液, 剩余卵巢组织存于 1.5 mL 无酶冻存管中, 经液氮冷冻后保存于 -80 °C 超低温冰箱。其余产卵雌鱼随机分为 2 组, 每组 3 个重复, 一组温度设置为适宜温度 (OT) (26±1) °C, 一组温度设置为低温 (low temperature, LT) (11±1) °C (降温速率为 3 °C/d), 分别于产卵后第 1 周末 (W1) 和第 2 周末 (W2) 取材, 每次取样每个重复取鱼 3 尾, 操作如初始对照 C。

使用测量数据计算性腺成熟指数:

$$GSI(\%) = (GW/W) \times 100\%$$

式中, GSI 为性腺成熟指数, GW 为性腺质量 (g), W 为体质量 (g)。

1.2 卵母细胞形态和组织学观察

用 PowerShot SX60 HS 相机对剖取的卵巢组织进行整体拍照, 并将固定于 Smith 氏液的卵巢组织用乙醇梯度脱水, 正丁醇透明, 石蜡包埋, Leica RM2235 切片机制片, 苏木精-伊红 (H.E) 染色, 中性树胶封片, 最后在 Nikon Eclipse 80i 显微镜下观察拍照。卵母细胞分期参照尹敏^[2]的划分标准。

1.3 酶联免疫反应检测血清生殖激素水平

用对应的酶联免疫反应吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (Telenbiotech, 广州) 采用双抗体夹心法测定血清中 FSH、LH、E₂、DHP 和 11-KT 的水平。试剂盒内含带有对应激素抗体 (被辣根过氧化物 HRP 标记) 包被的微孔板, 血清激素与微孔板中的抗体结合后, 利用显色液和 HRP 酶显色, 使用酶标仪在 450 nm 的波长下测定吸光值, 通过标准曲线法计算样品中激素水平。具体方法参见试剂盒内说明书。

1.4 卵巢组织转录组测序及分析

总 RNA 的提取, 文库构建和高通量测序 使用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen, 美国) 提取各组卵巢组织的总 RNA, 并使用无 RNase 琼脂糖凝胶电泳检测分析样品 RNA 完整性及是否存在 DNA 污染, NanoPhotometer spectrophotometer 仪器检测 RNA 纯度 (OD_{260/280} 及 OD_{260/230} 比值), Qubit 2.0 Fluorometer 仪器对 RNA 浓度进行定量,

使用 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 完整性。RNA 质量检测合格后构建 cDNA 文库, 进行 Illumina HiSeq 4000 测序。

转录组数据分析 利用 fastp 程序对原始数据进行序列质量控制^[12]得到干净读序 (clean reads), 用 Trinity^[13] 软件从头组装, 拼接得到的转录本序列作为后续分析的参考序列。使用 Nr (NCBI non-redundant protein sequences)、Nt (NCBI nucleotide sequences)、COG/KOG (Clusters of orthologous groups of proteins/euKaryotic ortholog and reviewed protein sequence database)、Swiss-prot (a manually annotated and reviewed protein sequence database)、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 以及 GO (gene ontology) (e -value<0.000 01) 数据库对 Unigene 进行 Blastx-search 注释分析。使用 RSEM^[14] 软件对原始读序 (raw reads count) 进行 RPKM 转换, 得到各样品中各基因的表达水平。使用 DESeq2^[15] 软件对不同发育时间节点四川华鲮卵巢组织差异表达基因进行分析 (edgeR^[16] 在 2 个样本之间)。根据模型进行假设检验概率 (P 值) 的计算, 并进行多重假设检验校正, 得到 FDR 值 (false discovery rate)。基于差异分析结果, 筛选 FDR<0.05 且 $|\log_2(\text{FoldChange})|>1$ 的基因为差异表达基因, 用于后续相关分析。

1.5 权重基因共表达网络分析

利用 R 的权重基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)^[17] 算法构建四川华鲮卵巢组织权重共表达网络。首先确定最佳的软阈值参数 β , 根据阈值和基因间的 Pearson 相关系数依次构建相关矩阵、邻接矩阵和拓扑矩阵, 使最后基因网络符合无尺度分布。其次进行层次聚类, 并利用分支切割法来识别构建模块。由于模块内基因数目庞大, 可把模块中具有代表性的基因-模块特征向量基因 (module eigengene, ME) 挑选出来。最后用 ME 代表模块中的基因进行相关性分析, 计算模块与性状数据的相关性, 筛选具有生物学意义的模块, 进行 KEGG 功能富集分析。

1.6 实时荧光定量 PCR (qPCR) 验证

为验证转录组测序结果的可靠性并筛选基因的相对表达水平, 以建库剩余的 RNA 为模板, 选取了 18 个基因, 利用 qPCR 技术检测其表达水平。根据所测浓度, 每个样品取 1 008 ng 总 RNA, 用

GoScript™ Reverse Transcription System (Promaga, 北京) 试剂盒进行逆转录合成 cDNA, 将逆转录合成的 cDNA 稀释 30 倍作为 qPCR 的模板, 以 β -actin 为内参, 在 Step one real time PCR 系统 (Applied Biosystems, 美国) 中进行 qPCR。20 μ L 的 qPCR 反应体系中包含有 GoTaq® qPCR Master Mix (Promaga, 中国) 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ mol/L, cDNA 模板 2 μ L。反应程序为预变性阶段 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 65 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。所选基因特异性引物设计序列来源于转录组数据, 具体引物信息见表 1。

1.7 数据分析

本研究数据以平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示, 组内差异采用单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析 (Tukey 氏检验), 组间样本采用两个独立样本 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。使用 SPSS 23.0 软件分别对四川华鲮 GSI、血清激素水平和基因相对表达水平进行显著性分析, 并利用 Graphpad Prism 8.0.2 软件作图, 相关性分析采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 组织学和形态学观察

产卵后四川华鲮雌鱼 (C 组) 卵巢萎缩, 呈肉色半透明 (图版-1); 组织学观察可见各时相卵母细胞, 但主要是单层滤泡时相 (II 时相) 和卵黄泡出现时相 (III 时相) 卵母细胞 (图版-6), 在 III 时相卵母细胞外可见滤泡细胞层和扁平的放射带 (图版-12)。另外也可见空滤泡以及未及退化的卵黄充满时相 (IV 时相) 卵母细胞分布于卵巢切片中。

OT 组四川华鲮在 W1 时, 其卵巢颜色明显变白 (图版-2), 组织学观察可见 IV 时相早期和中期卵母细胞较多, 也可见部分未及完成退化的残余卵泡 (图版-7)。IV 时相卵母细胞外滤泡细胞层和放射带增厚 (图版-13), 此时卵巢发育进入 IV 期。在 W2 其卵巢较 W1 膨大 (图版-3), 组织学观察可见卵巢内卵母细胞以 VI 时相晚期为主 (图版-8), 卵巢发育进入 IV 期末。

LT 组四川华鲮在 W1 时, 其卵巢萎缩, 肉眼可见部分卵粒呈白色或肉色半透明 (图版-4), 组织学观察可见卵巢内卵母细胞以正在退化的卵母细胞为主 (图版-9)。退化卵母细胞具有闭锁卵泡的主要特征。退化的卵黄生成前期卵母细胞滤泡

表1 本研究所用的引物序列

引物名称 primers name	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')
<i>actb</i> -F	GATTCGCTGGAGATGATGCT
<i>actb</i> -R	CGTTGTAGAAGGTGTGATGCC
<i>fshr</i> -F	GCTACCCTACACCAGATGC
<i>fshr</i> -R	CTGCAAAGCCAAGTGGCAC
<i>lhcg</i> -F	CTGTGGTGACAACAGCCCTC
<i>lhcg</i> -R	CGCTGACACAGGTCTAGCTC
<i>pgr</i> -F	GCGCTTCTGCCAAGGAG
<i>pgr</i> -R	CTGTTGGGCAGCTTGAGATG
<i>esr1</i> -F	CCGCAGATCCTGCCTCTG
<i>esr1</i> -R	GACACCTGTTGGGTCGAGTG
<i>ar</i> -F	CCGAAAGCAGCGACAGGC
<i>ar</i> -R	GGCTTGCACAGTTCTCGCG
<i>StAR</i> -F	GTGTCCGCTGTGCCAAGC
<i>StAR</i> -R	GGGATCCAACCCTTAAGGTC
<i>cyp17a1</i> -F	CCACCAAGCTGTCTTAGC
<i>cyp17a1</i> -R	CAGAACAGCGCTGTGGATC
<i>hsd3b</i> -F	GCTTGACAGAGATCCGACTGC
<i>hsd3b</i> -R	CGATGAGAGACGCAGTGTGG
<i>cyp19a2</i> -F	CGGGACAGGTGGACATTC
<i>cyp19a2</i> -R	GCAGCCAGTGCAGTCTG
<i>hsd17b1</i> -F	CCTGACGTCATCTGCTGG
<i>hsd17b1</i> -R	GCCAGGCTCTCACATGCC
<i>vtg</i> -F	GAAGGACATCGGCTTGGC
<i>vtg</i> -R	GCTTCCATCTGGGCAGC
<i>zp4</i> -F	GGTTCATCACAAGGGACAG
<i>zp4</i> -R	GCACAGCCTTGTGTGACAC
<i>mmp9</i> -F	GGTCCAGACATCCGCAAC
<i>mmp9</i> -R	CAGTGCCGTCATAGAGACGC
<i>mmp15</i> -F	CCACTCACCCAAAGTTGGCC
<i>mmp15</i> -R	CACCATGATACCCAGCGGC
<i>ccni</i> -F	GCGTGATGAGGCCGTCC
<i>ccni</i> -R	CCTCACTGGTCTTAACAGCC
<i>cdk16</i> -F	GGGTTCACTGAGAGGTTCCGG
<i>cdk16</i> -R	GAAGCCTGATCGCTCTCTCC
<i>igf1r</i> -F	CCTAATCTCGCCGTGATCCG
<i>igf1r</i> -R	GAGACCAGTCCACGGAATCC
<i>egfr</i> -F	CTGCGTATCATTCTGTGGCC
<i>egfr</i> -R	CTGCGTATCATTCTGTGGCC
<i>nobox</i> -F	CAGATCCCACCGCAGGTC
<i>nobox</i> -R	CAGTCCACTGGATGGTCTCC
<i>bcl2</i> -F	GGACACGATGACAGCGTCTC
<i>bcl2</i> -R	GCCGTGATGGACGTGAGATG
<i>bax</i> -F	CTGCGCTCAGGACGTCTTC
<i>bax</i> -R	CTTGCTGTCTGATCCAGGC
<i>tnf</i> -F	CGGCAGAGGCTGTTGCTAG
<i>tnf</i> -R	GCGCATTAAACCCTTCCTGAC
<i>tp53</i> -F	CAGTCACTTGCTCAGCTG
<i>tp53</i> -R	GAATGGTGCTGCAGGGCAAG

细胞层、卵膜崩解变粗, 卵母细胞内细胞核消失, 胞质内出现许多空泡状结构。退化早期的卵黄生成期卵母细胞滤泡细胞层和放射带与卵母细胞分离(图版-14), 胞质内卵黄物质也逐渐被分解。在退化后期, 滤泡细胞层和放射带几乎完全分解(图版-15), 卵黄物质被分解殆尽。退化的卵泡仅剩一个空腔, 被周围的结缔组织逐渐包围, 部分区域有橙褐色色素细胞出现。在 W2 时, 其卵巢呈肉色(图版-5), GSI 较 OT 组显著下降(图 1)。组织学观察可见退化的卵泡, 退化中形成的结缔组织以及退化后剩余的空腔、卵巢内基本不可见卵黄生成期卵母细胞, 多为卵黄生成前期卵母细胞(图版-10)。

综合分析, 11 °C 的低温使四川华鲮卵巢发育受到抑制, 卵泡发生退化闭锁。

2.2 血清生殖激素及其卵巢受体基因水平测定

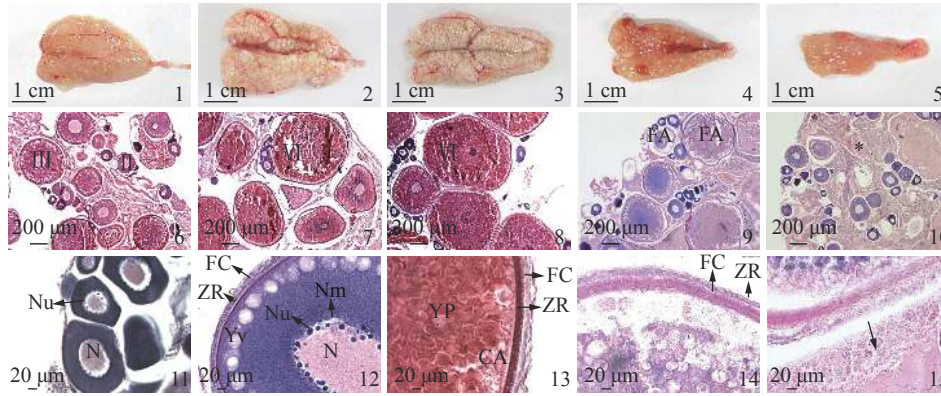
为探究低温对雌鱼生殖激素水平的影响, 对雌鱼血清中 FSH、LH、DHP、E₂ 和 11-KT 水平进行测量, 发现在 LT 组, 各激素变化趋势与 OT 组基本一致, 而且激素 E₂ 和 11-KT 水平与 OT 组无显著差异。但 DHP 水平在 W1 和 W2 极显著低于 OT 组 ($P < 0.01$), LH 水平在 W1 显著低于 OT 组 ($P < 0.05$), FSH 水平在 W2 极显著低于 OT 组 ($P < 0.01$)(图 2-a-e)。

对激素受体基因 *fshr*、*lhcg*、*pgr*、*esr1* 和 *ar* 的相对表达水平进行 qPCR 检测, 发现 OT 组各受体基因的相对表达水平在 C~W2 基本呈连续上升趋势, 尤其是在 W2, 迅速上升。而 LT 组各受体基因的相对表达水平在 C~W2 持续下降, 并显著低于 OT 组 ($P < 0.05$)(图 2-f-j)。

2.3 低温影响四川华鲮卵巢发育的调控机制

差异表达基因的鉴定 对 OT 组和 LT 组在 W1 和 W2 的基因表达情况进行组间的两两比较分析, 发现在 W1, OT 组和 LT 组存在差异表达基因 512 个, 其中 284 个基因在 LT 组下调, 228 个基因在 LT 组上调。在 W2, OT 组和 LT 组存在 1 948 个差异表达基因, 其中 1 277 个基因在 LT 组下调, 671 个基因在 LT 组上调。

将 OT 组和 LT 组的差异表达基因绘制成韦恩图, 发现有差异共表达基因 155 个(图 3-a)。对差异共表达基因进行 KEGG 富集分析, 发现富集到的通路多与蛋白质和脂质的代谢合成相关, 如蛋白质消化和吸收 (protein digestion and absorption) 通路, 与类固醇激素合成相关的卵巢类固醇激素合成 (ovarian steroidogenesis) 和甾体激素生物



图版 卵巢和卵母细胞的形态学和组织学观察

1. C 时卵巢形态学观察, 2. OT 组 W1 时卵巢形态学观察, 3. OT 组 W2 时卵巢形态学观察, 4. LT 组 W1 时卵巢形态学观察, 5. LT 组 W2 时卵巢形态学观察, 6. C 时卵巢组织学观察及其 II 时相卵母细胞和 III 时相卵母细胞, 7. OT 组 W1 时卵巢组织学观察及其 IV 时相卵母细胞, 8. OT 组 W2 时卵巢组织学观察及其 IV 时相卵母细胞, 9. LT 组 W1 时卵巢组织学观察及其闭锁卵泡, 10. LT 组 W2 时卵巢组织学观察及其橙褐色色素细胞, 11. II 时相卵母细胞及其细胞核和核仁, 12. III 时相卵母细胞的滤泡细胞、放射带、卵黄泡、细胞核、核膜和核仁, 13. IV 时相卵母细胞的滤泡细胞、放射带、皮层小泡和卵黄小板, 14. 退化早期卵母细胞的滤泡细胞和放射带, 15. 退化后期卵母细胞被分解的滤泡细胞和放射带 (箭头); II. II 时相卵母细胞, III. III 时相卵母细胞, IV. IV 时相卵母细胞; * 橙褐色色素细胞; FA. 卵泡闭锁, FC. 滤泡细胞, ZR. 放射带, CA. 皮层小泡, YV. 卵黄泡, YP. 卵黄小板, N. 细胞核, Nm. 核膜, Nu. 核仁; C. 对照, OT. 适宜温度, LT. 低温; 下同

Plate Morphological and histological observations of ovaries and oocytes

1. observation of ovarian morphology at C, 2. observation of ovarian morphology at W1 in the OT groups, 3. observation of ovarian morphology at W2 in the OT groups, 4. observation of ovarian morphology at W1 in the LT groups, 5. observation of ovarian morphology at W2 in the LT groups, 6. observation of ovarian histology at C and its oocytes in phase II and phase III, 7. observation of ovarian histology at W1 in the OT groups and its oocyte in phase IV, 8. observation of ovarian histology at W2 in the OT groups and its oocyte in phase IV, 9. observation of ovarian histology at W1 in the LT groups and its atresia follicle, 10. observation of ovarian histology at W1 in the LT groups and its tenne pigment cell, 11. oocyte in phase II and its nucleus and nucleolus, 12. follicular cells, zone radiate, yolk vesicle, nucleus, nuclear membrane, and nucleolus of oocyte in phase III, 13. follicular cells, zone radiate, cortical alveoli, and yolk platelet of oocyte in phase IV, 14. follicular cells and zone radiate in the early stage of degenerated oocyte, 15. decomposed follicular cells and zone radiate in the late stage of degenerated oocyte (arrow); II. oocyte in phase II, III. oocyte in phase III, IV. oocyte in phase IV; * . tenne pigment cell; FA. follicular atresia, FC. follicular cells, ZR. zone radiate, CA. cortical alveoli, YV. yolk vesicle, YP. yolk platelet, N. nucleus, Nm. nuclear membrane, Nu. nucleolus; C. control, OT. optimum temperature, LT. low temperature; the same below

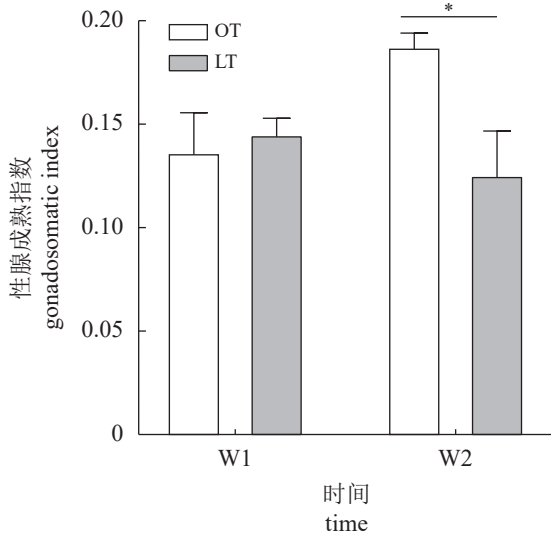


图 1 OT 组和 LT 组间 GSI 比较

“*”表示组间存在显著差异, $P < 0.05$

Fig. 1 GSI comparison between OT groups and LT groups

“*” indicates significant differences between groups, $P < 0.05$

合成 (steroid hormone biosynthesis) 通路以及脂肪酸的消化、吸收、代谢和合成通路 (图 3-b)。

WGCNA 分析结果 为将转录组数据与测量性状更好地建立关联, 将转录组测序结果与 GSI 和激素受体基因的相对表达水平进行 WGCNA 分析。设置软阈值参数 β 为 8, 层次聚类树进行剪切分区后共得到 20 个模块。其中 greenyellow 模块聚类到的基因数目最多, 为 5 278 个, 同时该模块与 *fshr*、*lhcr*、*pgr*、*esr1* 和 *ar* 的相对表达水平都呈显著正相关 (R^2 分别为 0.580、0.520、0.640、0.680 和 0.650, P 分别为 0.020、0.050、0.009、0.005 和 0.009) (图 4-a)。对该模块进行 KEGG 富集分析, 发现在 top20 中富集到与细胞生长、凋亡和自噬密切相关的范可尼贫血通路 (Fanconi anemia pathway)、细胞周期 (cell cycle)、同源重组 (homologous recombination)、p53 信号通路 (p53 signaling pathway)、动物自噬 (autophagy-animal)、FoxO 信号通路 (FoxO signaling pathway)、哺乳动物长寿调节通路 (longevity regulating pathway-mammal) 和

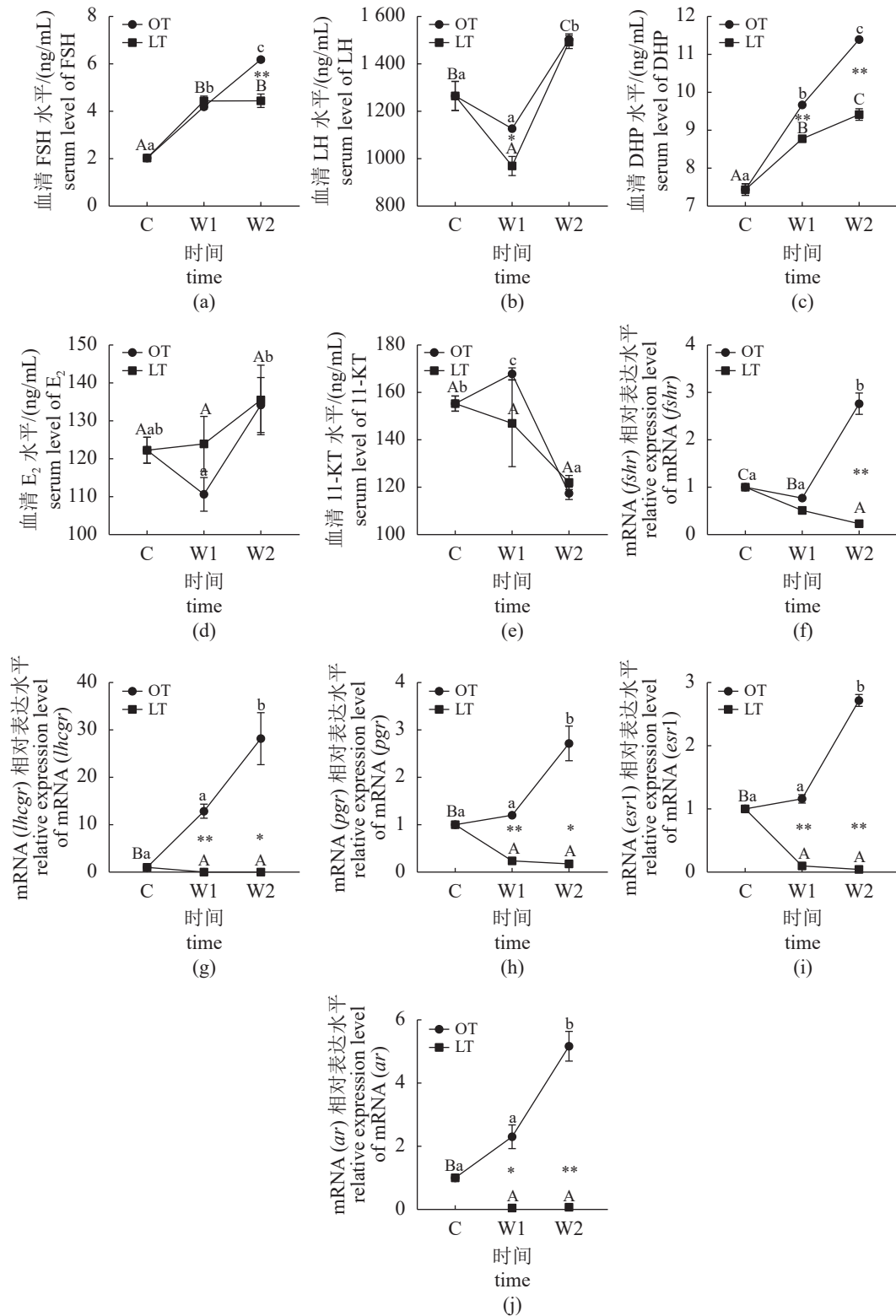


图 2 OT 组与 LT 组血清激素水平和卵巢激素受体基因的相对表达水平

不同小写字母代表 OT 组内有显著差异 $P < 0.05$ ，不同大写字母代表 LT 组内存在显著差异 $P < 0.05$ ；“*”表示组间有显著差异，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

Fig. 2 Serum hormone levels and relative expression levels of the ovarian hormone receptor genes in the OT group and LT group

Different lowercase letters represent significant differences $P < 0.05$ within the OT groups, and different capital letters represent significant differences $P < 0.05$ within the LT groups; “*” indicates significant differences between groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

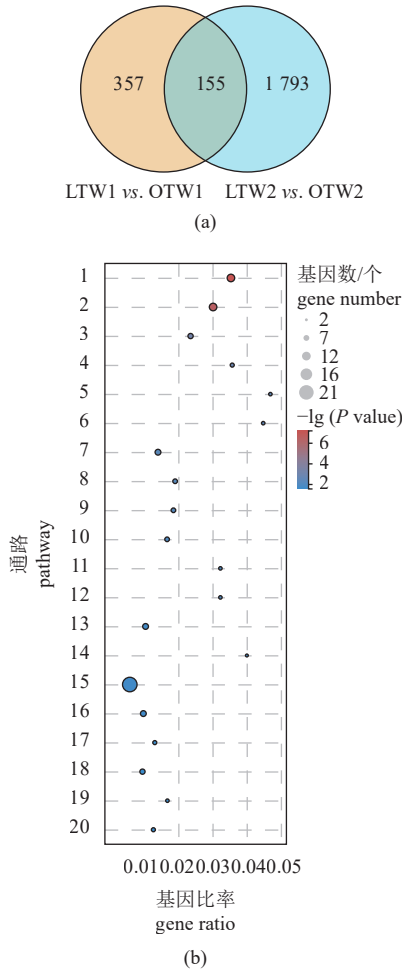


图 3 OT 组和 LT 组在 W1 和 W2 的差异表达基因韦恩图 (a) 以及差异共表达基因 KEGG 富集气泡图 (b)

KEGG 富集气泡图展示了显著性排名前 20 的通路, 图中“gene ratio”表示富集在该通路上的基因占该通路所有基因的比率, 圆圈大小表示富集在该通路上的基因数目, 下同; 1. 蛋白质的消化与吸收, 2. 胰液分泌, 3. 小细胞肺癌, 4. 卵巢类固醇激素合成, 5. 氮代谢, 6. 甾体激素生物合成, 7. 氧化磷酸化, 8. ECM 受体相互作用, 9. 阿米巴病, 10. 心肌收缩, 11. 精氨酸生物合成, 12. 脂肪的消化与吸收, 13. 阿尔兹海默症, 14. 脂肪酸生物合成, 15. 代谢途径, 16. 生热作用, 17. AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用, 18. 粘着斑, 19. 脂肪酸代谢, 20. 松弛素信号通路

Fig. 3 Venn diagram of differentially expressed genes in W1 and W2 of the OT groups and LT groups (a) and the KEGG enrichment bubble chart of differentially co-expressed genes (b)

The KEGG enrichment bubble chart shows the top 20 significant pathways, in the figure, "gene ratio" indicates the ratio of genes enriched in the pathway to all genes in this pathway, and the size of the circle indicates the number of genes enriched in this pathway, the same below; 1. protein digestion and absorption, 2. pancreatic secretion, 3. small cell lung cancer, 4. ovarian steroidogenesis, 5. nitrogen metabolism, 6. steroid hormone biosynthesis, 7. oxidative phosphorylation, 8. ECM-receptor interaction, 9. Amebiasis, 10. cardiac muscle contraction, 11. arginine biosynthesis, 12. fat digestion and absorption, 13. Alzheimer disease, 14. fatty acid biosynthesis, 15. metabolic pathway, 16. thermogenesis, 17. AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, 18. focal adhesion, 19. fatty acid metabolism, 20. relaxin signaling pathway

TGF-β 信号通路 (TGF-β signaling pathway) 等经典通路 (图 4-b)。另外在性状与模块关系热图中还发现 skyblue3 模块与 GSI 和基因 (*fshr*、*lhcr*、*pgr*、*esr1* 和 *ar*) 的相对表达水平呈显著负相关 (R^2 分别为 -0.820 、 -0.600 、 -0.720 、 -0.560 、 -0.530 和 -0.640 ; P 分别为 2×10^{-4} 、 0.020 、 0.003 、 0.030 、 0.040 和 0.010) (图 4-a), 在该模块中, 蛋白质消化和吸收以及疾病和免疫相关通路被 KEGG 富集分析显著富集 (图 4-c)。

综合转录组测序分析结果, 发现对四川华鲮产卵后雌鱼进行低温处理过程中, 类固醇激素合成、细胞生长增殖以及凋亡自噬等信号通路被多次显著富集, 与低温影响显著相关。

2.4 qPCR 验证候选基因

为验证低温处理对四川华鲮卵巢发育影响的调控机制, 对相关基因的相对表达水平进行检测, 发现类固醇激素生成、卵母细胞发育成熟、细胞生长增殖和抗凋亡相关基因 *StAR*、*cyp17a1*、*hsd3b*、*cyp19a2*、*hsd17b1*、*vtg1*、*zp4*、*mmp9*、*mmp15*、*ccni*、*cdk16*、*egfr*、*igflr*、*nobox* 和 *bcl2* 在 W1 和 W2 时 OT 组的表达水平显著高于 LT 组 ($P < 0.05$), 而促凋亡基因 *bax*、*tnf* 和 *tp53* 恰好相反, 在 LT 组的表达水平多显著高于 OT 组 ($P < 0.05$) (图 5-a, b)。

为验证转录组测序结果的可靠性, 将上述基因的相对表达水平与转录组测序所得 FoldChange 值进行比较, 具有基本一致的变化, 证明转录组测序结果可靠 (图 5-c, d)。

3 讨论

3.1 低温对四川华鲮卵巢发育的影响

卵巢发育是卵泡发育与闭锁之间的动态平衡, 闭锁卵泡是雌鱼性腺常见的结构成分, 拥挤和饥饿等极端条件应激会加剧卵泡闭锁的发生 [18-19]。在鱼类卵泡发生闭锁时, 卵母细胞和滤泡细胞内、外部形态结构都会发生一系列变化 [20]。本研究对产卵后的四川华鲮雌鱼进行 $11\text{ }^\circ\text{C}$ 低温养殖, 与 OT 组相比 LT 组卵巢发生退化, 组织学观察发现低温作用下卵母细胞明显发育不良, 大量卵泡出现典型卵泡闭锁的特征。如滤泡细胞层和放射带与卵母细胞分离, 甚至崩解。滤泡细胞层是合成激素和营养物质以及其他信号分子的场所, 通过微绒毛和血管等结构传递这些物质到卵母细胞, 起到调控卵母细胞生长发育和为卵母细胞发育提

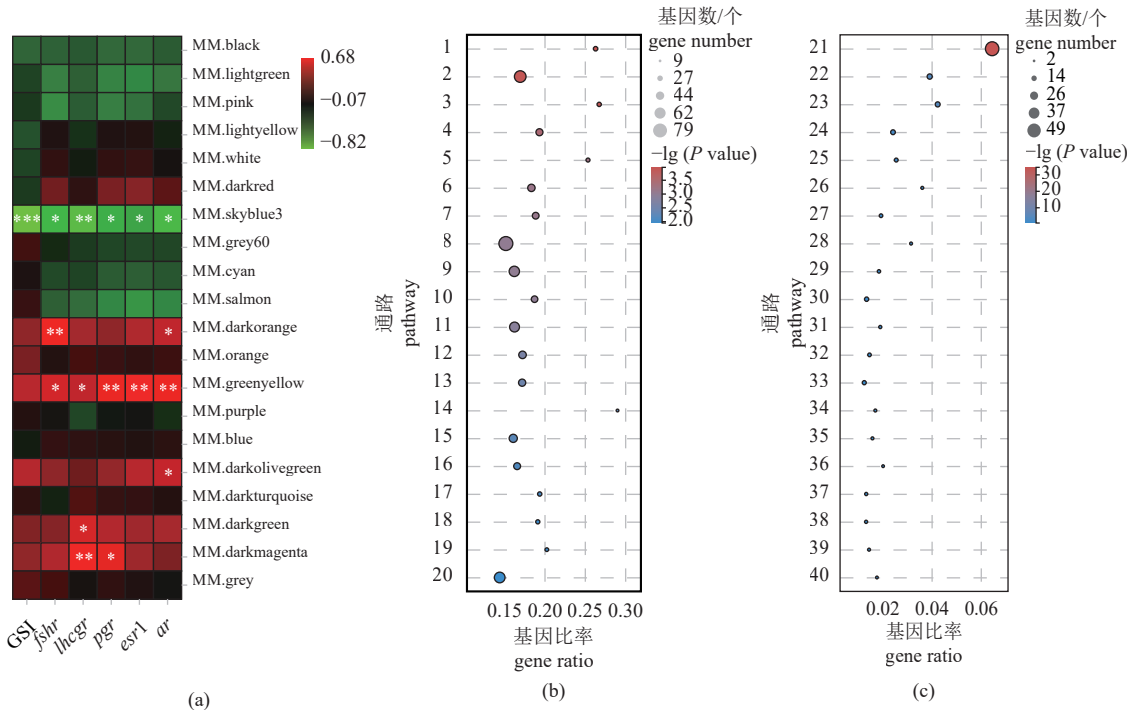


图 4 WGCNA 结果

(a) 性状与模块关联热图, “*”表示数据间存在显著相关 (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$); (b) greenyellow 模块 KEGG 富集气泡图, 1. 范可尼贫血通路, 2. 细胞周期, 3. 同源重组, 4. 真核生物中的核糖体生物发生, 5. 基本转录因子, 6. RNA 降解, 7. p53 信号通路, 8. RNA 转运, 9. 自噬-动物, 10. 赖氨酸降解, 11. FoxO 信号通路, 12. 长寿调节通路-哺乳动物, 13. TGF- β 信号通路, 14. 糖基磷脂酰肌醇锚定生物合成, 15. 黏附连接, 16. ErbB 信号通路, 17. N-聚糖生物合成, 18. 昼夜节律, 19. 自噬-其他真核生物, 20. 泛素介导的蛋白水解; (c) skyblue3 模块 KEGG 富集气泡图, 21. 核糖体, 22. 胰液分泌, 23. 蛋白质的消化与吸收, 24. 甲型流感, 25. 军团菌病, 26. 非洲锥虫病, 27. 抗原的处理和呈递, 28. 光转导-蝇, 29. 病毒性心肌炎, 30. 肌动蛋白细胞骨架的调节, 31. 志贺菌病, 32. 细胞凋亡, 33. 吞噬体, 34. Hippo 信号通路-蝇, 35. 霍乱弧菌感染, 36. 朊病毒病, 37. 心肌收缩, 38. 沙门氏菌感染, 39. RNA 降解, 40. 糖类消化与吸收

Fig. 4 Results of WGCNA

(a) traits and modules associated heat map, "*" indicates significant correlation between the data (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$); (b) KEGG enrichment bubble chart of greenyellow model, 1. Fanconi anemia pathway, 2. cell cycle, 3. homologous recombination, 4. ribosome biogenesis in eukaryotes, 5. basic transcription factors, 6. RNA degradation, 7. p53 signaling pathway, 8. RNA transport, 9. autophagy - animal, 10. lysine degradation, 11. FoxO signaling pathway, 12. longevity regulating pathway- mammal, 13. TGF-beta signaling pathway, 14. glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, 15. adherens junctions, 16. ErbB signaling pathway, 17. glycan biosynthesis, 18. circadian rhythm, 19. autophagy - other eukaryotes, 20. ubiquitin mediated proteolysis; (c) KEGG enrichment bubble chart of skyblue3 module, 21. ribosome, 22. pancreatic secretion, 23. protein digestion and absorption, 24. Influenza A, 25. Legionellosis, 26. African trypanosomiasis, 27. antigen processing and presentation, 28. phototransduction-fly, 29. viral myocarditis, 30. regulation of the actin cytoskeleton, 31. Shigellosis, 32. apoptosis, 33. phagosome, 34. Hippo signaling pathway-fly, 35. *Vibrio cholerae* infection, 36. prion diseases, 37. cardiac muscle contraction, 38. *Salmonella* infection, 39. RNA degradation, 40. carbohydrate digestion and absorption

供营养的作用^[21]。因此低温导致滤泡细胞层与卵母细胞分离, 中断了卵母细胞的营养物质供给和信号分子对卵母细胞的调控, 应该是四川华鲮卵母细胞会发生退化闭锁的一个重要原因。在四川华鲮卵母细胞内还发现卵黄物质随着卵泡的退化闭锁而不断被分解, 有报道称是因为滤泡细胞在此过程中获得了吞噬能力, 而侵入卵母细胞吞噬和摄取卵黄的结果^[22]。不仅如此, 在卵泡闭锁时, 滤泡细胞还可以吞噬线粒体和其他细胞器^[23]。另外在四川华鲮闭锁卵泡中有橙褐色色素细胞被观察到, 是脂褐素积累的结果^[24], 由滤泡细胞等侵入

卵母细胞, 释放包含裂解酶的颗粒最后退化形成的, 是卵泡闭锁的一个重要特征。综上所述, 滤泡细胞积极参与了低温导致四川华鲮卵泡闭锁的过程。

本研究发现, 卵泡闭锁多发生在卵黄生成期卵母细胞, 而很少发生在卵黄生成前期卵母细胞, 可能是卵黄生成期细胞卵黄物质的吞噬吸收为其他卵母细胞的存活提供了能量来源, 这对下一个周期的卵巢发育具有重要意义。

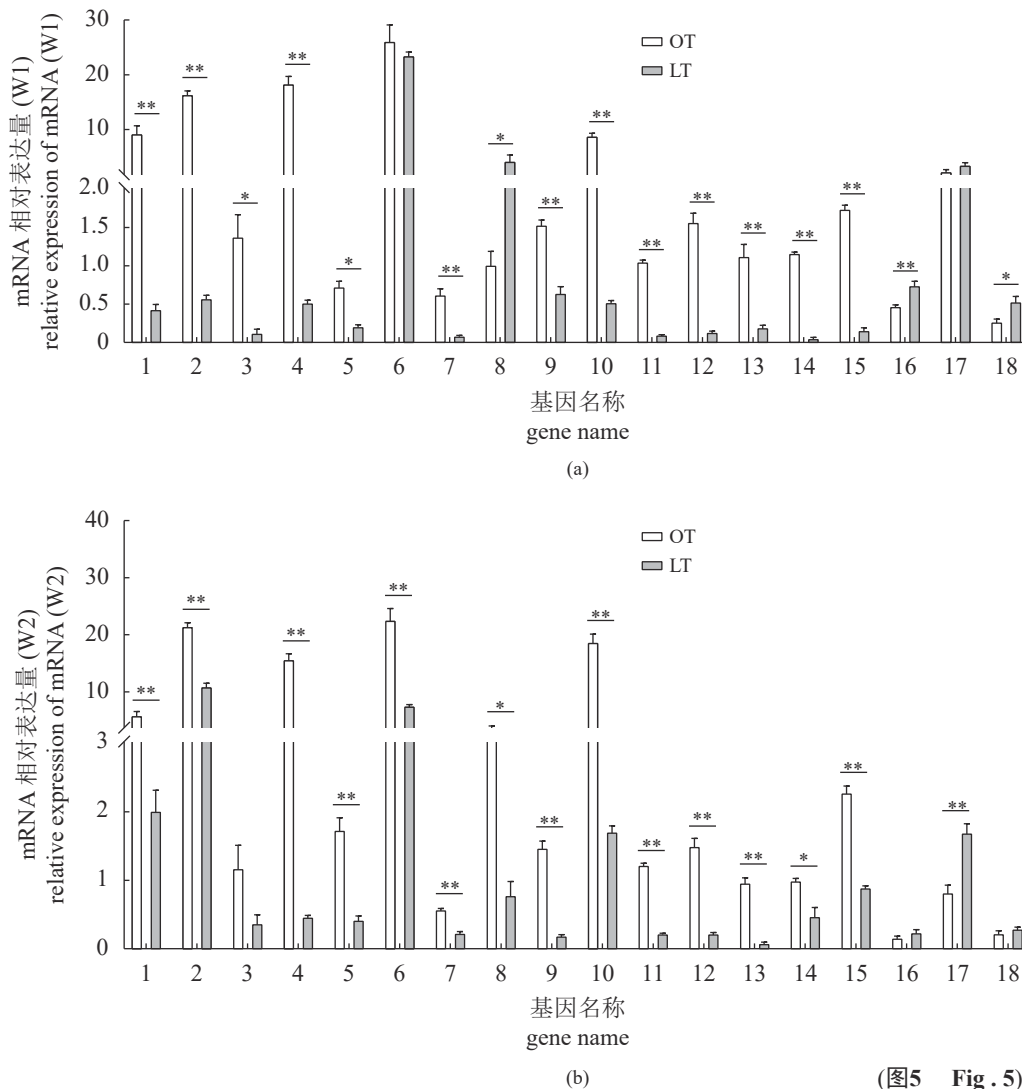
3.2 低温对四川华鲮血清生殖激素及卵巢受体基因的影响

现在观点普遍认为卵泡闭锁的本质是颗粒细

胞凋亡^[25], 在这个过程中, 生殖激素起到重要作用。在哺乳动物中发现, FSH 和 LH 可以不同程度抑制卵巢颗粒细胞的凋亡^[26-27], 尤其是 FSH, 其分泌不足可以直接导致卵泡发生闭锁^[25], FSH 还可以通过抑制线粒体自噬保护颗粒细胞免受氧化损伤^[28], 因此 FSH 水平下降是导致多数脊椎动物卵泡闭锁的关键原因。在卵巢类固醇激素中, E₂ 可以促进卵泡发育, 抑制颗粒细胞凋亡^[29], 而雄激素可以促进颗粒细胞凋亡以及卵母细胞退化^[30], 同时高浓度的孕激素也可以介导卵泡闭锁, 研究发现, 颗粒细胞凋亡往往伴随着 E₂ 水平的下降和 P4 水平的增加^[31]。本研究对各组四川华鲮血清中促性腺激素和类固醇激素水平进行测定发现, FSH 水平随着卵泡闭锁的进行, 在 W2 时极显著低于 OT 组, LH 水平在 W1 显著低于 OT 组。但与哺乳动物不同的是, DHP 水平在 W2 也极显著低于 OT 组, 而 E₂ 和 11-KT 水平与 OT 组之间无

显著差异, 这表明不仅 FSH 水平下降与低温处理下四川华鲮卵泡闭锁的发生密切相关, DHP 水平下降对其也有一定影响, 同时也暗示低温导致鱼类卵泡闭锁与哺乳动物卵泡闭锁有着不同的内分泌调控机制。在本研究中, 低温处理虽然会一定程度上降低生殖激素的水平, 但是其中 LH、E₂ 和 11-KT 最终恢复到和 OT 组相近的水平, 受到的影响较小, 这可能得益于脊椎动物生殖激素在下丘脑-垂体-卵巢轴上复杂的负反馈调节。

本研究还对各激素受体基因的相对表达水平进行检测, 发现其变化趋势与激素完全不同, 低温处理后各激素受体基因表达水平随着时间推移显著下降, 低于 OT 组。由此可见, 低温之所以导致四川华鲮卵巢闭锁, 可能是由于促性腺激素和类固醇激素的合成和分泌受到抑制, 但这并非主要原因, 更重要的影响因素可能是激素受体表达降低, 使卵母细胞对激素的敏感度降低, 从而



(图5 Fig. 5)

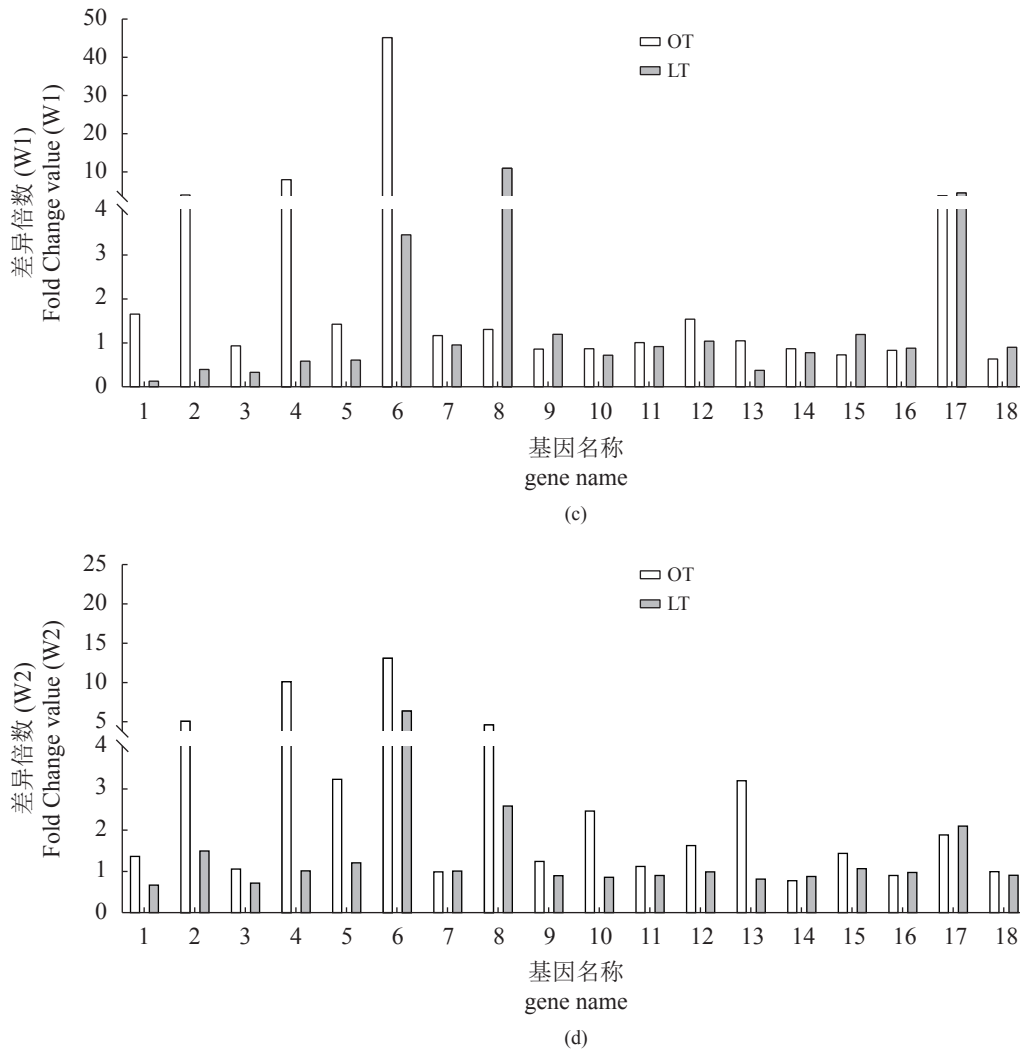


图 5 目的基因的相对表达水平和 FoldChange 值

(a) qPCR 中目的基因在 W1 相对于 C 的相对表达水; (b) qPCR 中目的基因在 W2 相对于 C 的相对表达水平, 结果计算利用 $\Delta\Delta C_t$ 法, *表示组间存在显著差异, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; (c) 转录组测序中目的基因在 W1 相对于 C 的 FoldChange 值; (d) 转录组测序中目的基因在 W2 相对于 C 的 FoldChange 值; 1. *StAR*, 2. *cyp17a1*, 3. *hsd3b*, 4. *cyp19a2*, 5. *hsd17b1*, 6. *vtg1*, 7. *zp4*, 8. *mmp9*, 9. *mmp15*, 10. *ccni*, 11. *cdk16*, 12. *egfr*, 13. *igf1r*, 14. *nobox*, 15. *bcl2*, 16. *bax*, 17. *tnf*, 18. *tp53*

Fig. 5 Relative expression levels and FoldChange value of the target genes

(a) relative expression levels of the target genes in W1 relative to C of qPCR; (b) relative expression levels of the target genes in W2 relative to C of qPCR, the results calculated by $\Delta\Delta C_t$ method, "*" indicates significant difference between groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; (c) FoldChange value of the target genes in W1 relative to C of RNA-seq; (d) FoldChange value of the target genes in W2 relative to C of RNA-seq; 1. *StAR*; 2. *cyp17a1*; 3. *hsd3b*; 4. *cyp19a2*; 5. *hsd17b1*; 6. *vtg1*; 7. *zp4*; 8. *mmp9*; 9. *mmp15*; 10. *ccni*; 11. *cdk16*; 12. *egfr*; 13. *igf1r*; 14. *nobox*; 15. *bcl2*; 16. *bax*; 17. *tnf*; 18. *tp53*

导致卵泡发生闭锁退化。

3.3 低温对鱼类卵巢发育的调控

卵泡闭锁是一个受多种机制共同调控的卵泡退化过程。为探究低温导致产卵后四川华鲮卵泡闭锁的调控机制, 实验对四川华鲮的卵巢组织进行了转录组测序分析, 结果显示, 低温主要影响了类固醇激素合成、细胞生长增殖以及凋亡和自噬相关通路。凋亡和自噬共同调控卵泡闭锁在家

禽^[32]和哺乳动物^[33]中早有报道。本研究在组织学检测结果中观察到低温作用下卵黄物质不断被分解, 细胞出现凋亡特征, 因此细胞凋亡和自噬很可能也是低温导致四川华鲮卵泡闭锁的一个重要机制。但细胞凋亡和自噬应是低温造成四川华鲮卵泡闭锁的一个外部表现, 利用 WGCNA 进行分析时, 范可尼贫血通路、同源重组和细胞周期等与 DNA 损伤修复和细胞生长增殖相关通路的高度

显著, 暗示其内在原因可能是低温使卵泡细胞 DNA 复制过程中的损伤修复能力下降, DNA 复制或转录出现障碍, 最终导致卵泡细胞生长和增殖无法进行, 走向凋亡。

本研究利用 qPCR 对 OT 组和 LT 组部分类固醇激素进行合成, 并对细胞生长增殖和凋亡相关基因的相对表达水平进行测定, 发现在低温作用下, 卵巢类固醇合成和卵母细胞发育成熟相关基因 (*StAR*、*cyp17a1*、*hsd3b*、*cyp19a2*、*hsd17b1*、*vtg1*、*zp4*、*mmp9* 和 *mmp15*), 细胞生长增殖和抗凋亡相关基因 (*ccni*、*cdk16*、*igflr*、*egfr*、*nobox* 和 *bcl2*) 的表达水平显著降低, 而促凋亡基因 (*tnf*、*bax* 和 *tp53*) 恰好相反。在卵巢类固醇合成过程中, *StAR*、*cyp17a1*、*hsd3b*、*cyp19a2* 和 *hsd17b1* 都是其合成通路上的代谢酶基因, *StAR* 可以将前体物质胆固醇由线粒体内膜转至外膜, 是类固醇激素合成过程中重要的限速酶^[34]。*Cyp17a1* 和 *Cyp19a2* 可以催化雌激素的产生, 而 *Hsd17b1* 催化雌激素转化为有活性的 E_2 。*mmp15* 和 *mmp9* 等金属蛋白酶基因的表达已被证明可以被 *pgr* 调控^[35], 在青鳉 (*Oryzias latipes*) 体内发现 *mmp15* 在卵母细胞成熟过程中有重要作用^[36]。*IGF-I* 和 *EGF* 可以协同 *FSH* 和 *LH* 促进卵泡发育和鞘膜细胞增殖^[37] 以及抑制颗粒细胞凋亡^[38]。而 *bcl2* 和 *bax* 共同调节着卵泡细胞的存活与凋亡, *bcl2* 在闭锁卵泡的表达量小于健康卵泡, *bax* 则在闭锁卵泡中高表达^[39]。*nobox* 对于卵巢功能的维持也十分重要, 缺失 *nobox* 的小鼠卵泡生长出现异常, 最终会被结缔组织所取代^[40]。*tnf* 和 *tp53* 与颗粒细胞凋亡密切相关, 体外培养牛卵泡细胞时, 加入 *TNF- α* 会增加卵巢中凋亡细胞的数量^[41]; 体外培养大鼠颗粒细胞, 随着细胞凋亡率增加, *tp53* 的表达量上升^[42]。

低温之所以导致四川华鲮卵泡闭锁, 是由于影响了类固醇激素合成、细胞生长增殖和凋亡自噬相关信号通路, 促进了促凋亡相关基因表达, 抑制了类固醇合成、细胞生长增殖和抗凋亡基因的表达, 导致卵泡细胞生长受损, 发育受阻。

4 结论

低温导致四川华鲮的卵巢发育被抑制, 卵母细胞明显发育不良, 发生退化, 出现典型闭锁卵泡的特征。在这个过程中 *FSH* 和 *DHP* 水平显著下降, 而 *LH*、 E_2 和 *11-KT* 水平受到的影响较小,

相应激素受体基因 *fshr*、*lhcr*、*pgr*、*esr1* 和 *ar* 的表达水平显著下降。在转录组分析中, 发现低温导致四川华鲮卵泡闭锁时类固醇激素合成、细胞生长增殖和凋亡自噬相关信号通路起关键作用。低温处理一方面使类固醇激素合成和卵母细胞生长增殖相关基因的表达受抑制, 导致激素的合成和作用受到影响, 卵巢发育受限, 卵母细胞退化; 另一方面, 低温促进了促凋亡基因表达, 抑制了抗凋亡基因的表达, 导致卵泡细胞发生自噬凋亡, 最终导致卵泡发生退化闭锁。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 解崇友, 倪露芸, 吴迪, 等. 岷江眉山段四川华鲮年龄与生长[J]. *四川动物*, 2016, 35(1): 78-83.
Xie C Y, Ni L Y, Wu D, et al. Age and growth of *Sinibrama taeniatus* in Meishan section of Minjiang River[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2016, 35(1): 78-83 (in Chinese).
- [2] 尹敏. 四川华鲮繁殖生物学初步研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
Yin M. Preliminary studies on reproductive biology of *Sinibrama taeniatus*[D]. Chongqing: Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [3] Lin Q, Lu J Y, Gao Y L, et al. The effect of temperature on gonad, embryonic development and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus kuda* Bleeker[J]. *Aquaculture*, 2006, 254(1-4): 701-713.
- [4] Li G L, Zhang M Z, Deng S P, et al. Effects of temperature and fish oil supplementation on ovarian development and *foxl2* mRNA expression in spotted scat *Scatophagus argus*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2015, 86(1): 248-260.
- [5] Dzikowski R, Hulata G, Karplus I, et al. Effect of temperature and dietary *L-carnitine* supplementation on reproductive performance of female guppy (*Poecilia reticulata*)[J]. *Aquaculture*, 2001, 199(3-4): 323-332.
- [6] Webb M A H, Van Eenennaam J P, Doroshov S I, et al. Preliminary observations on the effects of holding temperature on reproductive performance of female white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson[J]. *Aquaculture*, 1999, 176(3-4): 315-329.
- [7] 林加涵, 方永强, 刘建, 等. 不同水温对文昌鱼性腺发

- 育的影响[J]. 台湾海峡, 1996, 15(2): 170-173.
- Lin J H, Fang Y Q, Liu J, *et al.* Effects of different temperatures on gonadal development in lancelet, *Branchiostoma belcheri*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 1996, 15(2): 170-173 (in Chinese).
- [8] Lim B S, Kagawa H, Gen K, *et al.* Effects of water temperature on the gonadal development and expression of steroidogenic enzymes in the gonad of juvenile red seabream, *Pagrus major*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 28(1): 161-162.
- [9] Elisio M, Chalde T, Miranda L A. Effects of short periods of warm water fluctuations on reproductive endocrine axis of the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) spawning[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2012, 163(1): 47-55.
- [10] 张亚晨. 急性温度胁迫对妊娠期许氏平鲷血液生理和生殖内分泌机能的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- Zhang Y C. Effects of acute temperature stress on hematological physiology and reproductive endocrine functions of gestational ovoviviparous black rockfish *Sebastes schlegelii*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015 (in Chinese).
- [11] Pankhurst N W, Purser G J, Van Der Kraak G, *et al.* Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and *in vitro* ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Aquaculture*, 1996, 146(3-4): 277-290.
- [12] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, *et al.* fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): 884-890.
- [13] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644-652.
- [14] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323.
- [15] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [16] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.
- [17] Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(1): 559.
- [18] McCormick H J, Stokes N G, Hermanutz O R. Oocyte atresia and reproductive success in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to acidified hardwater environments[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1989, 18(1): 207-214.
- [19] Corriero A, Zupa R, Bello G, *et al.* Evidence that severe acute stress and starvation induce rapid atresia of ovarian vitellogenic follicles in Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (L.) (Osteichthyes: Scombridae)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(11): 853-860.
- [20] 强俊, 马俊蕾, 曹哲明, 等. 鱼类卵子发育与卵泡闭锁的研究进展 [J]. 中国水产科学, 2021, 28(2): 239-252.
- Qiang J, Ma J L, Cao Z M, *et al.* Research progress on egg development and follicular atresia in fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(2): 239-252 (in Chinese).
- [21] 施琼芳. 鱼类性腺发育研究新进展[J]. 水生生物学报, 1988, 12(3): 248-258.
- Shi Q F. Recent advances in the studies on gonad development in fishes[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1988, 12(3): 248-258 (in Chinese).
- [22] 张永泉, 尹家胜, 杜佳, 等. 哲罗鱼(*Hucho taimen*)卵巢滤泡细胞发生的超微结构研究[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(1): 262-266.
- Zhang Y Q, Yin J S, Du J, *et al.* Study on developmental ultrastructure of follicular cells in ovary of *Hucho Taimen*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 262-266 (in Chinese).
- [23] Baccari G C, Minucci S, Matteo D L, *et al.* Ultrastructural investigation of the corpora atretica of the electric ray, *Torpedo marmorata*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1992, 86(1): 72-80.
- [24] Miranda A C L, Bazzoli N, Rizzo E, *et al.* Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study[J]. *Tissue and Cell*, 1999, 31(5): 480-488.
- [25] Tilly J L, Kowalski K I, Johnson A L, *et al.* Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and

- postovulatory regression[J]. *Endocrinology*, 1991, 129(5): 2799-2801.
- [26] Kaipia A, Chun S Y, Eisenhauer K, *et al.* Tumor necrosis factor- α and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles[J]. *Endocrinology*, 1996, 137(11): 4864-4870.
- [27] Guthrie H D, Garrett W M, Cooper B S. Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells[J]. *Biology of Reproduction*, 1998, 58(2): 390-396.
- [28] Shen M, Jiang J, Guan Z Q, *et al.* FSH protects mouse granulosa cells from oxidative damage by repressing mitophagy[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 38090.
- [29] Rosenfeld C S, Wagner J S, Roberts R M, *et al.* Intraovarian actions of oestrogen[J]. *Reproduction*, 2001, 122(2): 215-226.
- [30] Maxson W S, Haney A F, Schomberg D W. Steroidogenesis in porcine atretic follicles: loss of aromatase activity in isolated granulosa and theca[J]. *Biology of Reproduction*, 1985, 33(2): 495-501.
- [31] 林鹏飞. 猪有腔卵泡发育与闭锁的内分泌及分子细胞学变化研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- Lin P F. Study on endocrine and molecular cytological alterations of porcine antral follicles during development and atresia[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [32] 邹坤, 路丽丽, Amponsah C A, 等. 家禽卵泡闭锁机制的研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(4): 185-191.
- Zou K, Lu L L, Amponsah C A, *et al.* Research progress on mechanism of poultry follicular atresia[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(4): 185-191 (in Chinese).
- [33] Meng L, Jan S Z, Hamer G, *et al.* Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis[J]. *Biology of Reproduction*, 2018, 99(4): 853-863.
- [34] Selvaraj V, Stocco D M, Clark B J. Current knowledge on the acute regulation of steroidogenesis[J]. *Biology of Reproduction*, 2018, 99(1): 13-26.
- [35] Liu D T, Carter N J, Wu X J, *et al.* Progesterin and nuclear progesterin receptor are essential for upregulation of metalloproteinase in zebrafish preovulatory Follicles[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 9: 517.
- [36] Ogiwara K, Takahashi T. Involvement of the nuclear progesterin receptor in LH-induced expression of membrane type 2-matrix metalloproteinase required for follicle rupture during ovulation in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 450: 54-63.
- [37] Young J M, McNeilly A S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle[J]. *Reproduction*, 2010, 140(4): 489-504.
- [38] Mani A M, Fenwick M A, Cheng Z R, *et al.* IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells[J]. *Reproduction*, 2010, 139(1): 139-151.
- [39] Zhang G, Wan Y, Zhang Y, *et al.* Expression of mitochondria-associated genes (*PPARGC1A*, *NRF-1*, *BCL-2* and *BAX*) in follicular development and atresia of goat ovaries[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015, 50(3): 465-473.
- [40] Rajkovic A, Pangas S A, Ballow D, *et al.* NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression[J]. *Science*, 2006, 305(5687): 1157-1159.
- [41] Silva A W B, Ribeiro R P, Menezes V G, *et al.* Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure *in vitro*[J]. *Animal Reproduction Science*, 2017, 182: 56-58.
- [42] Choi D, Hwang S, Lee E, *et al.* Expression of mitochondria-dependent apoptosis genes (p53, Bax, and Bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development[J]. *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 2004, 11(5): 311-317.

Effects of low temperature on the ovarian development of *Sinibrama taeniatus*

LIU Nannan, CHENG Xinkai, YANG Yang, LIU Juan, GU Haoran, WANG Zhijian*

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: *Sinibrama taeniatus* is a rare and small economic fish which is distributed in the upper reaches of the Yangtze River. *S. taeniatus* can reproduce twice a year in the wild, while the reproductive cycle of *S. taeniatus* reared at the temperature of 26 °C is only 14 days. Low temperature is a major factor limiting the reproduction of the fish in the wild, especially in winter. We found that the low temperature of 11 °C significantly inhibited the ovarian development of *S. taeniatus*. To explore the effects of low temperature on ovarian development, the female *S. taeniatus* after spawning were reared at a low temperature of 11 °C (LT groups) for two weeks, and the fish reared at the temperature of 26 °C (OT groups) as control group. We compared the ovarian development of the LT groups and OT groups. The morphological and histological results showed that the ovarian development was inhibited in the LT groups and that the oocytes were underdeveloped and degenerated. Besides, the atretic follicles were observed in the ovaries of the LT groups. The results of enzyme-linked immunosorbent assay and qPCR showed that the secretion of FSH and DHP, and the gene expression of *fshr*, *lhcg*, *pgr*, *esr1*, and *ar* were significantly inhibited by the low temperature. Transcriptome sequencing results showed that the differentially expressed genes were significantly enriched in steroid hormone synthesis, cell growth and proliferation, apoptosis, and autophagy pathways, indicating these pathways were affected by the low temperature significantly. The expression of genes involved in pro-apoptosis (i.e. *bax*, *tnf*, and *tp53*) was up-regulated in the LT groups. However, the expressions of genes involved in steroid hormone synthesis, oocyte development, cell growth and proliferation, and anti-apoptosis, viz., *StAR*, *cyp17a1*, *hsd3b*, *cyp19a2*, *hsd17b1*, *vtg1*, *zp4*, *mmp9*, *mmp15*, *ccni*, *cdk16*, *igflr*, *egfr*, *nobox*, and *bcl2* were significantly down-regulated in the LT groups. It suggests that the low temperature may inhibit the synthesis and action of reproductive hormones, limit oocyte growth and proliferation, and promote autophagy and apoptosis of follicles which results in follicular atresia. It provides a theoretical basis for conservation biology and artificial reproduction of *S. taeniatus*.

Key words: *Sinibrama taeniatus*; low temperature; follicular atresia; reproductive hormones; apoptosis and autophagy

Corresponding author: WANG Zhijian. E-mail: wangzj1969@126.com

Funding projects: Chongqing Municipal Science and Technology Innovation Project for Social Undertakings and People's Livelihood Guarantee (cstc2017shms-zdyf0201)