

邹华锋,冯宇红,兰兆辉,等.低温处理对斑马鱼 CNSS 系统应激相关基因的影响[J].江苏农业科学,2016,44(8):43-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.010

低温处理对斑马鱼 CNSS 系统应激相关基因的影响

邹华锋,冯宇红,兰兆辉,吕为群

(上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要:选取斑马鱼在 28、18 ℃ 条件下处理 2 周,对尾部神经系统 CNSS 组织的 *UI*、*CRH*、*U II α*、*U II β*、*M2* 基因表达以及斑马鱼的游泳运动行为进行了研究。经过寒冷应激后,试验组应激相关基因 *CRH*、*U II α*、*U II β*、*M2* 表达与对照组相比均明显上升,但对 *UI* 基因表达没有影响。对斑马鱼的运动轨迹进行分析表明,2 个组的斑马鱼在快速游泳距离、慢速游泳距离、平均游泳速度方面均存在明显差异,低温处理组斑马鱼的慢速游泳时间明显高于对照组,平均游泳速度明显低于对照组。行为学数据和基因表达分析均表明,寒冷处理对斑马鱼造成了应激反应,低温条件下斑马鱼活动行为的减少可能是降低机体能量消耗的一种生存策略。

关键词:斑马鱼;尾部神经系统;尾加压素;基因表达;低温

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0043-04

水体温度是影响鱼类生长发育的重要环境因子,对鱼类生长、繁殖、迁移等生命过程具有重要影响^[1]。与陆地哺乳动物不同,鱼类属于变温动物,鱼类生活的环境温度波动范围更为剧烈,经常遭遇多种不可避免的剧烈温差变化,如昼夜气温骤降、季节交替等引起的温度骤变,从而对鱼类产生各种短期或长期的应激反应^[2]。如果鱼类不能适应这种剧烈温度变化引起的应激反应,通常会导致死亡,对渔业生产造成严重经济损失^[3]。

应激是生物生存和进化必不可少的生理反应,鱼类尾部神经系统(CNSS)作为应激系统的一部分,与下丘脑-神经-垂体系统共同参与维持鱼类应激状态下内环境的稳态,在环境适应、应激过程中起到至关重要的作用^[4-5]。CNSS 在鱼类中是 *CRH*、*UI*、*U II* 等激素表达和分泌的主要场所^[6],开展对斑马鱼 CNSS 的研究有利于了解其在低温变化过程中适应环境变化的生理机制,为其他经济鱼类抗寒冷应激的研究提供依据。

斑马鱼(*Danio rerio*)是近几十年来被广泛应用于生物学、遗传学、医学等生命科学领域的重要模式生物,可在 5~38 ℃ 下生存^[7-8],是研究鱼类对不同环境温度适应性的良好模型。根据已有研究,本试验对正常环境温度 28 ℃ 与寒冷温度 18 ℃ 下饲养的斑马鱼进行比较^[9-10],以揭示斑马鱼在低温环境温度下 CNSS 参与应激反应的相关基因变化,并结合行为学分析初步研究斑马鱼在寒冷应激条件下的适应机制。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2015-06-19

基金项目:上海海洋大学博士启动基金(编号:A-0209-13-0105384)。

作者简介:邹华锋(1976—),男,博士,讲师,主要从事鱼类应激生理学研究。Tel:(021)61900494;E-mail:hzfou@shou.edu.cn。

通信作者:吕为群,博士,教授,主要从事鱼类适应生理学和鱼类抗逆良种培育研究。E-mail:wqlv@shou.edu.cn。

1.1.1 斑马鱼养殖 试验所用斑马鱼由笔者所在实验室斑马鱼房自行繁育,属野生型 Tuebingen 纯系后代。斑马鱼养殖系统购自上海海圣水族设备有限公司,每 10~15 尾养殖于 3 L 水循环系统鱼缸中。养殖房水温和室温均控制在 26~28 ℃,光照度约为 200 lx,光一暗周期为 14 h—10 h。

1.1.2 样品处理 选取健康、性成熟的 6 月龄雄性斑马鱼为研究对象,随机选取同批次体长为 (3.05 ± 0.30) cm、体质量为 (0.36 ± 0.10) g 的雄鱼。将斑马鱼移至恒温培养箱进行试验处理,分为常温对照组、冷应激组,处理温度分别为 28、18 ℃。光照周期与养殖系统内养殖环境相同,2 个组的斑马鱼分别在各自温度下处理 14 d。试验结束后迅速断头、断尾,在冰上对斑马鱼尾部完成 CNSS 取样。

1.2 方法

1.2.1 行为学试验和分析 每组取 6 尾鱼进行行为学分析,于 20:00 将待观察的斑马鱼从恒温培养箱内取出,转移至 Zebrafish 行为学观察装置中,待斑马鱼适应后(约 10 min)对其游泳行为进行连续记录并分析。采用 Viewpoint 系统(法国众为公司产品)对斑马鱼的游泳行为进行摄像分析,每尾斑马鱼连续观察 5 min 并记录。根据预试验结果,将斑马鱼游泳速度在 2 cm/s 以下定义为慢速游泳,将 2 cm/s 以上定义为快速游泳。采用 Zebrafish 行为学分析软件对 5 min 内快速游泳时间和距离、慢速游泳时间和距离、平均游泳速度进行分析。

1.2.2 反转录与荧光定量 PCR 按照说明书采用 Trizol (TaKaRa)提取斑马鱼 CNSS 样品 RNA,提取的 RNA 在 Nano-drop 仪器上进行浓度测定。采用反转录试剂盒(TaKaRa, A047)按照说明书取 1 μg RNA 进行反转录,将得到的 cDNA 稀释 10 倍后进行实时荧光定量 PCR 分析。采用 2 × SRBR 荧光分析酶(Roche 公司)进行实时荧光定量分析,PCR 反应体系共 20 μL,其中上下游引物各 1 μL, cDNA 模版 2 μL、SYBR 酶 10 μL,剩余体积用水补足。采用 abi7500 型仪器行热循环反应,PCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 变性和延伸 40 s,共设置 40 个循环。反应结束后设置溶解曲线检验反应产物的特异性。以 β -actin 为内进

标,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对目的基因进行相对定量分析,所用引物序列见表 1。

1.3 统计学分析

采用 Graphpad prism 5 (Graphpad Software. San Diego, CA) 软件对数据进行统计分析并作图,数据以“平均值 \pm 标准误”表示。采用 T-test 方法对对照组和试验组的基因表达、行为学数据进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$

表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼的游泳行为

采用 Viewpoint 行为学观察仪(法国众维公司产品)对斑马鱼 5 min 内的游泳轨迹进行摄像。游泳轨迹见图 1,绿色曲线、红色曲线分别表示低速、快速游泳运动。

表 1 PCR 扩增反应所用引物序列

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>U I</i>	CACGCTTCCTCACCGCTACT	TCAATGGGACGGGCTTCA
<i>U II α</i>	GCAGCCGCAGCACATT	CAAAAGACCACTGGGAGGAAC
<i>U II β</i>	AGTCGGCGGAGATGAGCTT	GCGGCATCATGGGAGAGATA
<i>CRH</i>	GCCGCGCAAAGTTCAAAA	GCGAGGAGAATCTGTGCGTAA
<i>M2</i>	CAGACCGTCAACAACTACTTCC	TAATCAACAGCCAGCCACA
<i>β-actin</i>	GCTGCCTCTTCTTCTCTCC	ATGTCCACGTCGCACTTC

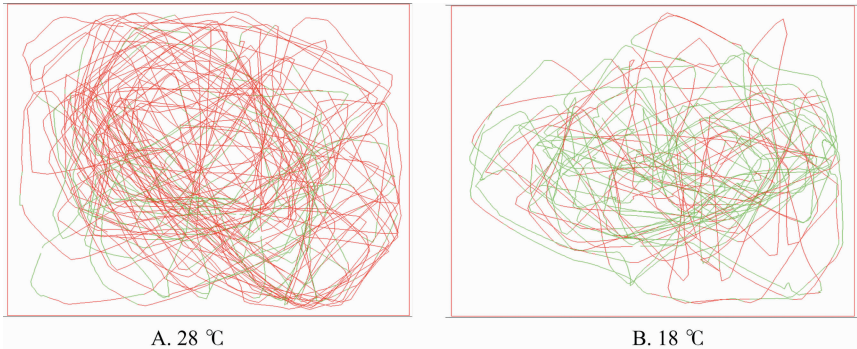
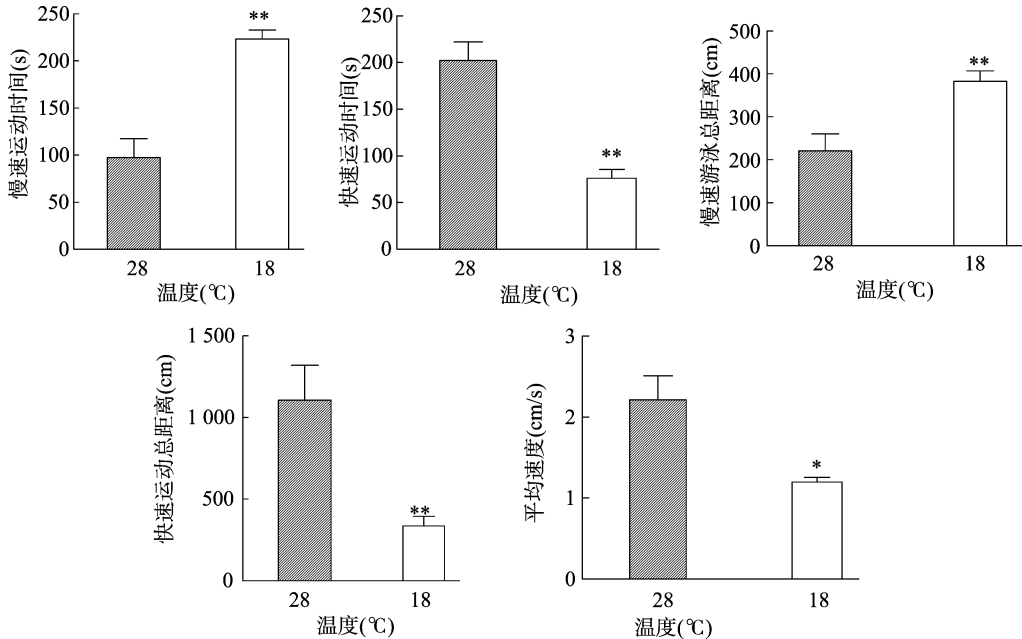


图1 斑马鱼在 28、18 °C 下的运动轨迹

采用行为学分析软件对斑马鱼的运动轨迹进行分析。结果表明:从时间分布来看,2 个组的斑马鱼在运动时间分布上具有显著差异,在观察记录的 5 min 运动行为中,寒冷组斑马鱼慢速运动所占时间明显多于对照组(图 2 - A),而快速游

泳运动的时间明显少于对照组(图 2 - B);从游泳距离来看,寒冷应激组的慢速游泳距离显著高于对照组(图 2 - C),而快速游泳距离显著低于对照组(图 2 - D);寒冷应激组斑马鱼的平均游泳速度明显小于对照组(图 2 - E)。



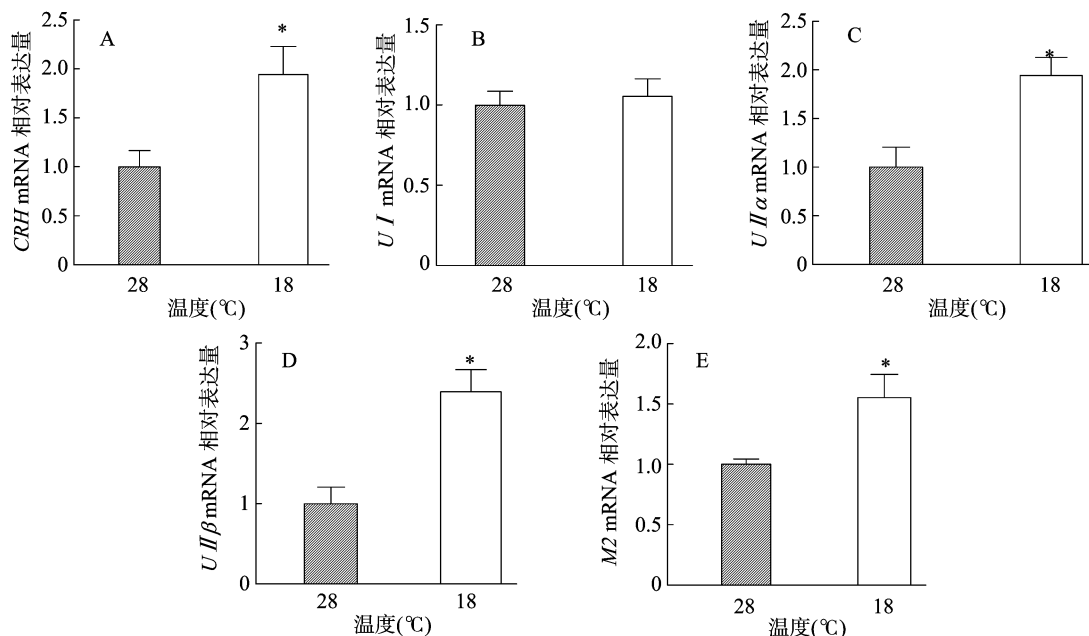
“*” “**” 分别表示在 0.05、0.01 水平下差异显著。下图同

图2 斑马鱼运动轨迹分析

2.2 CNSS 组织 *U I*、*CRH*、*U II*、*M2* 基因表达

采用 Real-time PCR 方法检测对照组和试验组斑马鱼 CNSS 组织中应激相关基因 *CRH*、*U I*、*U II* α 、*U II* β 的表达,并对运动相关基因 *M2* 进行研究。结果表明:与对照组相比,试验组斑马鱼 CNSS 组织中应激相关基因 *CRH*、*U II* α 、*U II* β

的表达均显著增加(图 3-A、3-C、3-D);*U I* 基因的表达在对照组和试验组之间没有差异(图 3-B);乙酰胆碱受体基因 *M2* 在试验组斑马鱼 CNSS 组织中的表达显著高于对照组(图 3-E)。



A—*CRH*; B—*U I*; C—*U II* α ; D—*U II* β ; E—*M2*
图3 斑马鱼 CNSS 组织 *U I*、*CRH*、*U II* α 、*U II* β 、*M2* 基因表达

3 结论与讨论

应激是生物应对外界环境变化重新调整体内动态平衡过程而进行特异和非特异级联放大的生理反应,应激的重要神经内分泌反应之一是 HPA 轴即下丘脑-垂体-肾上腺轴的激活。鱼类不仅具有下丘脑-垂体系,还具有一套类似的神经内分泌系统 CNSS,即尾部神经内分泌系统^[11]。CNSS 系统内的 Dahlgren 细胞分泌物通过轴突运送至尾垂体中贮存,再由尾垂体直接分泌进入尾静脉,以便分泌物迅速抵达肾脏、肠、性腺、肝脏等靶器官,参与机体对外界环境的适应过程^[5,12]。

已有研究表明,鱼类在寒冷条件下运动能力显著下降,机体内参与代谢的各种酶的活性随着温度下降而下降,提供给肌肉运动的能量也随之减少^[13]。本试验中,18℃寒冷条件下斑马鱼慢速游泳的时间显著长于 28℃条件下的对照组,且其游泳距离显著小于对照组,表明寒冷处理对斑马鱼的正常游泳机能造成了影响。在试验前期对斑马鱼 1、24 h 等长时间的游泳运动行为进行了观察,发现低温条件下鱼的运动行为均显著下降,因此本研究只分析具有代表性的 5 min 内游泳轨迹。

以往关于鱼类对温度应激的研究多集中于鱼类脑部^[10],而鱼类 CNSS 是机体除脑部外参与应激的主要部位,CNSS 内的 Dahlgren 细胞通过分泌 *CRH*、*U I*、*U II* 等激素进入血液参与应激反应^[14]。在大鼠和虹鳟鱼的研究中,应激导致 *CRH* mRNA 表达上升^[15-16],这与本研究中斑马鱼经冷应激处理后 *CRH* 基因表达显著上升相一致,但本研究中 *U I* 基因表达并未表现出差异。尽管 *CRH* 和 *U I* 基因同属于 *CRH* 超家族一

类,且 *CRH* 和 *U I* 在鱼脑和尾部 CNSS 系统存在共表达的现象^[17],但参与 *CRH* 和 *U I* 的具体转录调控机制可能并不同。在大麻哈鱼脑组织内,8—9 月时雌性、雄性脑组织 *CRH* mRNA 均显著升高,但 *U I* 基因却没有差异^[18]。将虹鳟从淡水环境转移至海水中,24 h 后进行基因表达分析,发现脑前区组织中 *CRH* 表达升高,但 *U I* 并未发生变化^[19]。

对低等脊椎动物硬骨鱼 *U II* 的研究表明,该激素参与动物体内的渗透压调节^[20]。国外学者研究发现,*U II* 能刺激离体虾虎鱼膀胱,并适应淡水生活的欧洲鳗鲡后肠组织对钠离子的吸收和重吸收能力^[21]。*U II* 能增加鱼类在低渗环境中对钠离子和氯离子的保存能力,从而减少机体内离子的流失。牙鲆血液中 Urotensin 激素的含量与外部盐度密切相关,当欧洲川鲈从盐水环境转移至淡水中时,血液 Urotensin 水平显著上调^[14],表明 *U II* 在离子调节方面具有重要作用。已有研究表明,寒冷条件下斑马鱼鳃组织中 Na-K-ATP 酶的活性下降,伴随体内钙离子和钠离子显著下降^[22]。本研究中,*U II* α 和 *U II* β 基因 mRNA 升高可能是寒冷刺激引起斑马鱼离子丢失后,体内离子浓度恢复平衡的一种弥补机制。

毒蕈碱样乙酰胆碱受体(M 受体)属于 G 蛋白相偶联的受体超大家族,参与运动、体温调节、学习记忆等多种重要生理功能^[23-24]。*M2* 激动剂可以剂量依赖性地增强老鼠血液内皮质醇的浓度,如果将 *M2* 基因进行敲除,*M2* 激动剂的效果被抑制,表明 *M2* 信号通路在应激过程中起到了重要作用^[25]。本研究中,寒冷应激处理后斑马鱼 CNSS 组织中的 *M2* 受体表达明显上调,进一步证明寒冷处理对斑马鱼产生了明显的应激反应,同时体现了 *M2* 基因在应激中的重要性。

18 ℃ 的寒冷处理对斑马鱼造成了应激反应,并严重影响斑马鱼的运动机能。寒冷造成斑马鱼的应激反应以及运动机能下降,可能是机体为了生存而减少运动、保存能量的一种策略,具体机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Le M C, Troutaud D, Deschaux P. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish[J]. The Journal of Experimental Biology, 1998, 201 (Pt 2): 165 – 168.
- [2] 邹曙明, 沈俊宝, 孙效文. 鱼类低温适应机制及抗寒育种[J]. 上海水产学报, 1998, 7(3): 231 – 237.
- [3] Donaldson M R, Cooke S J, Patterson D A, et al. Cold shock and fish[J]. Journal of Fish Biology, 2008, 73(7): 1491 – 1530.
- [4] Winter M J, Ashworth A, Bond H, et al. The caudal neurosecretory system: control and function of a novel neuroendocrine system in fish[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2000, 78(3): 193 – 203.
- [5] 吕为群, 刘爽, 钟英斌. 鱼类尾部神经内分泌系统研究进展[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 743 – 749.
- [6] Bernier N J, Alderman S L, Bristow E N. Heads or tails? Stressor – specific expression of corticotropin – releasing factor and urotensin I in the preoptic area and caudal neurosecretory system of rainbow trout[J]. Journal of Endocrinology, 2008, 196(3): 637 – 648.
- [7] Schaefer J, Ryan A. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio* [J]. Journal of Fish Biology, 2006, 69(3): 722 – 734.
- [8] Cortemeglia C, Beitinger T L. Temperature tolerances of wild – type and red transgenic zebra danios[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2005, 134(6): 1431 – 1437.
- [9] Uliano E, Cataldi M, Carella F, et al. Effects of acute changes in salinity and temperature on routine metabolism and nitrogen excretion in gambusia (*Gambusia affinis*) and zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology, 2010, 157(3): 283 – 290.
- [10] Tseng Y C, Liu S T, Hu M Y, et al. Brain functioning under acute hypothermic stress supported by dynamic monocarboxylate utilization and transport in ectothermic fish[J]. Frontiers in Zoology, 2014, 11(1): 53 – 58.
- [11] Alderman S L, Bernier N J. Ontogeny of the corticotropin – releasing factor system in zebrafish [J]. General and Comparative Endocrinology, 2009, 164(1): 61 – 69.
- [12] Pepels P P, Van H H, Wendelaar B S E, et al. Corticotropin – releasing hormone in the teleost stress response: rapid appearance of the peptide in plasma of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. The Journal of Endocrinology, 2004, 180(3): 425 – 438.
- [13] Wardle C S. Effects of temperature on the maximum swimming speed of fishes[M]//ALi M A. Environmental physiology of fishes. New York: Spinger, 1980: 519 – 531.
- [14] Lu W, Greenwood M, Dow L, et al. Molecular characterization and expression of urotensin II and its receptor in the flounder (*Platichthys flesus*): a hormone system supporting body fluid homeostasis in euryhaline fish[J]. Endocrinology, 2006, 147(8): 3692 – 3708.
- [15] Doyon C, Trudeau V L, Moon T W. Stress elevates corticotropin – releasing factor (CRF) and CRF – binding protein mRNA levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. The Journal of Endocrinology, 2005, 186(1): 123 – 130.
- [16] Hsu D T, Chen F L, Takahashi L K, et al. Rapid stress – induced elevations in corticotropin – releasing hormone mRNA in rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: an *in situ* hybridization analysis [J]. Brain Research, 1998, 788(1/2): 305 – 310.
- [17] Lu W, Dow L, Gumusgoz S, et al. Coexpression of corticotropin – releasing hormone and urotensin I precursor genes in the caudal neurosecretory system of the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*): a possible shared role in peripheral regulation [J]. Endocrinology, 2004, 145(12): 5786 – 5797.
- [18] Westring C G, Ando H, Kitahashi T, et al. Seasonal changes in CRF – I and urotensin I transcript levels in masu salmon: correlation with cortisol secretion during spawning [J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 155(1): 126 – 140.
- [19] Craig P M, Al – Timimi H, Bernier N J. Differential increase in forebrain and caudal neurosecretory system corticotropin – releasing factor and urotensin I gene expression associated with seawater transfer in rainbow trout [J]. Endocrinology, 2005, 146(9): 3851 – 3860.
- [20] 竺晓鸣, 杜冠华. 尾加压素 II 生物学效应研究进展[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(6): 651 – 654.
- [21] Larson B A, Madani Z. Increased urotensin I and II immunoreactivity in the urophysis of *Gillichthys mirabilis* transferred to low salinity water [J]. General and Comparative Endocrinology, 1991, 83(3): 379 – 387.
- [22] Chou M Y, Hsiao C D, Chen S C, et al. Effects of hypothermia on gene expression in zebrafish gills: upregulation in differentiation and function of ionocytes as compensatory responses [J]. The Journal of Experimental Biology, 2008, 211 (Pt 19): 3077 – 3084.
- [23] Zhang W L, Yamada M, Gomez J, et al. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M – 1 – M – 5 muscarinic receptor knock – out mice [J]. Journal of Neuroscience, 2002, 22(15): 6347 – 6352.
- [24] Perry E K, Smith C J, Court J A, et al. Cholinergic nicotinic and muscarinic receptors in dementia of Alzheimer, Parkinson and Lewy body types [J]. Journal of Neural Transmission: Parkinson's Disease and Dementia Section, 1990, 2(3): 149 – 158.
- [25] Hemrick L S K, Bymaster F P, Evans D C, et al. Muscarinic agonist – mediated increases in serum corticosterone levels are abolished in m(2) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice [J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002, 303(1): 99 – 103.