

文章编号: 1674-5566(2025)06-1335-10

DOI: 10.12024/jsou.20241204727

长期低氧胁迫对斑马鱼精巢的影响

张馨月^{1,2}, 吴煜国^{1,2}, 林一川^{1,2}, 胡瑞芹^{3,4}, 江守文^{3,4}, 许强华^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 海洋生物资源与管理学院, 上海 201306; 2. 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 4. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为研究长期低氧胁迫对精巢发育的影响, 采用显微观察和转录组测序技术比较了常氧(6.5 ± 0.2)mg/L与长期低氧胁迫(1.5 ± 0.2)mg/L下, 斑马鱼精巢组织的显微结构与转录组变化。结果表明: 光镜切片下, 长期低氧使斑马鱼精巢组织呈现精原细胞排列疏松、精子数量明显减少的现象; 常氧组和长期低氧组精巢的转录组比较显示, 683个基因在低氧精巢中表达量显著下调($P<0.05$), 710个基因在低氧精巢中表达量显著上调($P<0.05$)。对差异基因进行基因本体论(Gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)的富集分析发现, 差异基因主要富集在肌细胞分化、对含氧化合物的反应、精巢发育和生物合成氨基酸等通路上。其中, *aco2*基因的高表达与*idh3b*基因的低表达可能与长期低氧影响精巢组织发育相关。与能量生成相关的基因 *pgam2*、*aldoaa*、*aldoab* 在低氧精巢中表达量显著上调, 提示低氧下精子的生成可能有更高的能量需求。另外, 低氧斑马鱼精巢中多个肌细胞分化基因的显著高表达, 可能是雄性斑马鱼性腺发育对低氧环境的适应机制。研究表明, 在长期低氧胁迫下雄性斑马鱼性腺组织发育退化, 通过转录组分析研究, 可为揭示鱼类精巢的长期低氧适应提供新思路。

关键词: 斑马鱼; 低氧胁迫; 转录组; 生殖系统

中图分类号: S 917.4 文献标志码: A

氧气是动物生存的限制因子, 对动物的生长发育及各项生理活动具有重要影响。鱼类在水体中的生命活动会受到不同环境的影响, 水中的溶解氧浓度变化对鱼类有至关重要的影响^[1]。水中溶解氧含量降低会引起鱼体代谢紊乱、氧化应激和组织损伤等一系列应激响应, 还会影响种群繁殖, 甚至导致其死亡^[2]。

缺氧影响着全球的海洋与淡水水域, 可能引起渔业产量下降、地区性物种组成变化等重大问题^[3]。长期暴露在亚致死水平的缺氧环境中, 会引起鱼类种群数量降低和鱼类性腺发育不良。有研究^[4]表明, 在成年鲤鱼中, 缺氧会破坏睾酮和雌二醇平衡, 导致精子质量、受精成功率和幼鱼孵化率下降。对斑马鱼胚胎发育的研究也发现, 受精后48 h (48 hpf, Hours post fertilization, 受精

后小时数)的胚胎如果面临缺氧环境, 可能会出现性别分化提前^[5]。因此, 了解缺氧的作用方式及其长期在缺氧环境下对鱼类性腺发育繁殖的影响是一个重要的生物学问题。

高通量RNA测序技术(RNA-Seq)具有高灵敏度和准确性、数字化表达以及区分转录本异构体的能力, 已被广泛用于发现、分析和量化RNA转录本^[6]。RNA-Seq结合了微阵列和表达序列标签测序的优势, 包括单碱基分辨率、高通量、低背景噪声和高灵敏度, 可用于绘制转录区图谱、量化并区分基因表达水平^[7]。高通量测序技术彻底改变了基因组学和转录组学领域, 为快速、经济高效地生成基因组规模的数据提供了机会^[8]。

斑马鱼是生命科学基因功能研究中的脊椎

收稿日期: 2024-12-11 修回日期: 2025-05-12

基金项目: 国家自然科学基金(32470557); 国家重点研发计划(2022YFD2400800)

作者简介: 张馨月(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。E-mail: 1079128007@qq.com

通信作者: 许强华, E-mail: qhxu@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydxxb.com>

模式生物,具有繁殖力强、胚胎透明、性成熟周期短、个体小、易养殖等诸多特点,可进行大规模培育^[9]。精巢是种群繁殖的重要器官,低氧胁迫影响斑马鱼精巢退化的分子机制尚不清楚。本研究以成年斑马鱼为研究对象,对常氧与低氧胁迫的精巢组织的结构和转录组进行了比较研究,拟探究低氧胁迫对雄性斑马鱼生殖系统的影响,为研究斑马鱼低氧适应机制提供参考。

随着全球气候变化导致的温室效应日益加剧,水体溶氧变低成为水产养殖业的挑战。在此背景下,通过以斑马鱼作为模式生物开展基础研究,并将其研究成果转化为经济鱼类的养殖实践,有望显著提升养殖效益。对雄性鱼类生殖系统的深入研究,这对维持养殖鱼类种群的稳定繁衍具有重要的理论和实践意义。该研究方向不仅能够为提高鱼类苗种成活率提供科学依据,还可为应对气候变化下的水产养殖可持续发展提供新的解决方案。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用斑马鱼(*Danio rerio*)已在实验室中养殖至少10代。斑马鱼生活在淡水中,在驯化期间,每天喂食2次相同的食物,食物量为体质量的4%。养殖条件为(28.0±0.5)℃,光照时间每天为12 h光照,12 h黑暗。

取同一对亲本繁殖的后代进行本实验,并挑选出雄性斑马鱼为后续实验备用。实验鱼常氧下(6.5±0.2)mg/L饲养3个月后,分成实验组与对照组。对照组维持在常氧条件下。将实验组置于氧浓度可以调节的低氧箱(长沙华曦电子科技公司)中,用N₂气体鼓泡至所需的O₂浓度,每日定时用YSI Pro20溶氧仪(美国)进行水体溶解氧测定,确保低氧斑马鱼的水体溶氧为(1.5±0.2)mg/L。基于前期的研究^[10]表明,溶氧为1.5 mg/L时足以引发鱼类的显著生理反应,且斑马鱼在水体溶氧为(1.5±0.2)mg/L条件下可以长期生存,故本实验采用(1.5±0.2)mg/L低氧驯养斑马鱼。

在低氧驯化后,麻醉处死6尾低氧斑马鱼,立即取出相应的斑马鱼精巢。同时,将6尾养殖于正常溶氧(6.5±0.2)mg/L中的斑马鱼作为阴性对照。实验按照美国国家科学院国家研究委员会发布的《实验动物的护理和使用指南》中的原则

进行。实验方案经上海海洋大学动物使用伦理委员会批准。

1.2 实验方法

1.2.1 组织切片观察

精巢是雄性斑马鱼生殖的主要器官之一。为观察低氧对斑马鱼精巢组织的影响,分别取缺氧组和常氧组的斑马鱼精巢,对其进行组织病理学切片。首先,用PBS溶液清洗精巢组织,并用4%多聚甲醛溶液固定12~24 h。脱水剂脱水后,用切片机连续切片(厚度6 μm)、贴片、烘烤切片。用二甲苯脱蜡、梯度酒精复水、苏木精和伊红染色、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后,在扫片机扫描之后,进行观察拍照。

1.2.2 总RNA提取及文库构建与测序

使用TRIzol试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)提取总RNA。在1%琼脂糖凝胶上监测RNA降解和污染情况。选取低氧浓度(1.5±0.2)mg/L和正常氧浓度(6.5±0.2)mg/L下的3个精巢样本,共6个样本进行文库测序。严格按照“VAHTS Stranded mRNA-seq Library Prep Kit for Illumina®”的说明进行后续的数据库构建实验。

1.2.3 差异表达基因分析

在计算机上测量原始数据后,对数据质量进行评估,选出高质量的数据。然后,在Linux系统环境下使用Trinity软件去除拼接数据。数据拼接完成后,利用DESeq^[11]软件进行不同样本间差异基因比较分析,筛选出不同样本间差异表达基因,并对差异表达基因进行显著性($P<0.05$)分析。

1.2.4 差异表达基因富集分析

利用软件GOseq^[12]对筛选出的差异表达基因进行基因本体论(Gene ontology, GO)富集分析。筛选条件设定 $P\leq 0.05$ 为阈值,满足该条件即为显著富集GO项。通过对GO功能的显著富集分析,确定不同表达基因的主要生物学功能。

利用KOBAS(2.0)软件筛选获得的差异表达基因序列,注释到京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of gene and genomes, KEGG)数据库中,富集分析的显著 P 值与GO分析类似。通过对KEGG通路的富集分析,确定不同表达基因所涉及的主要生物代谢通路和信号转导通路。

1.2.5 差异基因 RT-qPCR

随机选取差异表达基因中的 6 个基因,以 GAPDH 作为 RT-qPCR 的内参基因,基因的引物设计如表 1 所示。取常氧、低氧条件(1.5 ± 0.2)mg/L 下驯化 3 个月的雄性斑马鱼,提取精巢组织中

表 1 荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 RT-qPCR primers

基因名称 Gene		引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	产物长度 Product length/bp
<i>pgam2</i>	F	CACCTGGCGTCTGAATGAAC	87
	R	ACCTGCTCCTCTCCATGTTG	
<i>aco2</i>	F	TCGACAAGGGTCTCAAGTGC	141
	R	AAGGTCCACAGGCATTAGCC	
<i>idh3b</i>	F	ACCGCTATGCTCCTTAGTGC	157
	R	CCCTGGTGAACCTCGTCGTT	
<i>dusp27</i>	F	ACCCAGAGTTACGATGGCG	209
	R	TGCGAGACGAGTAGCTAAC	
<i>aldoaa</i>	F	GGAGAGGGGCATGGTAGTTG	181
	R	AGGGGTTGTGGGAGTGATCT	
<i>sycp3</i>	F	GAAGGCCTTGACTTCACCG	157
	R	AACCTCATTCCCCACACCCAC	

2 结果与分析

2.1 组织切片

将低氧驯化 3 个月与正常氧浓度养殖条件下的斑马鱼精巢组织进行对比,用组织石蜡切片观察长期低氧可能对精巢造成的影响。如图 1 所示,常氧组斑马鱼精巢组织由许多生精小管(ST)和管间结构组成,生精小管将精原细胞(Sg)、初级精母细胞(Ps)、次级精母细胞(Ss)和精细胞(St)等不同发育时期的生精小囊包裹在其中,通过胞吐作用将成熟的精子释放到管腔中央。对比长期低氧组和常氧组斑马鱼精巢的组织切片后发现,长期缺氧对斑马鱼精巢内各种细胞数量以及结构有较大的影响,低氧组与常氧组呈现出较大的差异:常氧组斑马鱼精巢的精子数量多、分布密集,精原细胞成团明显,各细胞团之间间隔紧凑;而低氧胁迫组的精子数量明显减少,精原细胞排列疏松(图 1)。可见,长期低氧下生活的成年雄性斑马鱼其生殖系统受到慢性损伤,导致生殖系统退化。

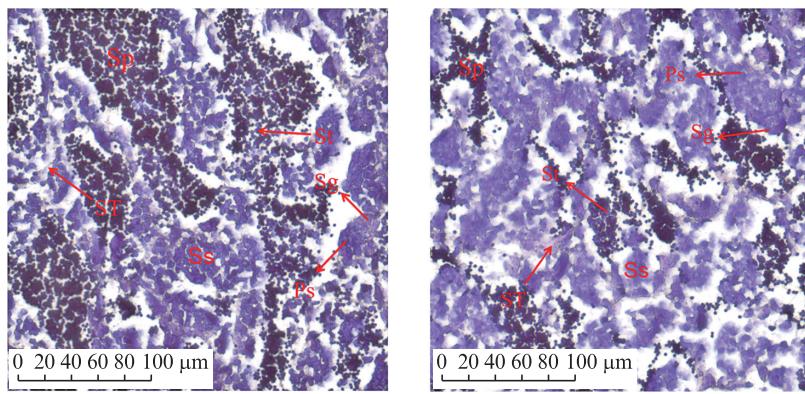
的总 RNA。按照反转录试剂盒提供的步骤将 RNA 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 实验, 并且将所得数据进行熔解曲线分析, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各个样本的相对表达量。

2.2 差异基因的筛选

将长期低氧驯化与正常氧浓度下的斑马鱼精巢组织差异表达基因进行对比分析。用于两组比较的基因总数为 36 212 个。将基因表达量的变化倍数设置为 2 倍以上, $P < 0.05$ 的基因作为差异表达基因(图 2a)。从表达谱分析可知:低氧组与常氧组斑马鱼精巢共有 1 393 个差异表达基因, 683 个基因在低氧精巢中显著下调(图 2b, 蓝), 710 个基因在低氧精巢中表达量显著上调(图 2b, 红)。

2.3 低氧与常氧精巢差异表达基因的 GO 富集分析

对低氧胁迫与常氧下精巢组织的差异表达基因进行 GO 富集发现, 差异表达基因在分子功能、生物过程和细胞成分类别中均有富集。最主要富集在生物过程类别中, 包括 8 个 GO Term 富集(图 3a)。其中, 特别是与肌细胞分化、对低氧适应和性腺发育相关的几个 GO Term 显著富集, 如:“肌肉细胞分化(GO:0045214)”、“对含氧化合物的反应(GO:1901700)”和“精巢发育(GO:0007286)”等(图 3a)。



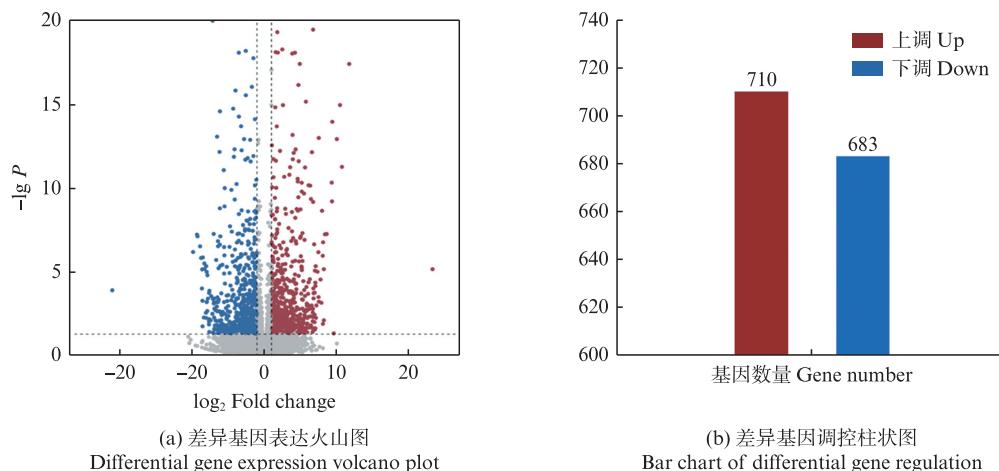
(a) 常氧组 Hypoxia group

(b) 低氧组 Normal group

ST. 生精小管; Sp. 精子; Sg. 精原细胞; Ps. 初级精母细胞; Ss. 次级精母细胞; St. 精细胞。

ST. Seminiferous tubule; Sp. Spermatozoon; Sg. Spermatogonium; Ps. Primary spermatocyte; Ss. Secondary spermatocyte; St. Spermatid.

图1 常氧组(a)和低氧组(b)斑马鱼精巢组织形态(H.E染色)

Fig. 1 Hypoxia group (a) and normal group (b) histomorphology of the testes of *Danio rerio* (H.E staining)

(a) 差异基因表达火山图

Differential gene expression volcano plot

(b) 差异基因调控柱状图

Bar chart of differential gene regulation

红点和蓝点分别表示低氧精巢中显著上调/下调的差异表达基因；灰色的点表示没有显著差异表达的基因。红柱和蓝柱分别表示低氧精巢中显著上调/下调的基因。

Red dots indicate upregulated genes, blue dots indicate downregulated genes, and gray dots indicate non-significant genes in hypoxic testes; red and blue bars represent the counts of upregulated and downregulated genes.

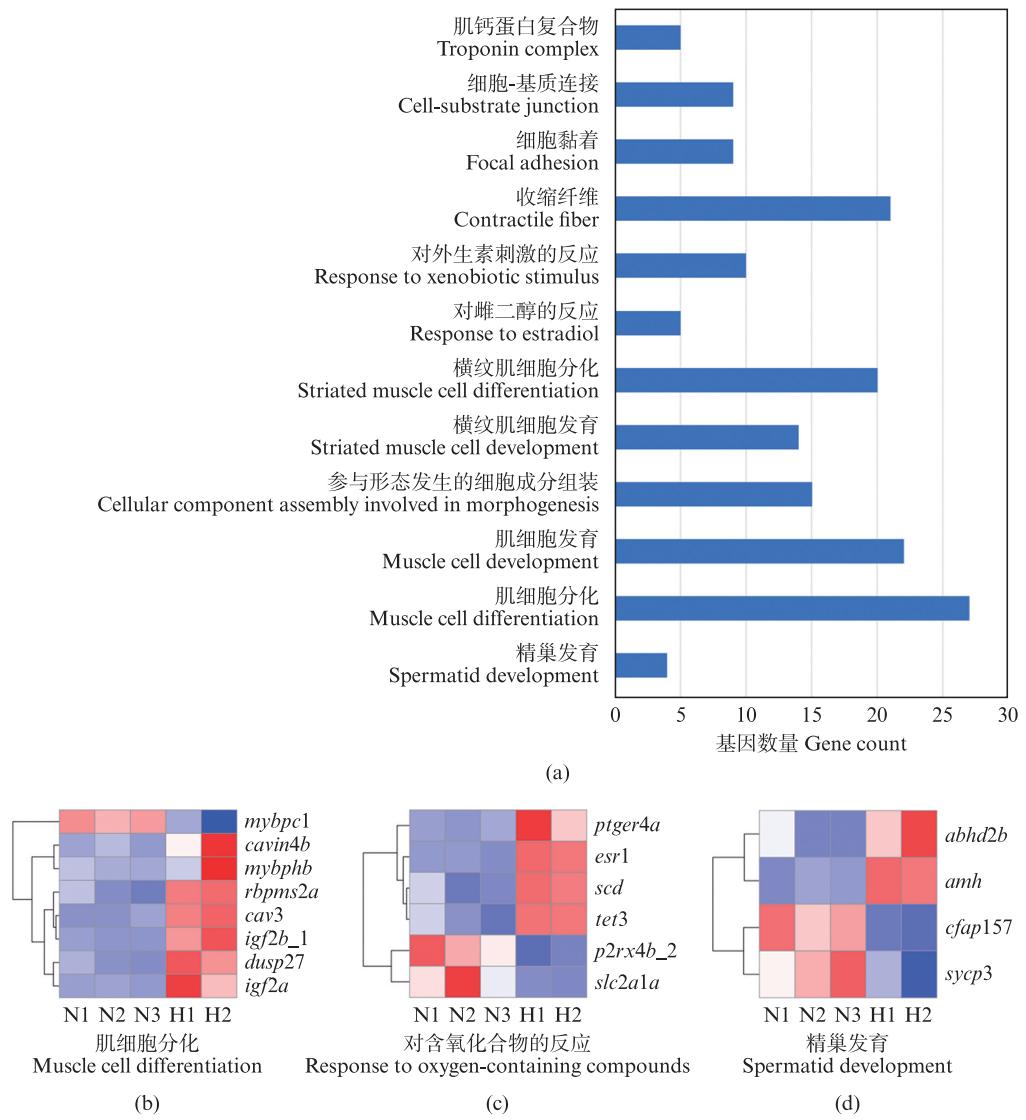
图2 差异表达基因火山图(a)和差异基因调控柱状图(b)

Fig. 2 Map of differentially expressed genes represented in a volcano plot (a) and histogram of differential gene regulation (b)

从差异基因的GO富集可知,长期低氧胁迫下,斑马鱼精巢组织的发育及分化与低氧适应、细胞增殖分化密切相关。因此,在所有富集的通路中,挑选出3条可能与精巢发育退行相关的代表性通路,并试图从中寻找影响低氧下精巢发育的关键基因。表2和图3分别显示了富集的3个GO[肌细胞分化(图3b)、对含氧化合物反应(图3c)和精巢发育(图3d)]包括的基因表达量和表达量热图。这些在低氧斑马鱼精巢表达量显著变化的基因可能与斑马鱼低氧下精巢生殖功能维持密切相关。

2.4 低氧与常氧精巢差异表达基因的KEGG功能富集

在对常氧组与低氧组差异基因的KEGG富集中发现,差异基因显著富集在4个通路上:“Cytoskeleton in muscle cells 肌肉细胞骨架”“Focal adhesion 细胞黏着”“ECM-receptor interaction ECM受体相互作用”“Biosynthesis of amino acids 生物合成氨基酸”(图4a)。其中,2个KEGG信号通路(肌肉细胞骨架、细胞黏着)富集程度最高。肌肉细胞骨架包含36个基因、细胞黏着包含24个基因,与GO富集分析结果中肌细胞分化相关基因相符合。



(a) 差异基因GO富集通路图; (b) 肌细胞发育通路(GO:0045214)中重要基因热图; (c) 对含氧化合物的反应通路(GO:1901700)中重要基因热图; (d) 精巢发育通路(GO:0007286)中重要基因热图。
 (a) GO enrichment analysis of differentially expressed genes; (b) Heatmap of key genes in muscle cell development pathway (GO: 0045214); (c) Response to oxygen-containing compounds pathway (GO: 1901700); (d) Heatmap of key genes in testis development pathway (GO: 0007286).

图3 GO通路的表达量热图分析
 Fig. 3 Heat map analysis of GO pathway

值得一提的是,在“生物合成氨基酸”通路中,富集到了与精子活性相关的关键基因 *aco2* 和 *idh3b*(表3)。有研究^[8]表明, *aco2* 蛋白的低表达与精子活力呈正相关,而 *idh3b* 的缺失将可能导致小鼠雄性不育。与对照组相比, *aco2* 基因在长期低氧斑马鱼精巢中的表达显著上调,而 *idh3b* 基因的表达在低氧斑马鱼精巢中表达量显著下调(图4b和表3),这可能与低氧下斑马鱼精子发育受抑制相关。除此之外,其他与能量生成相关的多个基因(如:*pgam2*、*aldoaa*、*aldoab*)在低氧下精巢中表达量显著上调(图4b),这表明低氧下精

子的生成可能有更高的能量需求。

2.5 转录组数据的RT-qPCR验证

基于转录组测序分析结果,本研究随机选取6个差异表达基因,采用RT-qPCR技术对其在斑马鱼精巢组织中的表达水平进行验证。如图5所示,qPCR检测结果显示这些基因的表达趋势与RNA-seq数据基本一致,进一步证实了转录组分析结果的可靠性。实验验证结果表明,本研究筛选获得的差异表达基因具有较高的准确性,为后续功能研究提供了可靠的分子靶点。

表2 部分调控精巢分化和发育的重要差异表达基因

Tab. 2 Summary of some differentially expressed genes that regulate testicular differentiation and development

GO通路 GO Term	基因 Gene	$\log_2 FC$	P	调控 Regulation
对含氧化合物的反应 Response to oxygen-containing compound	<i>ptger4a</i>	1.715 4	9.18×10^{-6}	上调
	<i>esr1</i>	1.407 9	0.000 4	上调
	<i>scd</i>	1.907 8	0.000 1	上调
	<i>tet3</i>	1.030 8	0.000 1	上调
	<i>p2rx4b_2</i>	-4.127 8	0.000 7	下调
	<i>slc2a1a</i>	-3.483 9	0.000 2	下调
精巢发育 Spermatid development	<i>amh</i>	1.883 0	3.41×10^{-29}	上调
	<i>cfap157</i>	-5.029 5	0.001 1	下调
	<i>sycp3</i>	-1.119 8	0.000 2	下调
肌细胞分化 Muscle cell differentiation	<i>mybpc1</i>	-1.220 4	0.000 1	下调
	<i>ccdc78</i>	-2.599 9	4.9426×10^{-26}	下调
	<i>mybphb</i>	3.339 1	0.001 7	上调
	<i>rbpms2a</i>	1.138 1	5.04×10^{-6}	上调
	<i>cav3</i>	5.192 2	0.000 4	上调
	<i>igf2b_1</i>	6.021 5	2.03×10^{-5}	上调
	<i>dusp27</i>	3.030 8	1.05×10^{-5}	上调
	<i>igf2a</i>	1.256 4	3.64×10^{-5}	上调

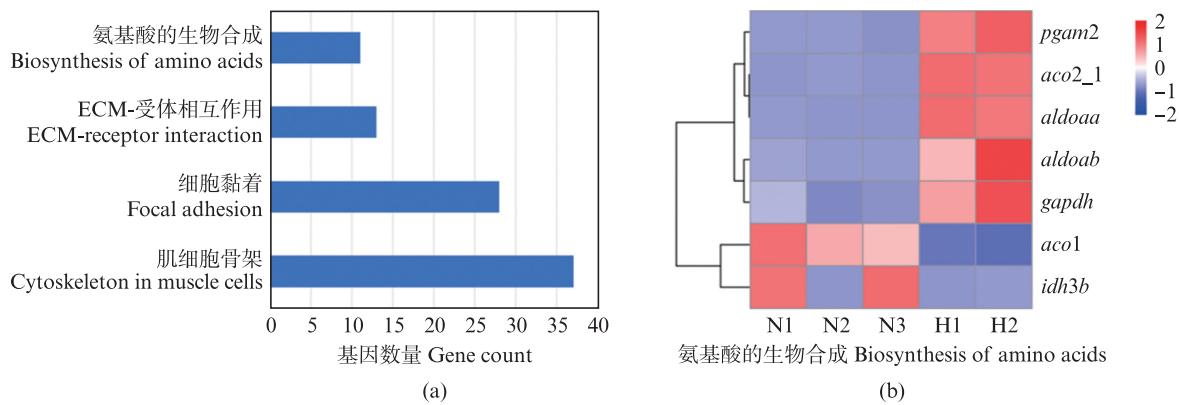
图4 KEGG通路富集分析
Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis

表3 生物合成氨基酸通路中的差异表达基因

Tab. 3 Differentially expressed genes in the biosynthetic amino acid pathway

基因名称 Gene	$\log_2 FC$	P	调控 Regulation	功能 Function
<i>pgam2</i>	1.774 68	3.9185×10^{-7}	上调	参与糖酵解过程 ^[13]
<i>aco2</i>	6.745 4	3.0802×10^{-42}	上调	参与 TCA 循环, <i>aco2</i> 蛋白的低表达与精子活力呈正相关 ^[14]
<i>aldoaa</i>	1.091 2	1.5078×10^{-38}	上调	参与 ATP 合成和三羧酸循环
<i>aldoab</i>	5.194 1	7.3728×10^{-13}	上调	
<i>gapdh</i>	1.553 3	1.5491×10^{-7}	上调	受雄激素水平影响, 转导跨质膜发生的快速 Ca^{2+} 通过 ^[15]
<i>aco1</i>	-1.707 3	2.4126×10^{-19}	下调	调节编码铁转运、储存和使用蛋白质的 mRNA 的翻译和稳定性, <i>aco1</i> 是缺氧诱导因子 ^[16]
<i>idh3b</i>	-4.057 4	0.000 8	下调	参与线粒体三羧酸 (TCA) 循环, 缺失导致小鼠雄性不育, 精子线粒体代谢和精子发生所必需的 ^[17]

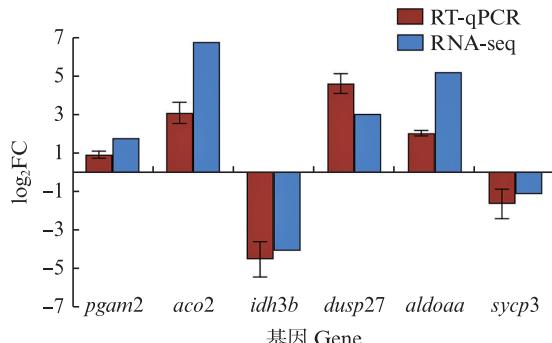


图 5 转录组数据的 RT-qPCR 验证
Fig. 5 Validation of transcriptomic data by RT-qPCR

3 讨论

精巢是斑马鱼种群繁殖的重要器官,低氧胁迫影响斑马鱼精巢的分子机制尚不清楚。先前的研究^[18]表明,低氧环境会影响斑马鱼的性别分化和发育,导致斑马鱼雄性偏向发育。本研究对长期低氧胁迫和常氧条件下的性成熟雄性斑马鱼精巢进行转录组比较研究,通过对差异基因的分析,从中筛选影响低氧下斑马鱼精巢发育退化的关键基因。

从低氧与常氧精巢显著差异基因的 GO 富集可知,长期低氧胁迫下,斑马鱼在“对含氧化合物的反应”“精巢发育”及“肌细胞分化”等 GO Term 与低氧下精巢维持正常功能密切相关(图 3 和表 2)。

在富集的“对含氧化合物的反应”GO Term 中包含了基因 *scd* 基因(图 3 和表 2)。在低氧环境下,*scd* 可能通过调节脂质代谢和细胞膜流动性,帮助细胞维持功能并应对压力^[19]。*scd* 基因在低氧精巢中的高表达体现出斑马鱼对低氧环境的适应。另外,富集的“对含氧化合物的反应”GO Term 中包含了基因 *slc2a1a*,该基因在低氧斑马鱼精巢中的表达显著下降(图 3 和表 2)。*slc2a1a* 是葡萄糖转运蛋白的成员,在细胞中负责将葡萄糖从血液运输到细胞内部^[20]。在精子的成熟过程中,需要大量的能量来支持细胞分裂、减数分裂以及随后的受精过程,低氧下 *slc2a1a* 的低表达可能会影响斑马鱼精细胞的分化,导致精子活力下降。

在富集的“精巢发育”GO Term 中包含了在低氧斑马鱼精巢中上调的 *amh* 基因(图 3 和表 1)。*amh* 是转录因子 TGF-β 超家族的成员,不仅能在

雄性胚胎发育时期启动苗勒管的降解,还能阻止雌性生殖器官的发育。在斑马鱼中,需要正常的 *amh* 活性来调节精原细胞的增殖,控制生精小管的数量和大小,并控制着精原细胞向精子的成熟速度^[21]。研究^[22]还发现,*amh* 在雄性性别分化中发挥重要作用,该基因通过抑制早期卵母细胞的发育或存活来使斑马鱼雄性化。*amh* 在塔哥尼罗非鱼^[23]和尼罗罗非鱼^[12]中也被发现加强了发育的雄性偏向的作用^[24]。在对低氧胁迫的黄颡鱼精巢的研究^[25]中发现,中度低氧会导致精巢中 *amh* 的表达升高,同时中度低氧也会导致雄性性腺中的精子数量减少。这与本研究结果一致(图 3 和表 2)。另外,在显著富集的“精巢发育”GO Term 中包含了在低氧斑马鱼精巢中下调的 *Sycp3* 基因(图 3 和表 2)。*Sycp3* 基因在斑马鱼精母细胞分化过程中可能起到重要作用^[23],提示在低氧环境胁迫下该基因的低表达可能与精子数量减少有关。

另外,值得一提的是,在富集的“肌细胞分化”的 GO Term 中包含了 8 个基因,其中 6 个基因在低氧斑马鱼精巢中都呈现出显著上调的表达(图 3 和表 2)。在对哺乳动物的研究表明,围绕生精小管周围的肌样细胞含有丰富的肌动蛋白丝,它们以物种特异性方式分布在细胞中。细胞骨架蛋白(包括肌球蛋白、结蛋白/波形蛋白和 α-肌动蛋白等)也存在于肌样细胞中,参与精子发生以及肾小管中的物质运输^[26]。本研究发现,在低氧斑马鱼精巢中多个肌细胞分化基因的显著高表达,可能是雄性斑马鱼性腺为维持正常的生殖功能对低氧环境的适应机制。

ATP 在维持精子活力中起着至关重要的作用,细胞内游离钙 Ca^{2+} 是参与精子活力调节的重要信号分子^[27]。糖酵解酶在精子主体中的主要作用是提供一些用于维持精子活力的 ATP^[28]。在精子发育过程中,新陈代谢的依赖性从糖酵解转变为 TCA 循环。乳酸、葡萄糖、丙酮酸和脂肪酸通过 TCA 循环的有氧呼吸是满足精子细胞成熟的高能量需求所必需的^[17]。在本研究中,通过对差异基因的 KEGG 富集分析中发现,富集的“生物合成氨基酸”信号通路中包括了多个参与 TCA 循环以及钙离子通道相关的基因(表 3)。这些与能量生成相关的基因 *pgam2*、*aldoaa* 及 *aldoab* 在低氧精巢中表达量的显著上调,提示低

氧下精子的生成可能有更高的能量需求。

4 小结

本研究以成年斑马鱼为研究对象,对常氧与低氧胁迫的精巢的组织结构和转录组进行了比较研究。从石蜡组织切片可以看出,长期低氧胁迫会导致精巢慢性受损,并导致生殖系统退化。从常氧与低氧精巢转录组的比较研究中发现,差异基因在“肌肉细胞分化”“精巢发育”“含氧化合物的反应”“生物合成氨基酸”等通路上富集。本研究揭示在低氧下的精巢发育退化关键基因、低氧斑马鱼精巢中肌细胞分化基因的高表达以及低氧下精子的生成对能量的高需求,为研究鱼类生殖系统的低氧适应机制提供参考。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] 林枫,贾若南,王法祥,等.低氧胁迫下斑马鱼鳃microRNAs差异分析[J].南方水产科学,2022,18(3):86-93.
- LIN F, JIA R N, WANG F X, et al. Differential analysis of microRNAs in zebrafish gills under hypoxic stress[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(3): 86-93.
- [2] 王彦欣,向蒙,陈磊,等.长期低氧对斑马鱼肝脏糖脂代谢的影响[J].大连海洋大学学报,2023,38(3):429-437.
- WANG Y X, XIANG M, CHEN L, et al. Effects of long-term hypoxia acclimation on liver glycolipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2023, 38(3): 429-437.
- [3] DIAZ R J, ROSENBERG R J O, REVIEW M B A A. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural response of benthic macrofauna[J]. Oceanography and Marine Biology, 1995, 33: 245-303.
- [4] WU R S, ZHOU B S, RANDALL D J, et al. Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(6): 1137-1141.
- [5] SHANG E H H, WU R S S. Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38 (18) : 4763-4767.
- [6] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(1): 57-63.
- [7] TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks [J]. Nature Protocols, 2012, 7(3): 562-578.
- [8] YANG M Q, ATHEY B D, ARABNIA H R, et al. High-throughput next-generation sequencing technologies foster new cutting-edge computing techniques in bioinformatics [J]. BMC Genomics, 2009, 10(s1): I1.
- [9] 刘昌盛,穆宇,杜久林.斑马鱼在生命科学研究中的应用[J].生命科学,2007,19(4):382-386.
- LIU C S, MU Y, DU J L. Applications of the zebrafish in the research of life sciences [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2007, 19(4): 382-386.
- [10] 吴煜国,林枫,江守文,等.长期低氧胁迫下斑马鱼的卵巢转录组特征分析[J].基因组学与应用生物学,2021,40(5/6):1921-1927
- WU Y G, LIN F, JIANG S W, et al. Analysis of zebrafish ovary transcriptome under long-term hypoxia stress[J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40 (5/6): 1921-1927.
- [11] ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data[J]. Genome Biology, 2010, 11 (10): R106.
- [12] YOUNG M D, WAKEFIELD M J, SMYTH G K, et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias[J]. Genome Biology, 2010, 11(2): R14.
- [13] LI X R, WANG T, YIN S W, et al. The improved energy metabolism and blood oxygen-carrying capacity for pufferfish, *takifugu fasciatus*, against acute hypoxia under the regulation of oxygen sensors [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(1): 323-340.
- [14] TANG M, LIU B J, WANG S Q, et al. The role of mitochondrial aconitate (ACO₂) in human sperm motility [J]. Systems Biology in Reproductive Medicine, 2014, 60(5): 251-256.
- [15] SEIDLER N W. Basic biology of GAPDH [M]// SEIDLER N W. GAPDH: Biological Properties and Diversity. Dordrecht: Springer, 2013: 1-36.
- [16] OSKARSSON G R, ODDSSON A, MAGNUSSON M K, et al. Predicted loss and gain of function mutations in ACO1 are associated with erythropoiesis [J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 189.
- [17] ZHU S Y, HUANG J C, XU R, et al. Isocitrate dehydrogenase 3b is required for spermiogenesis but dispensable for retinal viability[J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(9): 102387.
- [18] SHANG E H H, YU R M K, WU R S S. Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40 (9) : 3118-3122.
- [19] JIA J Y, CHEN G H, SHU T T, et al. Androgen signaling inhibits *de novo* lipogenesis to alleviate lipid

- deposition in zebrafish [J]. *Zoological Research*, 2024, 45(2): 355-366.
- [20] KANG T, ZHAO S Y, SHI L N, et al. Glucose metabolism is required for oocyte maturation of zebrafish [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 559: 191-196.
- [21] ROMANO S, KAUFMAN O H, MARLOW F L. Loss of *dmrt1* restores zebrafish female fates in the absence of *cyp19a1a* but not *rbpms2a/b* [J]. *Development*, 2020, 147(18): dev190942.
- [22] YAN Y L, BATZEL P, TITUS T, et al. A hormone that lost its receptor: Anti-Müllerian Hormone (AMH) in zebrafish gonad development and sex determination [J]. *Genetics*, 2019, 213(2): 529-553.
- [23] OZAKI Y, SAITO K, SHINYA M, et al. Evaluation of *SyCP3*, *Plzf* and *Cyclin B3* expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish [J]. *Gene Expression Patterns*, 2011, 11(5/6): 309-315.
- [24] LI M H, SUN Y L, ZHAO J E, et al. A tandem duplicate of anti-Müllerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *oreochromis niloticus* [J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(11): e1005678.
- [25] ZHAO C, YAN J, ZHANG Y F, et al. Effect of long-term hypoxia on the reproductive systems of female and male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2023, 267: 110864.
- [26] Maekawa M, KAMIMURA K, NAGANO T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function [J]. *Archives of Histology and Cytology*, 1996, 59(1): 1-13.
- [27] DARSZON A, NISHIGAKI T, WOOD C, et al. Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology [J]. *International Review of Cytology*, 2005, 243: 79-172.
- [28] MUKAI C, OKUNO M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement [J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(2): 540-547.

Study on the effects of long-term hypoxic stress on zebrafish testis

ZHANG Xinyue^{1,2}, WU Yuguo^{1,2}, LIN Yichuan^{1,2}, HU Ruiqin^{3,4}, JIANG Shouwen^{3,4}, XU Qianghua^{1,2,3}

(1. College of Marine Living Resource Sciences and Management, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Ocean Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

3. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306, China;

4. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To investigate the effects of chronic hypoxia on testicular development, this study employed histological observation and transcriptome sequencing to compare the microstructural and transcriptomic alterations in zebrafish testicular tissues under normoxic [(6.5±0.2) mg/L] and chronic hypoxic[(1.5±0.2) mg/L] conditions. Key findings revealed that chronic hypoxia induced disorganized arrangement of spermatogonia and significant reduction in sperm quantity under light microscopy. Transcriptome analysis identified 683 significantly downregulated($P<0.05$) and 710 upregulated($P<0.05$) genes in hypoxic testes. GO (Gene ontology) and KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) enrichment analyses demonstrated predominant involvement of differentially expressed genes in pathways including muscle cell differentiation, response to oxygen-containing compounds, testis development, and amino acid biosynthesis. Notably, upregulated *aco2* and downregulated *idh3b* expression patterns suggested their potential roles in hypoxia-impaired testicular development. The significant upregulation of energy metabolism-related genes (*pgam2*, *aldoaa*, *aldoab*) implied elevated energy demands for spermatogenesis under hypoxia. Furthermore, marked overexpression of muscle cell differentiation genes may represent an adaptive mechanism of male gonadal development to hypoxic stress. This study reveals testicular developmental regression in male zebrafish under chronic hypoxia and provides novel insights into the molecular adaptation of fish testes to prolonged hypoxic conditions through transcriptomic profiling.

Key words: zebrafish; hypoxia stress; transcription analysis; reproductive system development