

索取号: Q175/17.451:181202084

南京师范大学

硕士学位论文



水体铜暴露对暗纹东方鲀肝脏脂代谢 和肠道微生物的影响

研究生:	<u>魏小珍</u>
指导教师:	<u>尹绍武 教授</u>
培养单位:	<u>生命科学学院</u>
一级学科:	<u>生物学</u>
二级学科:	<u>水生生物学</u>
完成时间:	<u>2021 年 4 月 12 日</u>
答辩时间:	<u>2021 年 5 月 16 日</u>

摘要

暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*)，隶属于鲀形目、硬骨鱼纲、辐鳍亚纲、东方鲀属，主要分布在中国近海和长江中下游，是我国水产养殖的重要经济品种之一。然而，养殖暗纹东方鲀脂肪肝现象普遍存在，先前脂肪肝相关研究主要集中于该鱼不均衡的营养和饲料配比。近年来，水环境污染尤其是重金属污染对鱼类脂肪肝病的诱导机制成为研究热点。本研究以此为切入点，首先分析了水体铜 (Cu^{2+}) 暴露对暗纹东方鲀生长性能、组织积累量以及肝脏形态和组织化学的影响；接着检测了铜暴露下暗纹东方鲀肝脏中脂代谢相关酶活和基因的表达情况，并通过建立暗纹东方鲀原代肝细胞培养体系研究铜暴露对肝细胞脂代谢相关基因表达的影响；最后，利用高通量测序技术分析不同浓度铜暴露下暗纹东方鲀肠道微生物组成差异。本研究不仅进一步揭示了水体铜诱导暗纹东方鲀肝脏脂质沉积和肠道微生物群落变化的作用机制，而且为评估重金属暴露对水产养殖动物的毒害影响提供有效参考资料，也可作为暗纹东方鲀健康养殖提供实践指导。具体研究结果如下：

1、水体铜暴露下暗纹东方鲀生长性能、铜积累及肝脏显微结构变化分析

在水体铜暴露下，暗纹东方鲀个体生长受到明显抑制，内脏指数 (VSI) 和肝体指数 (HSI) 与对照组比明显升高，高浓度铜暴露 ($100 \mu\text{g/L}$) 显著抑制了暗纹东方鲀的生长性能。随着处理浓度的升高，暗纹东方鲀肝脏、肠和肌肉组织内铜离子积累量呈时间依赖性上升，最终积累量顺序为肝脏>肠>肌肉。H&E 染色显示，在不同浓度铜暴露下，肝脏组织受到损伤并有空泡化现象，与对照组相比，水体铜暴露下暗纹东方鲀肝脏颜色较浅，肝脏呈浅黄色状，细胞排列不规则，肝脏组织空泡化，细胞核边缘化。油红 O 染色显示，铜离子处理组暗纹东方鲀肝细胞内脂滴数量明显增加，肝脏脂肪含量显著上升。与高浓度 $100 \mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 组相比， $20 \mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 可导致暗纹东方鲀肝脏组织产生更大的空泡化面积，同时肝脏脂肪含量也更多。

2、水体铜暴露下暗纹东方鲀肝脏脂代谢相关酶活及基因的表达分析

水体铜暴露处理后，暗纹东方鲀肝脏内脂肪含量、甘油三酯(TG)含量和脂蛋白脂酶(LPL)活性与对照组比均升高，低浓度处理组 ($20 \mu\text{g/L Cu}^{2+}$) 中暗纹东方鲀肝脏内脂肪含量、TG 含量和 LPL 活性最高；铜暴露处理 21 天后，和对照组相比，与脂肪形成相关的 5 个基因 (*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS* 和 *ACC*) 表达水平显著上调，而与脂肪分解相关的 2 个基因 (*HSL* 和 *CPT1*) 表达水平则出现明显下调。与此同时， $20 \mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 处理组比 $100 \mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 处理

组诱导暗纹东方鲀肝脏内与脂肪生成相关的基因表达水平更高；与 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组相比，100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组诱导与脂肪分解相关的基因表达水平较高；同时检测到转录因子 *PPAR α* 和 *PPAR γ* 也参与了铜暴露下暗纹东方鲀肝脏脂质代谢，与对照组相比，20 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 铜暴露下，*PPAR α* 基因的表达均持续下调，而 *PPAR γ* 基因在 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组表达上调，在 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组表达下调。

3、水体铜暴露对肝细胞脂代谢相关基因表达的影响

肝细胞采用暗纹东方鲀稚鱼肝脏，II 型胶原酶 (1 mg/mL) 进行消化处理，每克肝重可获得 2.36×10^7 个细胞，细胞成活率达 94%，以此为模型，测得铜暴露 24 h 细胞半致死浓度 (IC_{50}) 为 143.64 μM 。利用 qRT-PCR 技术检测不同铜浓度 (0 μM 、10 μM 、30 μM 和 50 μM) 下暗纹东方鲀肝细胞脂代谢相关基因表达情况。结果显示，随着铜处理浓度的升高，与脂肪合成相关的 5 个基因 (*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS* 和 *ACC*) 表达均出现明显上调，30 μM Cu^{2+} 处理组上调幅度最大，*LPL* 和 *FAS* 基因表达水平最高；与脂肪分解相关的基因 (*HSL* 和 *CPT1*) 表达水平均显著下调；铜处理下，转录因子 *PPAR α* 表达略轻微下调，不同铜浓度对其表达并未产生显著影响，随着铜浓度的升高，转录因子 *PPAR γ* 表达水平先上升后下降，在 30 μM 处出现最大值。

4、水体铜暴露下对暗纹东方鲀肠道微生物菌群变化分析

利用 16S rRNA 高通量测序技术，分析铜暴露下暗纹东方鲀肠道微生物变化情况。结果显示，不同铜浓度对暗纹东方鲀肠道菌群 α 多样性影响不同，Chao 1, ACE, Shannon 和 Simpson 指数在 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组最高，在 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组最低，20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组诱导的 α 多样性值高于 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组。

铜暴露处理组与对照组中优势肠道菌群均为变形菌门 (Proteobacteria) (66.92%) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) (19.41%)，与对照组相比，铜暴露处理组螺旋菌门 (Spirochaetae) 所占比例 (11.19%) 明显下降，厚壁菌门 (Firmicutes) 所占比例 (14.16%) 在低浓度铜处理组 (20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+}) 上升，在高浓度铜处理组 (100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+}) 所占比例 (0.32%) 明显下降。随着水体铜浓度的增加，弓形菌属 (*Arcobacter*) 的丰度 (44.8%) 降低，而弧菌属 (*Vibrio*) (49.17%) 和伊丽莎白菌属 (*Elizabethkingia*) (23.07%) 的丰度则增加。暴露于 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 的鱼中观察到的厚壁菌门与拟杆菌门的比率 (0.80) 最高，而暴露于 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 的鱼中观察到的比率 (0.02) 最低。因此，铜可能通过诱导暗纹东方鲀肠道内菌群变化进而影响鱼体脂肪肝现象产生。

关键词：暗纹东方鲀；铜离子；脂代谢；原代肝细胞；肠道菌群

Abstract

Takifugu fasciatus, tetraodontiformes, osteichthyes, actinopterygii, takifugu, mainly distributed in the China's adjacent waters and the middle and lower reaches of the Yangtze River, is a hot economic variety of aquaculture. However, breeding dark grain oriental fatty liver phenomenon is generally existent, and past research is mainly focused on imbalanced nutrition and feed ratio. In recent years, the mechanism of water pollution, especially heavy metal pollution, on the induction of fatty liver in fish has become a research hotspot. This study takes this as a starting point. First, the effects of copper exposure in water on the growth performance, tissue accumulation, liver morphology and histochemistry of *T. fasciatus* were analyzed; then the effects of copper exposure on the liver and fat synthesis of *T. fasciatus* were analyzed, decompose and transport the enzyme activity and gene expression related to the physiological process; through establish the primary hepatocyte culture the system studied, the effects of different copper exposures on the expression of genes related to lipid metabolism in liver cells at the cellular level; finally, high-throughput sequencing technology was used to analyze the differences in the composition of the intestinal microbes of the *T. fasciatus* exposed to different concentrations of copper. This study not only further reveals the mechanism of copper in water in inducing liver lipid deposition and intestinal microbial community changes in aquaculture animals, but also provides effective reference materials for assessing the toxic effects of heavy metal exposure on aquaculture animals, and is useful for the breeding of *T. fasciatus*. Provide guidance on the green and healthy development of the industry. The specific research results are as follows:

1. The effects of Cu^{2+} exposure on growth performance, copper accumulation and liver microstructure on *T. fasciatus*

In this experiment, under the treatment of copper exposure in the water body, the individual development of *T. fasciatus* was significantly affected, the visceral index (VSI) and liver body index (HSI) were significantly increased, and high-concentration copper exposure (100 $\mu\text{g/L}$) significantly inhibited the growth performance of *T. fasciatus*. With the increase of the treatment concentration, the accumulation of copper ions in the liver, intestine and muscle tissues of the *T. fasciatus* increased in a time-dependent manner, and the final accumulation order

was liver>intestine>muscle. H&E staining showed that the liver tissue was damaged and vacuolated under different concentrations of copper. Compared with the control group, the liver of *T. fasciatus* under water copper exposure was lighter, the liver was light yellow, and the cells were not arranged. Regularly, the liver tissue is vacuolated and the nucleus is marginalized. Oil red O staining showed that the number of lipid droplets in the liver cells of *T. fasciatus* in the copper ion treatment group increased significantly, and the liver fat content increased significantly. Compared with the high concentration 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} group, 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} resulted in a larger vacuolation area of the liver tissue of *T. fasciatus*, and the number of liver lipid droplets was also greatly increased.

2. The effects of Cu^{2+} exposure on enzyme activity and gene expression related to liver fat synthesis, decomposition and transport on *T. fasciatus*

The results showed that the lipid content, TG content and LPL enzyme activity in the liver of *T. fasciatus* were increased after copper exposure. The lipid content in the liver of *T. fasciatus* in the low concentration treatment group (20 $\mu\text{g/L}$), TG content and LPL activity were the highest; after 21 days of copper exposure treatment, compared with the control group, the expression levels of genes related to fat formation (*G6PD*, *6PGD*, *LPL*, *FAS* and *ACC*) were up-regulated, while genes related to lipolysis (*HSL* and *ACC*) were up-regulated. *CPT1*) The expression level is down-regulated. At the same time, the 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} treatment group had higher expression levels of genes related to adipogenesis in the liver of *T. fasciatus* than the 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} treatment group. Compared with the 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} group, the 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} group induces low expression levels of genes related to lipolysis; transcription factors *PPAR α* and *PPAR γ* participate in the liver lipid metabolism of *T. fasciatus* under copper exposure. Compared with the control group, under copper exposure treatment, the expression of *PPAR α* gene continues to decrease, while The expression of *PPAR γ* gene was up-regulated in the 20 $\mu\text{g/L}$ group and down-regulated in the 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} group.

3. The effect of Cu^{2+} exposure on the expression of genes related to lipid metabolism in hepatocytes

Hepatocytes were digested with type II collagenase (1 mg/mL) from the liver of *T. fasciatus* juveniles, and 2.36×10^7 cells per gram of liver weight were obtained, and the cell survival rate reached 94%. This was used as a model to measure The median lethal concentration (IC_{50}) of the cells exposed to copper for

24 h was 143.64 μM . The qRT-PCR technique was used to detect the expression of genes related to lipid metabolism in liver cells of *T. fasciatus* under different copper concentrations (0 μM , 10 μM , 30 μM and 50 μM). The results showed that copper concentration significantly affected the expression of genes related to lipid metabolism in liver cells. Specifically: With the increase of copper treatment concentration, the genes related to fat synthesis (*G6PD*, *6PGD*, *LPL*, *FAS* and *ACC*) all appeared to be up-regulated, but the magnitude of the up-regulation was different, reaching a peak in the 30 μM treatment group, and *LPL* And *FAS* genes showed high sensitivity to copper concentration stimulation; the expression levels of genes related to lipolysis (*HSL*, *CPT1*) were down-regulated to varying degrees; under copper treatment, the expression level of transcription factor *PPAR α* was down-regulated, but different copper concentrations Its expression did not have a significant effect. With the increase of copper concentration, the expression level of transcription factor *PPAR γ* first increased and then decreased, with a maximum value at 30 μM .

4. The changes of intestinal microbial flora of *T. fasciatus* under Cu^{2+} exposure

Using 16S rRNA high-throughput sequencing, the changes in the intestinal flora of the obscured puffer under copper exposure were analyzed. The results show that different copper concentrations have different effects on the alpha diversity of the intestinal flora of *T. fasciatus*. The Chao 1, ACE, Shannon and Simpson indexes reached the highest in the 20 $\mu\text{g/L}$ group and the lowest in the 100 $\mu\text{g/L}$ group. With 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} , the induced alpha diversity value is higher than 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} . The dominant intestinal flora in the copper exposure treatment group and the control group were both Proteobacteria(66.92%) and Bacteroidetes(19.41%). Compared with the control group, the proportion of Spirochaetae(11.19%) in the copper exposure treatment group was significantly reduced, While the proportion of Firmicutes(14.16%) in the 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} exposure treatment group increased, and the proportion of the high-concentration copper treatment group (100 $\mu\text{g/L}$) decreased significantly(0.32%). As the copper concentration in the water increases, the abundance of *Arcobacter*(44.8%) decreases, while the abundance of *Vibrio*(49.17%) and *Elizabethkingia*(23.07%) increases. The highest ratio of Firmicutes to Bacteroidetes(0.80) was observed in fish exposed to 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} , while the lowest ratio(0.02) was observed in fish

exposed to 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} . Therefore, copper may affect the changes of the intestinal flora in *T. fasciatus* and cause the fatty liver of the fish.

Keywords: *Takifugu fasciatus*; Cu^{2+} ; Lipid metabolism; Primary hepatocytes; Intestinal flora

缩略词表

(Abbreviations)

缩写词	全称	中文注释
Abbreviation	Full name	Annotation in Chinese
6PGD	6-phosphate glucose dehydrogenase	6-磷酸葡萄糖脱氢酶
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶
LPL	Lipoprotein lipase	脂蛋白脂肪酶
FAS	Fatty acid synthase	脂肪酸合成酶
ACC	Acetyl-CoA carboxylase	乙酰辅酶 A 羧化酶
HSL	Hormone-sensitive lipase	激素敏感脂肪酶
CPT1	Carnitine palmitoyltransferase 1	肉碱棕榈酰转移酶 1
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor	过氧化物酶体增植物 激活受体
TG	Triglyceride	甘油三酯
ROS	Reactive Oxidative Species	活性氧
SOD	Superoxide Dismutase	超氧化物歧化酶
CAT	Catalase	过氧化氢酶
GSH-Px	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
GR	Glutathione reductase	谷胱甘肽还原酶
IRAK	IL-1 receptor associated kinase	白细胞介素-1 受体相关激酶

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略词表.....	VII
第 1 章 绪论.....	1
1.1 暗纹东方鲀生物学特性及其研究现状.....	1
1.1.1 暗纹东方鲀的生物学特性	1
1.1.2 暗纹东方鲀应对环境胁迫的研究现状	1
1.2 鱼类脂代谢的研究进展.....	5
1.2.1 重金属暴露对鱼类肝脏脂代谢的影响	5
1.2.2 鱼类脂代谢相关基因的研究	6
1.3 鱼类肠道微生物的研究进展.....	7
1.3.1 重金属暴露对鱼类肠道微生物的影响	7
1.3.2 16S rRNA 测序技术在鱼类肠道微生物研究中的应用	8
1.4 研究意义和主要研究内容.....	9
1.4.1 研究意义	9
1.4.2 主要研究内容	9
1.5 技术路线.....	10
第 2 章 水体铜暴露对暗纹东方鲀生长性能、铜积累及肝脏显微结构的影响	11
2.1 引言	11
2.2 实验材料、仪器及试剂.....	11
2.2.1 实验材料	11
2.2.2 主要实验仪器	12
2.2.3 主要试剂	12
2.3 实验方法.....	12
2.3.1 鱼体生长参数、肝体比和脏体比的测定	12
2.3.2 鱼体肝脏、肠和肌肉中铜积累量的测定	13
2.3.3 水体铜暴露下肝脏形态和组织化学观察	13
2.3.4 数据处理与分析	13

2.4 结果与分析	13
2.4.1 鱼体生长参数、肝体比和脏体比	13
2.4.2 鱼体肝脏、肠和肌肉内铜积累量	14
2.4.3 水体铜暴露下肝脏形态和组织变化观察	16
2.5 讨论	17
第 3 章 水体铜暴露对暗纹东方鲀肝脏脂代谢相关酶活及基因表达的影响..	18
3.1 引言	18
3.2 实验材料、仪器及试剂	18
3.2.1 实验材料	18
3.3.2 主要实验仪器	18
3.3.3 实验试剂	19
3.3 实验方法	19
3.3.1 脂代谢酶活测定	19
3.3.2 水体铜暴露后肝脏总 RNA 的提取及 cDNA 合成	19
3.3.3 荧光定量 PCR 检测 <i>G6PD</i> 、 <i>6PGD</i> 、 <i>LPL</i> 、 <i>FAS</i> 、 <i>ACC</i> 、 <i>HSL</i> 、 <i>CPT1</i> 、 <i>PPARα</i> 和 <i>PPARγ</i> 基因 mRNA 表达量	20
3.3.4 数据处理与分析	22
3.4 结果与分析	22
3.4.1 肝脏内脂质、甘油三酯含量和 <i>LPL</i> 活性	22
3.4.2 肝脏内脂代谢相关基因的表达分析	23
3.5 讨论	25
第 4 章 水体铜暴露对暗纹东方鲀肝细胞脂代谢相关基因表达的影响.....	26
4.1 引言	26
4.2 实验材料、仪器及试剂	26
4.2.1 实验材料	26
4.2.2 实验仪器	26
4.2.3 实验主要试剂	26
4.3 实验方法	27
4.3.1 暗纹东方鲀原代肝细胞培养和孵育	27
4.3.2 细胞成活率检测及半致死浓度的确立	28
4.3.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成	28
4.3.4 荧光定量 PCR 检测肝细胞内脂代谢相关基因表达量	28

4.3.5 数据处理与分析	28
4.4 结果与分析	29
4.4.1 暗纹东方鲀原代肝细胞培养方法的建立	29
4.4.2 脂代谢相关基因 mRNA 表达分析	31
4.5 讨论	32
第 5 章 水体铜暴露对暗纹东方鲀肠道微生物的影响	34
5.1 引言	34
5.2 实验材料、仪器及试剂	34
5.2.1 实验材料	34
5.3.2 主要实验仪器	34
5.3.3 实验试剂	34
5.3 实验方法	34
5.3.1 暗纹东方鲀肠道样品采集	34
5.3.2 总 DNA 提取与质量检测	35
5.3.3 高通量测序	35
5.4 结果与分析	36
5.5 讨论	41
第 6 章 小结	43
6.1 结论	43
6.1.1 水体铜暴露下暗纹东方鲀生长性能、组织铜积累及肝脏显微结构的分析	43
6.1.2 水体铜暴露下暗纹东方鲀肝脏脂代谢相关酶活和基因表达的分析	43
6.1.3 水体铜暴露下暗纹东方鲀肝细胞脂代谢相关基因的表达分析	43
6.1.4 水体铜暴露下暗纹东方鲀肠道微生物菌群组成变化分析	44
6.2 创新点	44
6.3 展望	44
参考文献	45
在读期间发表的学位论文及研究成果	56
致谢	58

第1章 绪论

1.1 暗纹东方鲀生物学特性及其研究现状

1.1.1 暗纹东方鲀的生物学特性

暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 隶属于鲀形目、硬骨鱼纲、辐鳍亚纲、东方鲀属, 主要分布在中国近海 (黄海、东海和渤海) 和长江中下游^[1]。暗纹东方鲀是一种洄游性鱼类, 当暗纹东方鲀从海水洄游到淡水时, 性腺开始进一步发育, 与此同时河鲀毒素 (Tetrodotoxin, TTX) 在其体内也急剧上升, 暗纹东方鲀的卵巢、肝脏、眼球等血液集中部位毒素积累最多^[2,3]。研究显示, TTX 本质属于生物碱, 有很强的毒性, 阻断钠离子内流, 可用于治疗痉挛和神经痛等病症, 短时间高剂量摄入河鲀毒素会阻碍神经传导, 最终引起动物死亡, 研究显示 0.5 mg 的 TTX 能够将成人致死^[4,5]。因此, 为了避免 TTX 在暗纹东方鲀中积累, 需要在整个暗纹东方鲀养殖过程中对 TTX 进行监测。

有资料记载, 1954 年, 长江下游野生河鲀的产量可达 1000 吨^[6], 但随着城市化进程的加快和工业化程度的提高, 工业废水和生活污水大肆排放、农田化肥滥用, 长江下游水域已遭到严重的污染。长江四大家鱼 (青鱼、草鱼、鲢鱼和鳙鱼) 的渔场规模不断缩小, 严重污染的江段甚至不见鱼虾, 南京以下水域盛产的鲥鱼和刀鱼与三十年前相比已减少 80% 以上, 鲥鱼已经绝迹^[7-9]。陈家长等^[10]研究显示长江下游水域主要污染物为石油烃类和挥发酚等, 这些污染物可导致鱼类急性中毒, 甚至诱导细胞产生微核, 同时部分水域鱼体内可检出较高的污染物残留。在暗纹东方鲀生存环境日趋恶劣的同时, 1970 年代后因日韩对河鲀需求量的日益增加, 为提高出口中国加大了在黄海和东海地区河鲀捕捞强度, 过度捕捞使野生河鲀资源日益衰退, 野生河鲀的捕捞季节已经消失多年^[11,12]。为保护和增殖这一重要渔业资源, 满足人们对河鲀鱼类的消费需求, 对暗纹东方鲀进行人工繁殖的研究成为当务之急。20 世纪 90 年代, 南京师范大学和上海水产研究所成功攻破了暗纹东方鲀人工繁殖^[13-15]。经过 20 多年的发展, 中国河鲀养殖业基本上形成工厂化、规模化, 海陆结合的养殖模式进行生产经营, 养殖河鲀的毒性含量极低, 甚至无毒^[14]。

1.1.2 暗纹东方鲀应对环境胁迫的研究现状

暗纹东方鲀肉质鲜嫩, 口味独特, 在经济鱼类市场占有一定的地位, 同时, 在科研领域, 尤其是在水体重金属污染物的生态评估方面, 暗纹东方鲀

也可作为一种很好的模式生物^[16-18]。为了优化水产养殖技术提高暗纹东方鲀产量，促进该产业在经济和生态方面的良性发展。近年来，从分子生物学的角度开展暗纹东方鲀在水环境胁迫下氧化应激、免疫应答和细胞凋亡等领域的研究成为热点。

在环境胁迫激活暗纹东方鲀氧化应激方面，Cheng 等^[19,20]研究显示，低温胁迫（13℃和 17℃）会增加 ROS（Reactive oxygen species, ROS）和导致氧化应激，超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase, SOD）和过氧化氢酶（Catalase, CAT）作为已知的细胞抗氧化剂发挥重要作用，SOD 作用产生 H₂O₂，而 CAT 可以消除 H₂O₂，低温胁迫下，SOD 和 CAT mRNA 的表达量显著增加。作为应激反应蛋白，HSP 家族（Heat Shock Proteins, HSP）被认为在保护细胞免受氧化应激中起关键作用，HSP70 与细胞氧化还原状态的调节和 ROS 水平的降低有关，HSP90 用于评估鱼类早期生活阶段的健康状态，并作为抵抗多种胁迫因素（如渗透压、感染或热休克）的防御机制。Cheng 等^[21,22]研究证明，高温（34℃和 37℃）同样可以诱导鱼体产生氧化应激，热胁迫下 CAT、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase, GSH-Px）和谷胱甘肽还原酶（Glutathione reductase, GR）等抗氧化酶的 mRNA 表达水平显著增加，热激蛋白 HSP70 和 HSP90 的表达同样升高，表明 HSP 家族参与其中保护机体免受氧化应激带来的损伤。Wen 等^[23]利用 iTRAQ 对低温胁迫下暗纹东方鲀肝脏进行了定量蛋白质组学研究，鉴定出 160 种差异丰富的蛋白质（DAP），其中变化显著的是氧化应激涉及的蛋白质（9 种蛋白质）、线粒体酶（11 种蛋白质）和信号转导（13 种蛋白质）。KEGG 富集分析表明，精氨酸和 D-鸟氨酸代谢、MAPK 信号转导、Wnt 信号转导和 Gap 连接途径显著增强，随后，通过平行反应监测（PRM）分析验证了三种显著上调的蛋白（CIRB, HSP90 和 GST）和两种显著下调的蛋白（FLNB 和 A2ML1）。该研究结果加深了对鱼类低温耐受性机理的理解，有助于提高鱼类在育种过程中的耐冷性以及培育耐寒新品种。Kim 和 Wang 等^[24,25]研究发现，镉暴露条件下，暗纹东方鲀体内各抗氧化基因（CAT、GR、GPx1a、GPx1b、Mn-SOD）随时间的推移均被显著上调，并呈现组织特异性，与对照组相比，肝脏中 GR、CAT 和 Mn-SOD mRNA 的诱导率为 5 倍，表明肝脏是一种研究镉易感性的重要器官，并在重金属代谢排毒中占据核心地位。王涛等^[26]研究显示在急性铜暴露处理条件下，随铜浓度的升高，暗纹东方鲀肝脏内 MDA 含量、抗氧化酶（SOD、GSH-PX 和 CAT）活力显著上升，也支持这一结论。

在环境胁迫激活暗纹东方鲀免疫应答方面，Cheng^[19,20]等研究显示，当温度降到 13℃时，暗纹东方鲀总血细胞计数明显下降，细胞活力受到抑制，尾

相 (Olivetailmoment, OTM) 值达到最大, DNA 损伤严重。血浆中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (Aspartate aminotransferase, ALT)、碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)、乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 等生化参数作为组织功能障碍和损伤的指标, 可以作为评估鱼类对环境胁迫的反应程度。ALT 和 AST 是线粒体中普遍存在的氨基转移酶, 在组织受到损害和功能障碍后释放到血浆中, AST 和 ALT 活力在低温胁迫 (13℃) 下出现明显增加; ALP 通过改变病原体的表面结构和增强识别和吞噬细胞的能力, 帮助机体增强抗病能力, LDH 负责丙酮酸到糖酵解重点产物乳酸的转化, 与对照组 (25℃) 相比, 13℃ 时 ALP 活性出现明显降低而 LDH 活性出现显著升高; 血清中的葡萄糖和总蛋白 (TP) 经常作为评估生物在环境胁迫下的健康状况和进行新陈代谢能力的生物学指标, 当温度从 17℃ 降到 13℃ 时 TP 含量出现显著下降, 而葡萄糖的含量则显著升高。与此同时, Cheng 等也^[21,22]做了高温胁迫对暗纹东方鲀免疫应答的影响, 结果显示, 高温 (34℃、37℃) 可显著降低暗纹东方鲀总血细胞计数, 细胞活力受到抑制, 随后出现 DNA 损伤, 37℃ 时观察到最大 OTM 值。热胁迫下, 血浆中 AST、ALT、LDH 活力均有明显上升但仍存在明显差异 (LDH>AST>ALT); 当温度升到 31℃ 时, ALP 活力开始下降; 在水温升到 37℃ 时葡萄糖和 TG 的含量显著增加, TP 含量明显下降。补体系统在鱼体的免疫防御中起着重要作用, 有助于抵抗细菌入侵和防止炎症产生, 在补体系统中, 补体激活的关键步骤是补体 (C3) 的转化^[20,27,28]。Cheng 等^[20]研究显示, C3 的 mRNA 水平在低温胁迫 (21℃、17℃ 和 13℃) 时显著增加, C3 的高表达可能减轻冷应激产生的有害自由基的毒性作用。嗜水气单胞菌的侵染下暗纹东方鲀中的先天免疫系统被病原体激活以抵抗异常的生理状态^[29-31]。由 SOD/CAT 代表的抗氧化物质上调以去除产生的氧自由基, 避免炎症或阻碍炎症反应, 同时, HSP 作为分子伴侣, 有助于稳定体内的蛋白质和多肽, 降解严重受损的蛋白质, 进一步阻碍病理变化。补体表现出一定的防御反应, 参与免疫调节并介导免疫病理学的侵袭性反应。白细胞介素积极动员免疫细胞并刺激免疫细胞的功能活动。同时暗纹东方鲀体内, *BI-1* 和 *Bcl-2* 转录水平上调, 抑制 *Bax* 诱导的健康细胞凋亡信号, 阻断线粒体压力引起的细胞凋亡信号。BAFF 和 LIGHT 分别维持 B 细胞和 T 细胞的活性, 从而消除外来致病因子^[32,33]。CD-28 是一种重要的参与机体适应性免疫应答中 T 细胞活化的共刺激分子^[34], TLR/MyD88 信号途径可能通过 TLR 招募 MyD88, 激活下游 IRAK1、IRAK4 和 IRAK 激酶随后磷酸化激活 TRAF6, 从而诱导其他与自然免疫反应相关的促炎因子的表达, CD28 可能与 TLR/MyD88 信号通路有关^[35,36]。Fang 等^[36,37]研究显示, 随着水体氯化三丁基锡 (TBT-Cl) 浓度

的增加,暗纹东方鲀总血细胞计数减少,ROS 水平逐渐升高,*To-CD28* mRNA 转录产物在所有采样组织中都广泛表达,但在肝脏表达量最高,随后是肾脏、鳃和脾脏。同时,TLR-MyD88 信号通路中相关基因的 mRNA 呈现相似的表达模式,在急性毒性试验中,暗纹东方鲀体内 *To-MyD88* mRNA 水平在鳃中要比在肝脏更有明显上调,而 *To-IRAK4* mRNA 含量在肝脏和鳃均有增加,但 0-20% TBT-CL 组 *To-IRAK4* mRNA 在肝脏呈现先升高后急剧下降趋势(仍高于对照组),在鳃中持续增加,同时, *To-IRAK1* 在肝脏和鳃呈现相似的表达趋势。免疫组织化学显示,高浓度 TBT-Cl (20%、50%) 暴露下, *To-CD28* 蛋白信号增强,细胞出现明显损伤。证明 *To-CD28* 可能参与了 TBT-Cl 暴露的毒性机制,并调节了暗纹东方鲀的稳态稳定性。

在环境胁迫诱导暗纹东方鲀的细胞凋亡方面,主要集中于死亡受体介导的外部凋亡途径、线粒体/细胞色素 C 介导的内源性凋亡途径和 B 粒酶介导的细胞凋亡途径。P53 是重要的肿瘤抑制基因,可以介导 DNA 损伤后的细胞应激反应,避免受损 DNA 的堆积,维持遗传的稳定性,Caspase 半胱氨酸蛋白酶家族引发的级联反应是细胞凋亡过程的中心环节,Caspase-9 是半胱天冬酶的启动子,可激活下游的半胱天冬酶,Caspase-3 是半胱天冬酶的主要执行者,负责许多关键细胞蛋白的蛋白水解切割,应激诱导的细胞色素 C 释放可以启动内在的线粒体途径,细胞色素 C 的释放可以激活下游效应子 caspase-9,随后导致 caspase-3 激活并诱导细胞凋亡。Cheng 等^[27]研究显示环境胁迫可能会产生过量的 ROS 并启动细胞凋亡,细胞应激产生的 ROS 可以调节 P53 活性^[38],高温胁迫(34℃和 37℃)下,P53 和 caspase-3 mRNA 表达水平有明显上调,当水温为 37℃,caspase-9 表达量达到最高^[21]。氨胁迫同样通过 caspase 途径诱导细胞凋亡,在低氨胁迫(1.43 mM)条件下,p53 的 mRNA 含量就有明显升高,氨胁迫 72 h 后,各浓度处理组中,caspase-3 和 caspase-9 基因表达水平均有明显升高^[39-41]。Wang 等^[16]研究显示,纳米铜(20 μg/L 和 100 μg/L)暴露条件下,随纳米铜浓度的升高,暗纹东方鲀体内 p53、caspase-3 和 caspase-9 mRNA 表达水平逐渐升高。表明 p53 和 caspase 依赖的信号通路在环境胁迫诱导暗纹东方鲀细胞凋亡中发挥重要作用。据报道,线粒体内 Ca^{2+} 的升高也参与了凋亡早期信号转导和凋亡的执行阶段,更重要的是在凋亡早期阶段,由 ROS 刺激的细胞质游离钙(Cf-Ca^{2+})浓度的增加会触发凋亡途径, Ca^{2+} 稳态失衡可激活水解酶,导致能量消耗过大,损害能量产生,引发细胞骨架降解并最终导致细胞死亡^[27,28]。Cheng 等^[42]研究中,在氨胁迫条件下, Cf-Ca^{2+} 浓度有明显增加,随时间的延长,凋亡细胞的比率显著上升,高氨胁迫下(7.14 mM),48h 后在血细胞中观察到最大 OTM 值,提示 DNA 严重受损。同样

高温胁迫 6 小时后, 血细胞内 Ca^{2+} 浓度有明显增加, 12h 后达到最高, 随着时间的延长, 血细胞凋亡比率从 1.13% 逐渐升高至 12.23%, 从结果表明, 高温可能通过产生 ROS, 中断 Ca^{2+} 稳态, 随后触发细胞凋亡^[21]。Bcl-2 (B 细胞淋巴瘤 2) 是通过诱导 (促凋亡) 或抑制 (抗凋亡) 细胞凋亡来调节细胞死亡的 Bcl-2 调节蛋白家族的创始成员^[43]。P53 可以通过上调促凋亡基因的转录和下调抗凋亡基因 (例如 Bcl2 家族) 的转录来诱导凋亡。Bax 是位于线粒体外膜的 Bcl2 家族的促凋亡成员, 诱导细胞色素 C (Cyt-C) 释放到细胞质中, 是 P53 转录激活的直接靶点^[32, 43], 抗凋亡的 Bcl2 属于抗凋亡基因可以抑制线粒体中细胞色素 C 的释放。细胞内 Bcl2 和 Bax 表达比例的改变会影响线粒体细胞色素 C 的释放, Bax 与 Bcl2 之比的增加可诱导细胞凋亡^[42, 44]。Cheng 等^[42]研究显示, 在氨浓度为 3.57 mM 和 7.14 mM 时 Bax 的转录水平才检测到有明显上调, 作为抗凋亡蛋白, Bcl2 在低氨浓度 (1.43 mM) 胁迫前期, 未出现明显下降, 72 h 后才观察到有明显下降, Bax 与 Bcl2 的比例因氨胁迫而增加, 这表明氨也可能通过 P53 - Bax - Bcl2 途径引起凋亡。

1.2 鱼类脂代谢的研究进展

鱼类脂肪肝病, 是水产养殖行业常见的病害, 至今尚未得到根本性解决。鱼类脂肪肝病因复杂, 目前多集中于营养与饲料配比失衡、养殖水环境污染及物种本身生理特性等几个方面。近年来, 由于水环境污染严重加之水产养殖行业绿色发展的理念的提倡, 水环境污染尤其是重金属污染对鱼类脂肪肝病的诱导作用逐渐成为研究热点。

1.2.1 重金属暴露对鱼类肝脏脂代谢的影响

肝脏是鱼类最重要的消化腺之一, 承担着鱼体物质代谢、解毒和免疫防御等重要作用, 当肝脏出现损伤或发生病变往往会导致鱼体内稳态失衡继而降低免疫防御能力, 导致细菌或病毒等传染性鱼病大流行, 严重影响水产养殖行业的持续发展。同时, 鱼体脂肪 90% 以上由肝脏合成, 集约化养殖模式下, 鱼类脂肪肝病已成为人工养殖鱼类常见的疾病^[45]。杨鸿昆等^[46]研究显示, 当鱼类出现脂肪肝现象时, 肝脏颜色将变黄、变浅出现花斑, 肝细胞排列不规则, 线粒体肿胀, 细胞核边缘化, 核膜破裂, 脂肪颗粒大量蓄积。以往关于鱼类脂肪肝现象的研究多集中于不均衡的营养和饲料配比^[47], 近年来研究显示, 水环境污染尤其是重金属污染也是诱发鱼类脂肪肝现象的重要因素。谢文平^[48]在对珠江三角洲养殖水体进行重金属污染检测显示, 养殖水体中 Cu 质量浓度最大为 0.1438mg/L, 超标率为 64.3%; 和庆等^[49]研究显示长三角地区池塘养殖水产品体内重金属 Cu 含量较高, 有近 60% 的样品超标。Chen 等^[50]

研究显示, 水体镉暴露不仅会使破坏正常组织细胞, 细胞代谢紊乱, 造成脂肪在肌肉和肝脏组织的沉积而且会通过促进脂肪合成类相关基因的表达并抑制脂肪分解类相关基因的表达, 降低脂肪分解效率, 诱导肝脏脂质沉积^[51,52]。重金属如铜、汞和铅等还可与营养型矿物元素(如钙、锌)协同作用放大重金属对鱼类产生的毒理学效应, 加重肝脏负担^[53-55]。铜既是鱼类生长中不可或缺的营养元素在饲料中广泛添加又可作为水体消毒剂在养殖水环境中广泛使用。Liu 等^[56]研究显示, 与其他重金属相比, 铜可特异性蓄积在鱼类肝脏组织中, Chen 等研究显示, 矛尾复虾虎鱼(*Synechogobius hasta*)经 30 天的铜暴露后, 脂肪合成相关酶(G6PD、6PGD 和 ME)的活性、肝体比、肝脏铜积累量和脂肪含量均有不同程度的上升; 同时, 油红 O 染色后处理组中肝脏组织中出现大量脂滴^[55], 该结果揭示了水体铜暴露可以诱导鱼类肝脏发生脂肪沉积, 并具有剂量和时间的依赖关系。因此, 铜对养殖鱼类脂肪肝现象的诱发作用值得我们进一步深入研究。

1.2.2 鱼类脂代谢相关基因的研究

脂类是鱼体主要的储能方式, 脂质沉积涉及复杂的生理过程, 是脂肪合成、脂肪分解和转运各环节相互协调相互平衡的结果, 不同组织间存在特异性的脂肪代谢^[57-59]。甘油三酯(Triglyceride, TG)是机体储存能量以及氧化供能的重要形式, 合成甘油三酯所需的甘油由糖酵解生成的磷酸二羟丙酮转化而成, 脂肪酸由糖氧化分解生成的乙酰 CoA 合成, 当肝合成的甘油三酯不能及时转运时就会形成脂肪肝^[60]。6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-phosphate glucose dehydrogenase, 6PGD)和葡萄糖 6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)是调节还原型辅酶 II(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)产生的关键基因, 对脂肪酸的合成至关重要^[50]; 乙酰辅酶 A 羧化酶(Acetyl-CoA carboxylase, ACC)负责催化乙酰辅酶 A 生成丙二酰-CoA, 随后在脂肪酸合成酶(Fatty acid synthase, FAS)催化下合成饱和脂肪酸棕榈酰酯; 脂蛋白脂肪酶(Lipoprotein lipase, LPL)可以水解血浆脂蛋白中的甘油三酯提供游离脂肪酸用于其他组织的氧化^[61]。王涛等^[26]在探究急性铜暴露对暗纹东方鲀肝脏脂代谢影响中发现, 铜暴露处理(96 h)后肝脏内脂肪含量显著升高, 脂肪合成相关基因(G6PD、6PGD、FAS、LPL 和 ACC)表达量在低浓度(0.1 mg/l)处理组达到高峰。

脂肪分解也称脂肪动员, 在相关酶作用下分解成脂肪酸和甘油并释放入血供其他组织氧化^[62]。甘油三酯在甘油三酯脂肪水解酶(Adipose triglyceride lipase, ATGL)作用下水解成甘油二酯和脂肪酸, 随后甘油二酯在激素敏感

脂肪酶（Hormone-sensitive lipase, HSL）作用下水解成单酰甘油和脂肪酸，长链脂肪酸进入细胞后，通过肉碱酯酰转移酶系统，在线粒体中进行 β 氧化^[63]。肉碱棕榈酰转移酶1（Carnitine palmitoyltransferase1, CPT1）是通过催化脂肪酰基辅酶A转化为脂肪酰基肉碱进入线粒体基质来调节线粒体中脂肪酸的 β -氧化的关键因子^[64]。

一些转录因子通过调控与脂代谢相关酶的转录进而调控体内脂质代谢稳态，例如过氧化物酶体增殖生物激活受体（Peroxisome proliferator-activated receptor α and γ , PPAR α 和 PPAR γ ），通过调节相关基因（如 CPT1）转录水平，进而调控脂肪酸合成和储存^[65]，固醇调节元件结合蛋白（SREBP-1c）通过调控 ACC 和 FAS 的基因表达进而激活脂肪合成相关酶的合成^[66]。

1.3 鱼类肠道微生物的研究进展

肠道微生物种类多样，数量庞大，关系复杂，可能是鱼体最复杂的微生物生态系统，随着技术发展，肠道微生物与鱼类生长发育的关系得以深入研究。然而，肠道微生物菌群的组成并非一成不变，不同生长阶段，饲料配比以及生活环境的改变均可能导致肠道微生物菌群变化。与陆生脊椎动物相比，鱼类终生生活在水环境中，肠道微生物与所处的肠道环境更易受到水环境改变的影响，当水体中重金属离子通过水或食物消化进入肠道时，会打破肠道稳态并改变菌群组成^[68]。

1.3.1 重金属暴露对鱼类肠道微生物的影响

肠道微生物在动物体内组成复杂，长期进化下与宿主肠道维持了特有的生态平衡，许多研究显示，肠道微生物在对机体生长发育、物质代谢吸收和免疫调节等方面发挥重要作用^[67]。目前国内外关于鱼类肠道微生物的研究尚处于起步阶段，Song 等^[69]人研究显示，在摄入硅酸盐为载体的铜离子（Cu²⁺-loaded silicate CLS）后，鲤鱼肠道中需氧菌（即弧菌和大肠杆菌）总数显著降低，但乳酸菌数目显著升高，提示 CLS 在鱼体内具有抗菌活性，可以帮助保护肠粘膜免受病原菌及毒素的侵袭。Merrifield 等^[70]人研究斑马鱼摄入纳米铜或纳米银后肠道菌群变化，结果显示，纳米银和纳米铜摄入显著影响了肠道微生物的群落组成，一些肠道有益菌（如索氏鲸杆菌）数量被显著抑制，影响机体消化功能和机体健康。梭杆菌门（Fusobacteria）属于革兰氏阴性细菌，常见于消化系统，可诱发机体产生疾病，Guo 等^[71]研究显示，低浓度铜暴露后，鲤鱼肠道中梭杆菌门比例显著提高；鲸杆菌属（Cetobacterium）是肠道生产维生素 B12 的主要细菌，可消化分解碳水化合物和多肽，铜离子暴露后，鲸杆菌属的比例显著升高，可促进鲤机体代谢水平。短链脂肪酸

(short-chain fatty acids, SCFA)是肠道菌群的主要代谢产物,研究显示,SCFA可以激活多种信号传递通路,调节脂肪、胆固醇和糖类的代谢,控制食欲,肠道内厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)比例变化直接影响机体能量摄取和脂肪代谢过程^[72, 73],本实验显示,高浓度铜暴露下,此比例降低,提示水体铜暴露也可能通过影响肠道微生物菌群变化从而间接影响机体脂质沉积。

1.3.2 16S rRNA 测序技术在鱼类肠道微生物研究中的应用

鱼类肠道可能是微生物最密集的微生态系统,随着分子生物学技术发展和进步,鱼类肠道微生物的研究主要经历了 3 个阶段:纯培养方法、依赖指纹图谱的分子生态学研究方法和依赖测序的分子生态学研究方法^[74]。纯培养方法是研究者通过模拟肠道环境,对肠道中微生物类群进行分离富集并分析鉴定,有助于了解肠道微生物在不同生长环境下基因表达和代谢产物变化情况,为深入了解致病菌的致病机理提供支撑^[75]。分子生态学可以对微生物群落中所有 DNA 物质进行分析,无须纯培养分离,可较全面分析样品中微生物群落组成。目前最常用的指纹图谱技术主要有变形梯度凝胶电泳(DGGE)、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)和 ERIC-PCR 指纹图谱,通过 PCR 扩增获得微生物群落总核酸分子,可以快速直观展现样品中微生物群落概况。其中 ERIC-PCR 技术由于操作简单,方法稳定,条带多态性高,因而广泛应用于微生物群落结构分析,反映群落结构变化^[76-78]。

在分子生态学研究,应用最广泛的分子标记物是核糖体小亚基 RNA 基因(16S 或 18S rRNA 基因)。微生物群落结构多样性研究中最常通过使用 16S rRNA 基因克隆文库^[79],获得群落中基因系统发育地位,判断微生物群落组成的丰富度和多样性,进而进行生物功能预测。Eckburg 等^[80]利用 16S rRNA 基因克隆文库方法系统分析了人体肠道粘膜及粪便中的微生物菌群组成,初步揭示了肠道菌群与健康的关系。高通量测序技术可以同时为数百万 DNA 分子进行测序,全面分析物种的转录组和基因组。因此,通过高通量测序可以全面了解影响鱼类肠道微生物菌群结构的因素,对调控鱼类肠道菌群稳态,提高饲料利用率,增强鱼体抗病力等有重要意义。通过对鱼类微生物进行测序分析结果显示,鱼类肠道中生物多样性相对较低,主要有变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、肠道杆菌(Enteric Bacilli)和梭状芽胞杆菌(Clostridia)。其中拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门属于肠道优势菌,在不同的鱼类中都几

乎占 90%以上,对维持肠道稳态具有重要作用^[81-84]。李彤华等^[85]人对养殖于同一池塘的鱼类肠道微生物采用 454 高通量测序技术分析,发现不同鱼类肠道微生物群落结构组成主要来源于来自于鱼类肠道内部菌群的特异性选择压力(物种特异性的免疫和代谢机制)。刘增新等^[86]利用高通量测序技术分析人工养殖条件下牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)不同生长阶段肠道菌群结构与饵料的关系,为工厂化养殖条件下牙鲆肠道生理健康标准提供理论依据。张美玲等^[87]人通过对生活在不同盐度中尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肠道微生物进行研究,结果显示,盐度可以显著影响水生鱼类肠道微生物组成,这为我们理解广盐性鱼类在不同盐度环境下营养代谢能力的差异提供依据。

1.4 研究意义和主要研究内容

1.4.1 研究意义

暗纹东方鲀已成为我国重要的水产养殖经济品种,先前的研究主要集中在该鱼生长发育、盐度适应、环境胁迫和洄游习性等方面^[88-90]。然而,暗纹东方鲀在养殖过程中对自然水体依赖性极强,不可避免受到周边工业、生活及渔业生产中铜污染的影响。目前研究表明过量的 Cu^{2+} 是促进暗纹东方鲀脂肪肝形成的重要因素之一,但关于水体铜暴露如何诱导暗纹东方鲀肝脏脂质沉积尚不清楚。

基于此,本研究首先分析了水体铜暴露对暗纹东方鲀生长性能、组织铜积累以及肝脏显微结构的影响;接着检测了铜暴露下暗纹东方鲀肝脏中与脂肪合成和分解相关过程相关酶活和基因的表达情况,并通过建立暗纹东方鲀原代肝细胞培养体系研究了不同铜暴露对肝细胞脂代谢相关基因表达的影响;最后,通过 16s rRNA 测序技术分析不同浓度铜暴露下暗纹东方鲀肠道微生物组成差异。这些结果为暗纹东方鲀脂肪肝形成病因提供新的见解,同时为暗纹东方鲀养殖过程中 Cu^{2+} 的合理使用提供理论依据。

1.4.2 主要研究内容

(1) 使用 H&E 染色、电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)等技术研究水体铜暴露下暗纹东方鲀肝脏组织显微结构的变化,并分析水体铜暴露下暗纹东方鲀幼鱼各项生长指标以及肝脏、肠道和肌肉中铜积累量变化。

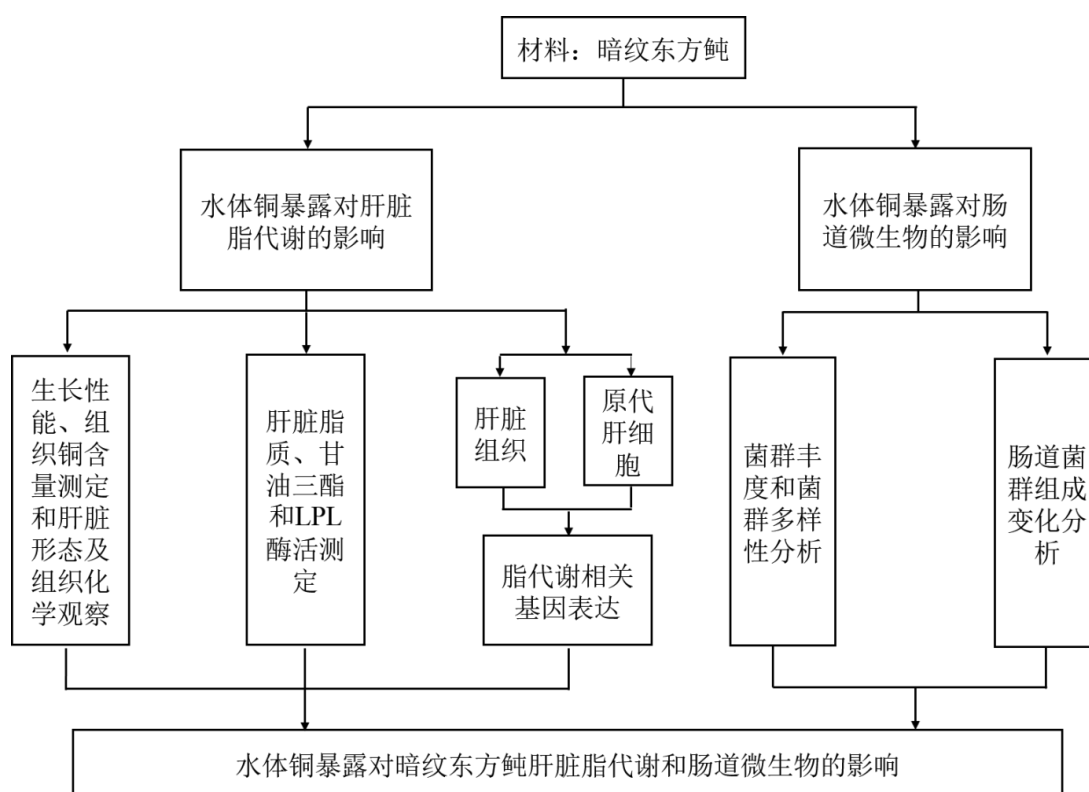
(2) 利用酶活测定和 qRT-PCR 等方法研究脂代谢相关酶活和基因(*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS*、*ACC*、*HSL*、*CPT1*、*PPAR α* 和 *PPAR γ*) 在暗纹东方鲀肝脏中的表达情况。

(3) 建立一种暗纹东方鲀原代肝细胞的分离及培养方法,同时采用

qRT-PCR 技术分析水体铜暴露下肝细胞内脂代谢相关基因 (*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS*、*ACC*、*HSL*、*CPT1*、*PPAR α* 和 *PPAR γ*) 表达情况。

(4) 运用 16S rRNA 测序技术, 研究并分析不同铜浓度暴露下暗纹东方鲀肠道微生物菌群变化情况。

1.5 技术路线



第2章 水体铜暴露对暗纹东方鲀生长性能、铜积累及肝脏显微结构的影响

2.1 引言

作为一种重要的矿物质成分,铜是鱼类生长骨骼发育所必须的元素,与骨胶原质合成有关,有研究显示,当铜元素摄入不足,鱼体内铜含量过低时,鱼体特定生长率和增重率会显著降低^[91,92]。此外,铜也是鱼类维持鱼类正常代谢和免疫等相关生理活动中关键酶类(如 Cu-Zn 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、细胞色素氧化酶等)的重要组成部分^[93-96]。然而,当鱼体摄入铜含量过高时会阻碍鱼类正常生长发育,抑制肝脏抗氧化酶系统和脂肪合成酶类的活性,对鱼体产生毒害作用,甚至诱发“铜中毒”现象,导致鱼体死亡^[97-102]。

本章研究水体铜暴露下暗纹东方鲀幼鱼各项生长指标,各组织内铜积累量变化,通过 H&E 染色以及油红 O 染色等手段观察水体铜暴露下暗纹东方鲀肝脏显微结构的变化,为进一步研究水体铜暴露对暗纹东方鲀肝脏脂代谢影响提供基础资料。

2.2 实验材料、仪器及试剂

2.2.1 实验材料

生长状况良好的暗纹东方鲀实验用鱼取自江苏省镇江市江之源渔业科技有限公司暗纹东方鲀养殖基地。实验用暗纹东方鲀共计 500 条,初始体重为 7.9 ± 0.5 g,体长 6.6 ± 0.3 cm。在进行正式实验之前,将鱼暂养实验室鱼类专用养殖缸,暗纹东方鲀养殖过程中暂停水循环系统,每 24 h 更换 20 % 的水。每日两次(上午 8 点和下午 4 点)给鱼投喂商业颗粒饲料(中国镇江嘉吉饲料有限公司,蛋白质含量为 42.0 %)。实验鱼在水体温度为 26 ± 0.5 °C, pH 7.1 ± 0.1 ,溶解氧 7.5 ± 0.2 mg/L,光周期为 14 h 白光和 10 h 黑暗的养殖环境中适应 15 天后,将约 100 尾暗纹东方鲀用于急性毒性试验,确定 96 小时的 LC50 (致死中值)为 0.2 mg/L。

将实验鱼随机分配到三个处理组中:对照处理组(不添加 Cu^{2+});实验组: $20 \mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组和 $100 \mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组。每个处理设置三个重复,每个水箱中放置 25 尾暗纹东方鲀,将鱼暴露处理 21 天,每隔 24h 更换一次水,更换水后重新添加 Cu^{2+} 试剂以保持相对恒定浓度的 Cu^{2+} ,与适应性培养期

间相同的方式进行饲养。

每次取样前 24 h 停止饲喂，在第 0、7、14 和 21 天从每个水箱中随机选取 3 条鱼，MS-222 麻醉（10 mg/L），在冰盘上解剖并收集鱼类肝脏、肠和肌肉，置于液氮中，-80℃低温保存，分析铜在鱼体各组织中的积累。暴露 21 天结束后，收集水箱中剩余的鱼，并测量鱼体、肝脏和内脏的重量，每个处理解剖 3 条鱼收集肝脏，中性福尔马林固定液（10%）固定，苏木精-伊红（H&E）染色，另取 3 条鱼解剖收集肝脏，置于液氮中，-80℃低温保存进行油红 O 染色。

2.2.2 主要实验仪器

仪器名称	公司
光学显微镜	日本 NIKON
超高压釜	德国 Leutkirch
NexION® 2000 电感耦合等离子体质谱仪	美国 PerkinElmer
电子天平 MP502N	上海民桥精密科学仪器
漩涡振荡器 QL-920	海门市麒麟医用仪器厂
超低温冰箱 NBS	德国 Eppendorf
颗粒制冰机 SIM-F140AY65-PC	日本松下
超纯水系统 AF2-1001-U	台湾艾科浦有限公司

2.2.3 主要试剂

试剂名称	公司
CuSO ₄	中国 邦诺
MS-222 溶液	美国 Sigma
中性福尔马林固定液（10%）	中国 森贝伽
苏木精-伊红（H&E）染色试剂盒	中国 迈基
饱和油红 O 染色液	中国 Solarbio

2.3 实验方法

2.3.1 鱼体生长参数、肝体比和脏体比的测定

在铜暴露处理 21 天后，每个水箱随机挑选 3 条鱼（每个处理共 9 条），测量鱼体长度并于电子天平上进行称量，称量结束后，将鱼在冰盘上进行解剖，并再次称量鱼体内肝脏和内脏的重量，记录上述实验数据。

2.3.2 鱼体肝脏、肠和肌肉中铜积累量的测定

将冷冻的肝脏、肠和肌肉样本取出, 参照 Gomes 等^[103]报道的方法, 称重并在 100℃ 烘干, 准确称取 0.2 g 干燥的组织, 并加入 2 mL 浓硝酸, 220℃ 下消化 30 min。将消化后的样品用超纯水稀释至 10 mL, 并使用 NexION® 2000 电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)测定不同样品中铜含量(以每克组织干重所含铜的微克数表示($\mu\text{g/g}$))。

2.3.3 水体铜暴露下肝脏形态和组织化学观察

将中性缓冲福尔马林中的肝脏样本进行苏木精-伊红(H&E)染色分析, 实验过程参照本实验室已有的实验方法^[16]。步骤如下: 将修剪固定的组织进行梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋, 切片机切片(厚度约为 6-7 μm), 苏木精和伊红染色, 酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固后, 在光学显微镜下进行组织结构和细胞形态观察。

对肝脏样本进行油红 O 染色进行组织化学分析, 样本处理参照 Wang 等^[16]实验方法, 首先将冰冻的肝脏样本在低温恒温切片机上切成 9 μm 厚的切片, 多聚甲醛固定 10 min, 进行油红 O 染色, 甘油封片, 光学显微镜下观察拍照。使用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件分析 H&E 染色中肝液泡和油红 O 染色中脂滴的相对面积, 从每个样本中随机选取 10 个视野的显微图片, 将观察结果进行统计合并。

2.3.4 数据处理与分析

实验数据利用统计学软件 SPSS 22.0 (IBM 公司) 进行单因子方差分析 (One-way ANOVA), 用 t 检验计算 p 值, 若 $p \leq 0.05$, 则差异显著, 所有数据采用均值 $\pm$ 标准差 (Means $\pm$ SD) 表示。

2.4 结果与分析

2.4.1 鱼体生长参数、肝体比和脏体比

如表 2.1 所示, 经 21 天铜暴露处理后, 鱼体增重率 (WG) 随着铜浓度的升高而显著降低, 而内脏指数 (VSI) 和肝体指数 (HSI) 则相反, 随着铜浓度的升高而升高, 同时观察到增长幅度在 20 $\mu\text{g/L}$ 组比在 100 $\mu\text{g/L}$ 组中更明显。此外, 水体铜浓度也对鱼体存活率产生影响, 结果显示在对照组或 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组中暗纹东方鲀死亡率为 0, 但 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组中幼鱼死亡率达 4.7%。

表 2.1 21 天水体铜暴露后对暗纹东方鲀生长参数的影响

Table 2.1 Effect of Cu²⁺ exposure on the growth parameters of *T.fasciatus* after 21 days.

	初试平均体重	最终平均体重	体重增长率	内脏指数	肝体指数	存活率
	IBW(g/fish)	FBW(g/fish)	WG(%)	VSI(%)	HSI(%)	S(%)
对照组	7.9±0.1 ^a	16.1±0.4 ^a	104.4 ±4.2 ^a	15.1±0.4 ^b	11.2±0.3 ^c	100 ^a
20 µg/L	7.7±0.2 ^a	15.7±0.2 ^a	103.1 ±1.9 ^a	17.2±0.1 ^a	14.8±0.1 ^a	100 ^a
100 µg/L	7.7±0.1 ^a	11.2±0.3 ^b	42.4 ±1.1 ^b	17.1±0.7 ^a	13.1±0.2 ^b	95.3 ±4.0 ^a

注：数据用平均值±标准差表示（n = 3）；同一列中不同字母之间表示处理组之间显著差异（ $p\leq0.05$ ）；IBW 表示初始平均体重；FBW 表示最终平均体重；WG 表示体重增长率；VSI 表示内脏指数；HSI 表示肝体指数；S 为存活率。

Note: Values are presented as means ± SD (n=3); the values with different letters within the same column are significantly different at $p\leq0.05$. IBW mean body weight; FBW mean body weight; WG mean body weight; VSI mean viscerosomatic index; HSI mean hepatosomatic index; S mean survival rate.

2.4.2 鱼体肝脏、肠和肌肉内铜积累量

图 2.1 显示了铜暴露处理 21 天后暗纹东方鲀肝脏、肌肉和肠中铜中积累。随着水体中铜浓度的升高，三个组织内铜积累量随时间的增加而增加。在相同铜浓度下，三个组织铜积累量有所差异，其顺序为肝脏>肠>肌肉。

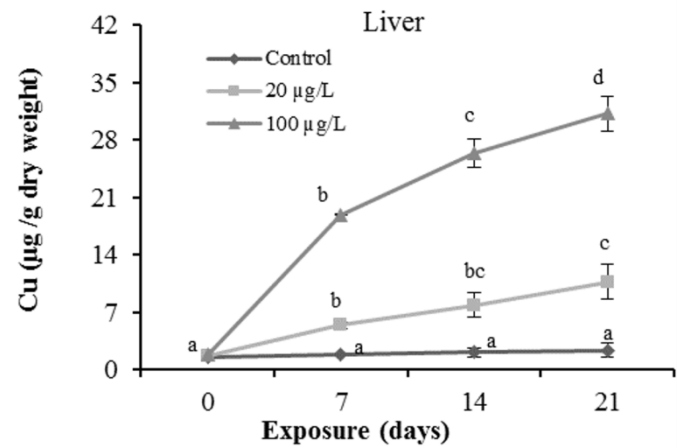


图 2.1 A 水体铜暴露后暗纹东方鲀肝脏铜积累量

Figure 2.1 A Copper contents in the liver of *T. fasciatus* after exposure to control conditions, 20 or 100 µg/L Cu²⁺

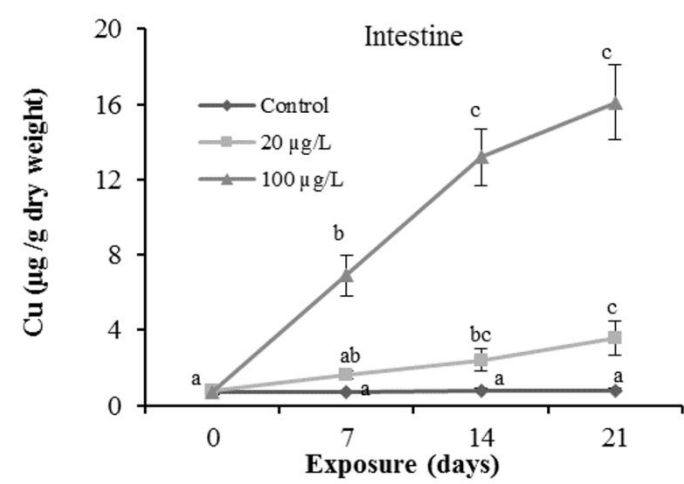


图 2.1 B 水体铜暴露后暗纹东方鲀肠铜积累量

Figure 2.1 B Copper contents in the Intestine of *T. fasciatus* after exposure to control conditions,20 or 100 µg/L Cu²⁺

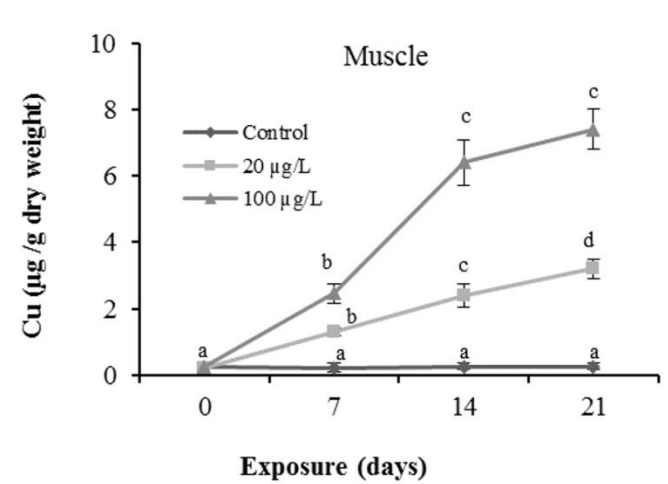


图 2.1 C 水体铜暴露后暗纹东方鲀肌肉铜积累量

Figure 2.1C Copper contents in the muscle of *T. fasciatus* after exposure to control conditions,20 or 100 µg/L Cu²⁺

注：数据表示为平均值±标准差（n = 3）。不同的小写字母表示不同组存在显著差异（ $p \leq 0.05$ ）。

Note: Data are presented as the means ± SD (n=3). The different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) during increasing duration of Cu²⁺ exposure.

2.4.3 水体铜暴露下肝脏形态和组织变化观察

在铜暴露 21 天后，对照组暗纹东方鲀肝组织正常，形态和结构规整。两个处理组中暗纹东方鲀肝脏颜色均比对照组浅（图 2.2A）。铜暴露处理导致暗纹东方鲀肝脏空泡化，与其余两组相比，20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组具有最大的液泡面积（液泡的总面积由大泡和微泡的总和计算）（图 2.2C 和 2.2E），与此同时，油红 O 染色表明，20 $\mu\text{g/L}$ 的铜暴露诱导暗纹东方鲀肝脏脂滴数量增加的程度更大（图 2.2B 和 2.2D）。

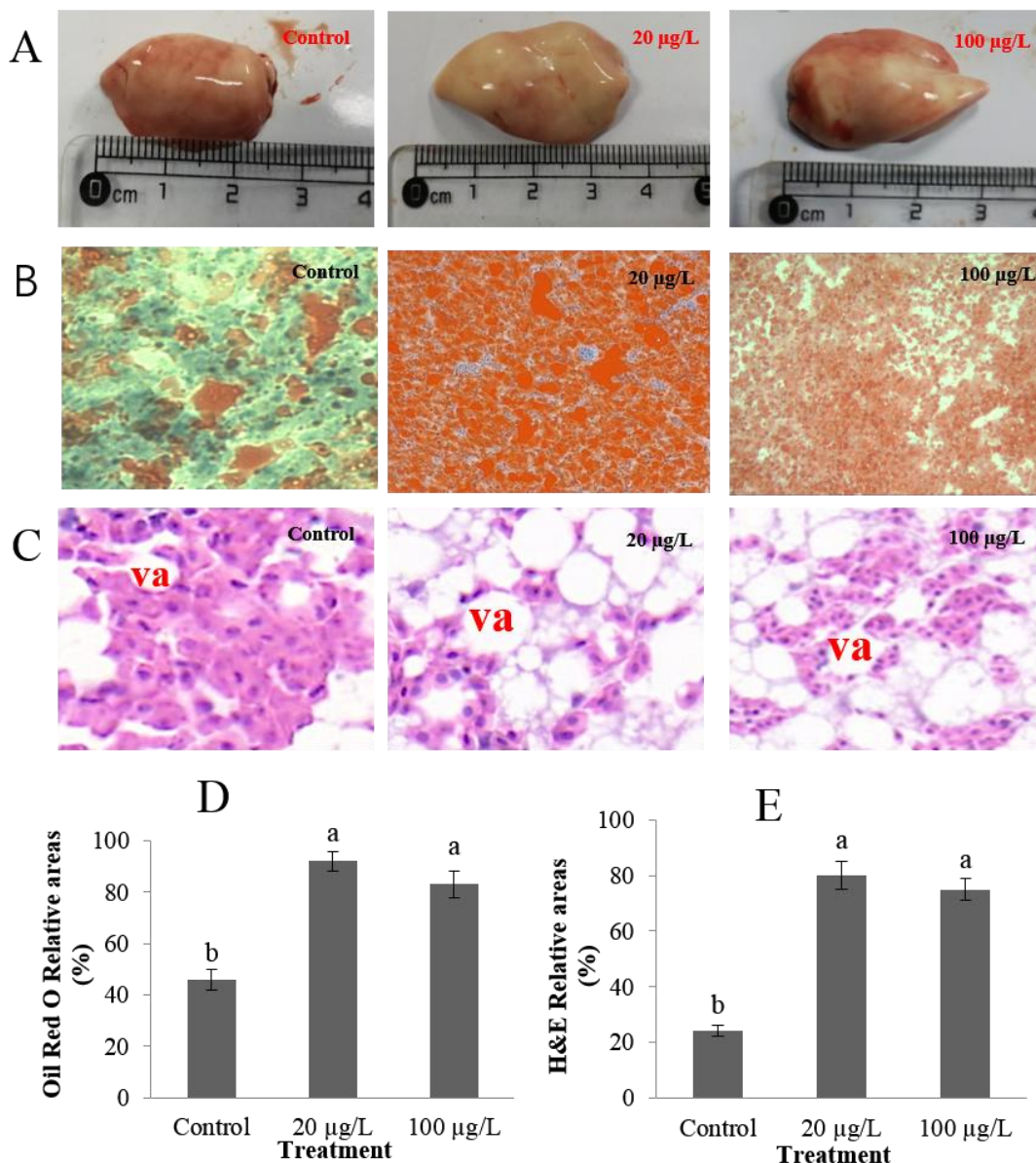


图 2.2 Cu^{2+} 暴露对 21 天后暗纹东方鲀肝脏形态和组织化学的影响。

Figure 2.2 Effects of Cu^{2+} exposure on liver morphology and histochemistry in *T. fasciatus* after 21 days.

注: A 为暴露 21 天后各实验组肝脏形态; B 在 200 倍放大倍率下为脂质的脂质显示油红 O 染色(红色); C 中的图像在 400 倍放大率下肝脏组织 H&E 染色-空泡性变(Va)。数据表示平均值 $\pm$ 标准差($n=3$), 不同组之间显著差异用不同字母表示($p\leq 0.05$)。

Note: Figure A represents the liver morphology of each experimental group after 21 days of exposure, The images in B display oil red O staining (red) for lipids at $200\times$ magnification. The images in C show haematoxylin and eosin (H&E)-stained hepatic vacuoles (Va) at $400\times$ magnification. Data represent means $\pm$ SD ($n=3$). Significant differences ($p\leq 0.05$) among treatments are indicated by different letters.

2.5 讨论

铜作为鱼类等生物体个体生长、神经发育和免疫防御等生命活动所必须的微量元素, 同时也作为抗菌剂被广泛应用于水产养殖领域。然而, 随着水体重金属污染日趋严重, 铜对水产养殖鱼类潜在危害引起学术界广泛注意。现有研究显示, 过量铜摄入会严重影响鱼类的生长发育, 包括抗氧化反应、肝脏损伤和免疫应答等一系列生理过程, 其中, 由于铜摄入过量而引起的鱼类体沉积和脂肪肝现象尤为严重。本实验通过对不同铜浓度暴露处理下暗纹东方鲀生长性能、铜积累量以及肝脏组织显微结构的影响, 为今后研究暗纹东方鲀肝脏脂代谢的调控机理提供了实验依据。

在本实验中, 铜暴露处理下, 暗纹东方鲀个体发育受到明显影响, 高浓度铜暴露显著抑制了暗纹东方鲀的生长性能(包括体重增长和存活率)。有相关研究显示, 鱼类生长性能的降低是由于重金属暴露增加了肝脏解毒和维持内环境稳态所需的代谢支出^[104]。作为鱼体最重要的代谢和解毒器官, 鱼类的肝脏表现出对重金属离子的高敏感性, 本实验也应证了这一点, 铜暴露处理下, 随时间的延长, 暗纹东方鲀肝脏、肠和肌肉组织内铜积累量均上升, 但上升幅度明显不同, 肝脏内铜积累量远大于其它两个组织(肠和肌肉)。暗纹东方鲀的肝脏组织中, 脂肪细胞与肝细胞密切交织, 有研究显示, 铜离子可与血清蛋白大量结合, 导致游离脂肪酸在肝细胞中大量累积, 诱发脂质过氧化反应, 导致脂代谢失衡, 进而引起鱼体肝脏内脂质沉积, 出现脂肪肝现象^[105]。本实验也证实了上述猜想, 在不同浓度铜暴露处理下, 肝脏组织受到损伤并有脂肪沉积现象。与对照组相比, 水体铜暴露下暗纹东方鲀肝脏颜色较浅, 肝脏稍呈黄色状。H&E 染色和油红 O 染色显示, 处理组中肝脏脂肪含量上升, 肝脏组织空泡化, 细胞排列不规则, 细胞核边缘化。与高浓度 $100\mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 组相比, $20\mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 导致产生了暗纹东方鲀肝脏组织更大的空泡化面积, 同时肝脏脂滴数量显著增加。本实验也证实, 不同浓度的铜处理对暗纹东方鲀肝脏脂肪含量的影响存在差异。

第 3 章 水体铜暴露对暗纹东方鲀肝脏脂代谢相关酶活及基因表达的影响

3.1 引言

近年来，由于社会 and 市场需求，水产养殖行业正迎来快速发展。然而，水产养殖鱼类脂肪肝现象突出，严重制约其健康发展。现有研究显示，脂肪肝形成的机制复杂，原因多样，但是过量的铜是促进某些鱼类的脂肪肝形成的重要原因。脂质的积累主要是由脂肪酸的合成（脂肪生成）和肝脏引起的 β -氧化（脂解）介导的脂肪分解代谢之间的不平衡引起的^[50, 62, 64]。在水产集约化养殖中，脂肪肝已经成为在大规模养殖鱼类（如草鱼、尼罗罗非鱼等）中常见的疾病。目前研究显示，许多关键基因参与脂质代谢，其中 *6PGD*、*G6PD*、*LPL*、*FAS* 和 *ACC* 等与脂质合成过程密切相关，而 *HSL* 和 *CPT1* 在调控脂肪分解过程中发挥关键作用，转录因子 *PPAR α* 和 *PPAR γ* 被证实可通过调节相关基因的表达水平，间接调控机体脂质代谢。

本章研究利用酶活测定和 qRT-PCR 技术，以暗纹东方鲀 18s RNA 为内参基因^[26]，检测并分析了暗纹东方鲀肝脏中 TG 含量、LPL 酶活和 *G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS*、*ACC*、*HSL*、*CPT1*、*PPAR α* 和 *PPAR γ* 基因的表达情况。这将对进一步揭示暗纹东方鲀脂肪肝形成的机制提供参考资料。

3.2 实验材料、仪器及试剂

3.2.1 实验材料

参照 2.2.1 所述。

3.2.2 主要实验仪器

仪器名称	公司
紫外杀菌循环水控温养殖系统	上海海圣
移液器	德国 Eppendorf
匀浆机 T10 B S25	德国 IKA
冷冻超速离心机 Centrifuge 5810R	德国 Eppendorf
超低温冰箱 NBS	德国 Eppendorf
PCR 仪 Mastercycler pro	德国 Eppendorf

实时荧光定量 PCR 仪 StepOnePlus	美国 ABI
Nanodrop 2000 分光光度计	美国 Thermo
电泳槽 DYC-31D	北京六一
电子天平 MP502N	上海民桥精密科学仪器
漩涡振荡器 QL-920	海门市麒麟医用仪器厂
颗粒制冰机 SIM-F140AY65-PC	日本松下
超纯水系统 AF2-1001-U	台湾艾科浦有限公司
凝胶成像仪	中国捷达公司
微波炉 Galanz	广东格兰仕集团有限公司
恒温水浴锅 HH-S6	金坛市医疗器械厂

3.3.3 实验试剂

试剂名称	公司
高纯总 RNA 快速抽提试剂盒	中国 Bioteke
反转录试剂盒	中国 Vazyme
ChamQ TM SYBR qPCR Master Mix	中国 Vazyme
甘油三酯 (TG) 测定试剂盒	南京 建成生物
总脂酶[脂蛋白脂酶(LPL)、肝脂酶(HL)]测定试剂盒	南京 建成生物

3.3 实验方法

3.3.1 脂代谢酶活测定

称取肝脏样本 100 mg, 加入 9 倍体积的生理盐水在冰上匀浆以制备 10% 匀浆液, 然后将匀浆在 4℃ 下以 9500 g 离心 5 分钟。TG 含量测定详细步骤参照南京建成生物提供的试剂盒说明书, LPL 酶活测定详细步骤参照南京建成生物提供的 LPL 酶活测定试剂盒说明书。使用 Bradford 方法^[106]和以牛血清白蛋白为标准品测定肝脏匀浆的可溶性蛋白含量。按照 Luo 等^[107]提供的方案, 使用乙醚萃取法进行肝脏内脂质含量的测定。处理好的样品用分光光度计或酶标仪进行测量并进行记录, 实验重复三次以减少误差。

3.3.2 水体铜暴露后肝脏总 RNA 的提取及 cDNA 合成

取新鲜冷冻肝脏样品, 按照高纯总 RNA 快速抽提试剂盒提供的方法进行操作, 提取肝脏组织总 RNA。提取过程中, 实验器材进行消毒灭菌, 避免 RNA 降解。将提取结束后的 RNA 样品使用 Nanodrop 紫外分光光度计进行浓

度测定和 OD 260/280 比值测定, 比值在 1.8~2.0 之间样品进行 RNA 条带完整性检测。将合格的 RNA 样品分批冻存于-80℃冰箱, 用于后续试验。

利用 Vazyme 提供的 HiScript™ 1 ST strand cDNA Synthesis kit 反转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成, 操作过程如下: 在无菌离心管中进行 20ul 反应液配制, 配制如下: 总 RNA 样品 2 ul, 4×gDNA wiper Mix 4 μL, RNase-free water 10 μL, 混合均匀后瞬时离心; 42℃ 反应 2 min, 加入 5×qRT SuperMixII 4ul, 移液枪轻吹混匀后瞬时离心; 按照试剂盒提供的反应程序: 50℃ 15min, 85℃ 2min 进行逆转录反应, 产物可立即用于后续 qRT-PCR 反应或于-20℃冰箱储存。

3.3.3 荧光定量 PCR 检测 *G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS*、*ACC*、*HSL*、*CPT1*、*PPARα* 和 *PPARγ* 基因 mRNA 表达量

(1) 引物设计

利用实验室已有的暗纹东方鲀转录组数据, 对暗纹东方鲀 *G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS*、*ACC*、*HSL*、*CPT*、*PPARα* 和 *PPARγ* 基因进行序列预测, 利用 Premier 5.0 软件设计基因特异性上下游引物, 并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物见表 3.1。

表 3.1 引物列表

Table 3.1 Primers used in this study

基因	引物	序列
Gene	Primer	Primer sequence (5' - 3')
<i>6PGD</i>	<i>6PGD</i> -F	CGGGAGAGCCTTGTGTGAT
	<i>6PGD</i> -R	CCGTCTTGTTCAGTCGTCA
<i>G6PD</i>	<i>G6PD</i> -F	CTCACCTTCAAGGAGCCGTT
	<i>G6PD</i> -R	GGGCTATACGCTTCAGGACC
<i>FAS</i>	<i>FAS</i> -F	GCAGCTTTCTTTGGCGTTCA
	<i>FAS</i> -R	TCTGATCCACTCACCCCGAT
<i>ACC</i>	<i>ACC</i> -F	GTGAAAATCCCAGACGAGGGT
	<i>ACC</i> -R	CCACGAGAAACAGTGTCCGA
<i>LPL</i>	<i>LPL</i> -F	CCTGCTGGGTACAGTCTGG
	<i>LPL</i> -R	CCCCGTTGGGGTAAATGTCA

<i>HSL</i>	<i>HSL</i> -F	CGTGTGTGAGGAAAATGCCG
	<i>HSL</i> -R	ACCACCTTGACTAACGAGCG
<i>CPT1</i>	<i>CPT1</i> -F	CTTCATCCAGATTGCGCTGC
	<i>CPT1</i> -R	AACAAACGCCTGCACACATC
<i>PPARα</i>	<i>PPAR α</i> -F	GTCAATGACTACCCGCCCTC
	<i>PPAR α</i> -R	AGCTTCAGACGGATAGTGCG
<i>PPARγ</i>	<i>PPAR γ</i> -F	GTAACCAGGACTCGGTGTGG
	<i>PPAR γ</i> -R	GATCTCCGATTGGTCGCTGT
18s RNA	18s RNA-F	AGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
	18s RNA-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC

(2) 构建荧光定量 PCR 扩增体系

将反转得到的 cDNA 作为模板，按照试剂盒中提供的荧光定量扩增体系（20ul）加入相应组分（表 3.2），并进行 3 次生物学重复。

表 3.2 荧光定量 PCR 扩增体系

Table 3.2 Quantitative Real-time PCR amplification system

组分 Constituents	体积/ μ L Volume
ChamQ TM SYBR qPCR Master Mix	10
cDNA 模板（5 ng/ μ L）	4
正向引物(2 mmol/L)	3
反向引物(2 mmol/L)	3
总体积	20

(3) 反应程序设置(ABI 仪器)

表 3.3 荧光定量 PCR 反应程序

Table 3.3 Quantitative Real-timePCR reaction procedure

程序 Procedure	温度 Temperature	时间 Times
预变性	95℃	30 s
循环反应（40 个循环）	95℃	10s
	55℃	30s
	95℃	15s
融解曲线	55℃	60s
	95℃	15s

3.3.4 数据处理与分析

为进一步检测暗纹东方鲀肝脏脂代谢相关基因在不同水体铜浓度暴露条件下 mRNA 表达水平的变化,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析法计算相关基因的相对表达量, 18s RNA 作为内参基因^[26], 实验数据利用统计学软件 SPSS 22.0 (IBM 公司) 进行单因子方差分析(One-way ANOVA), 用 t 检验计算 p 值, 若 $p \leq 0.05$, 则差异显著, 所有数据采用均值 $\pm$ 标准差(Means $\pm$ SD)表示。

3.4 结果与分析

3.4.1 肝脏内脂质、甘油三酯含量和 LPL 活性

水体铜暴露会显著影响暗纹东方鲀肝脏的脂质含量、TG 含量和 LPL 活性。如图 3.1 所示, 在处理 21 天后, 暴露于 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组的暗纹东方鲀中, 肝脏内脂质含量(图 3.1A 50.0%), TG 含量(图 3.1B 62.0%) 和 LPL 活性(图 3.1C 18.3 U/mg) 最高, 而对照组最低。用 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理的暗纹东方鲀肝脏内的脂质含量, TG 含量和 LPL 活性介于对照组和 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组之间。

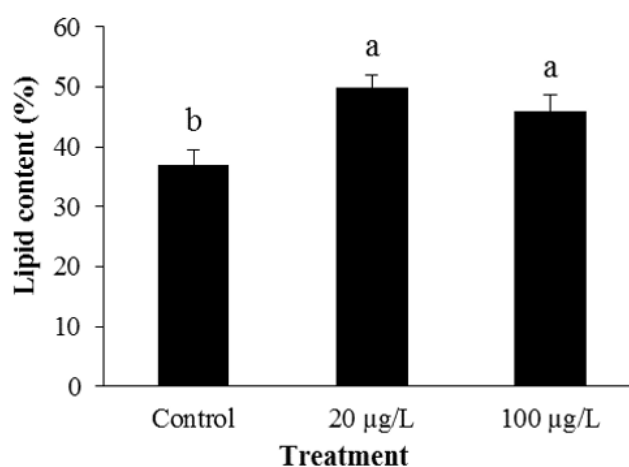


图 3.1 A 水体铜暴露 21 天对暗纹东方鲀肝脏脂质含量的影响

Figure 3.1A Effects of Cu^{2+} exposure on lipid contents in *T. fasciatus* after 21 days

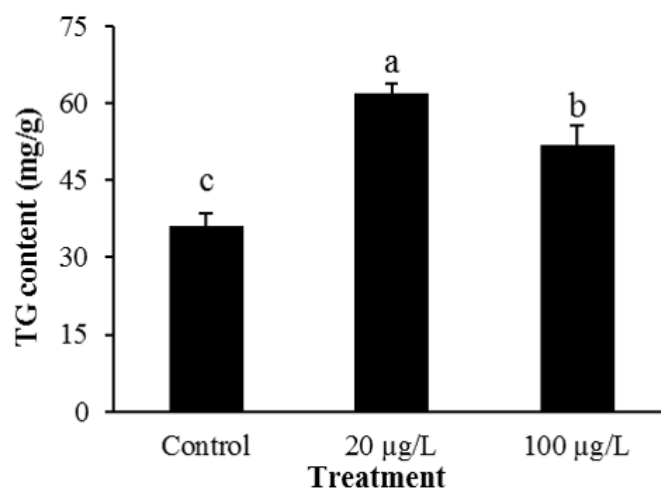


图 3.1 B 水体铜暴露 21 天对暗纹东方鲀肝脏 TG 含量的影响

Figure 3.1B Effects of Cu^{2+} exposure on TG contents in *T. fasciatus* after 21 days

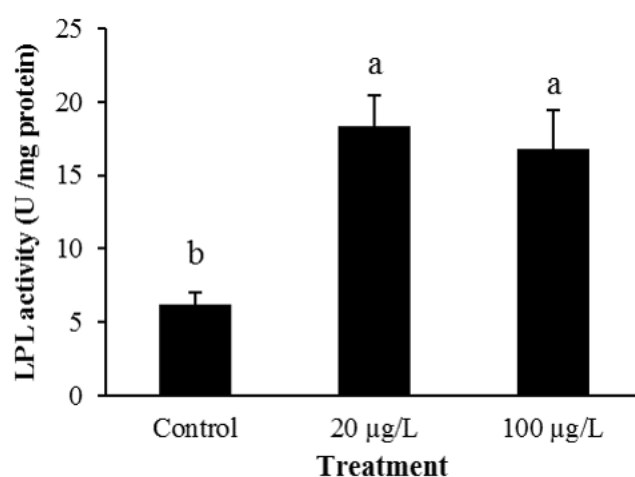


图 3.1C 水体铜暴露 21 天对暗纹东方鲀肝脏 LPL 活性的影响

Figure 3.1 Effects of Cu^{2+} exposure on LPL activity in *T. fasciatus* after 21 days

注：数据表示为平均值±标准差（ $n = 3$ ）。不同的字母表示处理组间的显著差异（ $p \leq 0.05$ ）用。

Note: Data are presented as the means $\pm$ SD ($n=3$). Significant differences ($p \leq 0.05$) among treatments are indicated by different letters.

3.4.2 肝脏内脂代谢相关基因的表达分析

采用荧光定量 PCR 方法检测水体铜暴露 21 天后暗纹东方鲀 *G6PD*、*6PGD*、

LPL、*FAS*、*ACC*、*HSL*、*CPT*、*PPAR α* 和 *PPAR γ* 基因的表达情况。结果显示，在铜暴露处理 21 天后暗纹东方鲀肝脏内与脂肪合成相关基因（*G6PD*，*LPL*，*FAS* 和 *ACC*）表达水平显著上调，在 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 的处理组中观察到最高的表达水平，*G6PD* 在铜暴露处理后未出现明显变化。此外，随着水体铜暴露浓度的升高，参与脂肪分解的基因（*HSL* 和 *CPT1*）表达水平逐渐降低，在 100 $\mu\text{g/L}$ 的处理组中观察到最高的下降幅度和最低的表达水平。转录因子 *PPAR α* 基因表达水平在铜暴露处理后出现显著下调，不同浓度铜处理未出现显著差异，转录因子 *PPAR γ* 基因表达水平在低浓度铜处理下（20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} ）显著上调，高浓度铜（100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} ）处理下显著下调，但仍高于对照组。

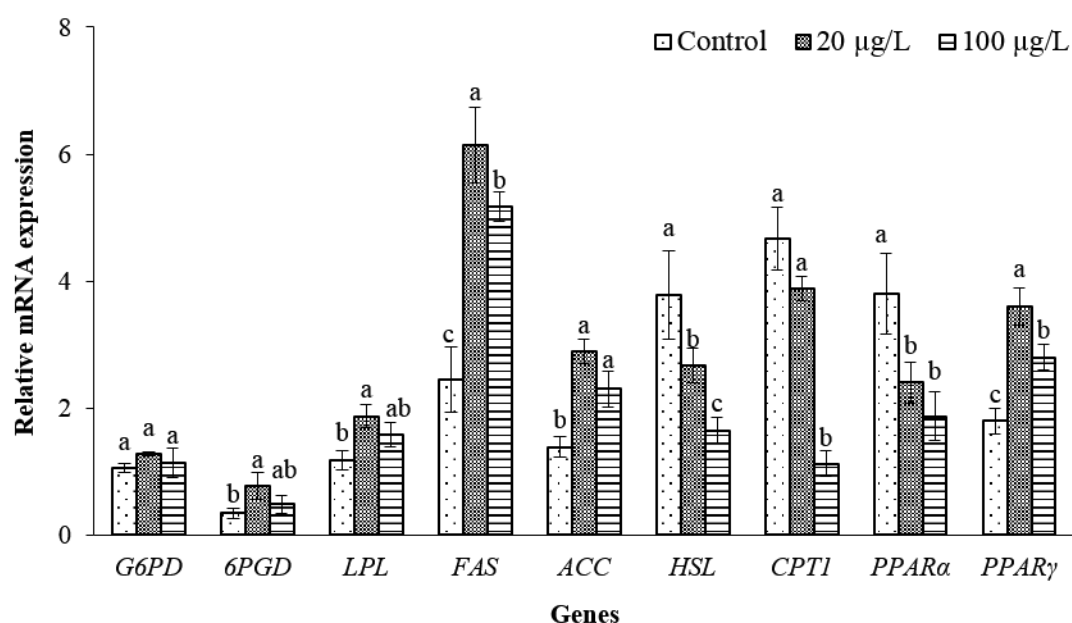


图 3.2 水体铜暴露 21 天对暗纹东方鲀肝脏中参与脂质代谢的基因（*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS*、*ACC*、*HSL*、*CPT1*、*PPAR α* 和 *PPAR γ* ）的 mRNA 表达的影响

Figure 3.2 Effects of 21 days of Cu^{2+} exposure on the mRNA expression of genes (*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS*、*ACC*、*HSL*、*CPT1*、*PPAR α* and *PPAR γ*) involved in lipid metabolism in the liver of *T. fasciatus*

注：数据表示为平均值 $\pm$ 标准差 ($n=3$)。不同的字母表示处理组间显著差异 ($p \leq 0.05$)。

Note: Data are presented as the means $\pm$ SD ($n=3$). Significant differences ($p \leq 0.05$) among treatments are indicated by different letters.

3.5 讨论

如何减少鱼类脂肪肝现象的出现一直是困扰水产养殖行业健康发展的问題，然而脂质的沉积和代谢存在非常复杂的生理机制，涉及脂肪形成、脂肪分解和转运之间的平衡。本章通过利用酶活测定和 qRT-PCR 等实验方法对铜暴露下暗纹东方鲀肝脏内脂质含量、TG 含量和 LPL 活性以及与肝脏内脂代谢相关基因表达情况进行分析，初步研究了水体铜诱导暗纹东方鲀肝脏脂质积累的机制。结果显示，水体铜暴露处理后，暗纹东方鲀肝脏内脂质含量、TG 含量和 LPL 酶活性升高，图 2.2 中 H&E 染色和油红 O 染色分析也进一步证实了肝脏脂质含量的变化。Mela 等^[108]也报道了相似结果，水体铜暴露会导致脂肪沉积在肝脏中，并损伤克林雷氏鲀（*Rhamdia quelen*）的肝细胞，Chen 等^[99]研究报道水体铜以剂量和时间依赖的方式诱导黄颡鱼（*Pelteobagrus fulvidraco*）肝脏的脂肪沉积。

qRT-PCR 结果显示，在铜暴露处理 21 天后，和对照组相比，处理组中脂肪形成相关基因（*G6PD*，*6PGD*，*LPL*，*FAS* 和 *ACC*）表达水平上调，而与脂肪分解相关基因（*HSL* 和 *CPT1*）表达水平出现下调。许多研究已经证实，与脂肪形成相关基因表达增加和与脂解相关的基因表达减少会导致肝脏内脂质沉积^[64]。与此同时，20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组比 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 诱导暗纹东方鲀肝脏内与脂肪生成相关的基因表达水平更高，这可能解释了用 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组暗纹东方鲀肝脏中脂滴积累量和 TG 含量高于 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组。然而，与 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组相比，100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组诱导与脂肪分解相关的基因表达水平仍然较低，该结果与脂质沉积数据表现不一致（用 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组的暗纹东方鲀肝脏中观察到的脂质沉积低于 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 组）。我们推测，高浓度铜胁迫下可能存在其他影响脂质沉积的途径，即鱼体为了维持高铜胁迫下机体内稳态的平衡而消耗更多的能量（脂肪）。研究显示，动物的脂类代谢和脂质沉积受转录因子（*PPAR α* 和 *PPAR γ* ）调控，其中，*PPAR α* 主要通过调控参与脂肪酸氧化的基因表达调控脂肪分解代谢，而 *PPAR γ* 主要负责调控脂肪的合成代谢进而促进脂质沉积。本研究显示，转录因子 *PPAR α* 和 *PPAR γ* 参与了铜暴露下暗纹东方鲀肝脏脂代谢，与对照组相比，铜暴露处理下，*PPAR α* 基因的表达下调，而 *PPAR γ* 基因的表达上调。

第4章 水体铜暴露对暗纹东方鲀肝细胞脂代谢相关基因表达的影响

4.1 引言

铜是鱼类生存所必须的微量元素,研究显示,与其它重金属相比,它能够特异性地蓄积到肝脏中,其在鱼类肝脏的积累量远超过镉和锌等其它传统重金属^[109]。因此,来自于饲料和环境中的铜很可能与鱼类脂肪肝的产生有密切关系。目前围绕肝脏进行脂代谢、解毒等相关机制的体外研究主要在哺乳动物中进行,近年来,围绕鱼类肝细胞培养进行的研究也日益增多。Kuwashiro等^[110]通过建立青鳉鱼 (*Oryzias latipes*)肝细胞病变模型进行相关药物试验,卢荣华^[111]等通过建立草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)肝细胞脂变模型进行脂代谢相关基因 (*PPAR γ* 、*LPL*、*SREBP-1c* 和 *Lep* 等)的研究,李学贤等^[112]通过在草鱼肝细胞中添加外源脂肪酸发现,低浓度脂肪酸可以促进肝细胞脂质积累而高浓度的脂肪酸抑制细胞活力并促进细胞凋亡。暗纹东方鲀在自然状态下肝脏内脂肪含量较高,远超其他常规鱼类,也被认为是研究脂肪代谢机制的潜在模式生物。本研究通过建立一种暗纹东方鲀原代肝细胞的分离及培养方法,为在细胞层面上揭示水体铜暴露对暗纹东方鲀肝脏脂代谢影响机制提供技术支持。

4.2 实验材料、仪器及试剂

4.2.1 实验材料

体格规整,状态活泼的暗纹东方鲀稚鱼,取自江苏省镇江市江之源渔业科技有限公司暗纹东方鲀养殖基地。稚鱼体长为 2.0 ± 0.5 cm,体重为 2.0 ± 0.3 g。饲养于鱼类专用养殖水缸中,用红虫或卤虫饲喂,每日两次。取肝组织前24h,停止投喂,饥饿处理。

4.2.2 实验仪器

参照 3.2.2

4.2.3 实验主要试剂

除参照 3.2.2 之外,还有以下试剂:

试剂名称	公司
II型胶原酶	美国 Gibco
胎牛血清	中国 四季青
双抗（青霉素和链霉素）	中国 四季青
0.25%胰蛋白酶	中国 Solarbio
红细胞裂解液	中国 Solarbio
Percoll 分离液	中国 Solarbio
0.4%台盼蓝染色液	中国 Solarbio
1×PBS 缓冲液	中国 生工生物
DMEM 基础培养基	中国 生工生物
CCK-8 细胞活力检测试剂盒	中国 南京建成
BIOG 微量细胞 RNA 提取试剂盒	中国 常州百代

完全培养基配制方法如下：每 100mL 完全培养基中，约含 DMEM 基础培养基 70mL，胎牛血清 20mL，暗纹东方鲀血清 10mL 和 110 μ L 双抗溶液（青霉素 100 Units/mL、链霉素 100 μ g/mL），pH 为 7.6~7.8 之间。

4.3 实验方法

4.3.1 暗纹东方鲀原代肝细胞培养和孵育

暗纹东方鲀原代肝细胞的分离参照已公开发明专利“一种暗纹东方鲀原代肝细胞高效分离及培养方法”（专利授权号：ZL201911044137.6）。实验分为三组：稚鱼+胶原酶、幼鱼+胶原酶和稚鱼+胰蛋白酶，除此之外，其余处理均相同。

具体操作如下：

（1）选取稚鱼（体长为 2.0 ± 0.5 cm，体重为 2.0 ± 0.3 g）和幼鱼（体长为 10.0 ± 2.0 cm，体重为 25.0 ± 3.2 g），70%酒精棉球擦拭鱼体，使用已高温灭菌的剪刀在无菌环境中快速解剖，取出肝脏，放入一次性培养皿中，PBS 缓冲液（含 2% 双抗）多次清洗去除杂质。

（2）将肝脏小心移入无菌离心管中，快速剪碎，将剪碎的肝脏转入 50mL 离心管中，加入 8 倍体积的 II 型胶原酶（1 mg/mL）或胰蛋白酶（0.25%）处理后置于 28 $^{\circ}$ C 恒温震荡摇床上消化 2 h。

（3）终止消化，筛网过滤后，细胞悬液放入新的离心管中，4 $^{\circ}$ C 1000 rpm 离心 10min，加入红细胞裂解液以及 percoll 分离液（60%），梯度离心得细胞沉淀。

（4）沉淀中加入完全培养基，用移液枪轻吹混匀，将液体转移至细胞培养

瓶中,补足完全培养基至 8 mL(细胞密度约为 $1 \times 10^3/\text{mL} \sim 1 \times 10^5/\text{mL}$ 之间)。

4.3.2 细胞成活率检测及半致死浓度的确立

吸取细胞悬液,加入台盼蓝溶液混合均匀进行染色(体积比为 9:1),在 3 分钟内,用血球计数板分别计数活细胞和死细胞(镜下观察,死细胞呈蓝色,而活细胞呈无色透明状),最后统计细胞活率。计算公式为:细胞成活率(%)=活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数) $\times 100\%$ 。比较不同处理下的细胞活力,结合细胞数量,选取最佳分离细胞的方案。

只有细胞成活率达到 90%以上的细胞才用于后续试验,细胞半致死浓度确定试验采用 CCK 法在无菌 24 孔细胞培养板中进行,铜浓度设置如下:0 μM 、10 μM 、50 μM 、100 μM 、200 μM 、300 μM 、400 μM 、500 μM 。步骤如下:将有不同铜浓度的细胞悬液(400 μL)放入对应孔中,每组 3 个平行重复,放入 28 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱中进行 24h 孵育培养。培养结束后,每孔加入 20 μL CCK-8 溶液(轻缓避免产生气泡),放入培养箱中继续孵育 4h。结束后,从每孔中小心吸取 200 μL 上清液放于 96 孔酶标仪板中,使用酶标仪测定在 450nm 处吸光度。每孔 OD 值为实测孔 OD 值减去本底 OD 值(完全培养基加 CCK-8,无细胞),细胞存活率(T/C)%=(加药细胞 OD/对照细胞 OD) $\times 100$,其中 T 为实验细胞的 OD 值,C 为对照细胞的 OD 值,确定 Cu 的 IC_{50} 值,为后续实验提供参考浓度。

4.3.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

分离后的细胞悬液先进行 8h 恢复后,再用于后续实验。实验分为 4 组,对应浓度分别为 0 μM 、10 μM 、30 μM 和 50 μM Cu^{2+} 。将细胞悬液放置于对应培养基进行培养,每组设置 3 个平行,于 24h 后收集细胞进行后续分析。细胞总 RNA 的提取按照常州百代提供的微量细胞 RNA 提取试剂盒说明书进行操作。RNA 质量检测以及后续 cDNA 的合成参照 3.3.3 所述

4.3.4 荧光定量 PCR 检测肝细胞内脂代谢相关基因表达量

采用 qRT-PCR 技术分析不同铜浓度处理下暗纹东方鲀原代肝细胞内 6PGD、G6PD、LPL、FAS、ACC、HSL、CPT、PPAR α 和 PPAR γ 基因表达情况。具体实验步骤参照 3.3.4 所述。

4.3.5 数据处理与分析

参照 3.3.5 所述

4.4 结果与分析

4.4.1 暗纹东方鲀原代肝细胞培养方法的建立

本实验设置3个不同处理分离暗纹东方鲀肝细胞,结果见图4.1和表4.1。从图4.1可以看到,选取稚鱼和胶原酶组(A)细胞,细胞状态和数量显著好于其余两组(B和C)。从表4.1可以看出,相同处理条件下,暗纹东方鲀稚鱼肝细胞存活率和产量都要显著高于幼鱼肝细胞,而II型胶原酶对肝细胞的损害要低于使用胰蛋白酶处理组。

为测定铜对暗纹东方鲀肝细胞的存活率影响,本实验采用CCK-8法分析获得了铜的24h的半致死浓度(如图4.2)。从图中可以看出,随着铜浓度的增加,细胞的存活率显著下降,当铜浓度达到 $50\mu\text{M}$ 时,细胞开始出现死亡现象,在铜浓度达到 $300\mu\text{M}$ 时,肝细胞基本全部死亡,最终获得铜的半致死浓度值约为 $143.64\mu\text{M}$ 。

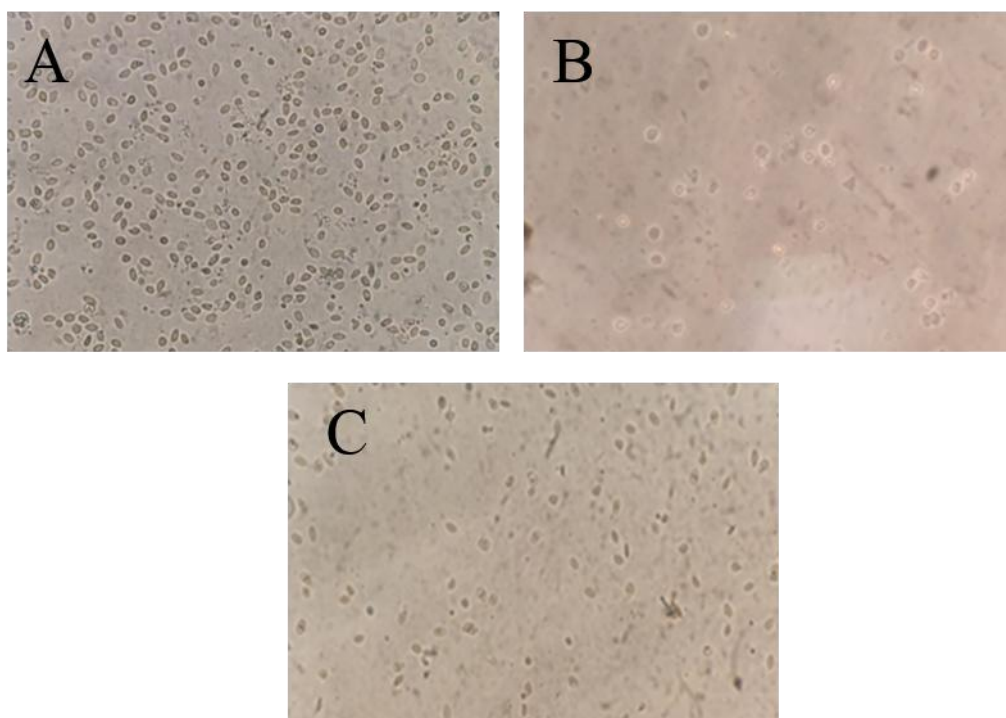


图 4.1 恢复处理 8h 后不同分离方法下暗纹东方鲀肝细胞

Figure 4.1 Hepatocytes of *T. fasciatus* under different separation methods after 8 hours of recovery treatment

表 4.2 暗纹东方鲀肝细胞不同分离方法对细胞产量和存活率的影响

Table 4.2 The effect of different methods of separation of liver cells from *T. fasciatus* on cell yield and survival rate

处理方法	每克肝组织的细胞量	存活率 (%)
Experimental treatment	Number of cells (g)	Survival rate
稚鱼+胶原酶	(2.36±0.02) ×10 ^{7a}	94±0.3 ^a
幼鱼+胶原酶	(1.47±0.03) ×10 ^{7c}	72±0.5 ^c
稚鱼+胰蛋白酶	(1.98±0.02) ×10 ^{7b}	88±0.3 ^b

注：数据以平均值±标准差表示 (n=3) ,同行不同字母之间表示差异显著 (p≤0.05)

Note: Values are mean ±SD (n=3) and values with different letters within the same row are significantly different at p≤0.05

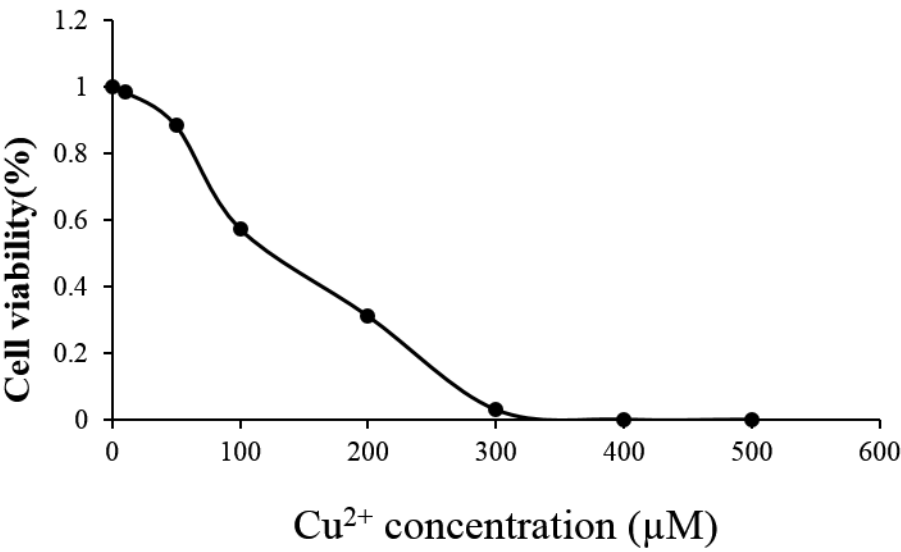


图 4.2 不同铜浓度处理 24h 对暗纹东方鲀原代肝细胞存活率的影响

Figure 4.2 The effect of different copper concentrations for 24h on the survival rate of primary cells of *T. fasciatus*

4.4.2 脂代谢相关基因 mRNA 表达分析

采用 qRT-PCR 技术检测暗纹东方鲀肝细胞内 *G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS*、*ACC*、*HSL*、*CPT1*、*PPAR α* 和 *PPAR γ* 等 9 个基因在不同铜浓度处理下的表达情况。结果显示,铜浓度显著影响了肝细胞内与脂代谢相关基因的表达,随着铜处理浓度的升高,与脂肪合成相关基因(*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS* 和 *ACC*)均出现了上调,但上调幅度有所不同,其中 *LPL* 和 *FAS* 基因表现出对铜浓度刺激的高敏感性,然而随着铜浓度的继续升高,*G6PD* 和 *6PGD* 等基因表达量又出现下调。随着铜处理浓度的升高,与脂肪分解相关基因(*HSL* 和 *CPT1*)表达水平均有不同程度的下调。而在铜处理下,转录因子 *PPAR α* 表达水平下调,但不同铜浓度对其表达并未产生显著影响,随着铜浓度的升高,转录因子 *PPAR γ* 表达水平先上升后下降,并在 30 μM 处出现最大值。

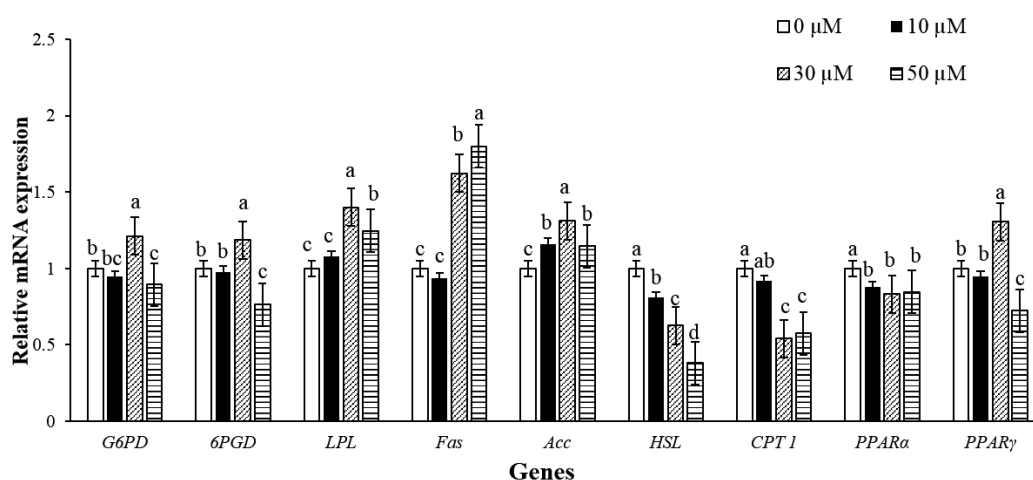


图 4.3 不同铜浓度处理 24h 对暗纹东方鲀原代肝细胞脂代谢相关基因表达的影响

Figure 4.3 The effect of different copper concentrations for 24h on the expression of genes related to lipid metabolism in primary hepatocytes of *T. fasciatus*

注: 数值表示为平均值 $\pm$ SD ($n=3$), 每个基因相对于内参基因 18s RNA 的相对表达水平。

不同字母之间表示处理组之间显著差异 ($p \leq 0.05$)。

Note: The value is expressed as the mean $\pm$ SD ($n=3$), the relative expression level of each gene relative to the internal reference gene 18s RNA. Different letters indicate significant differences between treatment groups ($p \leq 0.05$).

4.5 讨论

相较于小鼠等哺乳动物细胞的成熟培养体系,鱼类细胞培养发展稍显落后,除斑马鱼等少数模式生物具有成熟的细胞系外,绝大多数鱼类细胞的研究仍处在起步阶段。关于鱼类肝细胞的分离培养方法多基于于哺乳动物细胞,肝脏灌流法和组织块培养法在前期的摸索实验中已被证实不适用于暗纹东方鲀。研究显示,肝细胞产量与供体鱼种类、生理状态、年龄和性别等有关^[113-115],而暗纹东方鲀属于高脂肪性鱼类,因此,我们设置了根据鱼体状态和消化酶种类的三组试验来筛选暗纹东方鲀肝细胞的最佳分离方法。结果显示,采用未经饲料转化,只用红虫或卤虫喂养的暗纹东方鲀稚鱼经温和的Ⅱ型胶原酶消化处理得到了最佳的分离效果。尽管这一细胞产量比报道的其他鱼类肝细胞产量低,但经台盼蓝染色和 CCK-8 活力测定,该产量仍可以满足后续研究。与稚鱼相比,暗纹东方鲀幼鱼肝细胞分离的产量和成活率都有明显下降,这可能是由于经饲料喂养后暗纹东方鲀幼鱼肝脏内部分肝细胞已被脂肪细胞占据,肝细胞数量少,在加上脂肪细胞的干扰使得分离效果大大降低。由此可见,对于高脂肪性鱼类,选用未经饲料转化的稚鱼可以提高肝细胞分离的成功率。

在本研究中,随着铜处理浓度的升高,暗纹东方鲀肝细胞的存活率显著下降,高铜浓度(300 μM 以上)处理下肝细胞基本死亡。而测定的 24h 半致死浓度 IC_{50} 为 143.64 μM ,该数值显著低于草鱼成熟细胞系的测定值(243.09 μM)^[116]。我们推测除了具有物种特异性之外,原代细胞可能比成熟细胞系更能表现出对铜刺激的高敏感性。

为了进一步研究水体铜暴露对暗纹东方鲀肝脏脂代谢的影响,本实验在细胞水平上检测了与脂代谢相关基因的表达情况。本研究中,在 30 μM Cu^{2+} 处理组,脂肪合成相关基因(*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS* 和 *ACC*)均出现不同程度的上调,表达量显著高于对照组和其他处理组,而脂肪分解相关基因(*HSL* 和 *CPT1*)均出现下调,说明低浓度铜处理能够诱导暗纹东方鲀肝脏脂肪沉积。Chen 等^[117]研究显示,水体铜暴露会降低黄颡鱼肝细胞中脂肪合成相关基因(*G6PD*、*6PGD* 和 *FAS* 等)表达水平,这可能由于物种的差异性造成的。值得注意的是,在 50 μM Cu^{2+} 处理组,脂肪合成相关基因 *G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*ACC*)和脂肪分解相关基因(*HSL*、*CPT1*)均出现下调,高浓度铜处理下出现的基因水平下调可能是由于铜的毒害作用,而 *FAS* 基因在高铜浓度下表达水平仍然上调,可能是由于不同基因对铜刺激的响应有所不同。研究显示,动物脂质沉积与代谢受到 *PPAR α* 和 *PPAR γ* 的调节,在本实验中,不同铜处理对转录因子 *PPAR α* 的影响不显著,但转录因子 *PPAR γ* 基因表达水

平在 $30\mu\text{M}$ Cu^{2+} 处理组出现显著上调，这与 Zheng 等^[61]对锌暴露下黄颡鱼脂代谢的研究结果相类似。

第 5 章 水体铜暴露对暗纹东方鲀肠道微生物的影响

5.1 引言

近年来，得益于微生物研究技术的发展，肠道微生物与动物健康和疾病的关系成为研究热点。微生物代谢产物通过作为信号分子进而影响宿主代谢的各个方面，例如参与将多糖发酵成短链脂肪酸，胆汁酸的调节和胆碱代谢^[118]。目前研究显示，肠道菌群的稳态在促进机体物质吸收，抵抗病原入侵和调节脂肪代谢的过程中起着重要作用。当鱼体摄入重金属过量时，会改变肠道稳态并改变菌群组成，进而威胁鱼体健康。

本章通过利用 16S rRNA 高通量测序技术,通过水体铜暴露下暗纹东方鲀肠道微生物菌群变化情况，分析肠道微生物在水体铜暴露诱导暗纹东方鲀脂肪肝形成过程中发挥的作用，为进一步揭示鱼类脂肪肝形成机制提供新的参考依据。

5.2 实验材料、仪器及试剂

5.2.1 实验材料

参照 2.2.1

5.2.2 主要实验仪器

参照 3.3.2

5.2.3 实验试剂

试剂名称	公司
Fast DNA Stool Mini Kit	德国 Qiagen
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	美国 Thermo Scientific
凝胶提取试剂盒	德国 Qiagen

5.3 实验方法

5.3.1 暗纹东方鲀肠道样品采集

水体铜暴露处理 21 天进行样品采集，取样前 24h 停止投喂，每个缸中随机挑选 3 条鱼，麻醉后进行无菌环境下快速收集中肠，液氮冷冻，-80℃冰箱保存。

5.3.2 总 DNA 提取与质量检测

使用 *Fast DNA Stool Mini Kit* 试剂盒从肠道中提取细菌 DNA，使用 *NanoDrop* 分光光度计和 1%琼脂糖凝胶电泳测定总 DNA 浓度，OD260/280 在 1.8-2.0 之间质检合格的 DNA 样品用作模板以扩增 16s rRNA 基因的 V3-V4 区域。使用引物（341F：CCTACGGGNGGCWGCAG 和 806R：GGACTACHVGGGTATCTAAT）扩增该区域。在 *Phusion®*高保真 PCR 试剂盒中使用 GC 缓冲液，并按表 5.1 反应程序进行扩增，使用 *Qiagen* 凝胶提取试剂盒纯化 PCR 产物。

表 5.1 PCR 扩增反应程序

Table 5.1 PCR reaction procedure		
程序 Procedure	温度 Temperature	时间 Times
Step 1	95℃	2 min
Step 2	98℃	10s
(27 个循环)	62℃	30s
	68℃	30s
Step 3	68℃	10 min

5.3.3 高通量测序

在广州基迪奥生物科技有限公司对对 PCR 扩增子文库进行 16S rRNA 基因的 *Illumina HiSeq™2500* 测序。测序流程参照广州基迪奥生物科技提供的细菌基因组测序方案，大致如下：

- (1) DNA 样品合格性检测
- (2) 文库构建及库建
- 将合格 DNA 样品随机打断成短片段，再通过末端修复，添加 poly(A)、测序接头、纯化和扩增等步骤完成文库制备，并对文库有效浓度进行定量。
- (3) 上机测序
- (4) 测序结果预处理
- 为得到有效数据，需要将经 *Illumina HiSeq™2500* 测序得到的原始数据进行预处理，丢弃掉因低复杂度、联合污染、引物错配、碱基不明确或 barcodes 无法校正的序列，删除标签中基本质量得分小于 20 且少于总碱基数 80%的 reads。
- (5) 信息分析流程

得到的有效数据将进行 OTU 聚类 and 物种分类分析。使用基于 SILVA 数据库的 RDP 分类器 (2.2 版), 从具有天然贝叶斯模型的 12 种暗纹东方鲀肠道菌群中鉴定出代表性序列, 置信度阈值范围为 0.8 到 1.0。使用 Krona (版本 2.6) 可视化每个分类的丰度统计。使用 QIIME (版本 17.0) 生成 Shannon, Chao 1、ACE 指数以及 UniFrac 距离矩阵。使用 R 语言计算并比较了各组之间的 alpha 指数和基于加权 UniFrac 距离的主坐标分析 (PCoA)。使用 Welch 的 t 检验, Wilcoxon 秩和检验, Tukey 的 HSD 检验, Kruskal-Wallis H 检验以及 R 项目的 Adonis 和 Anosim 检验进行统计分析。

5.4 结果与分析

基于高通量测序的宏基因分析, 检测铜暴露下暗纹东方鲀肠道微生物组的变化。

(1) 菌群丰度和菌群多样性分析

Chao 1 和 Ace 用来计算菌群丰度的指数, 用来估计群落中含有 OUT 的数目, 与群落丰度成正相关。Simpson 和 Shannon 用来计算菌群多样性的指数, Simpson 指数与群落多样性成负相关, 而 Shannon 指数与群落多样性成正相关。

在本实验中, 铜暴露处理对暗纹东方鲀肠道菌群的丰度和多样性均产生了影响。暴露于 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组, Chao 1, ACE, Shannon 和 Simpson 指数最高, 而 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组暗纹东方鲀各指数则最低。(表 5.2)

表 5.2 铜暴露 21 天暗纹东方鲀肠道微生物指数变化

Table 5.2 Microbial diversity in intestine among *T. fasciatus* after 21 days Cu^{2+} exposure

指数 Parameters	对照组 Control	处理组 1 20 $\mu\text{g/L}$	处理组 2 100 $\mu\text{g/L}$
OTUs	368.5 $\pm$ 13.6 ^b	463.5 $\pm$ 28.0 ^a	284.7 $\pm$ 3.2 ^c
Chao 1	481.43 $\pm$ 21.6 ^{ab}	570.61 $\pm$ 30.3 ^a	406.5 $\pm$ 8.05 ^b
ACE	488.32 $\pm$ 14.04 ^b	584.2 $\pm$ 30.98 ^a	415.4 $\pm$ 9.09 ^b
Shannon	3.80 $\pm$ 0.12 ^b	5.53 $\pm$ 0.08 ^a	2.64 $\pm$ 0.3 ^c
Simpson	0.79 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.95 $\pm$ 0.01 ^a	0.68 $\pm$ 0.09 ^b
Goods-coverage (%)	99.89	99.89	99.87

注: 数据以平均值 $\pm$ 标准差表示 (n=3), 同行不同字母之间表示差异显著 ($p\leq 0.05$)

Note: Values are mean $\pm$ SD (n=3) and values with different letters within the same row are significantly different at $p\leq 0.05$

(2) 稀薄曲线分析

本实验对照组和铜暴露处理组各样品（9 个）在 97%相似度水平上所生成的稀薄曲线图如下（图 5.1），如图所示，随着序列数量的增加，各样本曲线趋向平坦，说明已获得足够的序列覆盖率，基本上可以可靠反映所有样品中微生物群落的多样性和基本的群落结构组成。

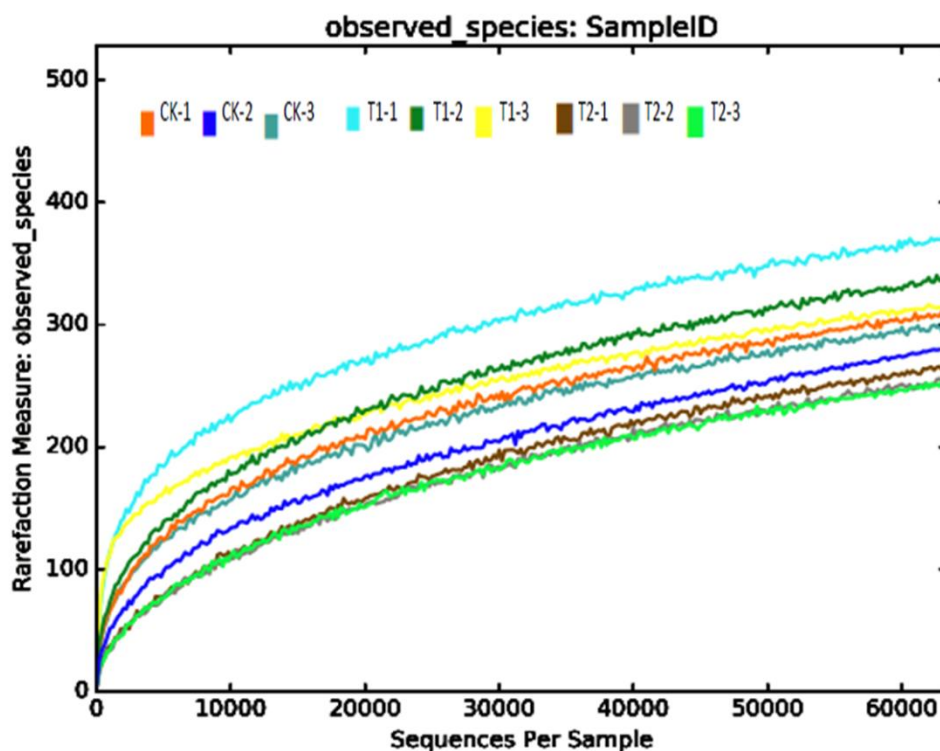


图 5.1 稀薄曲线图

Figure5.1 Rarefaction Curve

注：CK 表示对照组； T1 表示 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组； T2 表示 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组

Note: CK: Control; T1: 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} ; T2: 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+}

(3) 肠道菌群组成分析

基于 Unifrac 分析得到的距离矩阵可通过多变量统计学方法进行 PCoA 分析,进而直观显示不同样品中微生物进化上的差异性与相似性,如图 5.2 A 所示,与对照组相比,铜暴露组暗纹东方鲀在肠道微生物菌群组成组成上存在显著差异。

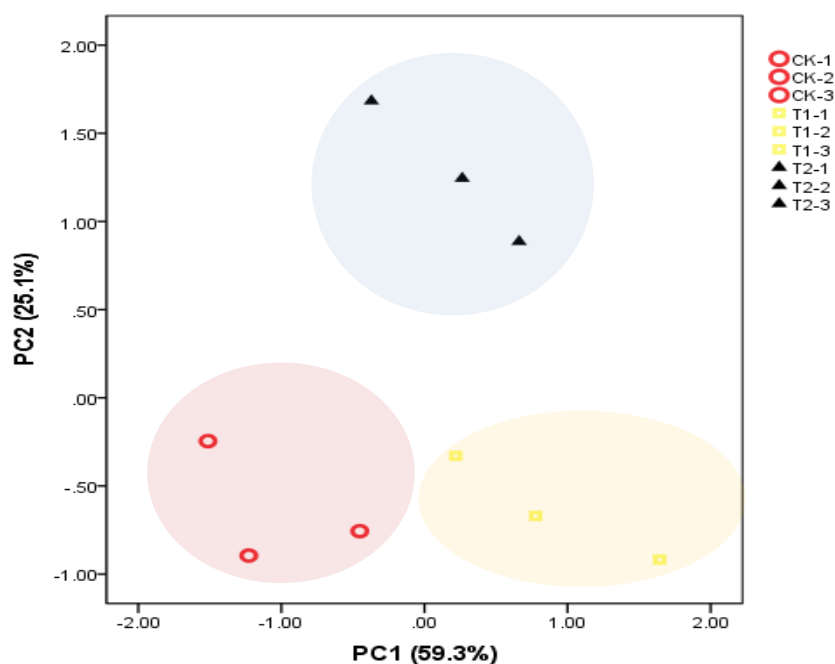


图 5.2 A 肠道菌群二维主坐标分析 (PCoA)

Figure 5.2 A Two-dimensional principal coordinate analysis (PCoA) plots of data (A)

注: CK 表示对照组; T1 表示 20 µg/L Cu²⁺处理组; T2 表示 100 µg/L Cu²⁺处理组

Note: CK: Control; T1: 20 µg/L Cu²⁺; T2: 100 µg/L Cu²⁺

在门的水平上,样品中各类群所占比例由图 5.2 B 所示,铜暴露处理组与对照组中优势肠道菌群均为变形菌门(*Proteobacteria*) (66.92%) 和拟杆菌门(*Bacteroidetes*) (19.41%)。与对照组 (11.2%) 相比,低浓度铜处理组 ($20\mu\text{g/L Cu}^{2+}$) 螺旋菌门(*Spirochaetae*) 所占比例 (2.13%) 明显下降。此外,低浓度处理组 ($20\mu\text{g/L Cu}^{2+}$) 厚壁菌门(*Firmicutes*) 所占比例 (14.16%) 明显上升,高浓度铜处理组 ($100\mu\text{g/L Cu}^{2+}$) 所占比例 (0.32%) 明显下降。

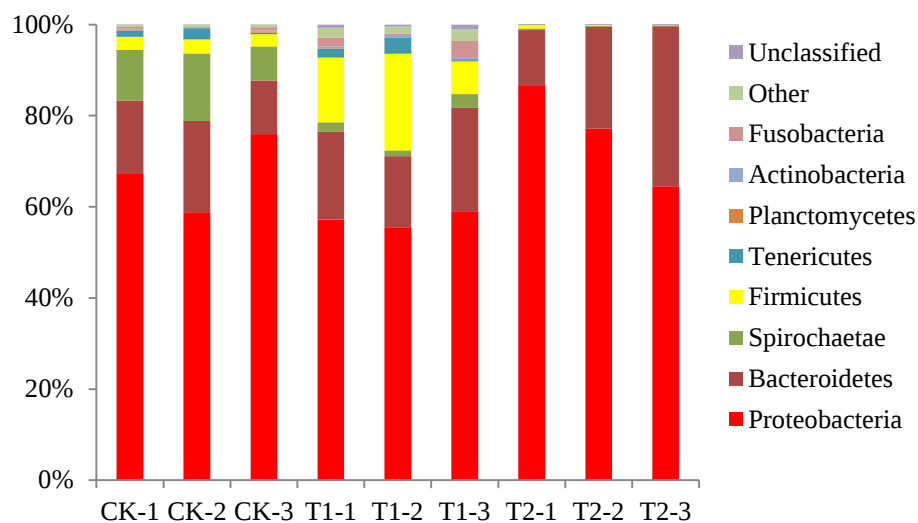


图 5.2 B 门水平下不同细菌的相对丰度

Figure 5.2 B Relative abundance of different bacterial phyla

注: CK 表示对照组; T1 表示 $20\mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 处理组; T2 表示 $100\mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 处理组

Note: CK: Control; T1: $20\mu\text{g/L Cu}^{2+}$; T2: $100\mu\text{g/L Cu}^{2+}$

在属的水平上,各组暗纹东方鲀肠道中主要菌属有所不同。如图 5.2 C 所示与对照组相比,随着水体铜浓度的增加,弓形菌属(*Arcobacter*) 的丰度 (CK:44.8%) 降低,而弧菌属(*Vibrio*) (T2:49.17%) 和伊丽莎白菌属(*Elizabethkingia*) (T2:23.07%) 的丰度则增加。如图 5.2 D 所示,在种水平上,暴露于 $100\mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 处理组中观察到霍乱弧菌的丰度 (49.01%) 最高。

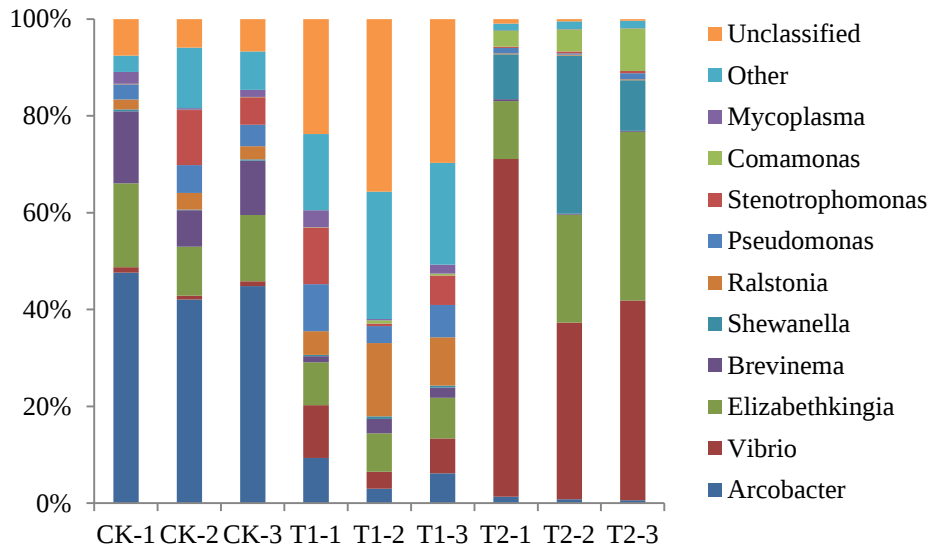


图 5.2 C 属水平下前 10 种不同细菌的相对丰度

Figure 5.2 C Relative abundance of top 10 different bacteria

at the genus level

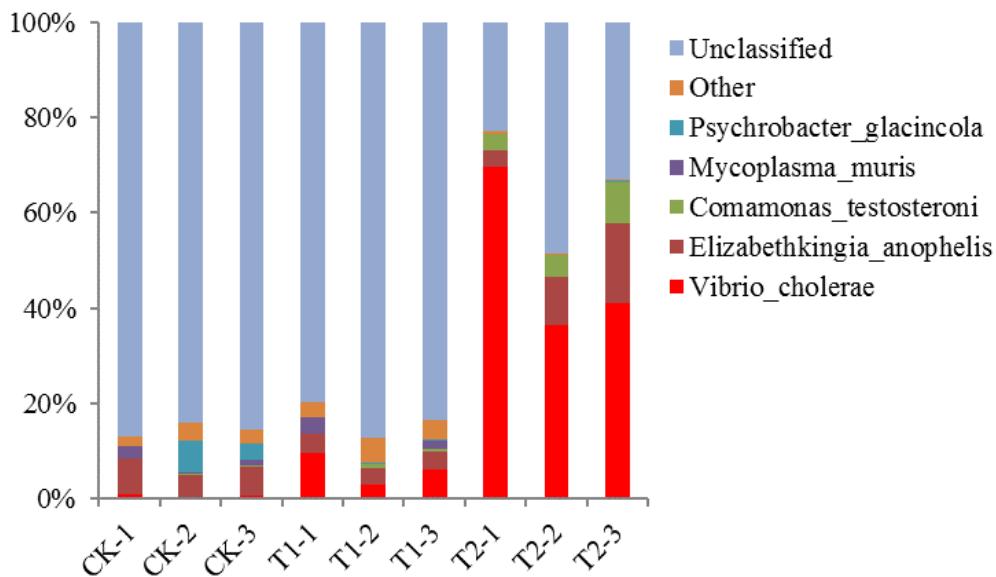


图 5.2 D 种水平下不同细菌相对丰度

Figure 5.2 D Relative abundance of different bacteria

at the species level

注：CK 表示对照组； T1 表示 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组； T2 表示 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组

Note: CK: Control; T1: 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} ; T2: 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+}

肠道中厚壁菌门和拟杆菌门的比例与肝脏的脂质代谢有关^[73, 119]。在本研究中, 如图 4.2 E 所示暴露于 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组暗纹东方鲀中观察到的厚壁菌门与拟杆菌的比率(0.80)最高, 而暴露于 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组暗纹东方鲀中观察到的比率(0.02)最低。

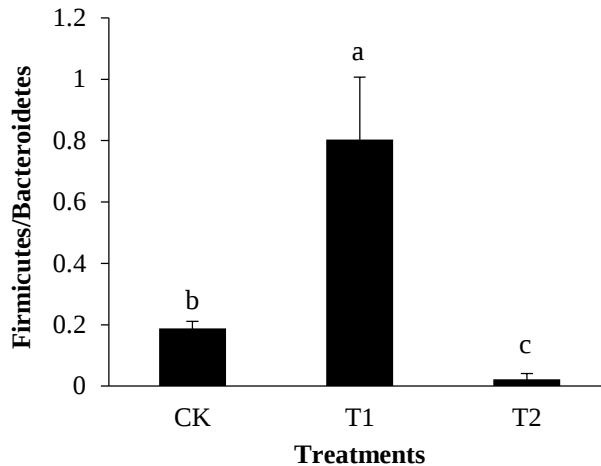


图 4.2E 水体铜暴露 21 天后暗纹东方鲀肠道中的厚壁菌门与拟杆菌门的比率。

Figure 4.2E the Firmicutes to Bacteroidetes ratio in the intestine after 21 days Cu^{2+} exposure

注: CK: 控制; T1: 20 $\mu\text{g/L}$; T2: 100 $\mu\text{g/L}$ 。不同小写字母表示各组之间显著差异 ($p \leq 0.05$)。

Note: CK: Control; T1: 20 $\mu\text{g/L}$; T2: 100 $\mu\text{g/L}$. Significant differences ($p \leq 0.05$) among treatments are indicated by different letters.

5.5 讨论

在正常情况下, 肠道菌群通过促进食物消化, 产生维生素和维持免疫系统稳态以及提高宿主的解毒能力而对宿主产生有益作用, 而肠道菌群紊乱和肠上皮屏障受损可能与脂肪肝现象的产生有关^[120, 121]。在本章研究中, 铜处理后暗纹东方鲀肠道菌群 Alpha 多样性发生了显著变化(如 Chao 1, ACE, Shannon 和 Simpson 指数所示), 这表明肠道微生物群落平衡的破坏可能是脂肪肝形成的重要诱因之一。与此同时, 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 诱导的 Alpha 多样性值高于 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} , 这表明环境中低浓度的 Cu^{2+} 可能刺激肠道中各种微生物的生长(Cu^{2+} 可作为微生物生长的营养物质), 但当处于高浓度时, Cu^{2+} 可能对肠道菌群产生毒害作用。而在本研究中, 铜处理组和对照组中暗纹东方鲀肠

道菌群均以变形杆菌和拟杆菌为主，而 Meng 等^[122]发现在铜处理组和对照组中鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 肠道菌群多为变形杆菌和梭杆菌，结果的不同可能是由于物种不同造成的差异。

肠道菌群对肥胖相关疾病的调节作用于 SCFA 合成，胃肠激素产生和全身性低度炎症有关。Kimura 等^[123]人研究显示，肝脏通过循环从肠道中接受短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFA)，厚壁菌门是产生 SCFA 的主要菌门，在脂肪肝形成过程中起重要作用。我们用 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理的暗纹东方鲀中发现了最高的厚壁菌门丰度和最高的厚壁菌门/拟杆菌比值 (0.80)，这表明 20 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 不仅可以通过诱导脂肪合成相关基因 (抑制脂解性基因) 的表达来诱导脂肪肝的形成，也可以通过在暗纹东方鲀肠道中产生 SCFA 来实现。但是，在 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组暗纹东方鲀肠道中观察到了低丰度的可产生 SCFA 的菌群，这表明高浓度的 Cu^{2+} 对产生 SCFA 的菌群有毒害作用 (或导致厚壁菌门对脂肪肝的形成没有影响)，因此脂肪合成相关基因表达上调是 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组暗纹东方鲀肝脏内脂肪沉积的主要原因。另外，在 100 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 处理组中，肠道菌群在属的水平上优势菌群为弧菌属。而之前的研究显示，致病性弧菌属 (霍乱弧菌和副溶血性弧菌) 会对鱼类的生长产生负面影响^[124]。本研究中，100 $\mu\text{g/L}$ 的 Cu^{2+} 处理组中观察到霍乱弧菌丰度大于 40%，这可能是高浓度 Cu^{2+} 处理导致暗纹东方鲀生长受到抑制甚至死亡的原因之一。

第6章 小结

6.1 结论

水体铜暴露对暗纹东方鲀生长造成负面影响，肝脏内铜积累量明显上升，肝脏组织遭到破坏，细胞内脂质含量增加，LPL 活性升高；脂代谢相关基因（*G6PD*，*6PGD*，*LPL*，*FAS*、*ACC*、*HSL*、*CPT1*、*PPAR α* 和 *PPAR γ* ）在体外和体内实验中均有不同程度变化；此外水体铜暴露也改变了暗纹东方鲀肠道微生物菌群组成。本研究揭示了水体铜通过诱导肝脏脂肪合成和分解基因的表达并诱导肠道产短链脂肪酸（SCFA）菌群丰度升高来促进暗纹东方鲀肝脏脂质沉积。研究结果为评估重金属暴露对水产养殖动物的毒害作用提供有效的参考资料。主要结论如下：

6.1.1 水体铜暴露下暗纹东方鲀生长性能、组织铜积累及肝脏显微结构的分析

高浓度铜暴露（100 $\mu\text{g/L}$ ）显著抑制了暗纹东方鲀的生长性能（包括体重增长和存活率），随着处理时间的延长，肝脏内铜离子积累量远大于肠和肌肉组织；H&E 染色和油红 O 染色分析显示，在不同浓度铜暴露处理下，肝脏组织受到损伤并有脂肪沉积现象。低浓度（20 $\mu\text{g/L}$ ）的 Cu^{2+} 暴露比高浓度（100 $\mu\text{g/L}$ ）的 Cu^{2+} 暴露能够诱导更多的肝脏脂肪含量。可知，水体铜暴露对暗纹东方鲀肝脏生长性能和肝脏脂肪沉积均有影响。

6.1.2 水体铜暴露下暗纹东方鲀肝脏脂代谢相关酶活和基因表达的分析

水体铜暴露处理后，暗纹东方鲀肝脏内脂肪含量、TG 含量和 LPL 酶活性均升高，与脂肪形成有关的基因（*G6PD*，*6PGD*，*LPL*，*FAS* 和 *ACC*）表达上调，而与脂肪分解有关的基因（*HSL* 和 *CPT1*）表达出现下调，转录因子 *PPAR α* 和 *PPAR γ* 参与了铜暴露下暗纹东方鲀肝脏脂质代谢。结果显示，水体铜通过促进脂肪合成基因的表达，并抑制脂肪分解基因进而诱导肝脏脂肪沉积。

6.1.3 水体铜暴露下暗纹东方鲀肝细胞脂代谢相关基因的表达分析

在细胞水平检测铜暴露对肝细胞脂代谢的影响，结果显示，随着铜处理浓度的升高，与脂肪合成相关的基因（*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*FAS* 和 *ACC*）表达在 30 μM 处理组显著上调，*LPL* 和 *FAS* 基因表现出铜浓度刺激的高敏感

性；与脂肪分解有关的基因（*HSL* 和 *CPT1*）表达水平显著下调；铜处理下，转录因子 *PPARα* 表达水平虽有下调，但不同铜浓度对其表达并未产生显著影响，转录因子 *PPARγ* 表达水平在 30 μM 组显著上调。研究结果与体内实验相互印证，揭示水体铜暴露对暗纹东方鲀肝脏脂代谢的影响机制。

6.1.4 水体铜暴露下暗纹东方鲀肠道微生物菌群组成变化分析

16S rRNA 高通量测序，分析铜暴露下暗纹东方鲀肠道菌群变化情况。结果显示，铜处理后暗纹东方鲀肠道菌群 α 多样性发生了显著变化，铜暴露处理组与对照组中优势肠道菌群均为变形菌门（*Proteobacteria*）和拟杆菌门（*Bacteroidetes*），螺旋菌门（*Spirochaetae*）所占比例明显下降，暴露于 20μg/L Cu 的鱼中观察到的最高的厚壁菌门与拟杆菌门的比率。因此，水体铜暴露改变了暗纹东方鲀肠道微生物菌群组成，肠道中产短链脂肪酸（SCFA）菌群丰度的升高可能促进肝脏脂肪的积累。

6.2 创新点

（1）本研究首次建立暗纹东方鲀原代肝细胞培养体系，在细胞层面检测了水体铜暴露对肝细胞脂代谢的影响，结合体内实验，初步揭示水体铜通过促进肝脏脂肪合成基因的表达，并抑制脂肪分解基因进而诱导暗纹东方鲀肝脏脂肪沉积。

（2）本研究率先研究了不同铜浓度对暗纹东方鲀肠道微生物组成的影响，证实水体铜暴露改变了暗纹东方鲀肠道微生物组成。肠道中产短链脂肪酸（SCFA）菌群丰度的升高可能促进肝脏脂肪的积累。

6.3 展望

本文通过对水体铜暴露下暗纹东方鲀生长性能和肝脏脂代谢相关基因表达情况以及肠道微生物菌群变化进行分析，探讨水体铜是如何诱导暗纹东方鲀脂肪肝形成。暗纹东方鲀在集约化养殖过程中不可避免会受到水体中重金属污染的影响。实验室前期证实水体铜暴露同样会诱导暗纹东方鲀肝脏产生内质网应激以及细胞凋亡，后续应针对水体铜暴露下肝脏脂代谢与内质网应激的关系进行研究，并在细胞层面进行验证。

参考文献

- [1] 纪元. 中国养殖东方鲀养殖情况调查,经济相关生物学特征比较及毒素含量监测[D]. 中国海洋大学, 2011.
- [2] 华元渝, 顾志峰, 周昕,等. 暗纹东方鲀控毒养殖技术的研究[J]. 淡水渔业, 2002, 32(5):20-23.
- [3] 王广和, 华元渝, 朱永祥,等. 暗纹东方鲀去毒技术研究[J]. 医学动物防制, 2004(11):662-664.
- [4] 李世平, 赵清良, 赵强. 野生和人工养殖暗纹东方鲀不同组织中河豚毒素(TTX)含量的初步研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 1998, 21(3):94-98.
- [5] 纪元, 刘岩, 宫庆礼,等. 国内养殖东方鲀毒性的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(6):1224-1226.
- [6] 张光贵, 唐志勇, 陆雪松. 暗纹东方鲀产业发展现状与思考[J]. 科学养鱼, 2006(11):9-10.
- [7] 钱嫦萍, 陈振楼, 刘杰. 长江三角洲河流污染现状及变化趋势[J]. 环境科学研究, 2002, 15(6):24-27..
- [8] 高月香, 高汾, 张毅敏,等. 长江三角洲水污染现状与相应对策[C]. 2015年中国环境科学学会学术年会. 2015.
- [9] 张海凌. 长江三角洲水资源污染现状与相应对策分析[J]. 科技创新导报, 2013(18):125-127.
- [10] 陈家长,孙正中,瞿建宏, 等.长江下游重点江段水质污染及对鱼类的毒性影响[J].水生生物学报,2002, 26(6):635-640.
- [11] 于爱清, 施永海, 徐嘉波,等. 暗纹东方鲀养殖和野生群体遗传变异的微卫星分析[J]. 水产科技情报, 2016(6):281-286.
- [12] 吴建新. 长江野生暗纹东方鲀资源现状与保护对策[J]. 水利渔业, 2002(6):47-49.
- [13] 胡亚丽, 王剑. 暗纹东方鲀幼鱼发育及工厂化育苗的研究[J]. 水利渔业, 2004(5):34-36.
- [14] 黄玉林,王文利,刘源, 等.我国养殖河鲀(业)发展现状及研究进展[J].中国食品学报, 2018, 18(1):217-224.
- [15] 冀诸. 暗纹东方鲀人工繁殖获成功[J]. 水产科技情报, 1991(5):151.
- [16] Wang T, Wen X, Hu Y, et al. Copper nanoparticles induced oxidation stress, cell apoptosis and immune response in the liver of juvenile *Takifugu fasciatus*

- [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 84:648-655.
- [17] Sun Z L, Zhu Y X, Chen Y Y. Acute toxicity of 3 disinfectants to postlarval puffer fish, *Takifugu fasciatus* [J]. Fisheries Science, 2015, 34(5): 277-281.
- [18] Rui J, Cao L P, Du J L, et al. Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 152:11-19.
- [19] Cheng C H, Liang H Y, Luo S W, et al. The protective effects of vitamin C on apoptosis, DNA damage and proteome of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under low temperature stress [J]. Journal of Thermal Biology, 2018, 71:128-135.
- [20] Cheng C H, Guo Z X, Wang A L. The protective effects of taurine on oxidative stress, cytoplasmic free- Ca^{2+} and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under low temperature stress [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 77:457-464.
- [21] 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, 2017, 150: 190-198.
- [22] 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.
- [23] Wen X, Zhang X, Hu Y, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Takifugu fasciatus* liver in response to low-temperature stress [J]. Journal of Proteomics, 2019, 201:27-36.
- [24] Kim J H, Rhee J S, Lee J S, et al. Effect of cadmium exposure on expression of antioxidant gene transcripts in the river pufferfish, *Takifugu obscurus* (*Tetraodontiformes*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology, 2010, 152(4):473-479.
- [25] Wang J, Zhu X, Huang X, et al. Combined effects of cadmium and salinity on juvenile *Takifugu obscurus*: cadmium moderates salinity tolerance; salinity decreases the toxicity of cadmium [J]. Scientific Reports, 2016, 6:30968.
- [26] 王涛, 王玮, 陈同庆, 等. 急性铜胁迫对暗纹东方鲀组织铜积累, 氧化应激, 消化酶, 组织病变及脂代谢相关基因表达的影响 [J]. 中国水产科学, 2019, 26(6): 1144-1152.

- [27] Sahu A , Lambris J D . Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity[J]. Immunological Reviews, 2001, 180(1):35-48.
- [28] Islam Z, Kato A, Romero M F, et al. Identification and apical membrane localization of an electrogenic $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger NCX2a likely to be involved in renal Ca^{2+} excretion by seawater fish [J]. American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2011, 301(5): 1427-1439.
- [29] 王永宏, 杨小玉, 郭正龙, 等. β -葡聚糖对暗纹东方鲀幼鱼非特异性免疫及生长性能的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6):1247-1256.
- [30] Wang D, Cao Q, Zhu W, et al. Individual and combined effects of salinity and lipopolysaccharides on the immune response of juvenile *Takifugu fasciatus* [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(3):965-976.
- [31] Chavez-Mardones J, Gallardo-Escarate C. Immune response of apoptosis related cysteine peptidases from the red abalone *Haliotis rufescens* (HrCas8 and HrCas3): molecular characterization and transcription expression[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 39(1):90-98.
- [32] Hildeman D A, Mitchell T, Aronow B, et al. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species[J]. American Journal of Physiology-regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2003, 100(25):15035-15040.
- [33] Fu S, Ding M, Liang Q, et al. The key differentially expressed genes and proteins related to immune response in the spleen of pufferfish (*Takifugu obscurus*) infected by *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 91:1-11.
- [34] Schildberg F A, Klein S R, Freeman G J, et al. Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family [J]. Immunity, 2016, 44(5):955-972.
- [35] 邵爱华, 杜建, 陈葵, 等. 暗纹东方鲀 CD8 α 基因克隆, 原核表达与多克隆抗体制备[J]. 苏州科技学院学报(自然科学版), 2012, 29(1):47-56.
- [36] Di An F, Chang S Z, Shu L J, et al. Toxic function of CD28 involving in the TLR/MyD88 signal pathway in the river pufferfish (*Takifugu obscurus*) after exposed to tributyltin chloride (TBT-Cl) [J]. Gene, 2018, 688:84-92
- [37] Dong P X, Di A F, Chang S Z, et al. Effect of tributyltin chloride (TBT-Cl) exposure on expression of HSP90 β 1 in the river pufferfish (*Takifugu obscurus*): Evidences for its immunologic function involving in exploring

- process [J]. Gene, 2018, 666:9-17.
- [38]Wang L, Wu Z Q, Wang X L, et al. Immune responses of two superoxide dismutases (SODs) after lipopolysaccharide or aeromonas hydrophila challenge in pufferfish, *Takifugu obscurus* [J]. Aquaculture, 2016, 459:1-7
- [39]Li M, Yu N, Qin J G, et al. Effects of ammonia stress, dietary linseed oil and *Edwardsiella ictaluri* challenge on juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 38(1):158-165.
- [40]Benli A C, Koksai G, Ozkul A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology [J]. Chemosphere, 2008, 72(9):1355-1358.
- [41]Sun Z L, Zhu Y X, Liu D Y. Acute toxicity of non-ionized ammonia and nitrite to postlarva puffer *Takifugu fasciatus* [J]. Fisheries Science, 2015, 34(3): 135-139.
- [42]Cheng C H, Yang F F, Ling R Z, et al. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*) [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 164:61-71.
- [43]Hardwick J M , Soane L . Multiple functions of BCL-2 family proteins[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013, 5(2):152-158.
- [44]Cleary M L, Smith S D, Sklar J . Cloning and structural analysis of cDNAs for Bcl-2 and a hybrid Bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation.[J]. Cell, 1986, 47(1):19-28.
- [45]王兴强, 段青源, 麦康森,等. 养殖鱼类脂肪肝研究概况[J]. 海洋科学, 2002, 26(7):36-39.
- [46]杨鸿昆, 黄凯, 等. 养殖鱼类脂肪肝及防治研究进展[J]. 水生态学杂志, 2007, 27(1): 4-6.
- [47]孔雨昕, 田佳鑫, 王桂芹. 鱼类脂肪肝的特征及发病原因研究概况[J]. 科学养鱼, 2020(2):42-44.
- [48]谢文平, 余德光, 郑光明, 等.珠江三角洲养殖鱼塘水体中重金属污染特征和评估[J].生态环境学报, 2014,23(4):636-641.
- [49]和庆, 彭自然, 张晨, 等.长三角地区池塘养殖水产品重金属含量及其健康风险评价[J].农业环境科学学报,2017,36(6):1070-1077.
- [50]Chen Q L, Gong Y, Luo Z , et al. Differential effect of waterborne cadmium exposure on lipid metabolism in liver and muscle of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 142-143:380-386.

- [51]Atli G, Canli M. Natural occurrence of metallothionein-like proteins in the liver of fish *Oreochromis niloticus* and effects of cadmium, lead, copper, zinc, and iron exposures on their profiles[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2003, 70(3):619-627.
- [52]Bouraoui Z, Banni M, Ghedira J, et al. Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2008, 34(3):201-207.
- [53]Pierron F, Baudrimont M, Bossy A, et al. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*).[J]. Aquatic Toxicology, 2007, 81(3):304-311..
- [54]Adiele R C, Don S, Collins K. Differential inhibition of electron transport chain enzyme complexes by cadmium and calcium in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic mitochondria[J]. Toxicological Sciences An Official Journal of the Society of Toxicology, 2012(1):110-119.
- [55]Chen Q L, Luo Z, Liu X, et al. Effects of waterborne chronic copper exposure on hepatic lipid metabolism and metal-element composition in *Synechogobius hasta*[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, 64(2):301-315.
- [56] Liu X J , Luo Z , Xiong B X , et al. Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73(6):1286-1291.
- [57]A, M Salhi, C.M Hernández-Cruz b, C M B , et al. Effect of different dietary polar lipid levels and different n3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae ScienceDirect[J]. Aquaculture, 1999, 179(1-4):253-263
- [58]Chen Y J, Liu Y J, Yang H J, et al. Effect of dietary oxidized fish oil on growth performance, body composition, antioxidant defence mechanism and liver histology of *juvenile largemouth bass micropterus salmoides*[J]. Aquaculture Nutrition, 2012, 18(3):321-331.
- [59]Sivaramakrishna B, Suresh A, Venkataramana P, et al. Copper influenced changes of lipid metabolism in the tissues of freshwater teleost *Labeo rohita* (Hamilton).[J]. Biochemistry International, 1992, 26(2):335-342
- [60]Du Z Y, Clouet P, Huang L M, et al. Utilization of different dietary lipid sources at high level in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*):

- mechanism related to hepatic fatty acid oxidation[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2010, 14(1):77-92.
- [61] Zheng J L, Luo Z, Liu C X, et al. Differential effects of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 132-133:173-181.
- [62] Carvalho C, Fernandes M N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2008, 151(3):437-442.
- [63] Zhou H, Zhang K, Janciauskiene S, et al. Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential[J]. *Biotechnology Research International*, 2012, 2012:257528.
- [64] Chen J, Thomsen M, Vitetta L. Interaction of gut microbiota with dysregulation of bile acids in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease and potential therapeutic implications of probiotics[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(3):2713-2720.
- [65] Luo S, Huang Y, Xie F, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of PPAR gamma in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after the *Vibrio alginolyticus* challenge [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 43(2): 310-324.
- [66] Magaña M M, Lin S S, Dooley K A, et al. Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins.[J]. *Journal of Lipid Research*, 1997, 38(8):1630-1638.
- [67] 李改娟, 赵全东, 高娜,等. 鱼类健康与肠道微生物关系研究进展[J]. *河北渔业*, 2020(8):56-58.
- [68] Wong S, Rawls J F. Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(13):3100-3102.
- [69] Song G K, Han X Y, Dai W, et al. Influence of Cu²⁺-loaded silicate on the growth performance and microflora of crucian carp *Carassius auratus*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 85(3):239-243.
- [70] Merrifield D L, Shaw B J, Harper G M, et al. Ingestion of metal-nanoparticle contaminated food disrupts endogenous microbiota in zebrafish (*Danio*

- rerio)[J]. Environmental Pollution, 2013, 174(3):157-163.
- [71] Meng X, Tian X, Nie G, et al. The transcriptomic response to copper exposure in the digestive gland of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 46(2):161-167.
- [72] Huang C, Chen Q L, Luo Z, et al. Time-dependent effects of waterborne copper exposure influencing hepatic lipid deposition and metabolism in javelin go by *Synechogobius hasta* and their mechanism[J]. Aquatic Toxicology. 2014, 155(4):291-300.
- [73] Meng X L, Li S, Qin C B, et al. Intestinal microbiota and lipid metabolism responses in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) following copper exposure - ScienceDirect[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 160:257-264.
- [74] Pond M J, Stone D M, Alderman D J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquaculture, 2006, 261(1):194-203.
- [75] 祭仲石. 三种不同环境中鲢鳙肠道微生物研究 [D]. 上海海洋大学, 2014.
- [76] Nayak S K. Role of gastrointestinal microbiota in fish[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(11):1553-1573.
- [77] David W, Robin J, Ian R. Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries[J]. Aquaculture, 2003, 219(1-4):21-42.
- [78] Skrodenyt-Arbaiauskien V, Sruoga A, Butkauskas D, et al. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta trutta* and diet[J]. Fisheries Science, 2010, 74(6):1307-1314.
- [79] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3):695-700.
- [80] Eckburg P B, Bik E M, Bernstein C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. Science, 2005, 308(5728):1635-1638.
- [81] Gong J, Forster R J, Hai Y, et al. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 208(1):1-7.
- [82] Yan X, Xu Z, Feng X, et al. Cloning of environmental genomic fragments as

- physical markers for monitoring microbial populations in coking wastewater treatment system[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(1):163-172.
- [83]杨彬彬, 邵庆均. 鱼类肠道微生物的研究进展[J]. *中国饲料*, 2013(23):1-4.
- [84]陈泓宇, 闫海亚, 赵胤丞, 等. 宏基因组学及其在鱼类肠道微生物中的研究进展[J]. *水产科学*, 2018, 37(5): 699-706.
- [85]李彤彤, 李爱华. 应用高通量测序技术比较三种不同鱼肠道微生物的群落结构[C]. 湖北省暨武汉微生物学会会员代表大会暨学术年会. 2013.
- [86]刘增新. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)仔稚幼鱼肠道菌群结构变化及定植规律研究[D]. 上海海洋大学, 2017.
- [87]张美玲, 杜震宇. 水生动物肠道微生物研究进展[J]. *华东师范大学学报(自然科学版)*. 2016, 1:1-8.
- [88]Bian P J, Qiu C G, Xu S L, et al. Effects of salinity on growth, activity of non-specific immune and antioxidant enzymes in obscure puffer (*Takifugu obscurus*) [J]. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 2014, 38(1):108-114.
- [89]华元渝, 顾志峰, 邹宏海, 等. 暗纹东方鲀生殖洄游期体内毒素分布规律[J]. *水利渔业*, 2002(2):12-14.
- [90]郭正龙.暗纹东方鲀常见疾病及防治方法[J]. *科学养鱼*, 2009(2):57-58.
- [91]Ogino C, Yang G Y. Requirement of carp and rainbow trout for dietary manganese and copper [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1980, 46:455-458.
- [92]Chen Q L, Luo Z, Wu K, et al. Differential effects of dietary copper deficiency and excess on lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 184:19-28.
- [93]Shaw B J, Handy R D. Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions.[J]. *Environment International*, 2011, 37(6):1083-1097.
- [94]Iii D, Wilson R P. Dietary copper requirement of fingerling channel catfish[J]. *Aquaculture*, 1986, 54(4):277-285.
- [95]Shao X P, Liu W B, Lu K L, et al. Effects of tribasic copper chloride on growth, copper status, antioxidant activities, immune responses and intestinal microflora of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed practical diets[J]. *Aquaculture*, 2012, 338-341:154-159.

- [96] Yuan Y, Jin M, Xiong J, et al. Effects of dietary dosage forms of copper supplementation on growth, antioxidant capacity, innate immunity enzyme activities and gene expressions for juvenile *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 84:1059-1067.
- [97] Meng X, Tian X, Liu M, et al. The transcriptomic response to copper exposure by the gill tissue of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) using deep-sequencing technology[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 38(2): 287-293.
- [98] Carreau N D, Pyle G G. Effect of copper exposure during embryonic development on chemosensory function of juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*)[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, 61(1):1-6.
- [99] Chen Q L, Luo Z, Zheng J L, et al. Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: copper accumulation, enzymatic activities, histology[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 76:126-134.
- [100] 种香玉, 周立志, 韩冬, 等. 饲料中铜浓度对异育银鲫和斑点叉尾鲴的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(4):751-763.
- [101] Berntssen M, Lundebye A K, Maage A. Effects of elevated dietary copper concentrations on growth, feed utilisation and nutritional status of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry.[J]. Aquaculture, 1999, 174(1-2):167-181.
- [102] 来杭, 黎明, 陶震, 等. 饲料中铜、钙水平对大黄鱼幼鱼生长、抗氧化酶及脂代谢酶活性的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(2):217-224.
- [103] Gomes T, Pinheiro J P, Cancio I, et al. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. [J]. Environmental Science and Technology, 2011, 45(21):9356-9362.
- [104] Song Y F, Huang C, Shi X, et al. Endoplasmic reticulum stress and dysregulation of calcium homeostasis mediate Cu^{2+} -induced alteration in hepatic lipid metabolism of *javelin goby* *Synechogobius hasta*[J]. Aquatic Toxicology, 2016, 175:20-29.
- [105] Listenberger L L, Han X, Lewis S E, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(6):3077-3082.
- [106] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of

- microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2):248-254.
- [107] Luo Z, Tan X Y, Zheng J L, et al. Quantitative dietary zinc requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, and effects on hepatic intermediary metabolism and antioxidant response[J]. Aquaculture, 2011, 319(1-2): 150-155.
- [108] Mela M, Guiloski I C, Doria H B, et al. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*)[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 88(1):108-116.
- [109] Storelli M M, Barone G, Storelli A, et al. Total and subcellular distribution of trace elements (Cd, Cu and Zn) in the liver and kidney of green turtles (*Chelonia mydas*) from the Mediterranean Sea[J]. Chemosphere, 2008, 70(5): 908-913.
- [110] Kuwashiro S, Terai S, Oishi T, et al. Telmisartan improves nonalcoholic steatohepatitis in medaka (*Oryzias latipes*) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation[J]. Cell and Tissue Research, 2011, 344(1):125-134.
- [111] 卢荣华, 梁旭方, 孙君君, 等. 草鱼肝细胞脂变模型的建立及脂代谢基因表达分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(1):24-32.
- [112] 李雪贤, 孙健, 吉红, 等. 脂肪酸影响草鱼肝细胞脂质蓄积状态及诱导其凋亡的离体研究[J]. 水生生物学报, 2017 (1):56-64.
- [113] 贾睿, 曹丽萍, 丁炜东, 等. 鱼类肝细胞分离、原代培养与应用研究综述[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(1):147-157.
- [114] 梁岳, 马广智, 方展强. 剑尾鱼肝细胞原代培养[J]. 中国比较医学杂志, 2006 (3):185-187.
- [115] 骆源, 张春晓, 王玲, 等. 斜带石斑鱼肝细胞分离及原代培养方法的建立 [J]. 水产学报, 2016, 40(4):558-565.
- [116] 朱庆玲. 离体条件下铜对草鱼和黄颡鱼肝细胞脂代谢影响的研究[D]. 华中农业大学, 2014.
- [117] Chen Q L, Luo Z, Pan Y X, et al. Differential induction of enzymes and genes involved in lipid metabolism in liver and visceral adipose tissue of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to copper[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 136-137:72-78.
- [118] Jérôme B, Sébastien M, et al. Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome[J]. BMC Pharmacology and Toxicology,

- 2013, 14(1):62.
- [119] Turnbaugh P J, Ley R E, Mahowald M A, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest.[J]. Nature, 2006, 444(7122):1027-1031.
- [120] Aron-Wisnewsky J, Gaborit B, Dutour A, et al. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: new insights.[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2013, 19(4):338-348.
- [121] Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism.[J]. Nature, 2012, 71(7415):242-249.
- [122] Meng X, Tian X, Nie G, et al. The transcriptomic response to copper exposure in the digestive gland of japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 46(2):161-167.
- [123] Kimura I, Ozawa K, Inoue D, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43[J]. Nature Communications, 2013, 4:1829-1840.
- [124] Austin B, Zhang X. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 43(2): 119-124.

在读期间发表的学位论文及研究成果

- 1、**Xiaozhen Wei**, Tao Wang*, Xinyu Zhang, Dongyong Fu, Yihui Bi, Yiru Sun, Yonghai Shi, Yongxiang Zhu, Shaowu Yin**. Responses to environmental stress and its mitigation in *Takifugu fasciatus*[J]. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture** (2021, DOI:10.1080/23308249.2020.1837068) .[第一作者, SCI, IF=3.755]
- 2、Tao Wang*, **Xiaozhen Wei**, Tongqing Chen, Wei Wang, Xiaoyu Xia, Jinhan Miao, Shaowu Yin**. Studies of the mechanism of fatty liver formation in *Takifugu fasciatus* following copper exposure[J]. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2019, 181:353-361.[第二作者, SCI 收录, IF=4.872]
- 3、Tao Wang*, **Xiaozhen Wei**, Yiyu Sun, Yadong Hu, Jie Li, Xinyu Zhang, Shaowu Yin**,Yonghai Shi, Yongxiang Zhu. Copper nanoparticles induce the formation of fatty liver in *Takifugu fasciatus* triggered by the PERK-EIF2 α -SREBP-1c pathway[J]. **NanoImpact**, 2021, 21:100280. [第二作者, SCI 收录, IF=5.478]
- 4、Xin Wen, Yadong Hu, Xinyu Zhang ,**Xiaozhen Wei**, Dongyong Fu, Tao Wang*, Shaowu Yin**. Combined effects of low temperature and salinity on the immune response, antioxidant capacity and lipid metabolism in the pufferfish (*Takifugu fasciatus*)[J]. **Aquaculture**, 2020, 531(4):735866. [第四作者, SCI 收录, IF=3.225]
- 5、Xin Wen, Yadong Hu, Xinyu Zhang, **Xiaozhen Wei**, Tao Wang*, Shaowu Yin**. Integrated application of multi-omics provides insights into cold stress responses in pufferfish *Takifugu fasciatus*[J] **BMC Genomics**. 2019, 20(1): 563. [第四作者, SCI 收录, IF=3.594]

授权和申请国家发明专利:

- 1、尹绍武, **魏小珍**, 王涛, 胡亚东, 孙亦如. 一种暗纹东方鲀原代肝细胞高效分离及培养方法,ZL201911044137.6. 2021.[第二发明人]
- 2、王涛, 胡亚东, 尹绍武, **魏小珍**, 褚鹏. 一种暗纹东方鲀原代鳃细胞培养方法, CN109971700A. 2019.[第四发明人]
- 3、王涛, 徐杰杰, 李杰, 尹绍武, **魏小珍**, 褚鹏. 一种室内高效诱导暗纹东方鲀食性转化的方法, CN110622889A.2019.[第五发明人]

获奖情况:

2018-2019 学年获“科技活动先进个人”

2019-2020 学年获“优秀研究生”

致谢

时光飞逝，白驹过隙，岁月如梭，这些形容时间流逝的词只有在别离时刻才令人感到它的贴切，回忆往昔，研究生三年好像太过短暂，短暂到来不及在脑海里储存记忆，手放在键盘上，想不起三年是如何度过，又或是三年太过漫长，记忆超载，只留下零碎片段。初下基地取材时的兴奋，取材过程的漫长，骑三轮车去吃火锅遇到的浦口夜晚；看师兄快速取材时的惊讶与佩服，从开始做时笨手笨脚，到磨练之后的熟能生巧；养鱼时的看似简单但却不简单，全缸覆灭的景象现在想起来仍心有戚戚，不禁感叹水产养殖非常人可为；实验遇到瓶颈时的焦灼，上穷碧落下黄泉寻找解决办法，放弃与坚持之间反复横跳，破罐子摔了又捡，终于有结果的舒心。研三开始找工作，写论文，答辩……我们像是流水线上的物品，走的磕磕绊绊但又急促，如今物品即将完工，我们也将毕业，三年生活汇聚变成文字流淌。

尹绍武教授是我科研路上的领路人，儒雅温和，知识渊博，实验室在他的带领下，从籍籍无名到占有一席之地，科研成果不断积累，研究生三年，由衷的感谢导师也相信实验室的发展一定明日可期。感谢王涛老师，从毕业论文的设计，方案的实施，到最终成稿都离不开他的耐心指导，实验遇到瓶颈，总及时指导一起想办法，实验失败并不苛责反而安慰，第一次写综述不厌其烦的帮改了一遍又一遍，送给老师科研人最真挚的祝福，paper 多多，左手 nature，右手 science。感谢张凯老师和暨杰老师，三年太短，相遇太晚，未能充分领略老师的科研魅力，祝多中基金，左手优青，右手国自然。

感谢实验室文鑫师兄，胡亚东师兄，王丹师姐，张鑫宇师兄，裴雪莹师姐……，从受你们照顾到手把手教师弟师妹，实验室的精神和技术就这样一批人一批人的传承。感谢同级的战友们，徐杰杰，褚鹏，郑翔等，实验与生活相互陪伴，相互鼓励，三年时光与君共度何其有幸。感谢师弟师妹，储明旭，付东勇，程景颢，毕宜慧，孙亦如……为实验室带来欢声笑语的是你们，实验室未来的希望也在你们，祝愿实验进行顺利，未来前程似锦。感谢寝室成员吴梦、吴采雯、李晓芳和范铭丽三年来相互陪伴；感谢父母三年来不遗余力的情感支持，无数次视频通话，听我倾诉烦恼，生活琐事，为我分忧，让我顺利度过研究生三年。

此去迢迢万里路，白云青山水长流。

书于仙林

2021 年 5 月 16 日