

长期低氧胁迫下红鳍东方鲀鳔的转录组分析

陆芸^{1,2*}, 李岩^{1,2*}, 尚凤芹^{2,3}, 韩冰¹, 魏仁杰^{1,2}, 王秀丽², 刘洋^{1#}

¹大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连

²辽宁省河鲀良种繁育及健康养殖重点实验室, 辽宁 大连

³大连海洋大学海洋科技与环境学院, 辽宁 大连

收稿日期: 2023年2月3日; 录用日期: 2023年2月25日; 发布日期: 2023年3月2日

摘要

水中的溶解氧(Dissolved Oxygen, DO)水平影响着鱼类的生存、繁殖、生长和发育。缺氧会对水产养殖业的发展, 生物多样性以及生态系统的功能产生影响。因此, 本研究以红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)为研究对象, 对常氧(7.5 ± 0.5 mg/L)与低氧(2.5 ± 0.5 mg/L, 10天)环境下的红鳍东方鲀的鳔组织进行了转录组测序分析, 以探究其应对低氧胁迫时的分子调控机制。随之, 筛选出差异表达基因并对其进行生物信息学分析。同时, 进一步采用qRT-PCR进行了验证。结果显示, 在红鳍东方鲀的鳔组织中共鉴定到了536个差异基因, 包括493个上调基因和43个下调基因。KEGG富集结果表明, 钙信号传导途径, 环磷酸腺苷(cAMP)通路, 胰岛素分泌三个信号通路通过调整机体内离子转运, 在机体适应低氧环境、维持细胞存活中发挥了重要作用。此外, GSEA富集分析表明, 红鳍东方鲀还通过下调DNA复制, 细胞周期等耗能的生物过程来抑制细胞正常分裂和生长, 从而减少低氧环境中的能量消耗。最后, 我们随机挑选了转录组数据中的6个基因进行qRT-PCR验证, 结果与转录组数据分析相一致, 证实了转录组测序结果的可靠性。本研究结果不仅丰富了红鳍东方鲀响应低氧胁迫的分子调控机制, 同时为探究鱼类的低氧适应机制提供了理论依据。

关键词

红鳍东方鲀, 长期低氧, 转录组, 鳔

Transcriptome Analysis of the *Takifugu rubripes* Swimbladder under Chronic Hypoxic Stress

Yun Lu^{1,2*}, Yan Li^{1,2*}, Fengqin Shang^{2,3}, Bing Han¹, Renjie Wei^{1,2}, Xiuli Wang², Yang Liu^{1#}

¹College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning

*共同第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 陆芸, 李岩, 尚凤芹, 韩冰, 魏仁杰, 王秀丽, 刘洋. 长期低氧胁迫下红鳍东方鲀鳔的转录组分析[J]. 海洋科学前沿, 2023, 10(1): 5-21. DOI: 10.12677/ams.2023.101002

²The Key Laboratory of Pufferfish Breeding and Culture in Liaoning Province, Dalian Liaoning

³College of Marine Technology and Environment, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning

Received: Feb. 3rd, 2023; accepted: Feb. 25th, 2023; published: Mar. 2nd, 2023

Abstract

Dissolved oxygen (DO) in water affects the fish's survival, reproduction, growth, and development. Hypoxia can significantly impact the development of aquaculture, biodiversity, and ecosystem function. Therefore, in this study, the transcriptome of *Takifugu rubripes* was sequenced to investigate the molecular regulatory mechanisms involved in the response to chronic hypoxic stress in the swimbladder under normoxic (7.5 ± 0.5 mg/L) and hypoxic (2.5 ± 0.5 mg/L, 10 days) conditions. Concomitantly, differentially expressed genes (DEGs) were identified and bioinformatics analysis of the DEGs was performed. At the same time, qRT-PCR validation was also carried out. The results showed that a total of 536 DEGs were identified in the *T. rubripes* swimbladder, including 493 up-regulated genes and 43 down-regulated genes. According to the KEGG enrichment analysis, the calcium signaling pathway, cAMP signaling pathway, and insulin secretion played an important role in adapting to the hypoxic environment and maintaining cell survival by regulating ion transport in the organism. In addition, GSEA enrichment analysis showed that *T. rubripes* could inhibit cell division and growth via down-regulating energy-consuming biological processes to reduce energy consumption in hypoxic environments, including DNA replication and cell cycle. Finally, 6 genes were randomly selected for qRT-PCR validation and the results proved to be consistent with the transcriptome data analysis, which confirmed the reliability of the transcriptome data. The results of this study not only enriched the molecular regulatory mechanism of *T. rubripes* in response to hypoxic stress, but also provided a theoretical basis for exploring the hypoxia adaptation mechanism of fish.

Keywords

Takifugu rubripes, Chronic Hypoxia, Transcriptome, Swimbladder

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

氧分子是大多数需氧生物新陈代谢, 正常生长和繁殖所必需的重要环境因素[1]。氧含量减少会抑制细胞内的能量产生, 使得活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)在细胞内大量累积, 从而对细胞和机体造成一定损伤[2]。水环境缺氧是指生物体内溶解氧浓度低的现象[3]。对鱼类而言, 缺氧的阈值在 $2\sim 10$ mg O₂ L⁻¹ 之间变化, 这主要取决于不同的物种[4]。近年来, 随着养殖范围的扩大和放养密度的增加, 水产养殖环境过程中缺氧现象频发, 对鱼类的生存、繁殖、生长和发育产生重要的影响[5]。此外, 有机物的积累, 水产养殖系统中藻类的大量繁殖, 使得缺氧状况愈加严重[6] [7]。不仅造成水产养殖业的经济损失, 还对生物多样性以及生态系统的功能产生一定破坏。因此, 研究水生动物耐受低氧的分子机制已经成为一个广泛关注的基础科学问题。研究表明, 为了维持氧稳态, 多数鱼类在漫长的进化过程中已经发展出了一系列适应机制来应对低氧胁迫, 且它们对缺氧的耐受性也有很大差异[8]。首先, 当鱼类处于低氧环境中

时, 它们会试图游至水面, 通过呼吸获得更多氧气, 这种现象通常被称为浮头。其次, 一些鱼类, 如尼罗罗非鱼则会通过降低游泳速度来减少能量和氧气消耗[9]。长颌姬鰕虎鱼在低氧能够通过改变代谢模式来维持正常的生理功能, 以适应低氧环境[10]。鲑鱼提高供氧量的方法是诱导血管内皮生长因子表达, 从而对血管的生成起到促进作用[11]。通过鲫鱼的转录组研究发现, 当鱼类长期处于低氧情况时, 与糖酵解通路有关的基因表达会显著增加[12]。虽然有许多低氧相关分子机制的研究, 但是不同种类的鱼在自然界中面对的低氧胁迫情况各不相同。

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)通常被称为“*tora-fugu*”, 是一种硬骨鱼类, 隶属于鲀形目(*Tetraodontiformes*)和鲀科(*Tetraodontidae*)。因其味道鲜美、肉质细嫩, 经济价值高昂, 在中国北方沿海地区、朝鲜半岛和日本等地已形成一定养殖规模。但由于养殖过程中的高密度养殖及其他意外的发生, 使其面临缺氧环境。基于已有的研究结果可知, 在急性低氧环境下, 红鳍东方鲀的脑能够通过调节昼夜节律、神经发育和促进血管生成、增加血流量等方式来减少缺氧引起的脑损伤[13]。而在长期低氧环境下, 糖酵解、脂肪分解代谢和氨基酸代谢则是红鳍东方鲀在低氧环境下的能量来源[14]。除了脑之外, 红鳍东方鲀的鳃、肌肉、肝脏和脾脏的转录组学研究也已陆续被报道[15][16][17], 分别揭示了与鱼类免疫、生长发育、能量代谢以及血管生成等相关的机理。然而, 作为提供平衡和浮力的器官, 鳔的转录组学研究一直以来被忽略。鳔是大多数硬骨鱼内的一个充满气体的器官(氧气、二氧化碳和氮气等气体), 其上覆盖着大量毛细血管, 主要由内膜和外膜组成。外膜由腹膜凹陷和胶原层组成, 内膜由平滑肌层、纤维层和膀胱上皮层组成。结构的复杂性使鱼鳔能够履行其气体分泌和重吸收以及自主神经支配的功能[18]。此外, 在硬骨鱼中, 鱼鳔在呼吸、调节浮力、接收压力、发出声音等功能中也发挥着重要的作用[19]。迄今为止, 低氧胁迫对红鳍东方鲀鳔组织的分子机制还未见报道。因此本研究的目的就是填补红鳍东方鲀的鳔的转录组学研究的空白, 从分子层面揭示红鳍东方鲀鳔组织的潜在功能。

本研究以红鳍东方鲀的鳔组织为研究对象, 通过 RNA-Seq 技术比较长长期低氧和常氧条件下的转录组学差异, 并对红鳍东方鲀有关低氧的差异基因进行分析, 筛选到关键基因后再进行后续相关性分析, 以期进一步探究红鳍东方鲀应对长期低氧胁迫时的分子机制。研究结果为理解鱼类对环境胁迫的适应提供新的见解, 不仅为选育耐低氧红鳍东方鲀和其他鱼类提供理论依据, 还对提高水产养殖业的产业效率、提高经济收入具有十分重要的意义。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

本次实验所用的红鳍东方鲀来自中国辽宁省大连富古有限公司, 转运至大连海洋大学的 AET 实验室 (Aquacultural Engineering R&D Team) 进行饲养与后期实验工作。在正式实验开始前, 先将实验鱼养殖在 4 个有循环海水供应、水温维持在 $17^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的 300 L 水箱中, 同时调控水中溶解氧浓度使其保持在常氧水平 ($\text{DO}: 7.5 \pm 0.5 \text{ mg/L}$), 随后进行为期 30 天的驯养工作。驯养期间, 每天用新鲜饵料喂养实验鱼两次, 及时清除水箱中残留的饵料, 并每天换一次水。

2.2. 长期低氧胁迫实验和样品采集

为期 30 天的驯养工作结束后, 我们挑选了 30 条活动正常、进食良好、无任何咬伤的健康实验鱼进行后续低氧实验。首先, 将实验鱼随机、平均地分配到两个 300 L 的水箱中, 其中一组设置为对照组(常氧组, NorSB), 另一组设置为实验组(低氧组, HypSB)。本次实验通过向水箱内充入氮气的方式来降低海水中溶解氧的浓度, 用气石进一步调节水中溶解氧浓度, 使常氧组和低氧组的溶解氧浓度分别维持在 $7.5 \pm 0.5 \text{ mg/L}$ 和 $2.5 \pm 0.5 \text{ mg/L}$, 同时使用氧气监测器(DO-Y100, 中国武汉)实时监测水中的溶解氧浓度。

经过为期 10 天的低氧处理后, 我们分别从常氧组和低氧组中挑选 12 条健康无咬伤的实验鱼进行组织取样。在取样过程中, 我们首先用浓度为 80 mg/L 的三卡因甲烷碘酸盐(MS-222, Sigma)对实验鱼进行麻醉, 并测量体重(302 ± 52.5 g)和体长(21.7 ± 1.1 cm)。体重和体长测量完毕后, 使用无菌器械将鳃组织从鱼体中解剖出来, 并装入无菌无酶的离心管中。组织采样结束后, 先将样本置于液氮中进行速冻, 带回实验室后将其储存于 -80°C 的超低温冰箱中, 以用于后续的 RNA 提取、文库构建和 qRT-PCR 验证。

2.3. 总 RNA 提取、cDNA 文库构建与测序

将每组的红鳍东方鲀的鳃组织分别置于液氮中进行研磨, 研磨后的样品使用 Trizol 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)进行总 RNA 的提取。RNA 提取完成后, 使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测分析 RNA 的完整性以及 RNA 是否存在 DNA 的污染, 用 NanoPhotometer 分光光度计(IMPLEN, California, CA, USA)来检测 RNA 的纯度, 并使用 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)来精确检测 RNA 的纯度和完整性。

在红鳍东方鲀的样本质量检测合格后, 选取常氧组(CSB1, CSB2, CSB3)和低氧组(ESB1, ESB2, ESB3)的鳃组织各 3 个样本(每个样本有 4 个生物学重复), 共 6 个样本进行文库的构建和测序, 本实验委托诺禾致源公司进行测序。再按照 NEB 普通建库方式进行 cDNA 文库的构建, 建库试剂盒为 NEBNext@Ultra™ RNA Library Prep Kit (Illumina, 美国), 所有的文库制备步骤均按照试剂盒说明书进行: 首先通过磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA, 在逆转录酶体系中合成单链 cDNA。然后以 dNTPs 为原料, 在 DNA 聚合酶 I 系统中再合成双链 cDNA。双链 cDNA 经过末端修复后, 加入 polyA 尾和测序接头到文库中。用 AMPure XP beads 筛选 250~300 bp 左右的 cDNA, 进行 PCR 扩增并再次使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 最终获得文库。在本次实验中共构建了 6 个 RNA (cDNA)文库(包括 3 个常氧组和 3 个缺氧组, 每组包含 4 个生物重复), 用于后续 RNA 测序和生物信息学分析。在 cDNA 文库构建完成后, 所有的 cDNA 文库均在 Illumina Novaseq 6000 平台(Illumina, 美国)上进行测序。

2.4. 数据过滤和数据比对

为了保证测序数据分析的可靠性, 测序完成的原始数据需要经过过滤才能进行后续的分析。首先, 我们使用 FastQC v0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)和 MultiQC v1.8 [20]对 fastq 格式的原始数据(Raw Reads)进行质量检测。根据质量检测结果, 使用 Trimmomatic v0.38 [21]对原始数据进行过滤, 去除包含接头(Adapter)、poly-N (N 表示碱基信息无法确定)的 reads 以及来自原始数据的低质量的 reads (Qphred ≤ 20 的碱基数占整个 read 长度的 50%以上的 reads), 从而得到干净数据(Clean Reads)。同时, 我们对干净数据的 Q20 和 Q30 值(Q20 和 Q30 代表大于 20 和 30 的核苷酸质量值), 以及 GC 含量进行了计算, 以检测测序数据的质量。接着, 我们从美国国家生物技术信息中心(NCBI)下载了红鳍东方鲀的参考基因组和基因注释文件(fTakRub1.2, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/63>), 并通过 Hisat2 v2.1.0 [22]建立了红鳍东方鲀的参考基因组的索引(index), 并将过滤后干净数据与红鳍东方鲀的参考基因组的序列进行比对(Reads Mapping)。最后, 使用 HTSeq v0.11.2 [23]来计算比对到每个基因的读长数(Read Counts), 以进行后续的差异基因表达分析。

2.5. 差异表达基因的筛选

我们使用 R 软件包 DESeq2 v3.10 [24]筛选出红鳍东方鲀鳃组织在常氧组与低氧组中的差异表达基因。本次实验中, $|\log_2\text{foldchange}| \geq 1$ & $p\text{-adj} < 0.05$ (p 值经过多重校验校正后的值)的基因被认为是差异表达基因(DEGs)。差异表达基因和筛选完成后, 使用 R 软件包 ggplot2 将 DEGs 可视化, 用火山图来直观

地显示测序结果的差异表达基因, 从中推断差异表达基因的整体分布情况。此外, 我们还通过 heatmap 进行了聚类分析, 以此来判断差异表达基因在不同实验条件下的表达模式。我们将表达模式相同或相近的基因聚集成类, 从而来识别未知基因的功能或已知基因的未知功能, 因为这些同类的基因可能具有相似的功能, 亦或是共同参与某一相同的代谢过程或者细胞通路。最后, 使用 R 软件包 clusterProfiler v3.18.1 [25]对筛选出的差异表达基因进行了 GO 功能富集分析、KEGG 富集分析以及 GSEA 富集分析, 以了解红鳍东方鲀在适应长期低氧胁迫时的分子机制, 以及所参与的生物学过程和生化途径, 探索低氧胁迫条件下的分子相互作用网络。

2.6. qRT-PCR 验证

为了验证转录组结果的准确性, 我们随机选择了 6 个基因进行 qRT-PCR 验证(*foxo3*, *hif1an*, *lgmn*, *prp5*, *angptl4*, *bh1he40*)。本实验以 β -actin 作为 qRT-PCR 的内参基因, 以分析目的基因的相对表达量。本实验使用 Primer Premier 5.0 设计 qRT-PCR 引物, 基因的引物设计如表 1 所示。首先, 按照诺唯赞的反转录试剂盒 HiScrip[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)的说明书, 将 2.2 中所提取的总 RNA 反转录成 cDNA; 然后, 以 cDNA 为模板, 使用上海生工的 Green-2-Go qPCR Mastermix (Plus)试剂盒配置 10 μ L 总体积的反应液, 并在 ABI StepOnePlus[™] Real-Time PCR 系统(Life Technologies, USA)上进行 qRT-PCR 实验。最后, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量[26], 并依据 Microsoft Office Excel 软件的计算结果, 将各个不同样品间的表达量差异绘制形成直方图。

Table 1. Lists of primers for quantitative real-time PCR

表 1. 实时荧光定量 PCR 引物列表

基因名称 Gene Name	引物序列 Primer Sequences	产物大小(bp) Product Size (bp)
foxo3	F: 5' GCTGGATAACATCAATTTAGTGCC 3' R: 5' GAGATGAGCCTGTTTTGTGGG 3'	231
hif1an	F: 5' CTAAAGTGGGACATCGCATACT3' R: 5' GGGACGTTGGGACAAAGTTCT 3'	94
lgmn	F: 5' GGTGACACGCTGAAGACGGTA 3' R: 5' TTGTGCTTGTAATGGTTGACTGC 3'	100
prp5	F: 5' CCTACGGGACAAAATACGCTT 3' R: 5' TGCCCTGAAGTGGATGGAA 3'	100
angptl4	F: 5' TGGACAGTGATACAGAGACGCC 3' R: 5' TGGATGTTTCCAGGATGTAGCCG 3'	94
bh1he40	F: 5' GAGAGCCAGCCAAAGCGAT 3' R: 5' AGGGTAGAGTATGGGCACGGT 3'	100
β -actin	F: 5' AAATCGTGCGTGACATCAAGG 3' R: 5' GATTCCACAGGACTCCATACCAAG 3'	203

3. 结果与分析

3.1. RNA 提取

我们从常氧组和低氧组的红鳍东方鲀的鳃组织(每组三个平行样本)中分别提取了总 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性并用凝胶成像系统拍照, 结果显示 RNA 电泳图中 28S 和 18S 两条带清晰, 且亮度比约为 2:1, 表明所提取的 RNA 完整性较好。使用分光光度计对总 RNA 进行浓度和纯度测定, 结果显示 A260/A280 的比值均在 1.9~2.1 之间, 表明所提取 RNA 的完整性和纯度均符合要求。

3.2. 转录组数据质量分析

本次实验共构建了 6 个 cDNA 文库进行测序, 包括 3 个常氧组文库(CSB1, CSB2, CSB3)和 3 个低氧组文库(ESB1, ESB2, ESB3), 并用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台对上述的 6 个文库进行了转录组测序。测序结果如表 2 所示, 本实验共获得 274,407,930 条原始数据。对原始数据进行过滤, 去除了带接头、poly-N 和低质量的碱基后, 总共获得了 269,098,380 条干净数据和 40.36 Gb 干净碱基。且每个样本中的 Q20 和 Q30 均超过 97%和 93%, GC 含量均超过了 50%。上述数据表明, 测序数据真实可靠, 可用于之后的分析。

Table 2. Summary of sequencing data quality results

表 2. 测序数据质量结果汇总

Sample 样本名	Raw_reads 原始数据	Clean_reads 干净数据	Clean_bases 干净碱基	Q20 Q20	Q30 Q30	GC_pct GC 含量
CSB1	40,077,926	39,321,898	6.38	98.07	94.51	51.87
CSB2	43,517,438	42,871,236	6.57	98.08	94.55	51.30
CSB3	44,536,190	43,821,718	6.69	98.09	94.54	51.67
ESB1	48,326,778	47,073,028	7.24	97.93	94.14	51.64
ESB2	48,204,344	47,253,292	6.71	97.75	93.67	50.94
ESB3	49,745,254	48,757,208	7.04	98.06	94.55	52.08

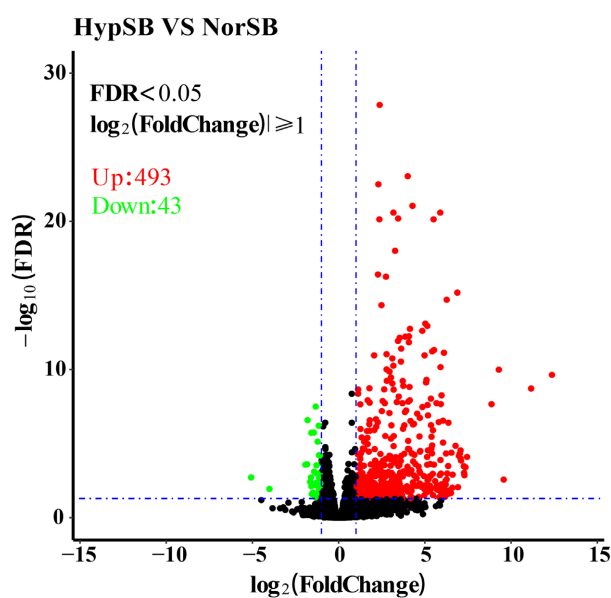
将过滤后的干净数据与红鳍东方鲀的参考基因组进行比对分析后, 总比对率和唯一比对率均超过了 95%, 正确比对率均大于 84% (表 3)。这说明本次实验样本与参考基因组亲缘关系近, 且样本的外源污染较少、样本的整体测序质量较好。本次实验的所有的干净数据都已提交至 NCBI 的 SRA 数据库(Bio Project: PRJNA645780)。

3.3. 红鳍东方鲀鳃转录组差异基因分析

我们使用 DESeq2 处理 HTSeq 计算的读长数(read counts)并进行差异基因表达分析。结果显示(图 1), 在红鳍东方鲀的常氧组(NorSB)和低氧组(HypSB)的鳃组织中一共鉴定到了 536 个差异基因 ($\log_2\text{foldchange} \geq 1$ & $p\text{-adj} < 0.05$), 包括 493 个上调基因和 43 个下调基因。由此结果可以看出, 在长期低氧环境下, 鳃中的上调基因远多于下调基因, 说明上调基因的表达水平是适应缺氧环境的一个主要反应。

Table 3. Statistics of sequencing data comparison rate
表 3. 测序数据与对比率统计

Sample 样本名	Clean_reads 干净数据	Total_map 总比对率	Unique_map 唯一比对率	Multi_map 多次比对率	Proper_map 正确比对率
CSB1	39,321,898	37,788,030 (96.1%)	35,040,055 (89.11%)	2,747,975 (6.99%)	34,166,696 (86.89%)
CSB2	42,871,236	41,358,627 (96.47%)	38,556,977 (89.94%)	2,801,650 (6.54%)	37,587,898 (87.68%)
CSB3	43,821,718	42,314,811 (96.56%)	39,417,887 (89.95%)	2,896,924 (6.61%)	38,462,928 (87.77%)
ESB1	47,073,028	45,126,839 (95.87%)	41,050,804 (87.21%)	4,076,035 (8.66%)	39,838,148 (84.63%)
ESB2	47,253,292	45,222,955 (95.7%)	41,215,240 (87.22%)	4,007,715 (8.48%)	40,005,916 (84.66%)
ESB3	48,757,208	46,997,939 (96.39%)	43,824,217 (89.88%)	3,173,722 (6.51%)	42,723,894 (87.63%)



注：FDR 表示校正后的 P 值，FoldChange 表示常氧组与低氧组与的差异表达倍数；红色点表示上调表达的基因，绿色点表示下调表达的基因。

Figure 1. Volcano plot of differentially expressed genes
图 1. 差异表达基因的火山图

此外，样本聚类热图显示(图 2)，本次实验的 6 个样本可以根据处理条件被很好地聚类为两个分支(常氧组和低氧组)，且组间差异较大，组内差异小，说明本次实验中的处理组之间的生物重复性良好，实验数据可靠，样本选择合理。

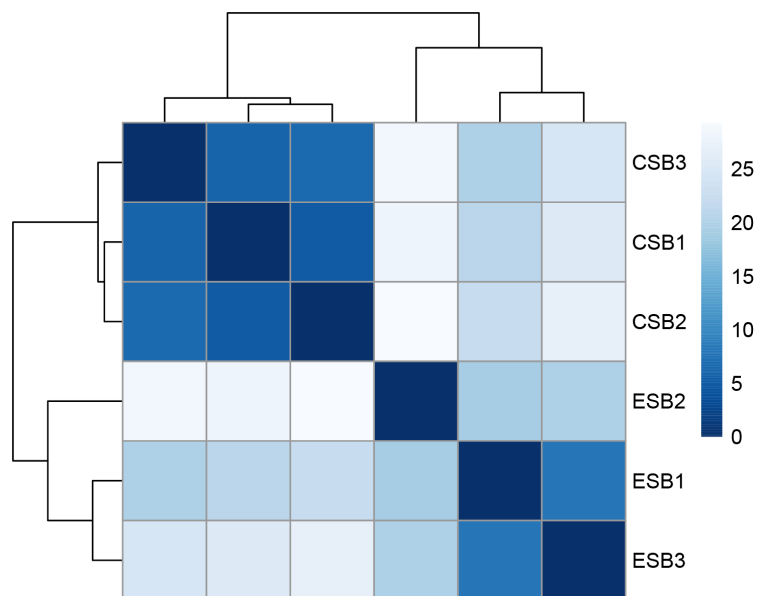
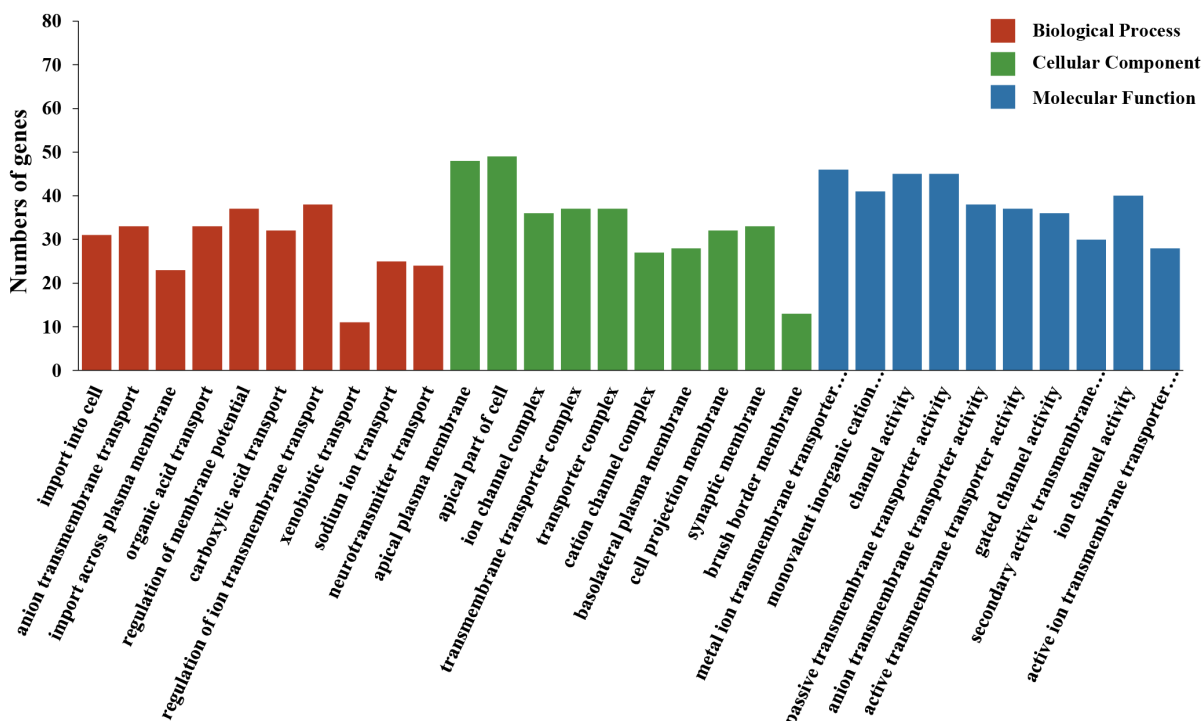


Figure 2. Heatmap of sample clustering for the normoxic and hypoxic groups
图 2. 常氧组和低氧组的样本聚类热图



注：横坐标表示富集的 GO 条目，纵坐标表示富集在每个 GO 条目上的差异基因数目。

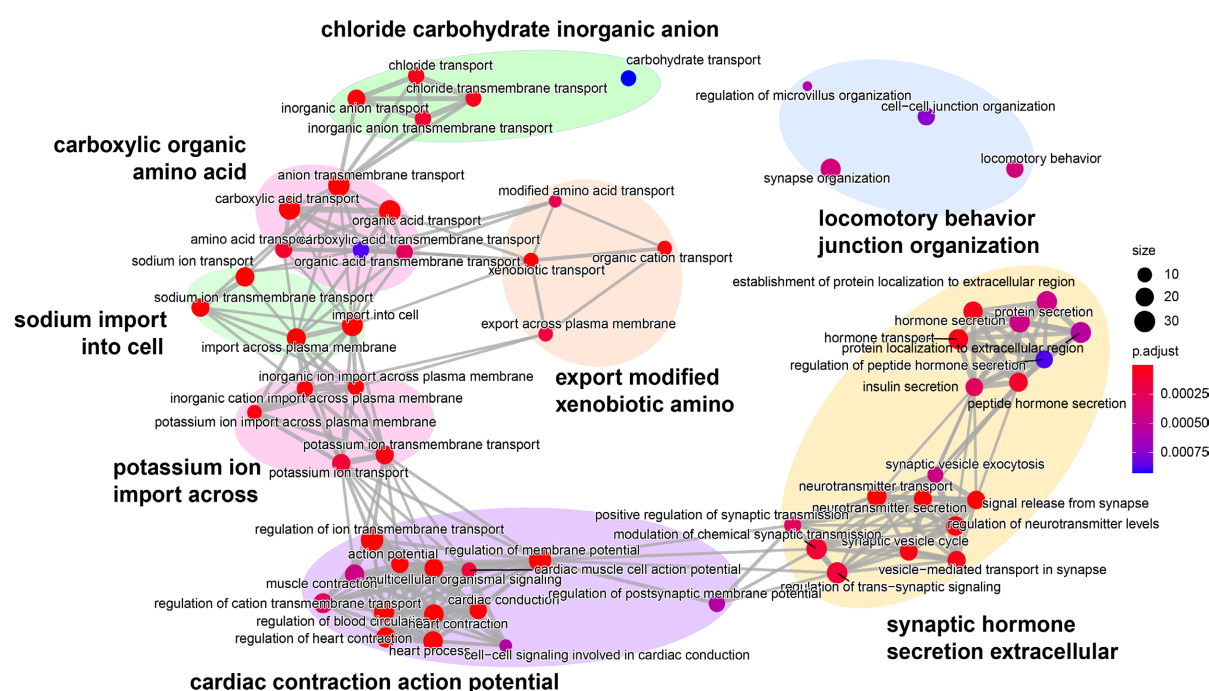
Figure 3. GO annotation enrichment map of differentially expressed genes
图 3. 差异基因的 GO 注释富集图

3.4. GO 功能富集分析

为确定对长期缺氧胁迫下调控缺氧反应的通路，我们分别从生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞成分(CC)三个方面对差异表达基因进行了 Gene Ontology (GO, <http://www.geneontology.org/>)功能富集分析。

GO 富集结果表明, 536 个差异基因共富集了 458 条 GO 条目上($p_{adj} < 0.05$), 包括 277 条生物过程条目(60.5%), 101 条细胞组分条目(22%)和 80 条分子功能条目(17.5%)。如图 3 所示, 在生物过程中, 一些与离子运输相关的条目显著富集, 如阴离子跨膜运输(Anion Transmembrane Transport), 有机酸运输(Organic Acid Transport), 羧酸运输(Carboxylic Acid Transport), 离子跨膜运输的调节(Regulation of Ion Transmembrane Transport), 钠离子运输(Sodium Ion Transport)等。在细胞组分中, 离子通道复合体(Ion Channel Complex), 跨膜转运器复合体(Transmembrane Transporter Complex), 转运器复合体(Transporter Complex), 阳离子通道复合体(Cation Channel Complex)等条目显著富集。在分子功能中, 金属离子跨膜转运器的活性(Metal Ion Transmembrane Transporter Activity), 通道活性(Channel Activity), 阴离子跨膜转运体活性(Passive Transmembrane Transporter Activity)等条目显著富集。

此外, 为了直观地显示我们的结果, 我们对所有富集的术语进行了聚类。如图 4 所示, 许多与离子转运相关的 GO 条目被聚类到了“钾离子进入细胞”(Potassium Ion Import Across)和“钠离子进入细胞”(Sodium Import into Cell)这两个大类中。



注: 图中不同颜色的椭圆代表聚类的功能组。每个点代表一个 GO 条目。

Figure 4. Functional grouping network diagram for GO enrichment analysis

图 4. GO 富集分析的功能聚类网络图

3.5. KEGG 富集分析

在生物体内, 不同基因相互协调行使其生物学功能, 通过通路显著性富集能确定基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。因此, 我们将所有差异基因映射到 KEGG 数据库[27], 以确定处于低氧过程中红鳍东方鲀鳃组织中受影响的生物途。KEGG 富集分析结果显示, 536 个差异基因共富集到了 276 条信号通路上, 且每个基因都可能富集到一个或多个途径中。图 5 为富集程度最高的前 40 条代谢通路。其中, 有 14 条代谢通路在低氧环境下显著富集($p_{adj} < 0.05$), 包括胰岛素分泌(Insulin Secretion), 昼夜节律的调整(Circadian Entrainment), 逆行性内分泌素信号传递(Retrograde Endocannabinoid Signaling), 催产

素信号传导途径(Oxytocin Signaling Pathway), 细胞粘附分子(Cell Adhesion Molecules)等。此外, 其他的一些重要的代谢通路也有所富集, 如钙信号传导途径(Calcium Signaling Pathway), cAMP 信号通路(cAMP Signaling Pathway), 紧密连接(Tight Junction)。

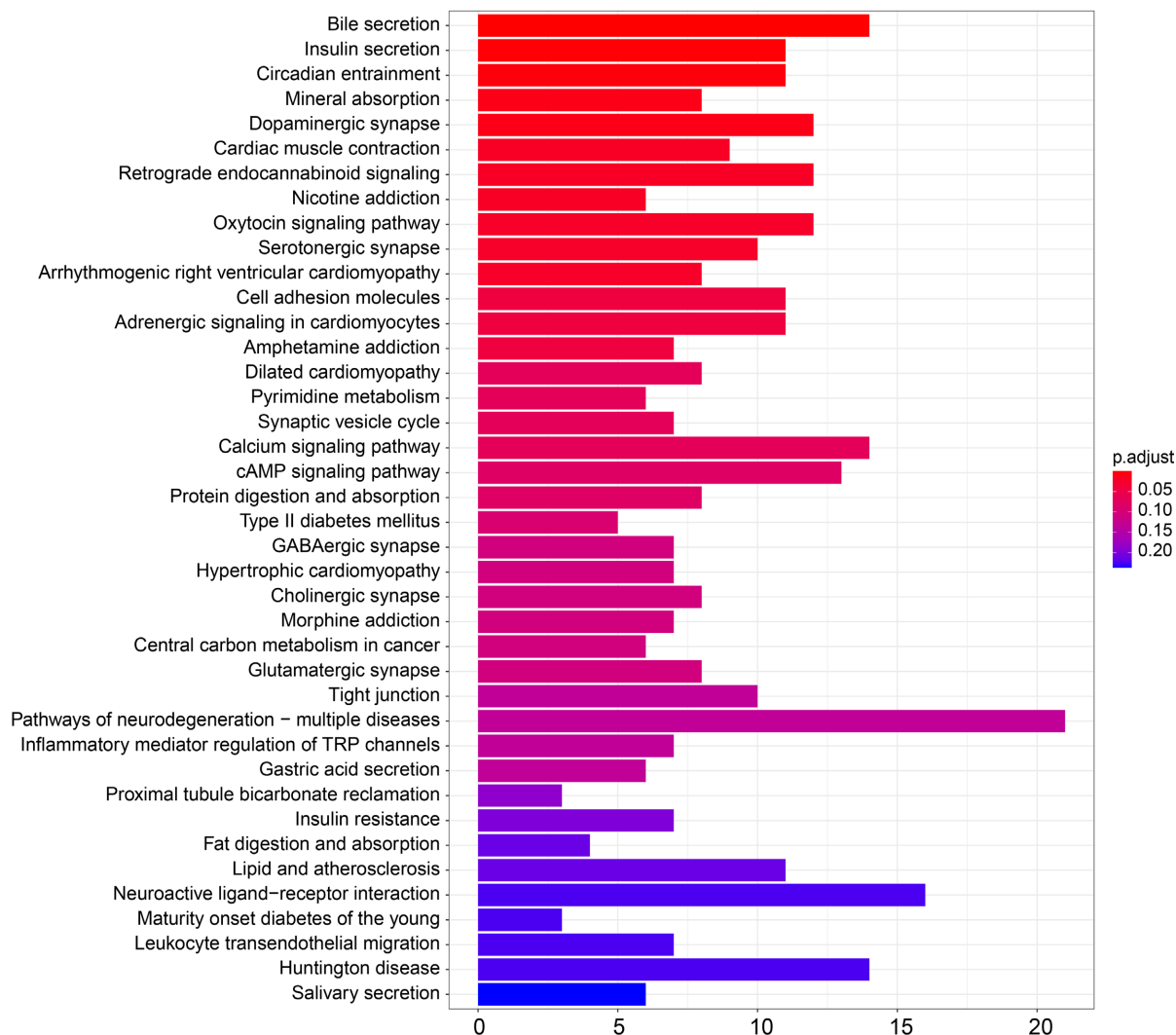


Figure 5. The top 40 enriched KEGG pathways
图 5. 富集度最高的前 40 条 KEGG 代谢通路

3.6. GSEA 富集分析

除 GO 和 KEGG 富集分析外, 我们进一步使用了基因集富集分析(GSEA, <http://software.broadinstitute.org/gsea/>)全面地对低氧处理后的全部基因的调节作用进行了分析, 以期进一步筛选介导红鳍东方鲀的缺氧耐受性的代谢通路。富集结果表明, 共有 115 条通路在低氧胁迫下显著富集($p\text{-value} < 0.25$), 其中上调通路有 89 条(77.4%), 下调通路仅 26 条(22.6%), 表明鳔组织在低氧环境下能够通过上调更多的生物过程来应对长期低氧环境刺激。此外, 我们也发现, 在 KEGG 中所富集的通路在低氧环境中显著上调, 如胰岛素分泌, 矿物质吸收, cAMP 信号传导途径, 钙信号传导途径等。此外, 与细胞生长相关的通路在低氧环境下显著下调, 如细胞周期, DNA 复制(表 4)。

Table 4. Part GSEA enrichment results of *T. rubripes* under chronic hypoxia
表 4. 长期低氧胁迫下的部分 GSEA 富集结果

Pathways	SetSize	ES	NES	pvalue
胰岛素分泌	110	0.7417692	1.7515256	2.69E-07
昼夜节律的调整	128	0.6767333	1.603884	2.92E-05
矿物质吸收	53	0.7036131	1.5897128	0.0028057
cAMP 信号传导途径	269	0.5344467	1.2781091	0.0126025
钙信号传导途径	285	0.5168283	1.2369882	0.0289
细胞周期	150	-0.302182	-1.257544	0.0111937
DNA 复制	37	-0.363811	-1.21909	0.1610169

注: SetSize 代表该基因集下的基因总数, ES 代表 Enrichment score, NES 代表归一化后的 Enrichmentscore, pvalue 表示富集结果的可信度。

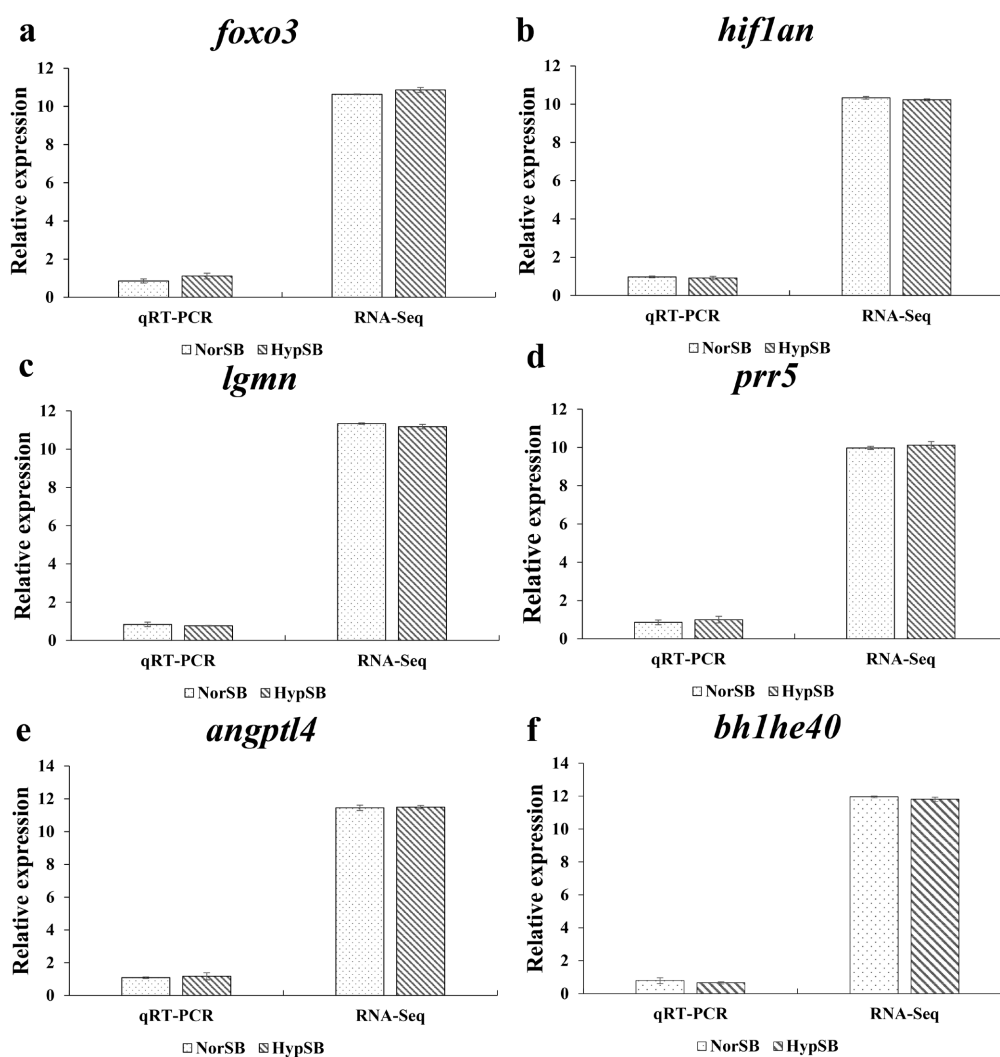


Figure 6. Quantitative real-time PCR validation
图 6. 实时定量 PCR 验证

3.7. qRT-PCR 验证

由图 6 可以看出, 从转录组中选取的 6 个基因, 经 qRT-PCR 验证, 基因的表达量变化趋势均与 RNA-Seq 一致。这些数据证实了本研究中使用的 RNA-Seq 结果的可靠性, 可以用于后续的研究分析。

4. 讨论

在水产养殖中, 低氧胁迫作为一种常见的外界应激压力, 给水产养殖业的可持续发展带来严重的影响。由于氧气在水中扩散能力较弱, 水环境中更容易出现低氧胁迫的情况。因此, 许多鱼类已进化出了一系列策略以适应低氧胁迫[28] [29]。近年来, 随着高通量测序技术的发展, 转录组技术已成为研究水生动物低氧胁迫的重要工具, 并已成功应用于尼罗罗非鱼[30]、草鱼[31]、大黄鱼[32]中。因此, 本研究使用 RNA-Seq 技术, 对低氧胁迫 10 天的常氧组和低氧组的红鳍东方鲀的鳃组织进行转录组比较分析, 结果发现了大量差异表达基因, 且上调表达的基因远多于下调表达的基因, 表明鳃组织能够通过上调更多的基因表达来应对长期低氧环境刺激。这一结果与其他鱼类在低氧胁迫中的结果相似[30] [31] [32]。但不同点在于差异基因表达数量不同, 这可能与胁迫处理时间、溶氧浓度及靶器官的敏感性的差异所致。GO 功能及 KEGG 通路富集结果表明, 差异表达基因大多集中在离子运输相关通路上。此外, GSEA 富集结果表明, 细胞周期, DNA 复制这两个与细胞生长相关的通路在低氧环境中显著下调。因此, 接下来我们着重从这几个通路着重分析红鳍东方鲀在应对长期低氧胁迫的适应情况。

4.1. 长期低氧胁迫对红鳍东方鲀离子运输的影响

4.1.1. SLC 转运蛋白

研究结果表明, 低氧诱导后, 红鳍东方鲀鳃中离子转运相关基因的表达发生了显著变化, 其中包括大量溶质运输蛋白(SLC)。溶质运输蛋白是最大的一类细胞内运输蛋白, 它们利用主要活性转运体产生的离子梯度或电化学电位差来将底物穿过生物膜[33]。在本研究中, 共有 45 个 SLC 基因差异表达, 且有 43 个 SLC 基因的表达量在长期低氧环境下呈现出上调趋势。在这些上调表达的基因中, SLC4A4 能够通过协同转运 Na^+ 和 HCO_3^- , 调节细胞内外的 pH 平衡[34]。Slc5a1 被称为钠/葡萄糖共转运体 1 (SGLT1), 能够介导细胞对葡萄糖的吸收。Slc7a5 属于细胞氨基酸转运 L-系统的一员, 参与细胞中大分子氨基酸链、芳香族氨基酸及中性氨基酸的转运, 在细胞生理中承担着重要的功能[35]。此外, slc7a5 可以通过钠离子非依赖机制, 以高亲和力结合苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸等中性氨基酸并将其转运至细胞特定部位[36]。在本研究中, 长期低氧显著地上调了鳃中多个离子转运相关基因的表达, 一定程度上促进了红鳍东方鲀鳃中离子的转运过程, 从而调节机体应对低氧所造成的影响。然而, 与我们的结果相反, 低氧胁迫显著地抑制了大黄鱼鳃中多个离子转运蛋白基因(*HVCN1*、*SLC20A2*、*SLC4A4*、*RHBG*、*RHCG* 和 *SCN4A*)的表达, 从而阻断了大黄鱼鳃内某些离子的转运过程, 结果的差异可能与低氧应激的种类和持续时间有关。

4.1.2. 钙信号传导途径

钙(Ca^{2+})是细胞内信号传导最常见的第二信使, 介导多种细胞生理过程, 如细胞凋亡和增殖。在静息状态下, 质外体中的游离钙浓度是细胞质中游离钙浓度的 10,000 倍[37]。钙通道的开放导致胞质中钙离子的动态增加。提高细胞内钙水平的刺激会增加钙神经蛋白的活性和基因表达, 钙神经蛋白是一种依赖 Ca^{2+} /钙调蛋白的丝氨酸磷酸酶[38] [39] [40], 该蛋白被激活后, 钙调蛋白使转录因子 NFAT 去磷酸化, NFAT 转入细胞核并与其他转录因子组合作用以调节肌红蛋白基因表达(*Myoglobin*)。研究表明, 肌红蛋白在促进氧气运输、氧气储存或作为肌细胞内一氧化氮的清除剂方面的作用[41]。我们的 KEGG 富集结

果显示, 钙信号传导途径(Calcium Signaling Pathway)在长期低氧环境中被激活, 同时一些电压依赖性钙通离子道亚单位基因(*cacna1b*, *cacna1d*)在该通路中富集且其表达量随着溶氧降低而上调。其中, *cacna1d* 编码 Cav1.3 钙通道 $\alpha 1$ 亚基, 参与神经递质的释放, 激素分泌以及平滑肌收缩等多项生理功能[42] [43]。由此可知, 长期低氧环境下, 红鳍东方鲀能够通过促进钙离子转运以调节缺氧环境中的氧气运输, 从而适应低氧环境。

4.1.3. 环磷酸腺苷(cAMP)通路

此外, 研究表明, 环磷酸腺苷(cAMP)通路(cAMP Signaling Pathway)在低氧应激过程中也发挥重要作用[44]。常氧与低氧下的红鳍东方鲀组织的差异基因的 KEGG 富集结果表明, 在环磷酸腺苷(cAMP)通路上注释到了较多差异基因, 说明该通路在低氧胁迫期间较为活跃, 且该信号通路在低氧环境下显著上调。在环磷酸腺苷(cAMP)通路中, 低氧应激诱导腺苷酸环化酶系统的转录上调, 腺苷酸环化酶(AC)是产生 cAMP 的酶, 部分是由低氧诱导因子-1 (HIF-1)转录因子介导的[45], 在低氧应激过程中, 低氧诱导的其它系统中酶的磷酸化状态的变化经常与 cAMP 依赖白激酶(PKA)联系在一起[44], 从而影响红鳍东方鲀的抗低氧能力。KEGG 结果显示, 共有 13 个上调基因富集到了环磷酸腺苷(cAMP)通路上。其中, *atp1b1* 是一种完整的膜蛋白, 它是建立和维持血浆膜内 Na^+ 和 K^+ 电化学梯度的必要条件, 也有助于建立上皮细胞极化和细胞粘附, 同时也是细胞活性的重要调节因子[46]。此外, 在宿主免疫系统中, *atp1b1* 还是一种积极的调节因子, 有助于免疫和炎症反应。*Adcy1* 是腺苷酸环化酶基因家族的一个成员, 能影响 Ca^{2+} 的释放[47] [48], 从而减少钙超载。在本研究中, *adcy1* 除了介导环磷酸腺苷(cAMP)通路外, 同时还介导了胰岛素分泌(Insulin Secretion)。结果显示, 胰岛素分泌在长期低氧环境下被显著富集, 且该通路随着溶氧降低呈现上调趋势。研究表明, *adcy1* 水平与胰岛素水平呈正相关, 且 *adcy1* 在控制胰岛 β 细胞的 cAMP 平衡和胰岛素分泌方面起着重要作用[48]。与本实验结果不同的是, 在大鼠模型中, 长期间歇性缺氧会干扰胰岛素的分泌, 并通过 MAPK 信号通路引起胰腺组织的炎症、病变和细胞凋亡[49], 这可能与物种特异性有关。综上可知, 长期低氧不仅能够调节离子转运以维持细胞内金属离子的平衡, 还能通过促进胰岛素分泌, 降低血糖水平, 减轻机体在低氧环境中脂类代谢的紊乱, 保护机体以防产生不良影响。

除了 KEGG 富集结果外, 离子运输相关条目在 GO 聚类分析中也显著富集, 包括钠离子运输(Sodium Ion Transport), 钠离子跨膜运输(Sodium Ion Transmembrane Transport), 钾离子跨膜运输(Potassium Ion Transmembrane Transport), 钾离子运输(Potassium Ion Transport)。且这些条目能够被很好地聚类到“钾离子进入细胞”(Potassium Ion Import Across)和“钠离子进入细胞”(Sodium Import into Cell)这两个大类中。大量离子转运相关基因在这些通路中富集, 这与我们的 KEGG 结果一致。

综上, 长期低氧胁迫影响着机体内的离子浓度[50]。首先, 长期低氧上调大量 SLC 离子转运相关基因的表达, 说明红鳍东方鲀的鳃组织能够通过调节机体内外的离子转运来应对低氧损伤。其次, 钙信号传导途径以及环磷酸腺苷(cAMP)通路在低氧胁迫下被激活并随着溶解氧降低而呈现出上调趋势。进而得知, 钾、钠和钙等选择性离子通过该通路或跨细胞膜转运, 维持细胞离子平衡。由此可以推测, 长期低氧应激下, 钠、钾通道蛋白活跃, 导致胞内金属离子浓度升高, 维持细胞正常兴奋。同时通过钙信号传导途径, 激活下游相关蛋白活性, 调节机体应对低氧所造成的影响。

4.2. 长期低氧胁迫对红鳍东方鲀生长调整的影响

除离子转运相关通路在低氧环境下受到调节外, GSEA 富集结果表明, 长期低氧还显著下调了与生长调整相关通路, 包括细胞周期和 DNA 复制。DNA 复制是最重要和调节良好的生物过程之一。真核生物 DNA 复制起始过程可以分为“解旋酶装载”和“解旋酶激活”两个步骤, 而这两个步骤是与细胞周期

的进行相协调的[51] [52]。细胞周期是许多生理过程中感知和应对缺氧的重要环节,也是细胞内最重要和最耗能的过程之一,包括细胞生长、增殖、动物发育和 DNA 损伤修复、组织增生的调节,因此氧气感应系统可以直接影响细胞周期进程[53] [54]。在本次研究中,细胞周期中涉及的下调基因有 *orc5*, *cdk4*, *skp1*, *ccnb3*, *gadd45a*, *bub3* 等。其中,细胞周期蛋白依赖激酶(Cyclin Dependent Kinase, CDK)在真核生物细胞周期调控中起着重要作用。原点识别复合体(ORC)是细胞周期 G1 期前复制复合物组装的重要支架,并且作为启动 DNA 复制的开关,在维持基因组完整性中起着重要作用,以确保每个细胞周期中只有一轮基因组进行复制[55] [56]。研究表明,G1 期晚期各种 ORC 亚基的耗尽或失活会破坏 DNA 复制[57]。此外,DNA 复制通路中所富集的基因有 *mcm4*, *mcm7*, *rfc4*, *ssbp1*, *rfc5*, *fen1*, 且这些基因的表达量均随溶氧降低而下调。其中,微小染色体维持蛋白(Minichro-Mosome Maintenance Proteins, MCMp, MCM 蛋白)基因是影响微染色体有丝分裂稳定性的主要基因[58],其编码的 MCM 蛋白家族是一组与 DNA 复制起始、延伸密切相关的蛋白质。因此,当 MCM 蛋白基因及 MCM 蛋白发生异常时,可引起 DNA 复制改变,使得细胞周期出现异常现象。综上可知,在长期低氧环境中,红鳍东方鲀能够下调这些与细胞增殖、有丝分裂等相关基因的表达,从而抑制 DNA 复制和细胞周期等耗氧的生物过程,以减少了低氧环境下的能量消耗,在一定程度上减轻低氧胁迫带来的损伤。

5. 结论

本研究通过转录组(RNA-seq)测序技术,研究比较了常氧(7.5 ± 0.5 mg/L)与低氧(2.5 ± 0.5 mg/L, 10 天)环境下红鳍东方鲀鳃组织的转录组变化。功能富集结果表明,长期低氧胁迫下鳃组织能够影响机体内的离子浓度,维持细胞正常兴奋;并通过激活钙信号传导途径,激活下游相关蛋白活性,调节机体应对低氧所造成的不良影响。同时,胰岛素分泌在长期低氧环境中被激活,在降低血糖水平,减轻机体在低氧环境中脂类代谢的紊乱起到了一定作用。此外,细胞周期, DNA 复制这两个与细胞生长相关的通路在长期低氧环境中被下调,通过抑制细胞正常分裂和生长,减少低氧环境中的能量消耗。上述结果初步阐明了红鳍东方鲀鳃组织应对低氧胁迫的分子机制,以及其相关的生物学过程或信号通路发挥作用的具体机制,同时该研究也为今后研究其他鱼类在应对低氧胁迫时的生理机制和分子机制提供重要的理论依据。

致 谢

特别鸣谢大连海洋大学水产设施养殖与装备工程团队(Aquacultural Engineering R & D Team, AET)提供的养殖设备和场地。

基金项目

本论文由国家海水鱼产业技术体系项目(CARS-47)、大连市重点领域创新团队项目(2021RT07)及大连海洋大学科技创新团队项目(B202102)资助。

参考文献

- [1] Semenza, G.L. and Wang, G.L. (1992) A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via de Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation. *Molecular and Cellular Biology*, **12**, 5447-5454. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.12.5447-5454.1992>
- [2] 熊向英, 黄国强, 彭银辉, 刘旭佳. 低氧胁迫对鲮幼鱼生长、能量代谢和氧化应激的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(1): 73-82.
- [3] Diaz, R.J. and Rosenberg, R. (1996) Marine Benthic Hypoxia: A Review of Its Ecological Effects and the Behavioural Responses of Benthic Macrofauna. *Oceanographic Literature Review*, **43**, 1250.
- [4] Vaquer-Sunyer, R. and Duarte, C.M. (2008) Thresholds of Hypoxia for Marine Biodiversity. *Proceedings of the Na-*

- tional Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 15452-15457. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803833105>
- [5] Matey, V., Richards, J.G., Wang, Y., *et al.* (2008) The Effect of Hypoxia on Gill Morphology and Ionoregulatory Status in the Lake Qinghai Scaleless Carp, *Gymnocypris przewalskii*. *The Journal of Experimental Biology*, **211**, 1063-1074. <https://doi.org/10.1242/jeb.010181>
- [6] Li, H.L., Lin, H.R. and Xia, J.H. (2017) Differential Gene Expression Profiles and Alternative Isoform Regulations in Gill of Nile Tilapia in Response to Acute Hypoxia. *Marine Biotechnology (New York, NY)*, **19**, 551-562. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9774-4>
- [7] Gallage, S., Katagiri, T., Endo, M., *et al.* (2016) Influence of Moderate Hypoxia on Vaccine Efficacy against *Vibrio anguillarum* in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Fish Shellfish Immunol*, **51**, 271-281. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.024>
- [8] Bickler, P.E. and Buck, L.T. (2007) Hypoxia Tolerance in Reptiles, Amphibians, and Fishes: Life with Variable Oxygen Availability. *Annual Review of Physiology*, **69**, 145-170. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.162529>
- [9] Li, M., Wang, X., Qi, C., *et al.* (2018) Metabolic Response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to Acute and Chronic Hypoxia Stress. *Aquaculture*, **495**, 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.031>
- [10] Gracey, A.Y., Lee, T.H., Higashi, R.M. and Fan, T. (2011) Hypoxia-Induced Mobilization of Stored Triglycerides in the Euryoxic Goby *Gillichthys mirabilis*. *The Journal of Experimental Biology*, **214**, 3005-3012. <https://doi.org/10.1242/jeb.059907>
- [11] Vuori, K.A., Soitamo, A., Vuorinen, P.J. and Nikinmaa, M. (2004) Baltic Salmon (*Salmo salar*) Yolk-Sac Fry Mortality Is Associated with Disturbances in the Function of Hypoxia-Inducible Transcription Factor (HIF-1 α) and Consecutive Gene Expression. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, **68**, 301-313. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.019>
- [12] Lkhagvadorj, S., Qu, L., Cai, W., *et al.* (2010) Gene Expression Profiling of the Short-Term Adaptive Response to Acute Caloric Restriction in Liver and Adipose Tissues of Pigs Differing in Feed Efficiency. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **298**, R494-R507. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00632.2009>
- [13] Bao, M., Shang, F., Liu, F., *et al.* (2021) Comparative Transcriptomic Analysis of the Brain in *Takifugu rubripes* Shows Its Tolerance to Acute Hypoxia. *Fish Physiology and Biochemistry*, **47**, 1669-1685. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-01008-6>
- [14] Shang, F., Lu, Y., Li, Y., *et al.* (2022) Transcriptome Analysis Identifies Key Metabolic Changes in the Brain of *Takifugu rubripes* in Response to Chronic Hypoxia. *Genes*, **13**, 1347. <https://doi.org/10.3390/genes13081347>
- [15] Shang, F., Bao, M., Liu, F., *et al.* (2022) Transcriptome Profiling of Tiger Pufferfish (*Takifugu rubripes*) Gills in Response to Acute Hypoxia. *Aquaculture*, **557**, Article ID: 738324. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738324>
- [16] Gao, K., Wang, Z., Zhou, X., *et al.* (2017) Comparative Transcriptome Analysis of Fast Twitch Muscle and Slow Twitch Muscle in *Takifugu rubripes*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D, Genomics & Proteomics*, **24**, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2017.08.002>
- [17] Peng, H., Yang, B., Li, B., *et al.* (2019) Comparative Transcriptomic Analysis Reveals the Gene Expression Profiles in the Liver and Spleen of Japanese Pufferfish (*Takifugu rubripes*) in Response to *Vibrio harveyi* Infection. *Fish & Shellfish Immunology*, **90**, 308-316. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.304>
- [18] Smith, F.M. and Croll, R.P. (2011) Autonomic Control of the Swimbladder. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, **165**, 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2010.08.002>
- [19] Alexander, R.M. (1966) Physical Aspects of Swimbladder Function. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **41**, 141-176. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1966.tb01542.x>
- [20] Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. and Källér, M. (2016) MultiQC: Summarize Analysis Results for Multiple Tools and Samples in a Single Report. *Bioinformatics*, **32**, 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- [21] Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, **30**, 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- [22] Kim, D., Langmead, B. and Salzberg, S.L. (2015) HISAT: A Fast Spliced Aligner with Low Memory Requirements. *Nature Methods*, **12**, 357-360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- [23] Anders, S., Pyl, P.T. and Huber, W. (2015) HTSeq—A Python Framework to Work with High-Throughput Sequencing Data. *Bioinformatics*, **31**, 166-169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- [24] Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. (2014) Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-seq Data with DESeq2. *Genome Biology*, **15**, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

- [25] Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y. and He, Q.-Y. (2012) clusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes among Gene Clusters. *OmicS: A Journal of Integrative Biology*, **16**, 284-287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- [26] Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative C(T) Method. *Nature Protocols*, **3**, 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- [27] Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., et al. (2017) KEGG: New Perspectives on Genomes, Pathways, Diseases and Drugs. *Nucleic Acids Research*, **45**, D353-D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
- [28] Gracey, A.Y., Troll, J.V., Somero, G.N. (2001) Hypoxia-Induced Gene Expression Profiling in the Euryoxic Fish *Gillichthys mirabilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 1993-1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1993>
- [29] van der Meer, D.L., van den Thillart, G.E., Witte, F., et al. (2005) Gene Expression Profiling of the Long-Term Adaptive Response to Hypoxia in the Gills of Adult Zebrafish. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **289**, R1512-R1519. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00089.2005>
- [30] Saetan, W. and Tian, C. (2020) Comparative Transcriptome Analysis of Gill Tissue in Response to Hypoxia in Silver Sillago (*Sillago sihama*). *Animals (Basel)*, **10**, 628. <https://doi.org/10.3390/ani10040628>
- [31] Jin, J., Wang, Y., Wu, Z., et al. (2017) Transcriptomic Analysis of Liver from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Exposed to High Environmental Ammonia Reveals the Activation of Antioxidant and Apoptosis Pathways. *Fish & Shellfish Immunology*, **63**, 444-451. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.02.037>
- [32] Mu, Y., Li, W., Wei, Z., et al. (2020) Transcriptome Analysis Reveals Molecular Strategies in Gills and Heart of Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) under Hypoxia Stress. *Fish & Shellfish Immunology*, **104**, 304-313. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.028>
- [33] Liu, X. (2019) SLC Family Transporters. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1141**, 101-202. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_3
- [34] Jalali, R., Guo, J., Zandieh-Doulabi, B., et al. (2014) NBCe1 (SLC4A4) a Potential pH Regulator in Enamel Organ Cells during Enamel Development in the Mouse. *Cell and Tissue Research*, **358**, 433-442. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1935-4>
- [35] Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., et al. (1999) Identification and Functional Characterization of a Na⁺-Independent Neutral Amino Acid Transporter with Broad Substrate Selectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 19745-19751. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19745>
- [36] Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., et al. (1998) Expression Cloning and Characterization of a Transporter for Large Neutral Amino Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Antigen (CD98). *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 23629-23632. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.23629>
- [37] Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., et al. (2018) Calcium Transport across Plant Membranes: Mechanisms and Functions. *The New Phytologist*, **220**, 49-69. <https://doi.org/10.1111/nph.15266>
- [38] Chin, E.R., Olson, E.N., Richardson, J.A., et al. (1998) A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway Controls Skeletal Muscle Fiber Type. *Genes & Development*, **12**, 2499-2509. <https://doi.org/10.1101/gad.12.16.2499>
- [39] Wilkins, B.J., De Windt, L.J., Bueno, O.F., et al. (2002) Targeted Disruption of NFATc3, but Not NFATc4, Reveals an Intrinsic Defect in Calcineurin-Mediated Cardiac Hypertrophic Growth. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 7603-7613. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.21.7603-7613.2002>
- [40] Wilkins, B.J. and Molkentin, J.D. (2002) Calcineurin and Cardiac Hypertrophy: Where Have We Been? Where Are We Going? *The Journal of Physiology*, **541**, 1-8. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.017129>
- [41] Garry, D.J., Kanatous, S.B. and Mammen, P.P. (2003) Emerging Roles for Myoglobin in the Heart. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **13**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(02\)00256-6](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(02)00256-6)
- [42] Pinggera, A., Lieb, A., Benedetti, B., et al. (2015) CACNA1D de Novo Mutations in Autism Spectrum Disorders Activate Cav1.3 L-Type Calcium Channels. *Biological Psychiatry*, **77**, 816-822. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.11.020>
- [43] Scholl, U., Goh, G., Stölting, G., et al. (2013) Somatic and Germline CACNA1D Calcium Channel Mutations in Aldosterone-Producing Adenomas and Primary Aldosteronism. *Nature Genetics*, **45**, 1050-1054. <https://doi.org/10.1038/ng.2695>
- [44] Cowan, K.J. and Storey, K.B. (2001) Protein Kinase and Phosphatase Responses to Anoxia in Crayfish, *Orconectes virilis*: Purification and Characterization of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, **130**, 565-577. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00467-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00467-5)
- [45] Simko, V., Iuliano, F., Sevcikova, A., et al. (2017) Hypoxia Induces Cancer-Associated cAMP/PKA Signalling through HIF-Mediated Transcriptional Control of Adenylyl Cyclases VI and VII. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 10121. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09549-8>

- [46] Xu, Z.W., Wang, F.M., Gao, M.J., *et al.* (2010) Targeting the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase alpha 1 Subunit of Hepatoma HepG2 Cell Line to Induce Apoptosis and Cell Cycle Arresting. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **33**, 743-751. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.743>
- [47] Jackson, C.R., Chaurasia, S.S., Hwang, C.K. and Iuvone, P.M. (2011) Dopamine D₄ Receptor Activation Controls Circadian Timing of the Adenylyl Cyclase 1/Cyclic AMP Signaling System in Mouse Retina. *The European Journal of Neuroscience*, **34**, 57-64. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07734.x>
- [48] Kitaguchi, T., Oya, M., Wada, Y., *et al.* (2013) Extracellular Calcium Influx Activates Adenylate Cyclase 1 and Potentiates Insulin Secretion in MIN6 Cells. *The Biochemical Journal*, **450**, 365-373. <https://doi.org/10.1042/BJ20121022>
- [49] Wang, Y., Hai, B., Niu, X., *et al.* (2017) Chronic Intermittent Hypoxia Disturbs Insulin Secretion and Causes Pancreatic Injury via the MAPK Signaling Pathway. *Biochemistry and Cell Biology*, **95**, 415-420. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0167>
- [50] 曾姣, 王倩, 王亚冰, 彭士明, 陈润, 马凌波, 等. 低氧及酸化胁迫对大黄鱼幼鱼离子调节与鳃组织结构的影响[J]. 应用生态学报, 2022, 33(2): 551-559. <http://doi.org/10.13287/j.1001-9332.202202.032>
- [51] Siddiqui, K., On, K.F. and Diffley, J.F. (2013) Regulating DNA Replication in Eukarya. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**, a012930. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012930>
- [52] Tanaka, S. and Araki, H. (2013) Helicase Activation and Establishment of Replication Forks at Chromosomal Origins of Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**, a010371. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010371>
- [53] Schafer, K.A. (1998) The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*, **35**, 461-478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>
- [54] Ortmann, B., Druker, J. and Rocha, S. (2014) Cell Cycle Progression in Response to Oxygen Levels. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, **71**, 3569-3582. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1645-9>
- [55] Ortega, M.A., Nguyen, H. and Ward, W.S. (2016) ORC Proteins in the Mammalian Zygote. *Cell and Tissue Research*, **363**, 195-200. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2296-3>
- [56] Huang, Z., Zang, K. and Reichardt, L.F. (2005) The Origin Recognition Core Complex Regulates Dendrite and Spine Development in Postmitotic Neurons. *The Journal of Cell Biology*, **170**, 527-535. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505075>
- [57] Da-Silva, L.F. and Duncker, B.P. (2007) ORC Function in Late G1: Maintaining the License for DNA Replication. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)*, **6**, 128-130. <https://doi.org/10.4161/cc.6.2.3743>
- [58] Yu, Z., Feng, D. and Liang, C. (2004) Pairwise Interactions of the Six Human MCM Protein Subunits. *Journal of Molecular Biology*, **340**, 1197-1206. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.024>