

温度胁迫对幼体大海马基因转录表达的影响

潘霞 徐永健 宁燕 沈锡权*

(宁波大学海洋学院,浙江 宁波 315211)

摘要:为探究大海马幼体在高温和低温胁迫条件下基因表达水平的变化规律,采用 Illumina 平台的 PE150 测序功能对大海马幼体肝脏进行了转录组测序。对照组、高温胁迫组和低温胁迫组测序数据组装后获得 22 513 个单基因簇(Unigene),N50 为 2 223 bp,平均长度为 1 122.71 bp。与对照组相比,高温胁迫组共获得 14 009 个差异表达基因,其中 5 543 个差异表达基因上调,8 466 个差异表达基因下调;低温胁迫组共获得 20 030 个差异基因,14 016 个差异表达基因上调,6 014 个差异表达基因下调。差异表达基因经 KEGG 数据库富集发现,高/低温胁迫均导致大海马体内抗氧化途径相关基因表达(*HSP70*、*HSP90*、*SOD* 等)发生显著改变;另外,高温胁迫还造成大海马免疫系统相关基因(*PIK3R*、*Akt*、*IL-10*、*TLR* 等)以及细胞凋亡相关基因(*CYCS*、*CASP9*、*CASP3* 等)表达显著改变;低温胁迫造成 DNA 损伤修复(*MSH*、*DDB2*、*XRCC2*、*RAD52*、*Ogg1*、*PMS2* 等)、脂肪酸代谢(*StARD7*、*ApoA4*、*CYP51*、*Fadsd6* 等)和细胞凋亡(*P21*、*P53*、*BAX* 等)相关基因显著上调。选择 *HSP70*、*Fadsd 6* 与 *IL-10* 等 13 个差异基因验证,RT-qPCR 结果与 RNA-Seq 测序结果基本一致。本研究结果为深入探究大海马温度应激的调控机制奠定了一定的理论基础,而且有助于预防极端温度对大海马造成损伤。

关键词:大海马;转录组测序;差异表达基因

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.07.1421

海马(*Hippocampus*)是中国水产经济中重要的高价值海水鱼类,在中药、海洋水族以及纪念品市场有很大的贸易成交量^[1-2]。中医认为,海马具有补气活血、补肾壮阳的功效,是治疗阳痿、不育等疾病的佳品^[3-4]。大海马(*Hippocampus kuda* Bleeker)广泛分布在热带印度洋-太平洋地区,通常生活在较浅的近海栖息地,包括红树林、海草床和河口等^[5]。海马的生长适温范围为 12~33℃,最适温度为 19~28℃,但其对温度急性变化的适应能力差,常由于水温的急剧变化而患病甚至死亡^[6]。水温是影响鱼类生长发育的重要环境因素之一,水温骤变影响鱼类的摄食、代谢、生长,还可能造成分解代谢加强,合成代谢减弱^[7]。为了减轻和避免海马养殖过程中温度骤变所产生的有害影响,有必要研究高/低温影响大海马的分子生理机制。

分析温度骤变前后的转录组学,可以较好地反映

大海马对温度的应激调控。转录组测序(RNA-Seq)结合了转录组测序的实验方法和数字基因表达谱的信息分析方法,可用于研究特定生物过程中基因的差异表达,具有通量高、重复性好、检测范围广等优点^[8],已被证明是许多非模型鱼对各种试验条件转录反应的可靠评估方法^[9],其中在硬骨鱼研究中主要涉及发育、适应性进化、免疫应答和应激反应等^[10]。此外,RNA-Seq 也被用于研究硬骨鱼温度适应和驯化所涉及的分子机制,如鲶鱼^[11]、虹鳟鱼^[12]和斑马鱼^[13]。当前,对海马的研究主要集中在温度、盐度、疾病等生理生化层面,鲜有研究采用 RNA-Seq 技术分析温度胁迫下大海马的转录表达变化。本研究以大海马幼体为研究对象,采用 RNA-Seq 技术对温度骤变前后大海马肝脏组织进行转录组测序,分析不同试验组之间基因转录表达的差异,以期挖掘温度应激调节的候选标志基因,为阐明其分子机制提供理论基础。

收稿日期:2019-05-22 接受日期:2019-07-19

基金项目:宁波市自然科学基金项目(2017A610282),教育部重点科技项目(212070),宁波大学学科开放基金项目(xkzsc1508)

作者简介:潘霞,女,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: panxia1994@163.com

* 通讯作者:沈锡权,男,高级实验师,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: shenxiqun@nbu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

大海马 (*H. kuda*) 幼体由宁波大学海马养殖研究实验室培育。挑选健康、活力良好的幼体, 体重为 0.3012 ± 0.0276 g, 体长为 5.35 ± 0.18 cm, 两者均无显著性差异。在循环水养殖系统中暂养 1 周, 以避免其他环境因素的干扰。暂养温度为 25 ± 0.5 °C, 盐度 25‰, 充氧 $DO > 5$ mg·L⁻¹, 试验用海水为经砂滤后的天然海水, 每天定时投喂 2 次, 摄食 2 h 后进行吸污。试验水温设置: 对照组 (CK) 25°C, 高温胁迫组 (H-test) 31°C, 低温胁迫组 (L-test) 19°C, 盐度均为 25‰。温度胁迫 12 h 后, 每组随机取 5 尾大海马的肝脏置于冻存管, 液氮速冻, 于 -80°C 冰箱中保存备用。

1.2 RNA 提取、文库构建和测序

参考 Liu 等^[11]的方法, 通过混样以消除个体之间的差异。采用 RNAiso plus 试剂盒 (大连宝生物有限公司) 从肝脏样品中提取总 RNA。采用 K5500 分光光度计 (北京凯奥科技发展有限公司) 测量 260、280 nm 波长处的吸光度值, 并用 1% 琼脂糖电泳检查 RNA 样品的纯度和完整性。采用 Bioanalyzer 2100 系统 (Agilent Technologies, 美国) 评估 RNA 的浓度和完整性。每个样品各取 2 μg RNA, 采用 NEBNext® Ultra™ RNA 文库制备试剂盒 (New England Biolabs, 美国) 按照制造商的建议构建测序文库。在 Illumina 平台上测序, 测序策略为 PE150 [安诺优达基因科技 (北京) 有限公司]。

1.3 转录组的组装、注释和差异表达基因分析

使用 Perl 脚本处理原始数据以确保用于信息分析的数据质量, 包括去除接头污染的 Reads、低质量的 Reads 以及含 N 比例大于 5% 的 Reads。过滤后得到的 Clean Data, 统计其质量、数据量等性状, 包括过滤后的总序列中质量值大于 30 (错误率小于 0.1%) 的碱基数的比例 (clean Q30 bases rate, Q30)、数据量、碱基含量等。采用 Trinity 软件进行组装, 对得到的全长转录本进行评估, 然后进行开放阅读框 (open reading frame, ORF) 预测和功能分析。采用 RPKM 方法计算基因表达量^[14], DEGseq v1.18.0 软件^[15]用于差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 分析。选取 $Q \leq 0.05$ 和 $|\log_2 \text{ratio}| \geq 1$ 的基因为 DEGs, 对其进行 GO 基因本体 (Gene Ontology) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路富集分析。

1.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析

选取 13 个 DEGs 对 RNA-Seq 结果进行验证, 根据转录组文库中的 Unigene 序列, 用 Primer Premier 5 软件设计特异性引物 (表 1)。以 β_2 -微球蛋白 (*beta-2 microglobulin, B2M*) 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[16] 计算目的基因的相对表达水平。采用 TB Green Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, 大连) 进行定量表达检测, 在 Eppendorf realplex⁴ 中进行。每组共 9 尾鱼, 3 尾大海马肝脏为一个混样, 设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 大海马肝脏 mRNA 测序结果及从头组装

高通量测序显示 (表 2), CK、H-test 和 L-test 组分别获得 49 556 386、49 404 042、48 043 100 个原始读段 (raw reads)。过滤后分别获得 47 880 348、47 987 534 和 46 520 778 个 clean reads。Q30 值均在 94% 以上, 说明该数据可靠。由表 3 可知, 高质量的测序数据用 Trinity 软件组装后生成了 86 712 个转录本, 长度在 200~2 000 bp 之间, 平均长度为 1 443.25 bp, N50 长度为 2 485 bp。所得转录本序列进一步组装处理后获得 42 264 个单基因簇 (Unigene), 平均长度为 1 122.71 bp, N50 为 2 223 bp。其中, 在 200~600 bp 范围内的 Unigenes 占 53.27%, 600~1 000 bp 占 12.41%, 1 000~2 000 bp 占 16.30%, 2 000 bp 以上的 Unigenes 为 18.02%。

2.2 基因功能注释

将获得的 Unigene 数据信息分别在蛋白质家族域数据库 (Pfam)、蛋白质序列数据库 (Swiss-Prot)、非冗余蛋白数据库 (Nr)、真核生物蛋白相邻类的聚簇 (KOG)、基因本体论数据库 (GO) 和东京基因与基因组百科全书 (KEGG) 等数据库比对注释。由表 4 可知, Nr 数据库中注释的 Unigenes 所占比例最多, 达 53.64%; 核酸序列数据库 (Nt) 注释的 Unigenes 占 44.49%; 19 506 个 Unigenes 在 GO 数据库中得到了注释, 占 46.15%; KEGG 数据库注释的 Unigenes 最少, 共 12 046 个。GO 分为分子功能 (molecular function)、生物过程 (biological process) 和细胞组成 (cellular component) 3 个部分。利用 Trinotate 的注释结果, 统计每个 GO 条目中注释到的基因, 并根据二级 GO 条目得到统计结果 (图 1)。生物学过程的主要类别是细胞过程, 占 74.74%, 其次是生物调节和代谢过程, 分别占 56.7% 和 49.7%; 在分子功能类别中最主要的类别是结合功能 (72.88%) 和催化活性 (35.33%); 细胞组

表 1 RT-qPCR 所用基因及其引物序列
Table 1 Genes used in RT-qPCR and their primer sequences

序号 Number	基因 ID Gene ID	基因注释 Gene annotation	引物序列(5'-3') Primer (5'-3')	扩增效率 Amplification efficiency/%
1	TRINITY_DN5284_c0_g1	DNA 修复蛋白 XRCC2 DNA repair protein XRCC2	F: CCGCCAAAAGTGTTCGTGA R: TGATCCAAATGCGCCATG	99
2	TRINITY_DN12165_c0_g1	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase (SOD)	F: TCACATACTTCACGGGTTTCG R: AGGGAAATGTTCAAGGTACTGC	102
3	TRINITY_DN12096_c0_g1	热休克蛋白 70 Heat shock 70 kDa (Hsp70)	F: GTCGGTGAAATAACAGGGAACA R: CTCTGGGTCTACAGGTATTAAGGTG	95
4	TRINITY_DN10718_c0_g5	StAR 相关的脂质转移结构域蛋白 7 StAR-related lipid transfer domain containing 7 (stard7)	F: CGTTTGGCTCCTTTTGTGC R: GCGGGTTTGTCTACTCCTCTG	97
5	TRINITY_DN12425_c0_g1	羊毛甾醇 14 α -脱甲基酶 Lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1)	F: CGCCTGGTTGGGTTTCTT R: TCAAACAACGCTCCAACAGG	102
6	TRINITY_DN12684_c0_g1	Δ -6 脂肪酰基去饱和酶 Delta-6 fatty acyl desaturase (Fads6)	F: TGGTGCTTGTACTACTACCTTCG R: CTTGATGCTTCTCGTGGTCCG	104
7	TRINITY_DN15307_c0_g5	硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 Stearoyl-CoA desaturase (Δ -9-desaturase)	F: TCCCTGGGGTTGATGGTGT R: TGGTACTTCTGGGGCGAGTC	101
8	TRINITY_DN9693_c0_g1	载脂蛋白 A-IV Apolipoprotein A-IV (apoA4)	F: CGTCTTCGTTTTGGCTGTTT R: TCTTTCCGAGATCCGACTGT	103
9	TRINITY_DN12219_c3_g4	Bcl-2 相关的 X 蛋白 Bcl-2-like protein 4 (BAX)	F: CCCGCAGTCAGTGAAGGAGA R: CGAGGCTGTAGAGTTGGAGTT	96
10	TRINITY_DN12335_c0_g2	RAC- γ 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶 RAC-gamma serine/threonine-protein kinase (AKT3)	F: GCGACGGAGAAGTTGTTGAG R: GTTGTCAAGGAAGGATGGGTC	96
11	TRINITY_DN14737_c1_g1	白细胞介素 10 Interleukin 10 (IL-10)	F: GGAGGACACGAGGGACTTGA R: GCCTTTGTTTTGCATCTGACTG	100
12	TRINITY_DN14616_c0_g4	Toll 样受体 2 Toll-like receptor 2 (TLR2)	F: AGCAGTACTGCCATGTCTGG R: GCTGTTGACAAAATGCCGTGA	98
13	TRINITY_DN9753_c0_g1	同种异体移植炎症因子 1 样 Allograft inflammatory factor 1-like (AIF1L)	F: ACGCCATCAATGAGGCTTTT R: TCTTGGCAAGTCCCAGTTTCT	102
14	TRINITY_DN14235_c1_g1	β 2-微球蛋白 Beta-2 microglobulin (B2M)	F: TACACCCACCAGCCAGGAAA R: GGACTCGACGACATCGAACATC	100

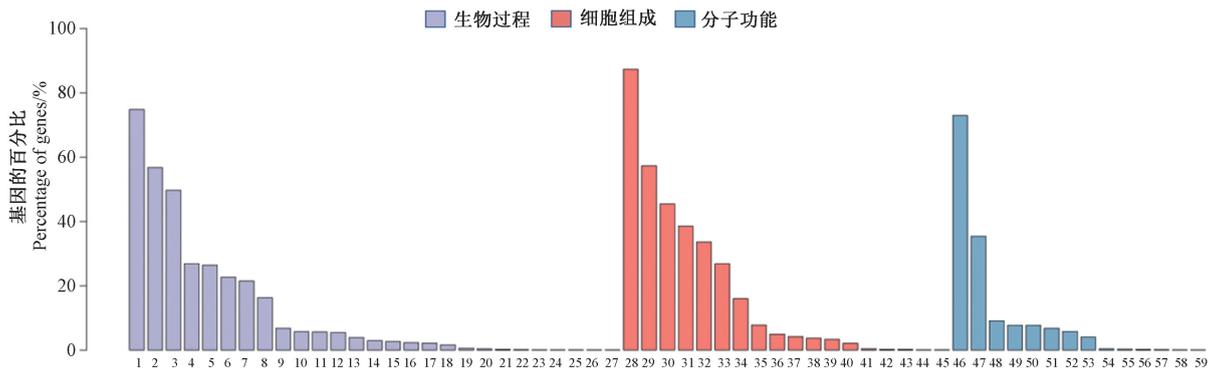
表 2 大海马测序数据的统计汇总
Table 2 Statistic summary of the sequencing data of *H.kuda*

组别 Groups	原始序列数 Raw reads number	过滤后序列数 Clean reads number	过滤后碱基数 Clean bases number	过滤后序列质量值大于 30 的碱基数比例 Q30/%
对照组 CK	49 556 386	47 880 348	7 182 052 200	94.03
高温胁迫组 H-test	49 404 042	47 987 534	7 198 130 100	94.08
低温胁迫组 L-test	48 043 100	46 520 778	6 978 116 700	94.32

成部分中代表性的类别为细胞部分(87.25%)、细胞器(57.24%)和细胞器部分(45.36%)。在 KOG 数据库中 15 454 个基因注释到了 25 个直系同源组(图 2),其中信号转导机制(T, 21.26%)与一般功能预测(R, 21.06%)代表了最大的类群,其次是翻译后修饰/蛋白质周转/分子伴侣(O, 8.29%)。

由图 3 可知, H-test vs CK 获得 14 009 个差异表达

基因,其中显著上调 5 543 个,显著下调 8 466 个; L-test vs CK 获得 20 030 个差异表达基因(14 016 个差异基因显著上调,6 014 个差异表达基因显著下调)。高温胁迫组上调基因数量低于下调基因,而低温胁迫组中上调基因数量占比更高。由图 4 可知,两两比对应后三组均显著差异表达的基因有 2 851 个, H-test vs CK 与 L-test vs CK 之间有 7 324 个差异表达基因相



注:1: 细胞过程;2: 生物调节;3: 代谢过程;4: 发育过程;5: 细胞部分组织或生物合成;6: 定位;7: 刺激反应;8: 多细胞生物过程;9: 免疫系统反应;10: 生物黏附;11: 生殖过程;12: 移动;13: 多机体过程;14: 细胞增殖;15: 行为;16: 信号;17: 生长;18: 节律过程;19: 化学性突触中参与突触前膜过程;20: 色素;21: 细胞杀伤;22: 细胞聚集;23: 解毒;24: 再生;25: 生物相;26: 氮代谢;27: 碳水化合物利用;28: 细胞部分;29: 细胞器;30: 细胞器部分;31: 膜;32: 膜部分;33: 大分子复合体;34: 细胞间区域组分;35: 胞间连丝;36: 细胞间区域;37: 突触部分;38: 膜结合腔体;39: 超分子复合体;40: 突触;41: 细胞;42: 核状体;43: 其他有机体部分;44: 病毒粒子部分;45: 病毒粒子;46: 结合功能;47: 催化活性;48: 分子功能调节剂;49: 转运因子活性;50: 转录调控因子活性;51: 信号传导活性;52: 分子感应器活性;53: 结构分子活性;54: 抗氧化剂活性;55: 劫持分子活性;56: 翻译调控因子活性;57: 分子载体活性;58: 蛋白标签;59: 营养受体活性;

Note: 1: Cellular process. 2: Biological regulation. 3: Metabolic process. 4: Developmental process. 5: Cellular component organization or biogenesis. 6: Localization. 7: Response to stimulus. 8: Multicellular organismal process. 9: Immune system process. 10: Biological adhesion. 11: Reproductive process. 12: Locomotion. 13: Multi-organism process. 14: Cell proliferation. 15: Behavior. 16: Signaling. 17: Growth. 18: Rhythmic process. 19: Presynaptic process involved in chemical synaptic transmission. 20: Pigmentation. 21: Cell killing. 22: Cell aggregation. 23: Detoxification. 24: Reproduction. 25: Biological phase. 26: Nitrogen utilization. 27: Carbohydrate utilization. 28: Cell part. 29: Organelle. 30: Organelle part. 31: Membrane. 32: Membrane part. 33: Macromolecular complex. 34: Extracellular region part. 35: Cell junction. 36: Extracellular region. 37: Synapse part. 38: Membrane-enclosed lumen. 39: Supramolecular complex. 40: Synapse. 41: Cell. 42: Nucleoid. 43: Other organism part. 44: Virion part. 45: Virion. 46: Binding. 47: Catalytic activity. 48: Molecular function regulator. 49: Transporter activity. 50: Transcription regulator activity. 51: Signal transducer activity. 52: Molecular transducer activity. 53: Structural molecule activity. 54: Antioxidant activity. 55: Hijacked molecular function. 56: Translation regulator activity. 57: Molecular carrier activity. 58: Protein tag. 59: Nutrient reservoir activity.

图1 GO统计柱状图

Fig.1 GO statistics histogram

表3 组装结果统计表

Table 3 Assembly result statistics

序列长度 Length range	组装的转录本 Trinity	单基因簇 Unigene
200~600 bp	33 659	22 513
600~1 000 bp	11 264	5 247
1 000~2 000 bp	19 264	6 887
> 2 000 bp	22 525	7 617
总计 Count	86 712	42 264
最小长度 Min length/bp	201	201
最大长度 Max length/bp	18 307	18 307
平均长度 Mean length/bp	1 443. 25	1 122. 71
N50	2 485	2 223
N90	646	406

注: N50代表序列从大到小排列,当其累计长度刚刚超过全部序列总长度50%时,最后一个序列的大小即为N50的大小。N90代表序列从大到小排列,当其累计长度刚刚超过全部序列总长度90%时,最后一个序列的大小即为N90的大小。

Note: N50 means that the sequence is distributed from large to small, and when the extension length just exceeds 50% of the total length of the entire sequence, the size of the last sequence is the size of N50. N90 means that the sequence is distributed from large to small, and when the extension length just exceeds 90% of the total length of the entire sequence, the size of the last sequence is the size of N90.

表4 各个数据库的注释汇总表

Table 4 Summary of comments in each database

数据库 Database	单基因簇数量 Number of unigenes	百分比 Percentage /%
非冗余蛋白数据库 Nr	22 671	53. 64
核酸序列数据库 Nt	18 801	44. 49
东京基因与基因组百科全书 KEGG	12 046	28. 50
蛋白质序列数据库 Swiss-Prot	18 276	43. 24
蛋白质家族数据库 Pfam	14 248	33. 71
基因本体论数据 GO	19 506	46. 15
基因进化谱系:非监督直系 同源群体 eggNOG	17 228	40. 76
真核生物蛋白相邻类的聚簇 KOG	15 454	36. 57
总单基因簇 Total unigenes	42 264	100

同,而6 685个差异基因仅在H-test vs CK显著表达,12 706个差异基因仅在L-test vs CK显著表达。

2.3 差异基因的KEGG富集分析

KEGG是一个综合数据库,大致分为系统信息、基

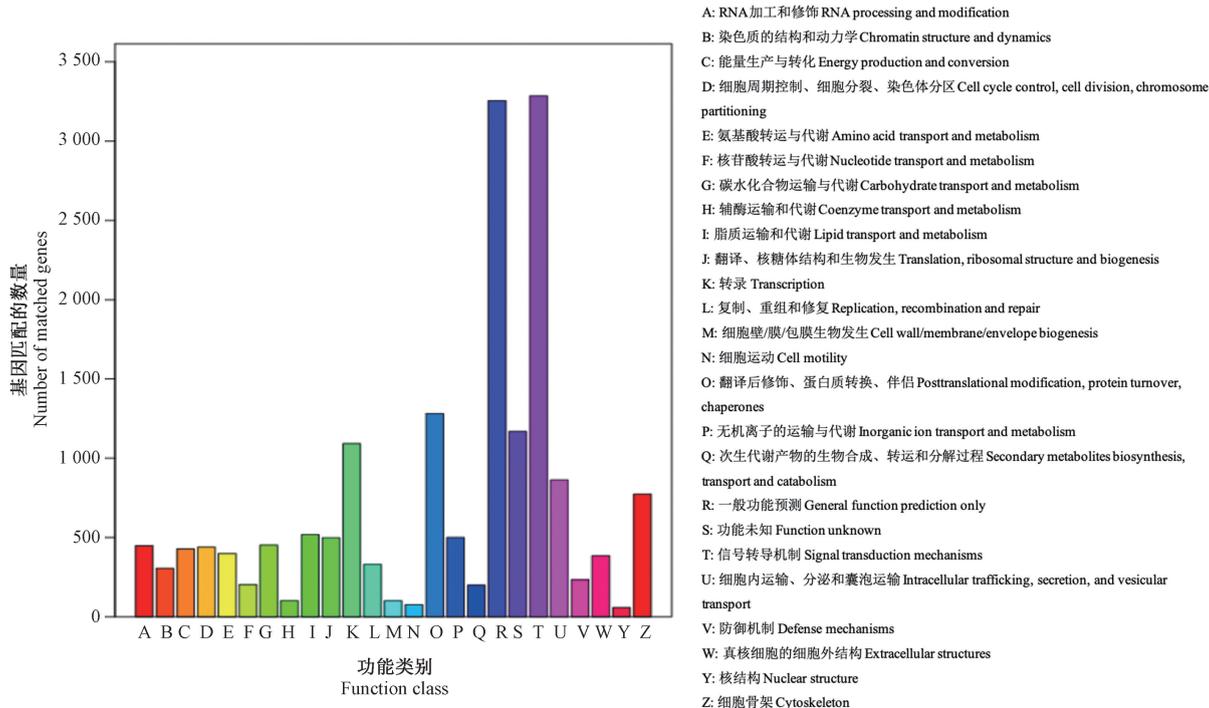


图 2 KOG 功能分类统计图
Fig.2 KOG function classification chart

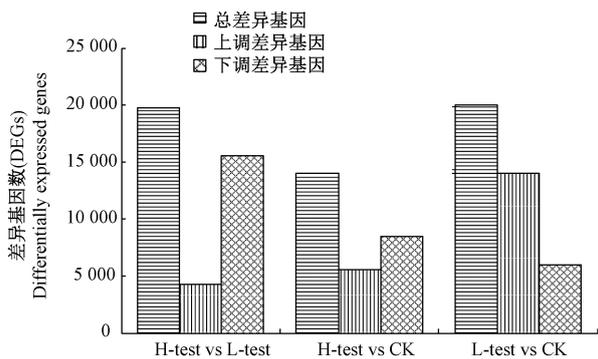


图 3 大海马肝脏转录组中差异表达基因个数统计图
Fig.3 Statistical diagram of differentially expressed genes in liver transcriptome of *H. kuda*

基因组信息和化学信息三大类,有助于了解生物系统的高级功能和实用性,如在基因和分子水平了解细胞、生物和生态系统的信息,其对差异表达基因的 Pathway 注释分析有助于进一步解读基因的功能^[17]。差异表达基因在 KEGG 数据库中富集,以 $Q < 0.05$ 为标准,对 KEGG 中每个 Pathway 应用超几何检验进行富集分析,找出差异表达基因中显著性富集的 Pathway。其中 Q 值为多重假设检验校正之后的 P 值, Q 值越小,表示差异表达基因在该通路中的富集显著性越高^[18]。本研究中, H-test vs CK 的差异表达基因富集到 332 条通路,显著富集的通路主要是蛋白质消化吸收、类固醇生

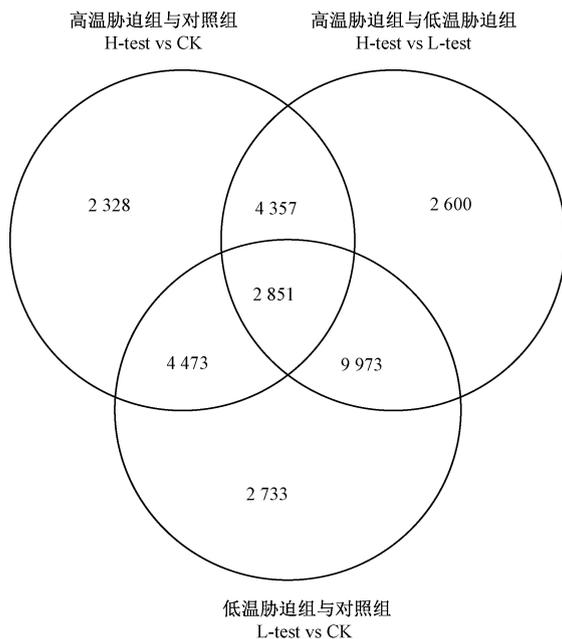


图 4 大海马肝脏转录组中差异基因韦恩图
Fig.4 Venn diagram of differential gene in liver transcriptome of *H. kuda*

物合成以及细胞外基质 ECM-受体相互作用, L-test vs CK 的差异表达基因富集到 332 条通路,显著富集的通路为同源重组及 DNA 复制。

表 5、表 6 为富集得到的前 20 个 KEGG 代谢通

路,其中高温胁迫组中免疫途径(如 ECM-受体相互作用、IgA 肠道免疫网络、军团菌病、PI3K-Akt 信号通路等)、代谢通路(如蛋白质消化吸收、类固醇生物合成、脂肪消化吸收、甘油酯代谢等)及细胞凋亡(依赖于铁的程序性细胞死亡)等受到影响。涉及的显著表达基因主要有 *SOD*、*HSP70*、*HSP90*、*PIK3R*、*CYCS*、*CASP9*、*CASP3*、*P21*、*Akt*、*IL-10*、*TLR*、*CCR9*、*MHC2* 等。低温胁迫

主要涉及 DNA 损伤修复(如同源重组、DNA 复制、细胞周期、核苷酸切除修复、碱基切除修复等)及代谢(花生四烯酸代谢、谷胱甘肽代谢、糖酵解等)等过程。筛选发现 *SOD*、*HSP70*、*HSP90*、*P21*、*P53*、*BAX*、*HSP70*、*HSP90*、*StARD7*、*ApoA4*、*CYP51*、*Fadsd6*、*MSH*、*DDB2*、*XRCC2*、*RAD52*、*Ogg1*、*PMS2* 等基因在低温应激中发挥重要作用。

表 5 H-test vs CK 差异基因富集的前 20 个 KEGG 代谢通路

Table 5 Top 20 KEGG metabolic pathways enriched in H-test vs CK differential genes

通路 ID Pathway ID	上调差异基因数 Up DEGs	下调差异基因数 Down DEGs	Q 值 Q value	代谢通路注释 Metabolic pathway annotation
map04974	23	45	0.004 9	蛋白质消化吸收 Protein digestion and absorption
map00100	3	13	0.005 9	类固醇生物合成 Steroid biosynthesis
map04512	22	44	0.012 3	ECM-受体相互作用 ECM-receptor interaction
map04923	9	31	0.073 8	脂肪细胞脂解调控 Regulation of lipolysis in adipocytes
map04975	20	5	0.194 7	脂肪消化吸收 Fat digestion and absorption
map00561	17	19	0.194 7	甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism
map04672	7	8	0.194 7	IgA 肠道免疫网络 Intestinal immune network for IgA Production
map05134	21	4	0.194 7	军团杆菌病 Legionellosis
map05145	31	23	0.194 7	弓形体病 Toxoplasmosis
map04978	12	9	0.215 3	矿质元素吸收 Mineral absorption
map04151	62	81	0.215 3	PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway
map04930	6	24	0.215 3	II 型糖尿病 Type II diabetes mellitus
map00604	6	5	0.235 1	神经鞘糖脂生物合成-ganglio 系列 Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series
map00830	11	8	0.235 1	视黄醇代谢 Retinol metabolism
map04721	17	19	0.235 1	突触囊泡循环 Synaptic vesicle cycle
map02010	18	16	0.280 2	ABC 转运 ABC transporters
map00520	23	5	0.280 2	氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
map05414	27	24	0.353 4	扩张型心肌病(DCM) Dilated cardiomyopathy (DCM)
map04612	19	1	0.634 9	抗原加工提呈 Antigen processing and presentation
map04216	18	4	0.634 9	铁凋亡 Ferroptosis

2.4 实时荧光定量 PCR 结果

为验证基于 RNA-Seq 方法检测的结果是否准确, 随机选取 13 个差异表达基因(表 1)进行验证。以 *B2M* 作为内参基因, 采用 RT-qPCR 相对定量方法检测这些基因在试验组与处理组中的转录表达差异。将

RT-qPCR 方法检测结果与转录组分析结果进行比较, 结果表明, 13 个被测基因的 RT-qPCR 相对表达与 RNA-seq 相对表达水平趋势基本一致(图 5、图 6), 证明了转录组分析结果的可靠性。

表 6 L-test vs CK 差异基因富集的前 20 个 KEGG 代谢通路
Table 6 Top 20 KEGG metabolic pathways enriched in L-test vs CK differential genes

通路 ID Pathway ID	上调差异基因数 Up DEGs	下调差异基因数 Down DEGs	Q 值 Q value	代谢通路注释 Metabolic pathway annotation
map03440	39	1	0.002 7	同源重组 Homologous recombination
map03030	34	0	0.009 2	DNA 复制 DNA replication
map00590	27	6	0.259 4	花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism
map04110	92	2	0.259 4	细胞周期 Cell cycle
map03460	40	4	0.259 4	范可尼贫血途径 Fanconi anemia pathway
map04724	80	32	0.259 4	谷氨酸能突触 Glutamatergic synapse
map00480	33	3	0.259 4	谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism
map00240	62	9	0.259 4	嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism
map04977	25	4	0.259 4	维生素消化吸收 Vitamin digestion and absorption
map03420	32	0	0.268 5	核苷酸切除修复 Nucleotide excision repair
map00520	35	4	0.509 3	氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
map03410	25	1	0.509 3	碱基切除修复 Base excision repair
map00010	44	6	0.509 3	糖酵解/糖异生 Glycolysis/Gluconeogenesis
map00340	11	7	0.509 3	组氨酸代谢 Histidine metabolism
map03430	15	0	0.509 3	错配修复 Mismatch repair
map04114	80	12	0.509 3	卵母细胞减数分裂 Oocyte meiosis
map03050	28	0	0.509 3	蛋白酶体 Proteasome
map00230	113	14	0.509 3	嘌呤代谢 Purine metabolism
map04742	24	12	0.509 3	味觉转导 Taste transduction
map05414	59	15	0.541 6	扩张型心肌病(DCM) Dilated cardiomyopathy (DCM)

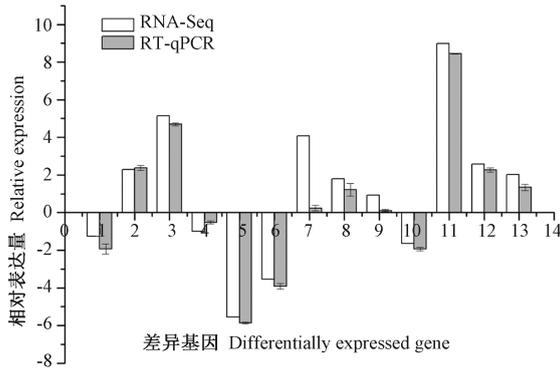


图 5 高温胁迫组 RT-qPCR 及 RNA-Seq 的比较分析

Fig.5 Comparative analysis of RT-qPCR and RNA-Seq in H-test

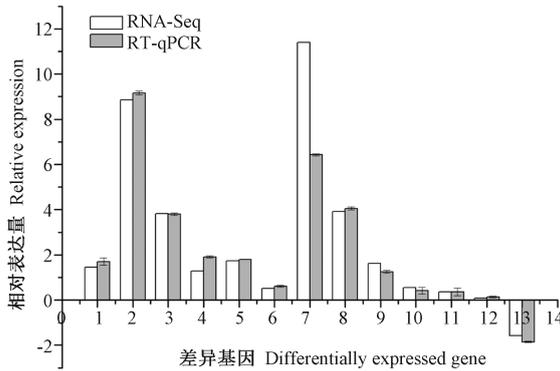


图 6 低温胁迫组 RT-qPCR 及 RNA-Seq 的比较分析

Fig.6 Comparative analysis of RT-qPCR and RNA-Seq in L-test

3 讨论

夏季高温或冬季寒潮^[19]以及人工养殖过程中换水等水温骤变对水产生物的生长、发育和摄食等方面均有较大影响^[20]。本研究分析了高/低温胁迫处理的幼体大海马肝脏转录组变化,高/低温胁迫组与对照组相比分别获得差异表达基因 14 009 个和 20 030 个,表明温度胁迫可能激活了多种细胞代谢,以应答温度应激对大海马幼体造成的伤害。高/低温胁迫均造成了抗氧化以及细胞凋亡方面相关基因表达的显著改变,如超氧化物歧化酶(SOD)、热休克蛋白(HSP70、HSP90)、细胞色素 C(CYCS)、半胱天冬酶-9(CASP9)、半胱天冬酶-3(CASP3)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(P21)、肿瘤蛋白 P53、Bcl-2 相关的 X 蛋白(BAX)等。此外,高温胁迫组中免疫途径中磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基(PIK3R)、P21、RAC- γ 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(Akt)、白细胞介素 10(IL-10)、

Toll 样受体(TLR)等基因表达发生显著变化。而低温胁迫组中脂肪酸合成和 DNA 损伤修复的相关基因表达差异显著,如 StAR 相关脂质转移结构域蛋白 7(StARD7)、载脂蛋白 A-IV(ApoA4)、羊毛甾醇 14 α -脱甲基酶(CYP51)、 Δ -6 脂肪酰基去饱和酶(Fadsd6)、DNA 错配修复蛋白(MSH)、DNA 损伤结合蛋白 DDB2、DNA 修复蛋白 XRCC2、DNA 修复蛋白 RAD52、8-氧代鸟嘌呤糖基化酶(Ogg1)、错配修复核酸内切酶 PMS2 等。此外,本研究发现(图 3)低温胁迫组上调基因数是高温胁迫组的 2.6 倍,说明低温胁迫较高温胁迫组诱导了更多基因表达,在斑马鱼幼体^[21]和大黄鱼幼体^[19]中也发现了这样的现象,可能与大海马幼体阶段的耐寒能力有关。

温度胁迫会增加水生生物体内的活性氧(reactive oxygen, ROS)含量,其积累到一定程度会激发体内抗逆性和抗感染的重要生物分子 HSP70、HSP90^[22]和 SOD 等基因的表达量显著上调^[23]。本研究中,高/低温胁迫处理均造成了 HSP70、HSP90 和 SOD 等抗氧化相关基因显著上调,可能是为了消除体内的 ROS,而热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)作为分子伴侣可防止有害蛋白质聚集,促进蛋白质正确折叠并帮助修复^[24]。

细胞凋亡指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序死亡。高/低温胁迫均会导致细胞凋亡相关基因表达差异显著,但两者表达差异基因不同。本研究发现高温胁迫组中显著上调的基因主要是 P21、CYCS、CASP9 和 CASP3。而低温胁迫组差异表达的凋亡相关基因有 P53、P21、BAX。细胞色素 C 大量释放会激活 Caspase-9,进而激活 Caspase-3 后诱导细胞凋亡^[25]。P53 参与多种修复 DNA 损伤途径,如染色质重塑、碱基切除修复等^[26]。而 P21 是位于 P53 基因下游的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子,主要作用是减少受损 DNA 的复制和积累,抑制细胞凋亡^[27]。此外,BAX 表达 Bcl-2 相关的 X 蛋白,通过抗氧化机制影响细胞凋亡^[28]。本研究结果表明,高温胁迫激活了 caspase 依赖的细胞凋亡途径,而低温胁迫则造成与抑制细胞凋亡的相关基因上调,并激活大量 DNA 损伤修复基因,以抵抗低温伤害。

生物体受到温度、pH 值等刺激或细胞毒性损伤时,PI3K-Akt 信号传导途径会调节细胞凋亡、蛋白质合成和细胞周期等重要过程^[29]。本研究结果表明,在高温胁迫下,PI3K-Akt 信号途径相关基因的表达受到显著影响(表 5),共有 62 个基因上调,81 个基因显著下调。此途径中的 2 个关键基因 PIK3R1 以及 AKT3

的表达均显著下调。而低温胁迫下, PI3K-Akt 信号传导途径总体未受到较大影响。Sun 等^[30]在杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 中也发现在热应激或缺氧及病原体攻击时, PI3K、AKT 基因表达显著下调。此外, 此途径中涉及免疫的差异基因有 *IL-10*、*TLR* 等显著上调, 显著下调的差异基因有 CC 趋化因子受体 9 型 (*CCR9*)、主要组织相容性复合物 (*MHC2*) 等。*IL-10* 可下调 T 辅助细胞因子 (*Th1* 和 *Th2*)、趋化因子和 MHC II 类抗原的表达, 是免疫和炎症的关键调节因子^[31]。*TLR* 信号通路也在先天免疫防御机制中起关键作用^[32]。以上结果表明, 高温胁迫相较于低温胁迫更可能导致大海马体内免疫系统紊乱, 最终导致患病率上升。

本研究中, 低温胁迫组中与脂肪酸代谢等有关的基因, 如 *Fadsd6*、*ApoA4*、*StARD7* 和 *CYP51* 等基因表达显著上调, 而高温胁迫组中仅 *ApoA4* 显著上调。鱼的脂肪酸代谢对温度变化很敏感^[33], 膜脂肪酸去饱和被认为是鱼适应低温的一种重要机制, 对维持膜的流动性、酶活力和细胞的正常功能至关重要^[34]。研究发现, 低水温可以增加硬骨鱼类 $\Delta 6$ -去饱和酶基因表达, 而水温升高导致几种淡水鱼的 $\Delta 6$ -去饱和酶活性降低^[35]。这可能是因为低温胁迫导致鱼体细胞中脂肪酸组成发生改变, 增加膜脂的不饱和和脂肪酸比率, 以维持细胞膜流动性。载脂蛋白可能用于细胞增殖和组织修复期间支持细胞生长材料的运输。而 StAR 蛋白是介导胆固醇生物合成中线粒体转运的限速蛋白^[36], *CYP51* 是 *CYP* 超家族中进化最保守的成员, 而且是甾醇生物合成的关键酶^[37]。本研究中低温胁迫导致类固醇及不饱和脂肪酸等相关基因表达上调, 而在高温胁迫中相反, 可能是因为脂肪酸对于大海马幼体抵抗低温应激有重要作用。

环境刺激会造成氧化和抗氧化系统之间的平衡被打破, 导致 DNA 受到损伤。细胞周期调节、蛋白质伴侣蛋白、DNA 修复等过程有降低 DNA 损伤的作用^[38]。本研究中, 低温胁迫组富集了多条 DNA 损伤修复途径 (表 6), 如同源重组、DNA 复制、细胞周期、嘧啶代谢、核苷酸切除修复、碱基切除修复、错配修复、嘌呤代谢等。筛选得到的上调基因有 *MSH*、*DDB2*、*XRCC2*、*RAD52*、*Ogg1*、*PMS2* 等。上述基因中, 高温胁迫中显著上调的仅有 *PMS2*, 说明低温胁迫可能导致鱼体内产生 DNA 损伤, 诱导修复基因显著表达以抵抗低温应激。

4 结论

本研究采用 RNA-Seq 技术, 在新一代 Illumina 测序平台, 采用 PE150 测序策略, 构建了幼体大海马肝脏转录组数据库, 获得了大量幼体大海马的转录组数据信息, 并分别构建高温和低温应激后的基因表达数据库, 对 3 个数据库进行从头拼接、组装和分析, 挖掘了温度胁迫相关的基因。通过转录组研究手段了解幼体大海马的温度应激反应, 并初步了解其所涉及的重要过程和途径, 为进一步研究温度应激的确切机制提供了基础, 而且有助于预防极端温度对大海马造成损伤。

参考文献:

- [1] Lin Q, Li G, Qin G, Lin J D, Huang L M, Sun H S, Feng P Y. The dynamics of reproductive rate, offspring survivorship and growth in the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810[J]. *Biology Open*, 2012, 1(4): 391-396
- [2] Job S D, Do H H, Meeuwig J J, Hall H J. Culturing the oceanic seahorse, *Hippocampus kuda*[J]. *Aquaculture*, 2002, 214(1): 333-341
- [3] Kumaravel K, Ravichandran S, Balasubramanian T, Sonneschein L. Seahorses-A source of traditional medicine [J]. *Natural Product Research*, 2012, 26(24): 2330-2334
- [4] Rosa I L, Defavari G R, Alves R R N, Oliveira T P R. Seahorses in Traditional Medicines: A Global Overview[M]. Springer, Berlin, Heidelberg: *Animals in Traditional Folk Medicine*, 2013; 207-240
- [5] Lourie S, Foster S, Cooper, E, Vincent A. A Guide to the Identification of Seahorses. Project Seahorse and TRAFFIC North America[M]. Washington DC: University of British Columbia and World Wildlife Fund, 2004: 9-13
- [6] 席寅峰, 尹飞. 海马人工养殖技术研究进展[J]. *现代渔业信息*, 2011, 26(10): 9-15
- [7] 曾明华. 鱼类的应激反应及应对措施[J]. *渔业致富指南*, 2017, (14): 69-70
- [8] 栾海业, 臧慧, 沈会权, 张英虎, 乔海龙, 陶红. 大麦白化颖壳突变体的转录组学分析[J]. *核农学报*, 2017, 31(12): 50-57
- [9] Yang Y, Yu H, Li H, Wang A, Yu H Y. Effect of high temperature on immune response of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by transcriptome analysis[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 58: 89-95
- [10] Qian X, Ba Y, Zhuang Q F, Zhong G F. RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics[J]. *Omic: A Journal of Integrative Biology*, 2014, 18(2): 98-110
- [11] Liu S K, Wang X L, Sun F Y, Zhang J R, Feng J B, Liu H, Rajendran K, Sun L Y, Zhang Y, Jiang Y L, Peatman E, Kaltenboeck L, Kucuktas H, Liu Z J, Zhang Y. RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein

- synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish[J]. *Physiological Genomics*, 2013, 45(12): 462-476
- [12] Tan E, Wongwarangkana C, Kinoshita S, Suzuki Y, Oshima K, Hattori M, Ineno T, Tamaki K, Kera A, Muto K, Yada T, Kitamura S, Asakawa S, Watabe S. Global gene expression analysis of gill tissues from normal and thermally selected strains of rainbow trout[J]. *Fisheries Science*, 2012, 78(5): 1041-1049
- [13] Scott G R, Johnston I A. Temperature during embryonic development has persistent effects on thermal acclimation capacity in zebrafish[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(35): 14247-14252
- [14] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621-628
- [15] Wang L K, Feng Z X, Wang X, Wang X W, Zhang X G. DEGseq: An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 26(1): 136-138
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [17] 林琤, 薛珠政, 李永平, 李大忠, 刘建汀, 朱海生, 温庆放. 青梗花椰菜和白梗花椰菜转录组分析[J]. *核农学报*, 2018, 32(9): 1708-1720
- [18] 邓素贞, 韩兆方, 陈小明, 李庆昌, 肖世俊, 李佳凯, 刘贤德. 大黄鱼高温适应的转录组学分析[J]. *水产学报*, 2018, 42(11): 3-13
- [19] Qian B Y, Xue L Y. Liver transcriptome sequencing and de novo annotation of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under heat and cold stress[J]. *Marine Genomics*, 2016, 25: 95-102
- [20] Saucedo P E, Ocampo L, Monteforte M, Bervera H. Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856)[J]. *Aquaculture*, 2004, 229(1/2/3/4): 377-387
- [21] 李林春, 李青, 龙勇, 崔宗斌. 温度刺激对斑马鱼仔鱼基因转录表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2012, 36(5): 882-891
- [22] 胡晓丽. 高温胁迫和鳃弧菌感染对栉孔扇贝基因表达影响的分析及相关基因的克隆与表达[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005: 15-23
- [23] 刘甜雨, 王清, 陈慕雁. 热刺激对栉孔扇贝免疫功能和热休克蛋白表达的影响[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2017, 47(8): 31-43
- [24] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein [J]. *Science*, 2002, 295(5561): 1852-1858
- [25] Cheng C H, Yang F F, Liao S A, Miao Y T, Ye C X, Wang A L, Tan J W, Chen X Y. High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2015, 53: 172-179
- [26] Adimoolam S, Ford J M. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair [J]. *DNA Repair*, 2003, 2(9): 947-954
- [27] Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown J P, Sedivy J M, Kinzler K W, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage[J]. *Science*, 1998, 282(5393): 1497-1501
- [28] 郎海滨, 糜漫天. Bcl-2 家族蛋白与线粒体凋亡路径研究进展[J]. *环境卫生学杂志*, 2004, 31(2): 88-91
- [29] King D, Yeomanson D, Bryant H E. PI3King the lock: Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma [J]. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 2015, 37(4): 245-251
- [30] Sun Y L, Zhang X, Wang G D, Lin S, Zeng X Y, Wang Y L, Zhang Z P. PI3K-AKT signaling pathway is involved in hypoxia/thermal-induced immunosuppression of small abalone *Haliotis diversicolor*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 59: 492-508
- [31] Kabery K, Anisuzzaman M, Jeong U C, Lee D I, Yu H S, Kang S J. Effects of diets containing different concentration of *Saccharina japonica* algae on growth and interleukin (IL)-10 gene expression of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Annual Research and Review in Biology*, 2018, 29(2): 1-11
- [32] Wang M Q, Wang L L, Jia Z H, Yi Q L, Song L S. The various components implied the diversified Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in mollusk *Chlamys farreri*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 74: 205-212
- [33] Farkas T, Csengeri I, Majoros F, Oláh J. Metabolism of fatty acids in fish: III. Combined effect of environmental temperature and diet on formation and deposition of fatty acids in the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758[J]. *Aquaculture*, 1980, 20(1): 29-40
- [34] 许友卿, 郑一民, 丁兆坤. 冷应激对水生动物代谢的影响及调控研究进展[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 1149-1159
- [35] Tocher D R, Fonseca-Madrigal J, Dick J R, Ng W K, Bell J G, Campbell P J. Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 137(1): 49-63
- [36] Alzaid A, Hori T S, Hall J R, Rise M L, Gamperl A K. Cold-induced changes in stress hormone and steroidogenic transcript levels in cunner (*Tautoglabrus adspersus*), a fish capable of metabolic depression[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 224(1): 126-135
- [37] Zhang L M, Dong X C, Wang C G, Zuo Z H, Chen M. Bioaccumulation and the expression of hepatic cytochrome P450 genes in marine medaka (*Oryzias latipes*) exposed to difenoconazole[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 52: 98-104
- [38] Cheng C H, Ye C X, Guo Z X, Wang A L. Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 64: 137-145

Effects of Temperature Stress on Genes' Transcription and Expression in Juvenile *Hippocampus kuda* Bleeker

PAN Xia XU Yongjian NING Yan SHEN Xiquan*

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Zhejiang, Ningbo 315211)

Abstract: In order to investigate the changes in gene expression levels of juvenile *H. kuda* under high and low temperature stress, the transcriptome sequencing of the juvenile's liver was performed using the PE150 sequencing strategy based on the Illumina platform. Sequencing data of control group, high temperature stress group and low temperature stress group were assembled totally 22 513 single gene clusters (Unigene) were obtained, with an N50 of 2 223 bp and an average length of 1 122.71 bp. Compared with the control, 14 009 differentially-expressed genes were obtained in the high temperature group, of which 5 443 genes were up-regulated and 8 416 genes were down-regulated. Compared with the control, 20 030 differentially-expressed genes were also obtained in the low temperature group (14 016 genes were up-regulated and 6 014 genes were down-regulated). Enriched by KEGG database, the differentially-expressed genes under high/low temperature stress both caused significant changes in the antioxidant pathway-related genes (*HSP70*, *HSP90*, *SOD*, etc.) in juvenile *H. kuda*. In addition, The high temperature stress also caused significant changes in the expression of immune system-related genes (*PIK3R*, *AKT*, *IL-10*, *TLR*, etc.) and apoptosis-related genes (*CYCS*, *CASP9*, *CASP3*, etc.), while the low temperature stress caused significant changes of genes related to DNA damage repair (*MSH*, *DDB2*, *XRCC2*, *RAD52*, *OGG1*, *PMS2*, etc.), fatty acid metabolism (*StARD7*, *APOA4*, *CYP51*, *Fadsd6*, etc.) and cell apoptosis (*P21*, *P53*, *BAX*, etc.). Thirteen differentially-expressed genes such as *IL-10*, *HSP70* and *stearoyl-CoA desaturase* were selected to validate the results, and the results of RT-qPCR were almost consistent with those of RNA sequencing. This work can lay a preliminary foundation for further research on the regulation mechanism of temperature stress in *H. kuda*, and help to prevent extreme temperature damage to the culture of *H. kuda*.

Keywords: *Hippocampus kuda* Bleeker, transcriptome, differentially expressed genes