

仿刺参 7 个盐度相关基因在低盐胁迫下的表达模式

商艳鹏, 田 焱*, 李晓雨, 蒋亚男, 常亚青

(大连海洋大学水产与生命学院, 农业农村部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要:从仿刺参 *Apostichopus japonicus* 低盐转录组数据库中选取肌腱蛋白-R1 (*TN-R1*)、肌腱蛋白-R2 (*TN-R2*)、乙酰胆碱受体亚基 α -3 (*CHRNA3*)、脂肪酸结合蛋白 6 (*FABP6*)、单羧酸转运蛋白 2 (*SLC16A7*)、纤维胶凝蛋白 1 (*Fcn1*)、黑素转铁蛋白 (*Mfi2*) 共 7 个盐度调节相关基因, 利用 qRT-PCR 技术分析这 7 个基因在低盐胁迫下不同组织中的表达水平及表达丰度。结果表明 *TN-R1* 基因在仿刺参体腔液中表达水平最高, 呼吸树次之, 肠表达较低; *TN-R2* 基因在仿刺参体腔液中表达水平最高, 在肠中表达较低, 呼吸树中不表达。*SLC16A7*、*FABP6*、*Fcn1*、*CHRNA3* 和 *Mfi2* 均在体腔液中表达最高。*Mfi2* 基因在体腔液中明显上调表达, 在呼吸树组织和肠组织中下调表达, 且与对照组均呈显著性差异。*Fcn1* 在体腔液中的表达量在胁迫后 1.5 h 达到最高, 为对照组的 669 倍, 在胁迫 48 h 之前均呈明显上调。低盐胁迫下这 7 个基因表达丰度的变化, 说明这些基因或作为功能基因直接参与机体的盐度适应的代谢调节, 或作为调控基因调节盐度相关功能蛋白的表达和活性来提高仿刺参对低盐胁迫的耐受能力。上述结果表明仿刺参的盐度适应过程是一个需要多基因参与的应激反应信号转导网络, 为仿刺参盐度调节适应机制的研究奠定基础。

关键词:仿刺参; 低盐胁迫; 盐度相关基因; 表达模式分析

doi: 10.13304/j.nykjdb.2017.0789

中图分类号: S966.9

文献标识码: A

文章编号: 1008-0864(2018)11-0145-09

Expression of Seven Genes Involved in Salinity Adaption in *Apostichopus japonicus* under Low Salinity Stress

SHANG Yanpeng, TIAN Yi*, LI Xiaoyu, JIANG Yanan, CHANG Yaqing

(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs;
College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University; Liaoning Dalian 116023, China)

Abstract: Seven genes involved in salinity adaption, including Tenascin-R1 (*TN-R1*), Tenascin-R2 (*TN-R2*), Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3 (*CHRNA3*), Fatty acid-binding protein 6 (*FABP6*), Monocarboxylate transporter 2 (*SLC16A7*), Ficolin-1 (*FCN1*), and Melanotransferrin (*Mfi2*) were selected based on salty transcriptome database of *Apostichopus japonicus*. The expression profiles of these 7 genes in different tissues and different periods under low salt stress were analyzed by qRT-PCR. The results showed that the expression levels of *TN-R1*, *SLC16A7*, *FABP6* and *Fcn1* was the highest in the coelomic fluid, followed by respiratory tree and intestinal tissue. No expression of *TN-R2* was detected in respiratory tree. The expression levels of *CHRNA3* and *Mfi2* were the highest in coelomic fluid, followed by intestinal tissue and respiratory tree. The expression levels of these 7 genes increased or decreased during low salt stress. Gene *Mfi2* was up-regulated in the coelomic fluid and significantly down-regulated in the respiratory tree and intestinal tissue. The expression of *FCN1* in the coelomic fluid reached the highest level after low salt stress for 1.5 h, 669 times higher than that of the control group. The changes of these 7 genes under low salt stress showed that these genes were either directly involved in the metabolic regulation as functional proteins or as a regulated protein to regulate the expression and activity of functional proteins to improve adaption to low salt stress. The results suggest that the salinity adaptation process of sea cucumber is a stress response

收稿日期: 2017-11-15; 接受日期: 2018-02-01

基金项目: 辽宁省教育厅项目 (L201620); 农业部北方海水增养殖重点实验室项目 (2015-MSENC-KF-02) 资助。

作者简介: 商艳鹏, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: 1329395382@qq.com。* 通信作者: 田 焱, 副教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: tianyi@dlou.edu.cn

signal transduction network requiring multiple genes. These results laid a foundation for studying the salinity adaptation mechanism of *Apostichopus japonicus*.

Key words: *Apostichopus japonicus*; low salinity stress; salinity related gene; expression analysis

仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)属棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、楯手目(Aspidochirota)、仿刺参科(Stichopodidae)、仿刺参属(*Apostichopus*),是一种营底栖碎屑食性的海洋生物^[1,2]。仿刺参广泛分布在热带和亚热带海洋沿海地区,包括日本、中国、韩国和远东俄罗斯。仿刺参的养殖池塘多位于潮间带,海水盐度变化会影响其正常生长发育,导致病害发生^[3]。有研究显示盐度变化对仿刺参的呼吸排泄系统影响显著^[4],并且从呼吸和排泄的角度,发现在高温(25.3~26.5℃)条件下,幼参盐度在23‰~35‰、1龄参盐度在20‰~35‰范围内具有较好的渗透调节能力,而幼参在盐度20‰、1龄参在盐度16‰的低温胁迫下代谢功能较弱。孙双双等^[5]认为盐度的变化会对仿刺参的消化酶活力产生影响,进而影响其消化系统。马峻峰^[6]研究发现当盐度在22‰~32‰之间,仿刺参的平均增长体重随盐度的增加而增加,当盐度大于32‰时,仿刺参的平均增长体重随盐度的增加而减少。王冲等^[7]认为盐度的变化能够影响仿刺参的活动,低盐度胁迫对仿刺参的影响更大。Geng等^[8]测定了仿刺参在急性盐胁迫下的体腔液渗透压、离子浓度和 Na^+/K^+ -ATPase酶活性及组织学变化,以评定仿刺参的耐盐性。也有研究发现海参免疫反应和盐度的变化有着重要的关系^[9]。

目前,研究者们已经对许多海洋经济动物开展了盐度调控相关基因的研究工作。田焱等^[10]研究表明低盐胁迫下DD104基因表达量的变化规律显示该基因可能与渗透胁迫密切相关。有研究表明溶菌酶的 Na^+/K^+ -ATPase、NKCC1和 Ca^{2+} -ATPase基因在渗透调节过程中可能存在协同效应^[11]。蒋玫等^[12]对鲻鱼*Mugil cephalus*鳃组织的盐度变化研究表明, Na^+/K^+ -ATPase β 和NKCC1a适宜作为鱼类鳃组织在低盐胁迫下渗透调控基因的潜在分子标志物。Hsp70、Hsp90、Hsp90b是仿刺参中盐度胁迫的重要响应因子^[13]。王亚男等^[14]研究发现在一定盐度和温度范围内,通过中心复合设计和响应曲面分析法分析发现,

Hsp70在马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)鳃中的表达量的二次效应显著。Zhang等^[15]将仿刺参暴露于高盐度和低盐度中,鉴定仿刺参在适应盐度变化的渗透特异性差异表达基因(DEG)。可见,目前国内外对仿刺参盐度适应机制相关基因的研究相对较少。本研究从低盐转录组数据中筛选显著差异表达基因,且选取参与盐度适应过程的与脂肪酸代谢、转运介质及信号转导相关的基因,包括:肌腱蛋白-R1(*Tenascin-R1*, *TN-R1*)、肌腱蛋白-R2(*Tenascin-R2*, *TN-R2*)、乙酰胆碱受体亚基 α -3(*CHRNA3*)、脂肪酸结合蛋白6(*FABP6*)、单羧酸转运蛋白2(*SLC16A7*)、纤维胶凝蛋白1(*Fcn1*)和黑素转铁蛋白(*Mfi2*)。对这七个基因进行功能验证及后续基因沉默研究,探讨低盐胁迫下仿刺参膜转运及信号转导相关基因的表达,初步解析仿刺参对盐度变化的渗透调节响应机制,以期丰富仿刺参的生理生态学理论,为养殖生产中的水质调控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用的仿刺参取自辽宁省大连市瓦房店附近海域,暂养于农业农村部北方海水增养殖重点实验室。实验用仿刺参平均体重为 25 ± 3.4 g,暂养期间水温保持 $16.8\pm 0.2^\circ\text{C}$, pH 8.3,每日换水投饵1次,实时检测水质。

1.2 实验设计

实验选取正常盐度(32‰)的仿刺参作为对照组,18‰的仿刺参为目标组。18‰的海水由天然滤砂海水和曝气除氯的淡水配制而成。低盐胁迫设置1.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h和72 h七个时间点进行处理,每个时间点取3头仿刺参迅速解剖,取其体腔液、呼吸树、肠置于液氮中,速冻后保存于 -80°C 冰箱中备用。

1.3 引物设计与筛选

选取 β -actin作为内参基因,对*TN-R1*、*TN-R2*、*CHRNA3*、*FABP6*、*SLC16A7*、*Fcn1*和*Mfi2*共7个目标基因和内参基因进行引物设计。引物通过

软件 Primer 5 进行设计,由上海生工生物工程股份有限公司合成。通过普通 PCR 结合荧光定量 PCR 对引物进行筛选。七个基因和内参基因的引物序列及产物长度详见表 1。

表 1 仿刺参盐度相关基因的引物信息
Table 1 Primers of osmoregulation related genes in *Apostichopus japonicus*.

基因 Gene name	上游引物序列(5'→3') Sense primer sequence (5'→3')	下游引物序列(5'→3') Anti-sense primer sequence (5'→3')	产物大小 (bp) Product length (bp)
<i>TN-R1</i>	GTTGCGATCACTGCCAGGTA	TGCCTGGTGGTACGTTGATT	72
<i>TN-R2</i>	GTTGCGATCACTGCCAGGTA	TGCCTGGTGGTACGTTGATT	72
<i>CHRNA3</i>	GAAGAAGGCCATGCAGGATA	TCTCACGGTTCAGAGTGTGG	80
<i>FABP6</i>	GCAATGCACGAATGTTCACT	CAATCCAGCTCCGCTCTTAC	90
<i>SLC16A7</i>	CGCCGATACTCGAAGAGACT	ATTCCATGCTGATTGCCATT	80
<i>Fcn1</i>	ATGACCGTCCATCCTCCTGT	TGTCGAGATGTCCAACGTCA	91
<i>Mfi2</i>	GCTCGTGTCACTGCGATACC	GCAGACCTTATCACGCTGGA	88
<i>β-actin</i>	CGGCTGTGCTGCTGAAGGAGTA	TCATGGACTCAGGAGACGGTGTG	144

1.4 荧光定量 PCR

分别取正常盐度养殖条件下的健康仿刺参以及各时间点的 3 头仿刺参的肠、呼吸树、和体腔液,按照动物组织总 RNA 提取试剂盒 (RNAprep pure Tissue Kit, TIANGEN) 提取 RNA。按照 TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit 说明书,将 RNA 反转录成 cDNA 第一链;将同一条件下同一种组织的 3 个 RNA 样品,按每个样品 300 ng 反转录成 900 ng 的 cDNA 第一链。用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 及 cDNA 的完整性,同时用 Nano Drop ND-1000 微量紫外/可见分光光度计测定总 RNA 浓度。荧光定量 PCR 使用 ABI 7500 Real-Time PCR 扩增仪,采用 SYBR Green I 嵌合荧光法,按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 使用说明书进行扩增反应。

PCR 反应体系为:SYBR® Premix Ex Taq™ (2×) 10 μL,ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL, DNA 模板 1.0 μL,上下游引物各 0.8 μL (10 mmol/L),加 ddH₂O 定容至 20.0 μL。反应程序:第一步:95℃ 预变性 30 s;第二步:95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 32 s,循环 40 次;第三步:95℃ 15 s, 60℃ 1 min,95℃ 5 s,60℃ 15 s,循环 1 次。

1.5 数据处理

以 *β-actin* 作为内参基因,计算目的基因的相对表达量。

相对表达量 =
$$2^{-[(Ct_{\text{待测组目的基因}} - Ct_{\text{待测组内参基因}}) - (Ct_{\text{对照组目的基因}} - Ct_{\text{对照组内参基因}})]}$$

利用 SPSS 16.0 软件对数据进行显著性检验,差异显著水平设置为 $P < 0.05$,对存在显著差异的数据用 Duncan 法进行数据间多重比较。

2 结果与分析

2.1 低盐胁迫下肌腱蛋白-R 基因在仿刺参不同组织中的时空表达

TN-R1 在低盐胁迫下不同时间点仿刺参各组织中的表达结果如图 1 所示,在体腔液中,除了 72 h 外,其他各个时间点的表达量明显高于对照组,在胁迫后 12 h 达到最大值,为对照组的 302 倍,之后其表达量开始降低,72 h 时显著低于对照组。在肠组织中,*TN-R1* 基因的表达量除胁迫后 1.5 h 外均低于对照组,并且在胁迫后 3 h、6 h、12 h、24 h 和 72 h 的表达量与对照组存在显著性差异。在呼吸树组织中,在胁迫后 1.5 h 达到最大值,为对照组的 8 倍。

TN-R2 在低盐胁迫下不同时间点仿刺参各组织中的表达结果如图 2 所示,在体腔液中,胁迫后 1.5 h 该基因表达量达到最大值,为对照组的 22 倍,胁迫后 72 h 达到最低值,在胁迫后 1.5 h、3 h、12 h 和 72 h 的表达量与对照组也存在显著性差异。在肠组织中,胁迫 48 h 之前的表达量均低于对照组,在胁迫后 72 h 表达量达到了最大值,为对照组的 16 倍,且与对照组存在显著性差异。在呼吸树组织中,*TN-R2* 基因表达量除胁迫后 72 h 外,其余与对照组均显著性差异。

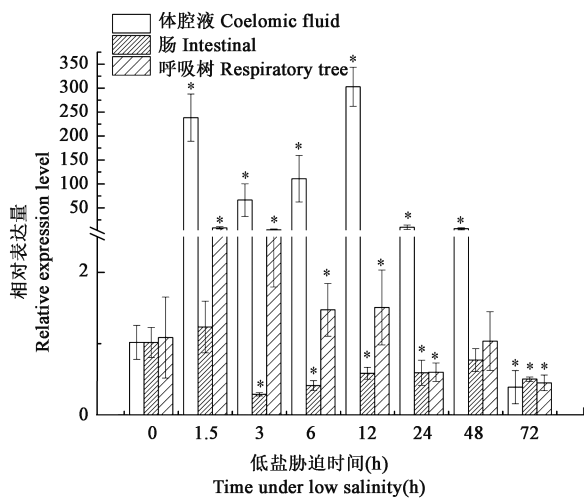


图1 低盐胁迫下 *TN-R1* 各组织不同时间段的表达

Fig.1 Gene expression of *TN-R1* in different issues of different time under low salinity stress.

注: * 表示实验组与对照组之间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: * indicates the significant difference at $P<0.05$ level between control and experiment groups.

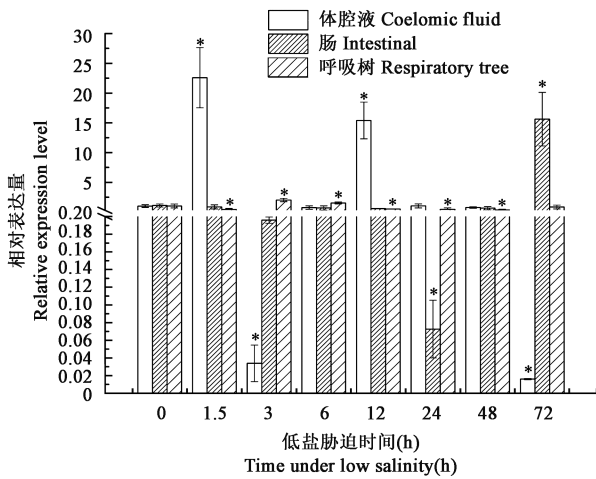


图2 低盐胁迫下 *TN-R2* 基因各组织不同时间段的表达

Fig.2 Gene expression of *TN-R2* in different issues of different time under low salinity stress.

注: * 表示实验组与对照组之间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: * indicates the significant difference at $P<0.05$ level between control and experiment groups.

2.2 低盐胁迫下 *CHRNA3* 在仿刺参不同组织中的时空表达

CHRNA3 基因在低盐胁迫下不同组织的表达结果见图3,可见 *CHRNA3* 基因在三个组织中总体表达趋势是先升高后下降的趋势。体腔液组织中,48 h 之前的 *CHRNA3* 基因表达量呈现上调表

达,在 1.5 h、3 h、48 h 的表达量与对照组差异显著并在胁迫后 48 h 达到最大值。肠组织中,胁迫后 1.5 h、6 h、24 h 和 72 h 的表达量与对照组差异显著,并在 6 h 达到最高值,是对照组的 2 倍,72 h 达到最低值。在呼吸树组织中,呈现 3 h 的短暂上调后出现下调趋势,并在 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 与对照组有显著性差异。

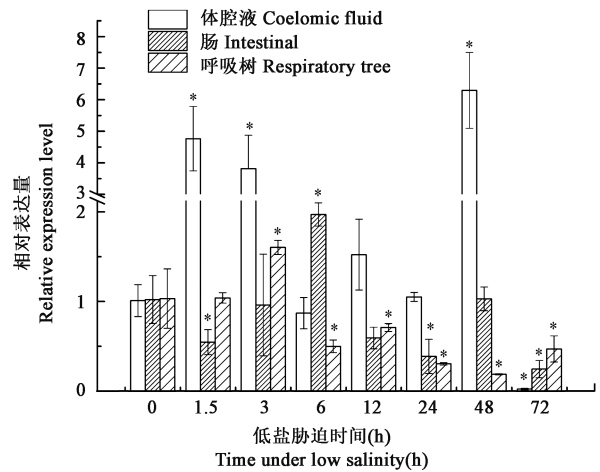


图3 低盐胁迫下 *CHRNA3* 基因各组织不同时间段的表达

Fig.3 Gene expression of *CHRNA3* in different issues of different time under low salinity stress.

注: * 表示实验组与对照组之间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: * indicates the significant difference at $P<0.05$ level between control and experiment groups.

2.3 低盐胁迫下 *FABP6* 基因在仿刺参不同组织中的时空表达

在低盐胁迫下, *FABP6* 在仿刺参不同组织的表达量情况如图4所示,在体腔液中,该基因的表达量在胁迫后 1.5 h 开始逐渐升高,至胁迫后 6 h 开始逐渐降低,在胁迫后 72 h 达到最大值,为对照组的 2 396 倍,与对照组有显著性差异。在肠组织中,胁迫后 1.5 h 存在较低上调表达,之后其表达量逐渐降低,至胁迫后 6 h 达到最低值。胁迫后 12 h、24 h、48 h、72 h 的表达量又逐渐上调,并且在胁迫后 48 h 达到最高值,是对照组的 7.69 倍,与对照组存在显著性差异。在呼吸树组织中,胁迫后 3 h 和 24 h 呈现上调表达,在胁迫后 24 h 达到最大值,且与对照组有显著性差异,为对照组的 548 倍,其余胁迫后各时间点都呈下调表达,其中在胁迫 1.5 h 达到最低值。

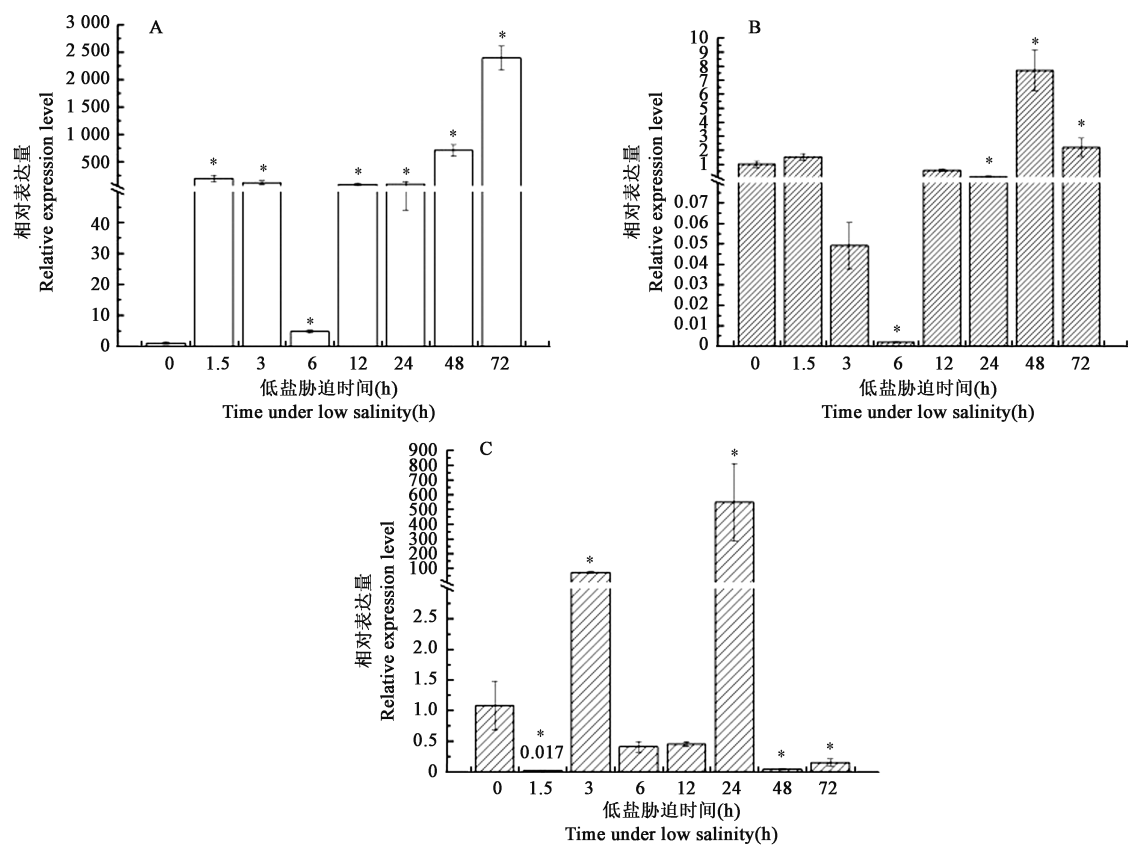


图 4 低盐胁迫下 *FABP6* 基因在各组织中不同时段表达

Fig.4 Gene expression of *FABP6* in different issues of different time under low salinity stress.

注:A.体腔液; B.肠; C.呼吸树。*表示实验组与对照组之间差异显著($P<0.05$)。
Note: A.Coelomic fluid; B.Intestinal; C.Respiratory tree. * indicates the significant difference at $P<0.05$ level between control and experiment groups.

2.4 低盐胁迫下 *SLC16A7* 基因在仿刺参不同组织中的时空表达规律

由 *SLC16A7* 在低盐胁迫不同时间不同组织中的表达结果(图 5)可以看出,在体腔液中,除胁迫后 6 h 和 12 h 的表达量与对照组差异不显著外,其余均显著。在肠组织中,*SLC16A7* 在胁迫后 12 h 上调表达,其余时间点均表现为下调表达,在胁迫后 6 h、24 h 和 72 h 的表达量与对照组差异显著。该基因在呼吸树组织中表达比较活跃,胁迫后表达量上调,在 3 h 后达到最高,为对照组的 14 倍,而后降低,在胁迫后 1.5 h、3 h、12 h、48 h 和 72 h 的表达量与对照组差异显著。

2.5 低盐胁迫下 *Fcn1* 基因在仿刺参不同组织中的时空表达

Fcn1 基因在低盐胁迫不同时间各组织中的表达结果(图 6)显示,体腔液组织中,除胁迫后 72 h 下调,其余均为上调,并在胁迫后 1.5 h、6 h、

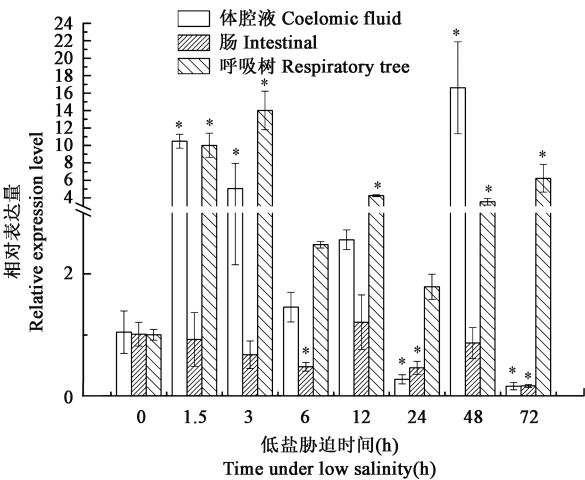


图 5 低盐胁迫下 *SLC16A7* 基因各组织不同时段表达

Fig.5 Gene expression of *SLC16A7* in

different issues of different time under low salinity stress.

注: *表示实验组与对照组之间差异显著($P<0.05$)。
Note: * indicates the significant difference at $P<0.05$ level between control and experiment groups.

12 h、24 h、48 h 和 72 h 与对照组存在显著性差异。肠组织中, *Fcn1* 在胁迫后表达量除胁迫后 12 h 外逐渐升高至 72 h 后下降至对照组的水平, 在胁迫后 1.5 h、3 h、24 h 和 48 h 的表达量与对照组有显著性差异, 且在胁迫后 48 h 达到最大值, 为对照组的 2.8 倍。在呼吸树组织中, *Fcn1* 基因表达相对活跃, 各个时间点的表达量全部高于对照组, 在胁迫后 1.5 h、3 h、12 h、48 h 和 72 h 的表达量与对照组存在显著性差异。

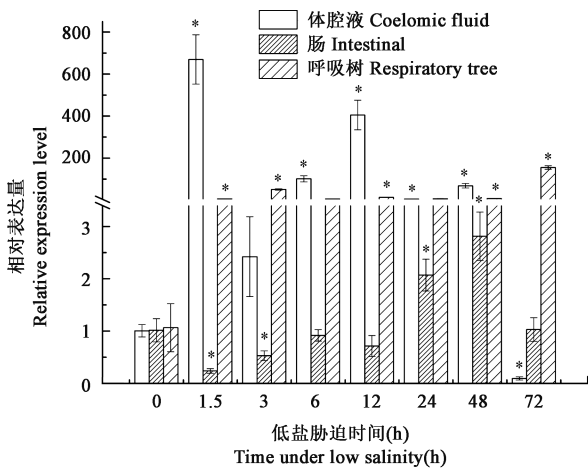


图 6 低盐胁迫下 *Fcn1* 基因各组织不同时间段的表达

Fig.6 Gene expression of *Fcn1* in different issues of different time under low salinity stress.

注: * 表示实验组与对照组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: * indicates the significant difference at $P < 0.05$ level between control and experiment groups.

2.6 低盐胁迫下 *Mfi2* 在仿刺参不同组织中的时空表达

Mfi2 在低盐胁迫下仿刺参各组织中不同时间点的表达量结果如图 7 所示, 在体腔液中, 其表达量逐渐升高, 在胁迫后 12 h 达到最大值, 为对照组的 12 倍, 且在胁迫后 3 h、6 h、12 h 和 24 h 与对照组有显著性差异。在肠组织中, 其表达量在 1.5 h 上调后, 均显著下调, 并且在胁迫后的各时间段均与对照组有显著性差异。在呼吸树中, 其表达量均显著下调, 且胁迫后各时间段均与对照组有显著性差异。

3 讨论

肌腱蛋白-R 属于与细胞外基质 (ECM) 密切相关的糖蛋白家族, 可以与不同的细胞类型粘合

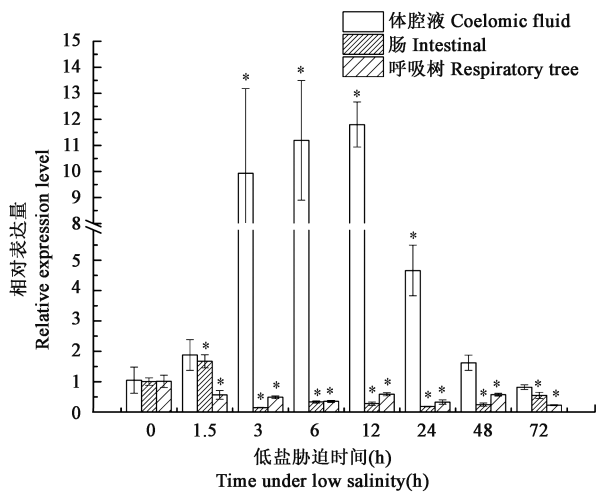


图 7 低盐胁迫下 *Mfi2* 基因各组织不同时间段的表达

Fig.7 Gene expression of *Mfi2* in different

issues of different time under low salinity stress.

注: * 表示实验组与对照组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: * indicates the significant difference at $P < 0.05$ level between control and experiment groups.

或抗粘附^[16~18], 在细胞识别中具有重要作用。Zhao 等^[19]在太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的研究表明, 低盐应激能够诱导涉及细胞粘附、信号转导、离子通道和免疫应答的基因表达。本实验仿刺参的低盐应激结果与太平洋牡蛎的研究结果一致, 仿刺参受到低盐应激后, 作为细胞识别中细胞间粘附的重要分子 *TN-R1* 和 *TN-R2*, 均表现出不同的表达图谱 (图 1 和图 2), 推测 TN-R 可能通过细胞间的识别与互作来参与仿刺参的盐度适应过程。有研究报道 TN-R 作为细胞外基质分子与钠通道相结合, 在钠通道的活性中起关键作用, 是电压门控钠通道 β 亚基的功能调节剂^[20,21], 也是神经系统维持动态平衡的重要成分^[22,23]。本研究结果中 *TN-R1* 和 *TN-R2* 在仿刺参低盐胁迫下均有不同程度表达 (图 1 和图 2), 推测 TN-R 可能参与仿刺参的盐度适应过程, 并在其适应过程中发挥重要作用。但是 TN-R 是通过细胞间的识别发挥作用还是通过与通道结合来参与仿刺参的盐度适应过程, 则需要后续实验进一步验证。

CHRNA3 是烟碱乙酰胆碱受体家族的成员之一, 具有胞外配体门控离子通道活性和配体门控离子通道活性, 在结合乙酰胆碱后, *CHRNA3* 通过构象变化导致穿过质膜的离子传导通道的开放^[24]。本研究结果中, *CHRNA3* 在盐度胁迫后不

同时时间点不同组织中均有表达,而且呈现不同的波动趋势,推测 *CHRNA3* 可能通过构象的改变导致仿刺参离子通路的变化而参与仿刺参的盐度适应过程。

FABP6 是细胞内细胞质脂肪酸结合家族的高度保守成员,其结合胆汁酸,长链脂肪酸和其他疏水配体^[25],并能结合类固醇和磷脂的多功能转运蛋白^[26],其主要作用包括脂肪酸摄取、运输和代谢。有研究表明 *FABP6* 还具有抗氧化作用,可以通过灭活活性脂类物质来保护细胞的完整性^[27]。Fiol 等^[28] 在罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 盐度应激响应分子机制的研究中,发现盐度诱导后罗非鱼基因表达可以组成一个应激反应信号转导网络,该网络包含 11 个已知罗非鱼基因,认为 *FABP6* 基因可能在罗非鱼盐度应激过程中,保护细胞膜和脂质免受盐度诱导的损伤中发挥作用。本实验结果中 *FABP6* 在仿刺参盐度胁迫诱导下也有不同程度的表达,说明仿刺参的盐度应激也需要 *FABP6* 的参与。

SLC16A7 属于催化单羧酸盐的质子连接转运蛋白家族,催化许多单羧酸盐(如衍生自缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的乳酸、丙酮酸、支链氧代酸、以及酮体乙酰乙酸酯、乙酸酯和 β -羟基丁酸酯)的快速跨膜转运,是许多细胞过程调节的关键^[29,30]。本实验中 *SLC16A7* 在低盐胁迫后仿刺参的体腔液和呼吸树中均有不同程度的高表达,推测仿刺参的盐度适应过程可能需要分解氨基酸产生乳酸等能够提供能量的单羧酸转运蛋白参与。*SLC16A7* 在肠组织中表达不显著,说明 *SLC16A7* 可能存在组织特异性。

Endo 等^[31] 发现纤维胶凝蛋白(ficolins)是一种补体激活分子,属于防御性胶原蛋白家族,能够识别病原体表面的特定聚糖,触发激活凝集素补体途径并介导识别目标的吞噬作用。此外, Honore 等^[32], Jensen 等^[33] 和 Kuraya 等^[34] 证明了纤维胶凝蛋白能够清除死亡细胞和细胞碎片。Genster 等^[35] 认为 *Fcn1* 是先天免疫和适应性免疫之间的新连接桥梁。本研究结果显示免疫相关因子 *Fcn1* 在低盐胁迫下各组织均高表达,研究结果与盐胁迫下中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)的结果相似,中华绒螯蟹和南美白对虾在低盐度胁迫下先天免疫信号转导的基因上调表达^[36]。与其他无脊椎动

物一样,仿刺参缺乏适应性免疫系统,并依赖各种先天免疫反应^[37],通过信号转导途径激活多种体液和细胞免疫活性^[38]来维持机体的平衡。这些结果表明,低盐度可能激发仿刺参先天免疫,进而通过激活免疫信号转导相关基因来适应盐度胁迫。

Suryo 等^[39] 研究发现 *Mfi2* 调控的基因产物参与膜转运、硫酸素磷酸化和增殖/存活。其中 *Mfi2* 调控的三磷酸腺苷结合转运子 B 亚族成员 5 (*ABCB5*)能够在低盐环境通过跨膜转运维持体内渗透压稳定具有重要作用,这与本研究结果中 *Mfi2* 在体腔液中高表达相一致。本研究发现,在肠和呼吸树组织中,在胁迫后各时间点的表达量均呈下调,并且全部与对照组有显著差异,推测 *Mfi2* 的表达具有组织特异性。这与 Nakamasu 等^[40] 在成年小鼠各种组织中, *Mfi2* 表达模式不同一致,尤其是在皮肤和肠中以非常低的水平表达,在心脏、肾脏、胃和肝脏几乎不表达。

综上所述,可见这 7 个基因在低盐诱导胁迫下均有不同程度的表达,说明仿刺参的盐度适应过程可能是一个需要多基因参与的应激反应信号转导网络,该网络包含有粘附识别功能的肌腱蛋白,有胞外配体门控离子通道活性和配体门控离子通道活性的 *CHRNA3*,脂肪酸摄取、运输和代谢相关的脂肪酸结合蛋白,单羧酸转运蛋白,纤维胶凝蛋白补体激活因子和参与膜转运的黑素转铁蛋白多种因子参与的过程。

对于仿刺参盐度适应过程的研究结果存有不同意见, Binyon^[41] 和 Walter^[42] 研究认为,大多数棘皮动物虽然不具备稳定完善的渗透调节能力,但海参在低盐和高盐介质中具有一定程度的渗透调节能力。Vidolin 等^[43] 报道,灰海参(*Holothuria grisea*)能暂时调节其体腔液的渗透压。Wang 等^[44] 和 Dong 等^[45] 报道, *HSP70*、*HSP90*、*SOD* 的上调表达可能会通过改变生化代谢途径和能量平衡来缓解海参的盐度胁迫。在本研究中,7 个盐度相关基因均被诱导表达,且呈现出上升和下降的波动表达趋势,分析结果认为仿刺参具有一定的盐度调节和适应能力。本研究结果将有助于理解仿刺参的盐度适应过程,为仿刺参的基础生物学研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Kang K H, Kwon J Y, Yong M K. A beneficial coculture:

- charm abalone *Haliotis discus hannai* and sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 2003, 216(1): 87-93.
- [2] 袁秀堂, 杨红生, 周毅, 等. 盐度对仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 呼吸和排泄的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 2006, 37(4): 348-354.
- Yuan X T, Yang H S, Zhou Y, *et al.* Salinity effect on respiration and excretion of sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka [J]. *Oceanol. Limnol. Sin.*, 2006, 37(4): 348-354.
- [3] Wang Q L, Yu S S, Qin C X, *et al.* Combined effects of acute thermal and hypo-osmotic stresses on osmolality and *hsp70*, *hsp90* and *sod* expression in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka [J]. *Aquacult. Int.*, 2014, 22(3): 1149-1161.
- [4] 薛素燕, 方建光, 毛玉泽, 等. 高温下不同盐度对仿刺参幼参和 1 龄参呼吸排泄的影响 [J]. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 975-980.
- Xue S Y, Fang J G, Mao Y Z, *et al.* Effects of salinity on the respiration and ammonia excretion of sea cucumber *Apostichopus japonicus* under high temperature [J]. *J. Fish. Sci. China*, 2009, 16(6): 975-980.
- [5] 孙双双, 张云. 盐度对仿刺参消化酶活力的影响 [J]. *中国饲料*, 2009(24): 28-31.
- Sun S S, Zhang Y. Effect of salinity on digestive enzyme activity of sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *China Feed*, 2009(24): 28-31.
- [6] 马峻峰. 盐度对仿刺参生长和行为的影响 [J]. *中国水产*, 2012(9): 70-71.
- Ma J F. Effect of salinity on growth and behavior of sea cucumber [J]. *China Fish.*, 2012(9): 70-71.
- [7] 王冲, 田焱, 常亚青, 等. 盐度胁迫对仿刺参非特异性免疫酶的影响 [J]. *中国农业科技导报*, 2013(3): 163-168.
- Wang C, Tian Y, Chang Y Q, *et al.* Effect of salinity stress on immune enzyme activity of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. *J. Agric. Sci. Technol.*, 2013(3): 163-168.
- [8] Geng C, Tian Y, Shang Y, *et al.* Effect of acute salinity stress on ion homeostasis, Na^+/K^+ -ATPase and histological structure in sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 1977.
- [9] Wang F, Yang H, Gao F, *et al.* Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 2008, 151(4): 491-498.
- [10] 田焱, 莫海波, 常亚青. 低盐胁迫下仿刺参 *DD104* 基因的定量表达分析 [J]. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(3): 236-240.
- Tian Y, Mo H B, Chang Y Q. Expression of *DD104* gene in sea cucumber *Apostichopus japonicus* under salinity stress [J]. *J. Dalian Ocean U.*, 2013, 28(3): 236-240.
- [11] Tian Y, Jiang Y, Shang Y, *et al.* Establishment of lysozyme gene RNA interference system and its involvement in salinity tolerance in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. *Fish Shellfish Immun.*, 2017(65): 71-79.
- [12] 蒋玫, 李磊, 沈新强, 等. 鲷鱼鳃组织 14-3-3a、NKCCla、Apo-14 和 Na^+/K^+ -ATPase β 基因表达对盐度变化的响应 [J]. *生态杂志*, 2014, 33(9): 2429-2435.
- Jiang M, Li L, Shen X Q, *et al.* Effects of abrupt salinity stress on gill 14-3-3a, NKCCla, Apo-14 and Na^+/K^+ -ATPase β [J]. *Chin. J. Ecol.*, 2014, 33(9): 2429-2435.
- [13] 于姗姗, 王青林, 孟宪亮, 等. 盐度骤变对仿刺参 *hsp70* 及 *hsp90* 基因表达的影响 [J]. *中国海洋大学学报 (自然科学版)*, 2012, 42(9): 22-27.
- Yu S S, Wang Q L, Meng X L, *et al.* Effects of salinity fluctuation on the expression of *hsp70* and *hsp90s* genes in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka [J]. *Periodical Ocean Univ. China*, 2012, 42(9): 22-27.
- [14] 王亚男, 王辉, 朱晓闻, 等. 温度、盐度对马氏珠母贝 *Hsp70* 基因表达量的联合效应 [J]. *应用生态学报*, 2012, 23(12): 3467-3473.
- Wang Y N, Wang H, Zhu X W, *et al.* Joint effects of water temperature and salinity on the expression of gill *Hsp70* gene in *Pinctada martensii* (Dunker) [J]. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2012, 23(12): 3467-3473.
- [15] Zhang L B, Feng Q, Sun L, *et al.* Differential gene expression in the intestine of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) under low and high salinity conditions [J]. *Comp. Biochem. Physiol. D*, 2018, 3(25): 34-41.
- [16] Morganti M C, Taylor J, Pesheva P, *et al.* Oligodendrocyte-derived J1-160/180 extracellular matrix glycoproteins are adhesive or repulsive depending on the partner cell type and time of interaction [J]. *Exp. Neurol.*, 1990, 109(1): 98-110.
- [17] Pesheva P, Gennarini G, Goridis C, *et al.* The F3/11 cell adhesion molecule mediates the repulsion of neurons by the extracellular matrix glycoprotein J1-160/180 [J]. *Neuron*, 1993, 10(1): 69-82.
- [18] Scachnep M. Neural recognition molecules in disease and regeneration [J]. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1994, 4(5): 726-734.
- [19] Zhao X, Yu H, Kong L, *et al.* Transcriptomic responses to salinity stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Plos One*, 2012, 7(9): e46244.
- [20] Srinivasan J, Schachner M, Catterall W A. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(26): 15753-15757.
- [21] Xiao Z C, Ragsdale D S, Malhotra J D, *et al.* Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel β subunits [J]. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(37): 26511-26517.
- [22] Brenneke F, Bukalo O, Dityatev A, *et al.* Mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R show physiological and structural hallmarks of increased hippocampal excitability, but no increased susceptibility to seizures in the pilocarpine model of epilepsy [J]. *Neuroscience*, 2004, 124(4): 841-855.
- [23] Saghatelian A K, Dityatev A, Schmidt S, *et al.* Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R [J]. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2001, 17(1): 226-240.
- [24] Petrovsky N, Ettinger U, Kessler H, *et al.* The effect of

- nicotine on sensorimotor gating is modulated by a CHRNA3 polymorphism [J]. *Psychopharmacology*, 2013, 229(1): 31–40.
- [25] Da B, Ma S, Av H, *et al.*. Intracellular lipid-binding proteins and their genes [J]. *Annu. Rev. Nutr.*, 1997, 17(1): 277–303.
- [26] Rassart E, Bedirian A, Doc S, *et al.*. Apolipoprotein D [J]. *BBA-Protein Struct. M.*, 2000, 1482(1–2): 185–198.
- [27] Bennaarsiden A, Higgins L, Herrtzel A V, *et al.*. Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal *in vitro* and *in vivo*. Evidence for a role in antioxidant biology [J]. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(52): 50693–50702.
- [28] Fiol D F, Chan S Y, Kltz D. Identification and pathway analysis of immediate hyperosmotic stress responsive molecular mechanisms in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gill [J]. *Comp. Biochem. Physiol. D*, 2006, 1(3): 344–356.
- [29] Halestrap A P. The SLC16 gene family-structure, role and regulation in health and disease [J]. *Mol. Aspects Med.*, 2013, 34(2–3): 337–349.
- [30] You G, Morris M E. Overview of Drug Transporter Families [A]. In: *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition* [M]. John Wiley & Sons, Inc., 2006, 1–10.
- [31] Endo Y, Matsushita M, Fujita T. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis [J]. *Immunobiology*, 2007, 212(4–5): 371–379.
- [32] Honor C, Hummelshoj T, Hansen B E, *et al.*. The innate immune component ficolin 3 (*Hakata antigen*) mediates the clearance of late apoptotic cells [J]. *Arthritis Rheumatol.*, 2007, 56(5): 1598–1607.
- [33] Jensen M L, Honor C, Hummelsh J T, *et al.*. Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells [J]. *Mol. Immunol.*, 2007, 44(5): 856–865.
- [34] Kuraya M, Ming Z, Liu X, *et al.*. Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation [J]. *Immunobiology*, 2005, 209(9): 689–697.
- [35] Genster N, Ma Y J, Munthe-Fog L, *et al.*. The pattern recognition molecule ficolin-1 exhibits differential binding to lymphocyte subsets, providing a novel link between innate and adaptive immunity [J]. *Mol. Immunol.*, 2014, 57(2): 181–190.
- [36] Li E, Wang S, Li C, *et al.*. Transcriptome sequencing revealed the genes and pathways involved in salinity stress of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Physiol. Genomics*, 2014, 46(5): 177–190.
- [37] Li F, Xiang J. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China [J]. *Dev. Comp. Immunol.*, 2013, 39(1–2): 11–26.
- [38] Li F, Xiang J. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp [J]. *Fish Shellfish Immun.*, 2013, 34(4): 973–980.
- [39] Suryo Rahmanto Y, Dunn L L, Richardson D R. Identification of distinct changes in gene expression after modulation of melanoma tumor antigen p97 (melanotransferrin) in multiple models *in vitro* and *in vivo* [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(10): 2172–2183.
- [40] Nakamasu K, Kawamoto T, Shen M, *et al.*. Membrane-bound transferrin-like protein (Mtf): structure, evolution and selective expression during chondrogenic differentiation of mouse embryonic cells [J]. *BBA-Gene Struct. Expr.*, 1999, 1447(2–3): 258–264.
- [41] Binyon J. Physiology of echinoderms [J]. *Physiol. Echinoderms*, 1972: 200–240.
- [42] Walter J. Diehl. Osmoregulation in echinoderms ☆ [J]. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 1986, 84(2): 199–205.
- [43] Vidolin D, Santos-Gouvea IA, Freire CA. Osmotic stability of the coelomic fluids of a sea-cucumber (*Holothuria grisea*) and a starfish (*Asterina stellifera*) exposed to the air during low tide: a field study [J]. *Acta Biol. Par.*, 2002, 31(1–2): 113–121.
- [44] Wang Q L, Yu S S, Qin C X, *et al.*. Combined effects of acute thermal and hypo-osmotic stresses on osmolality and *hsp70*, *hsp90* and *sod* expression in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka [J]. *Aquacult. Int.*, 2014, 22(3): 1149–1161.
- [45] Dong Y, Dong S, Meng X. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) [J]. *Aquaculture*, 2008, 276(1–4): 179–186.

(责任编辑:温小杰,李爱花)