

基于转录组探讨中国圆田螺在干旱胁迫下休眠特征

唐胜^① 卢想^① 朱颖^② 董学颖^② 唐俊^②
刘秋宁^② 王刚^{②*} 唐伯平^{①②*}

① 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; ② 盐城师范学院湿地学院 盐城 224000

摘要: 中国圆田螺 (*Cipangopaludina chinensis*) 属于淡水大型螺类, 适应性强, 分布广泛, 在极端环境下能够迅速进入休眠状态, 以抵御不良环境对自身造成的影响。为研究其在干旱胁迫下的休眠特征, 应用高通量测序技术对中国圆田螺在干旱胁迫下肝与肾组织进行转录组测序及分析。结果显示, 中国圆田螺在干旱休眠时与正常有水养殖相比, 其肾组织中 110 个基因上调, 389 个基因下调; 在肝组织中有 84 个基因上调, 86 个基因下调。肝组织差异基因主要与细胞黏附的调节、细胞外基质组织生长、神经元投射和轴突再生等功能相关; 肾组织差异基因与碳水化合物代谢过程、去磷酸化、上皮细胞增殖调节、羟酸有机酸跨膜转移、组织重塑等功能相关; KEGG 富集分析发现, 差异基因主要定位在 PI3K-Akt 信号通路、蛋白聚糖、乳糖、鞘脂的合成代谢通路等与干旱胁迫相关的主要代谢通路上。研究表明, 热激蛋白基因 *Hsp70*、*SRCR*、*FASN*、*APMAP*、*MSTN*、*Poc1b*、*S1P*、*Na⁺-K⁺-ATP 酶 β1 亚基* 及 *SLC28A3* 基因在中国圆田螺干旱休眠时开启自身调节, 田螺通过调控不同基因, 启动阻隔自身对外界光线的感知, 停止脂肪积累、抑制肌肉生长、吞噬自身凋亡细胞获取营养、调节细胞渗透压保水等使自身快速适应干旱休眠状态。

关键词: 中国圆田螺; 转录组; 休眠; 差异表达基因; 干旱胁迫

中图分类号: Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 06-937-13

Transcriptome Analysis of the Dormancy Characteristic Mechanism of *Cipangopaludina chinensis* Under Drought Stress

TANG Sheng^① LU Xiang^① ZHU Ying^② DONG Xue-Yin^② TANG Jun^②
LIU Qiu-Ning^② WANG Gang^{②*} TANG Bo-Ping^{①②*}

① College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

② Collage of Wetland, Yancheng Teachers University, Yancheng 224000, China

Abstract: [Objectives] *Cipangopaludina chinensis* is widely distributed in Asia. It has strong adaptability and

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32270487), 江苏省科学技术厅重点研发计划项目 (No. BE2020673);

* 通讯作者, E-mail: 815782493@qq.com, boptang@163.com;

第一作者介绍 唐胜, 男, 硕士, 研究生; 研究方向: 无脊椎动物学; E-mail: ts297896596@sohu.com。

收稿日期: 2023-01-11, 修回日期: 2023-06-22 DOI: 10.13859/j.cjz.202323007

can quickly enter a dormancy state under drought. In this paper, we study the dormancy characteristic of *C. chinensis* under drought stress to provide a research clue for revealing the mechanism of extensive adaptive tolerance, as well as the genetics and breeding of the *C. chinensis*. **[Methods]** The samples of *C. chinensis* were collected in Yancheng. Select individuals with sound ontogeny and consistent size to temporarily keep in the laboratory for 2 days. 30 *C. chinensis* were placed in an anhydrous plastic bucket for drought stress treatment, and the room temperature was adjusted to 24 °C. 30 *C. chinensis* were placed in plastic buckets with water as control, and kept temporarily for 30 days. After 30 days, the liver and kidney tissues of the control group and the stress group were taken at random for 3 biological replications. High throughput sequencing technology was used to sequence and analyze the transcriptome of the liver and kidney tissues of *C. chinensis* under drought stress. After cleaning the raw sequencing data then we identified different expressed genes by $P < 0.05$ and $|\log_2\text{FoldChange}| > 2$. Finally, GO (gene ontology) annotation and pathway enrichment analysis of the different expressed genes have been done. **[Results]** The results showed that under drought stress, 110 genes were up-regulated and 389 genes were down regulated in the kidney tissue, 84 genes were up-regulated, and 86 genes were down-regulated in the liver tissue (Fig. 3), gene ontology is mainly related to the regulation of cell adhesion, extracellular matrix organization, neuron projection regeneration, carbohydrate metabolic process, dephosphorylation, regulation of epithelial cell proliferation, carboxylic acid, organic acid transmembrane transport, and tissue remodeling (Fig. 5); the KEGG enrichment analysis showed that the differently expressed genes were mainly enriched in PI3K-Akt signal pathway, proteoglycan, lactose, sphingolipid biosynthesis and metabolic pathway 5 that are the main pathways under drought stress (Fig. 6). **[Conclusion]** Based on the enrichment analysis results of GO and KEGG, heat shock protein genes *Hsp70*, *SRCR*, *SLC28A3*, *FASN*, *APMAP*, *MSTN*, *Poc1b*, *S1P* and $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase β Subunit 1 have been identified as important genes related to dormancy of the *C. chinensis* under drought stress.

Key words: *Cipangopaludina chinensis*; Transcriptome; Dormancy; Different expressed genes; Drought stress

生物在长期进化过程中，形成了一整套应对恶劣环境的策略，最典型的是动物的休眠，其生命活动几乎停止，生命体处在代谢抑制的非活动状态，靠自身贮存能量维持最低的生存需求（Pratihar et al. 2011）。自然环境千变万化，休眠发生主要与环境因子有着密切的关系，最主要的因素有温度、禁食、干旱等。在鱼类中，肺鱼较为典型，在干旱胁迫下，肺鱼皮肤会分泌一种黏液包裹全身，呼吸器官改为鱼鳔，随后肺鱼进入休眠状态，身体消耗降到最低（Page et al. 2010）。与活动期相比，休眠动物的组织形态和功能发生显著变化。研究发现，在冬眠期间动物自身基础代谢降低，利用肌肉、肝和脂肪提供能量（Dutton et al. 2003）。其免疫系统也会发生变化，免疫反应下降，在血液、

脾、胸腺等组织中的造血细胞群逐渐丧失，淋巴细胞明显减少（Cooper et al. 1992），但补体功能和抗原抗体复合物维持不变，如牛蛙（*Lithobates catesbeiana*）在冬眠过程中，胰多肽（pancreatic polypeptide, PP）、生长抑素（somatostatin, SS）、胃泌素（gastrin, GAS）、神经肽Y（neuropeptide Y, NPY）、胰高血糖素（glucagon, GLU）和5-羟色胺（5-serotonin, 5-HT）等免疫反应细胞的免疫反应不仅没有降低，其强度反而显著提高（Wang et al. 2014）。

随着基因组学技术的发展，与休眠、免疫相关的基因逐渐被鉴定和发现，如纤维蛋白原α亚基、α-1微球蛋白前体（protein AMBP）、转铁蛋白等基因在冬眠过程中发挥重要作用（Wu et al. 2002）。两栖类在冬眠期间由于代

谢处于抑制状态, 细胞外信号调节激酶(*ERK-1/2*)、氨基末端激酶(*JNK1/2/3*)和热激蛋白基因(如*Hsp70*和*Hsp90*)等基因表达保持较低水平(Feidantsis et al. 2012), 很多参与磷酸化、氨基酸和脂肪代谢的酶含量也下降(Kiss et al. 2011)。在林蛙(*Rana chensinensis*)肝组织中, *FR10*、*FR47*和*LI16*三种基因具有相同的疏水区域, 这三种基因在结冰期显著上调, 并且对脱水和缺氧产生不同反应(Wu 1999, Sullivan et al. 2015)。此外, 跨膜转运蛋白(单羧酸转运蛋白、 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATP酶)、*FR47*低温诱导蛋白、线粒体转运蛋白均在林蛙休眠中起到重要作用, 提高了休眠期的免疫能力(Sullivan et al. 2015)。

研究发现, 在软体动物中, 福寿螺(*Pomacea canaliculata*)、蚌科(Unionidae)、断顶凸螺(*Rumina decollata*)以及烟管螺科(Clausiliidae)的一些贝类均存在干旱胁迫休眠现象(张卫红 2003, 韩微 2012)。然而, 淡水贝类在干旱胁迫下的休眠特征及机制还未见报道。中国圆田螺(*Cipangopaludina chinensis*)是田螺科(Viviparidae)大型淡水螺类, 在中国、日本、韩国及东南亚等国家和地区广为分布(Lu et al. 2014)。常见于湖泊、河流、沼泽、小溪、稻田等处, 适应性强、分布广泛, 在生态系统能量传递与水体净化方面也起到重要的作用, 常作为指示物种, 具有较高生态价值。在干旱条件下, 中国圆田螺自身紧闭厣甲, 从而有效阻止水分的散失, 进入休眠状态。本研究以中国圆田螺干旱胁迫后 3 d 全程紧闭厣甲、无触角及头部伸出等活动作为判断其进入休眠状态依据。

中国圆田螺为田螺科典型物种, 在各个组织器官中, 肝和肾组织是其主要消化和排泄器官, 具有合成代谢功能、免疫解毒功能、分泌排泄和吸收功能(刘凌云 2009), 是其重要器官。通过干旱胁迫使田螺进入休眠状态, 然后开展其肝和肾组织转录表达调控的差异研究, 初步挖掘其与干旱休眠相关的基因, 并解读其

功能, 在分子层面为揭示软体动物的休眠特征和机制提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集

中国圆田螺样本采集于江苏盐城。选取个体发育健全, 大小一致的中国圆田螺暂养于实验室 2 d。取 30 只中国圆田螺放置在干燥的塑料桶中, 进行干旱胁迫处理, 室温调节至 24 °C, 作为干旱胁迫组。30 只中国圆田螺放置在正常有水的塑料桶中(20 L), 作为对照组, 暂养 30 d。30 d 后, 随机抽取对照组和干旱胁迫下已经进入休眠状态的田螺的肝与肾组织, 每个组分别取 3 个生物学重复。将所取组织用液氮立即冷冻 3 h, 后保存在 -80 °C 冰箱中待用。

1.2 转录组文库构建与测序

将 -80 °C 低温保存的中国圆田螺肝、肾组织, 按照 RNA 提取试剂盒说明(TakaRa, 宝生物公司)提取总 RNA, 琼脂糖电泳检测完整性后, 使用微量紫外分光光度计(Maestro NanoPr, MN-913A)检测总 RNA 浓度, 选取吸光度比值 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间的样本, 送武汉菲莎生物公司测序。使用 Hiseq4000 测序仪对转录组进行双端测序, 测序读长为 150。

1.3 中国圆田螺转录组数据分析

使用 Trimmomatic 软件对初始 fastq 格式文件进行处理, 将原始测序数据低质量碱基序列、含 N(未知碱基)序列以及含接头序列除去, 获取干净的测序数据(Bolger et al. 2014)。中国圆田螺参考基因组由本实验室提供。使用 HISAT2 并采用默认参数将 RNA-seq 数据中的读段比对到参考基因组上(Kim et al. 2019), 并利用 samtools 软件对匹配项(alignment hit)按参考序列顺序进行排序, 得到 bam 格式的比对结果, 并利用 perl 脚本统计匹配率。

基于比对结果, 使用 Subread 软件中的 featureCounts 功能将比对后的测序数据进行基因表达定量(Liao et al. 2013)。随后使用 DESeq2 软件分析差异表达基因, 为了提高筛

选差异表达基因的准确性，我们根据 P -value 不超过 0.05 以及 $|\log_2\text{FoldChange}|$ 不小于 2 的标准筛选差异表达基因。

1.4 差异基因功能与通路富集分析、主成分分析

为了确定差异表达基因的生物学意义，用 clusterProfiler 的 R 包对干旱休眠状态下中国圆田螺肝及肾组织差异表达基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因和基因组数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 (Kanehisa et al. 2008, Du et al. 2010)。使用 PCATools 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)。

1.5 实时荧光定量验证

随机选取 5 个差异表达基因进行实时荧光定量 (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 验证，以此来证明本实验转录组数据筛选差异表达基因的可靠性。使用 Primer5.0 软件设计引物并由武汉菲莎公司合成 (表 1)。使用反转录试剂盒 (宝日医生物技术有限公司, TaKaRa) 将 RNA 反转录成 cDNA，以 cDNA 为模板， β -actin 基因为内参基因进行 RT-qPCR 检测。每个样品 3 次重复，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算各基因的相对表达量。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	序列 Primer sequences (5'-3')
Cchin09012 F	CTGGAAGGTGGACAGAGAGG
Cchin09012 R	AAATCATCGCTCCACCAGAG
Cchin15336 F	TGTCGCCATTGGACAGAAA
Cchin15336 R	TCCAGGGGGAGGAATTGAT
Cchin25526 F	TGGTGCATCATTGTTGCGG
Cchin25526 R	GTGCCCCACATCCTCCGTA
Cchin12511 F	GCTGTAATGGCGGCTTGATG
Cchin12511 R	ACTAGCATCGATGGCGACTG
Cchin16789 F	GTCAGTGGAGCGGAAGTTCA
Cchin16789 R	ATGCTCAGACAAAGACCGCA
Cchin20809 F	GTGCCAGATTACTGCCCT
Cchin20809 R	TCTGTCTCGAAACCGTTGGG

2 结果

2.1 中国圆田螺转录组测序结果的处理与分析

以中国圆田螺肝和肾 2 种组织为材料，正常养殖为对照，每个处理设 3 个生物学重复，共构建 12 个 cDNA 文库并测序。下机的 12 个样本原始数据经过数据质控，去除低质量的数据之后，共获得 106.2 Gb 纯净数据，得到的处理后数据平均读数为 58 775 377。将纯净数据映射到中国圆田螺参考基因组上，12 个样本的测序数据总读段匹配率均高于 90%，唯一读段匹配率均高于 85%，说明实验数据可靠性较高。比对情况汇总详见表 2。

2.2 中国圆田螺测序数据主成分分析

为检测中国圆田螺各样本可靠性、合理性和可重复性，应用皮尔逊相关系数 (Pearson's correlation coefficient) 进行样本相关性评估，中国圆田螺组织各样本重复之间的决定系数 R^2 值均大于 0.9，说明实验的可重复性和可靠性较高 (图 1)，而肾组织在对照组和干旱胁迫组之间差异较大。对低表达量过滤后的数据集进行主成分分析，取各样的前三个维度 (PC1、PC2 和 PC3) 应用 R 包绘制散点图 (图 2)。第一主成分 (PC1)、第二主成分 (PC2)、第三主成分 (PC3) 的可解释度分别为 73.12%、12.66%、10.30%。其中 PC1、PC2、PC3 能够支持各样本间的聚类。PC1 与 PC2 以及 PC3 都可以区分肝与肾组织，PC1 还可以区分干旱胁迫组和对照组的肾组织，且有着很高的可解释度。

2.3 中国圆田螺肝、肾组织在干旱胁迫下的差异表达基因分析

应用 DESeq2 对中国圆田螺干旱胁迫组肝和对照组肝以及干旱胁迫组肾和对照组肾的基因表达量进行差异分析，两两比较。在干旱胁迫下，相比对照组，肝组织中 84 个基因上调，86 个基因下调 (图 3)。其中，Cchin16789 (编码中心蛋白粒 b 基因 *Poc1b*)、Cchin20809 (*FASN* 脂肪酸合成酶编码基因)、Cchin07566 (细胞

表2 转录组数据比对情况汇总

Table 2 Summary of transcriptome alignment

组别 Group	组织 Tissue	样本编号 Sample number	处理后的数据 Clean reads	匹配数(匹配率) Total mapped (Matching rate)	交叉匹配数(交叉匹配率) Multiply mapped (Multiply mapped matching rate)	精准匹配数(精准匹配率) Uniquely mapped (Uniquely mapped matching rate)
对照组 Control group	肝 Liver	1	56 911 341	51 831 746 (91.05%)	2 483 104 (4.36%)	49 348 642 (86.71%)
		2	59 234 952	54 208 301 (91.51%)	2 566 842 (4.33%)	51 641 459 (87.18%)
		3	60 956 958	55 252 063 (90.64%)	2 488 906 (4.08%)	52 763 157 (86.56%)
	肾 Kidney	1	49 981 021	46 413 252 (92.86%)	1 999 595 (4.00%)	44 413 657 (88.86%)
		2	66 533 135	60 273 792 (90.59%)	3 574 299 (5.37%)	56 699 493 (85.22%)
		3	67 679 811	62 345 707 (92.12%)	2 739 195 (4.05%)	59 606 512 (88.07%)
干旱胁迫组 Drought stress group	肝 Liver	1	56 347 915	51 975 010 (91.89%)	2 314 822 (4.11%)	49 460 188 (87.78%)
		2	51 783 676	47 849 838 (92.40%)	2 124 369 (4.10%)	45 725 469 (88.30%)
		3	74 496 776	68 017 405 (91.31%)	3 297 566 (4.43%)	64 719 839 (86.88%)
	肾 Kidney	1	54 303 241	50 461 534 (92.92%)	1 733 015 (3.19%)	48 728 519 (89.73%)
		2	59 444 303	55 391 934 (93.18%)	2 237 291 (3.76%)	53 154 643 (89.42%)
		3	47 631 398	43 714 302 (91.78%)	1 367 373 (2.87%)	42 346 929 (88.91%)

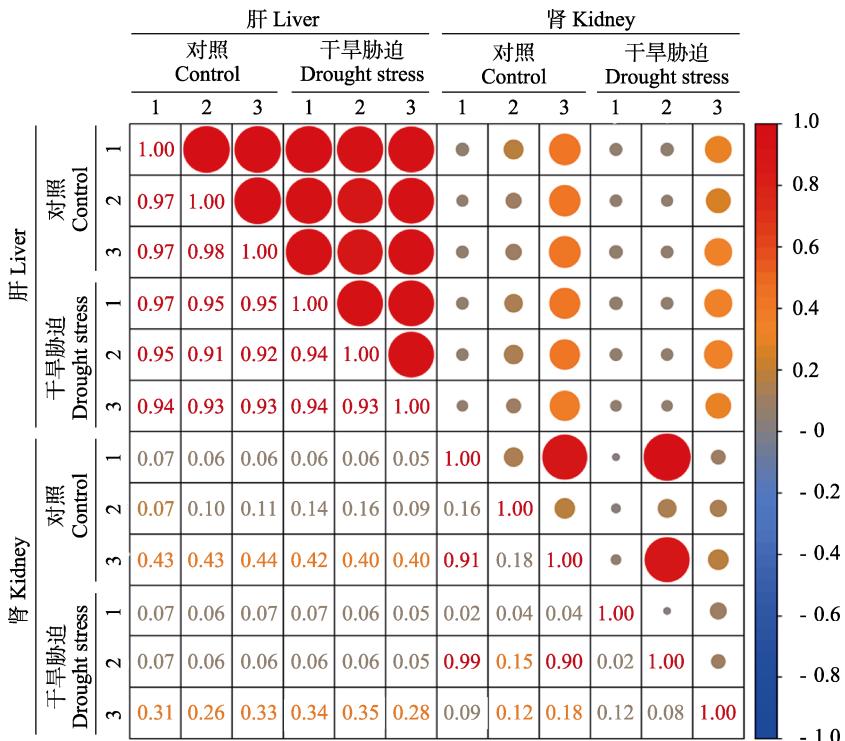


图1 样本相关性检验

Fig. 1 Test for Sample Correlations

图中数字表示皮尔逊相关系数的平方值 (R^2)，颜色越红、圆圈越大则 R^2 值越高。

The number in the figure indicates the square of correlation coefficient value (R^2), the redder the color, the larger the circle, the higher the R^2 value.

膜相关蛋白编码基因 *APMAP*) 和 Cchin19419 (半乳糖基转移酶编码基因 *TNR*) 4 个基因呈现极显著的差异 (图 3)。在肾组织中, 干旱胁迫下与对照组相比, 有 110 个基因上调, 389

个基因下调, 其中 Cchin15992 (清道夫受体富含半胱氨酸域 *SRCR*)、Cchin03039 (浓缩核苷转运蛋白编码基因 *SLC28A3*) 和 Cchin03047 (肌肉生长抑制素基因 *MSTN*) 3 个基因呈现

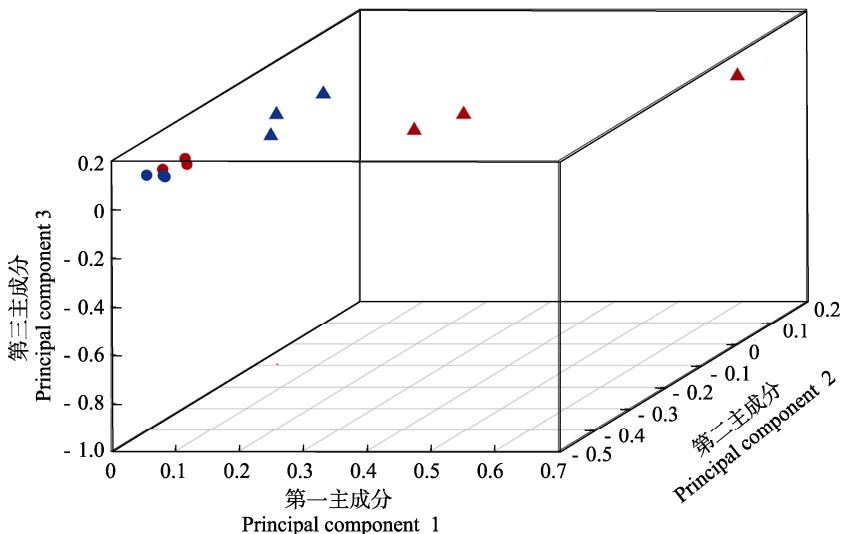


图 2 主成分分析三维图

Fig. 2 3D diagram of principal component analysis

红色代表对照组, 蓝色代表干旱胁迫组。圆形代表肝组织, 三角形代表肾组织。

The red colors represent the control group, and the blue colors represent the drought stress group. Circles represent liver tissue, triangles represent kidney tissue.

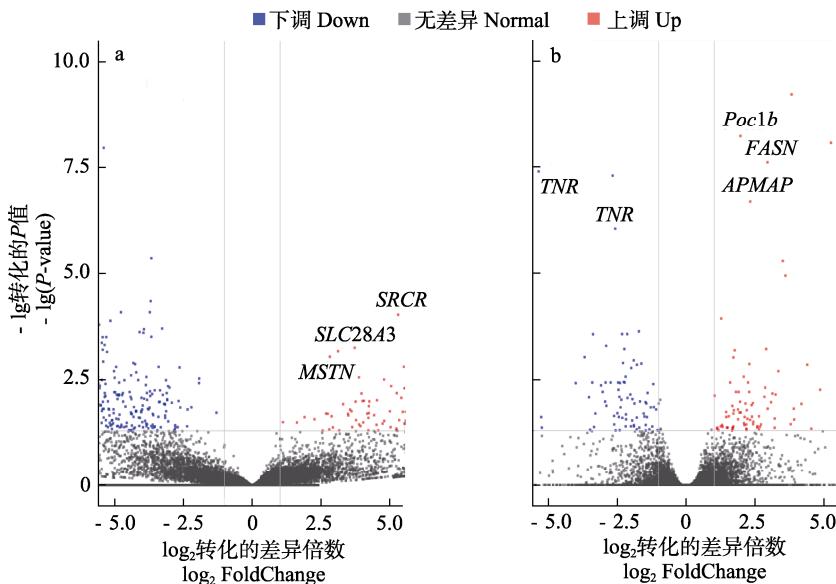


图 3 中国圆田螺干旱胁迫下肾 (a) 和肝 (b) 组织差异基因火山图

Fig. 3 Volcanic map of differentially expressed genes in kidney (a) and liver (b) tissues of *Cipangopaludina chinensis* under drought stress

极显著差异。

取中国圆田螺干旱胁迫肝对比对照组肝，干旱胁迫组肾对比对照组肾中差异基因的交集，绘制韦恩图（图 4），总计有 18 个共有基因。其中，在干旱胁迫下，肝和肾中共有的上调基因有 3 个，分别是 Cchin03147（功能是 RNA binding）和 Cchin10847（功能是 RNA binding）和 Cchin20989（Y1P1 家族成员）；肝与肾组织中共有的下调基因有 15 个，这些基因的主要功能有，Cchin06460（半乳糖基转移酶编码基因 TNR）调控神经系统的发生以及实现细胞间的识别与互作，Cchin18938（腺苷受体），从基底神经通路参与运动调节，如心率调节与血管张力等，Cchin03893（SH3 域结合蛋白）调节免疫和骨骼系统的信号转导衔接蛋白，Cchin18983（细胞凋亡抑制因子）抑制细胞的凋亡。在上调基因中包含了跨膜蛋白编码基因 YIPF4，其作用是阻止或允许某些特定物质进入细胞，同时负责排出细胞内废弃物以及 MSTN 基因。

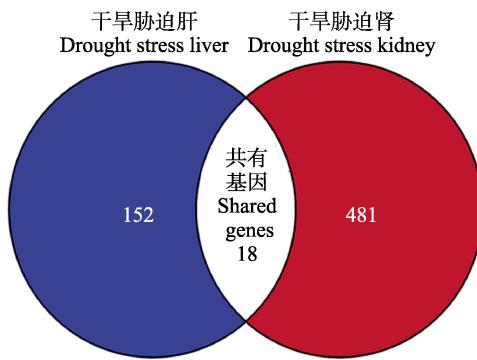


图 4 中国圆田螺干旱休眠状态肝肾差异表达基因韦恩图
Fig. 4 Venn diagram of differentially expressed genes in liver and kidney tissues of *Cipangopaludina chinensis* under drought stress

2.4 中国圆田螺差异基因 GO 功能富集分析

对肝组织中的差异基因 GO 功能富集分析显示，肝组织中差异基因功能主要与细胞黏附的调节、细胞外基质组织、神经元投射再生、

轴突的再生以及外部结构组织相关（图 5）。肾组织的差异基因主要与碳水化合物代谢过程、去磷酸化、上皮细胞增殖调节、羟酸有机酸跨膜转移、组织重塑等功能有关。

2.5 中国圆田螺差异表达基因的 KEGG 通路富集

为进一步分析中国圆田螺在干旱胁迫下的代谢通路，分别对肝和肾组织中差异基因进行 KEGG 富集分析（图 6）。干旱胁迫下肾组织的差异基因主要富集在细胞的黏附分子（cell adhesion molecules）通路、蛋白聚糖的合成与代谢、乳糖代谢、鞘脂的代谢与生物合成等通路（图 6a）。在细胞黏附分子通路上 8 个差异基因，其中 6 条功能对应到蛋白酪氨酸磷酸酶，都呈现了下调。蛋白酪氨酸磷酸酶在细胞信号传导、生长增殖、分化中起到重要作用。在蛋白聚糖、乳糖、鞘脂的合成代谢通路中鉴定到的 15 个差异表达基因都呈现下调。它们都与细胞的黏附、供能、神经元相关。这表明干旱胁迫导致中国圆田螺休眠的机制可能与上述这些通路相关。

在中国圆田螺对照组和干旱胁迫组肝组织中，差异基因功能主要富集到免疫系统代谢通路、P13k-Akt 信号通路、生物合成通路、ECM 受体、焦点附着斑等（图 6b）。细胞基质粘附在包括细胞运动、细胞增殖、细胞分化、基因表达调控及细胞存活在内的重要生物学过程中都发挥着重要的作用。细胞基质与 ECM 受体黏附通过整合素或蛋白聚糖介导，这些区域称为焦点附着斑。在焦点附着斑及 ECM 受体蛋白、PI3K-Akt 信号通路这 3 条通路上鉴定到 12 个差异表达基因，其中 8 条呈现了对神经元轴突参与再生的正向调控。这表明这 3 条通路与中国圆田螺干旱休眠状态相关。

2.6 RT-qPCR 验证结果

选择 5 个基因来验证差异表达的结果，在转录组测序中，Cchin16789、Cchin20809 和 Cchin25526 呈现上调，Cchin12511 和 Cchin15336 呈现下调。RT-qPCR 结果（图 7）

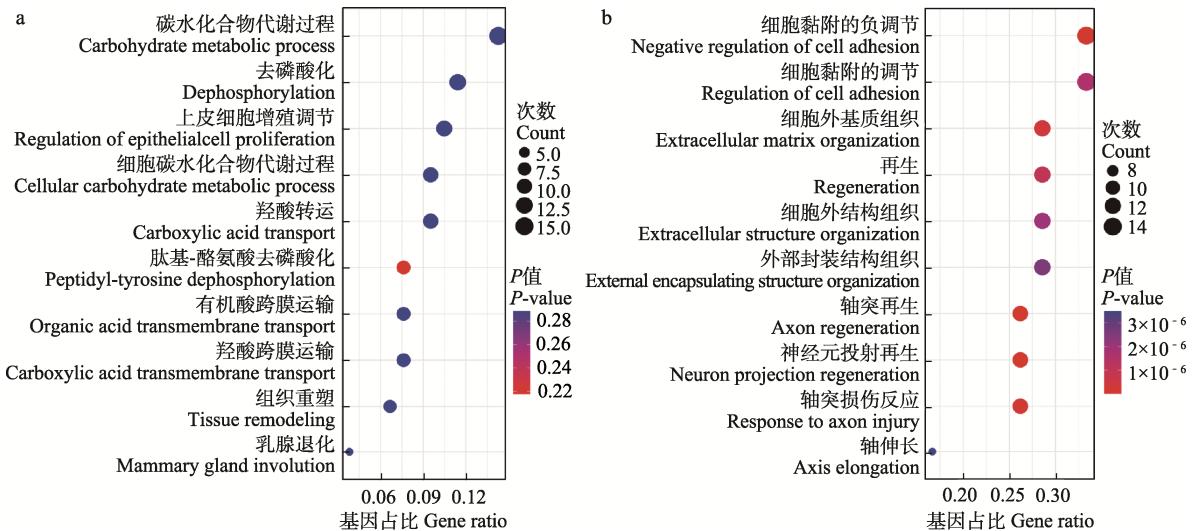


图 5 中国圆田螺干旱休眠状态下肾 (a) 及肝 (b) 组织中差异表达基因 GO 功能富集

Fig. 5 GO annotations of differentially expressed genes in kidney (a) and liver (b) tissues of *Cipangopaludina chinensis* under drought stress

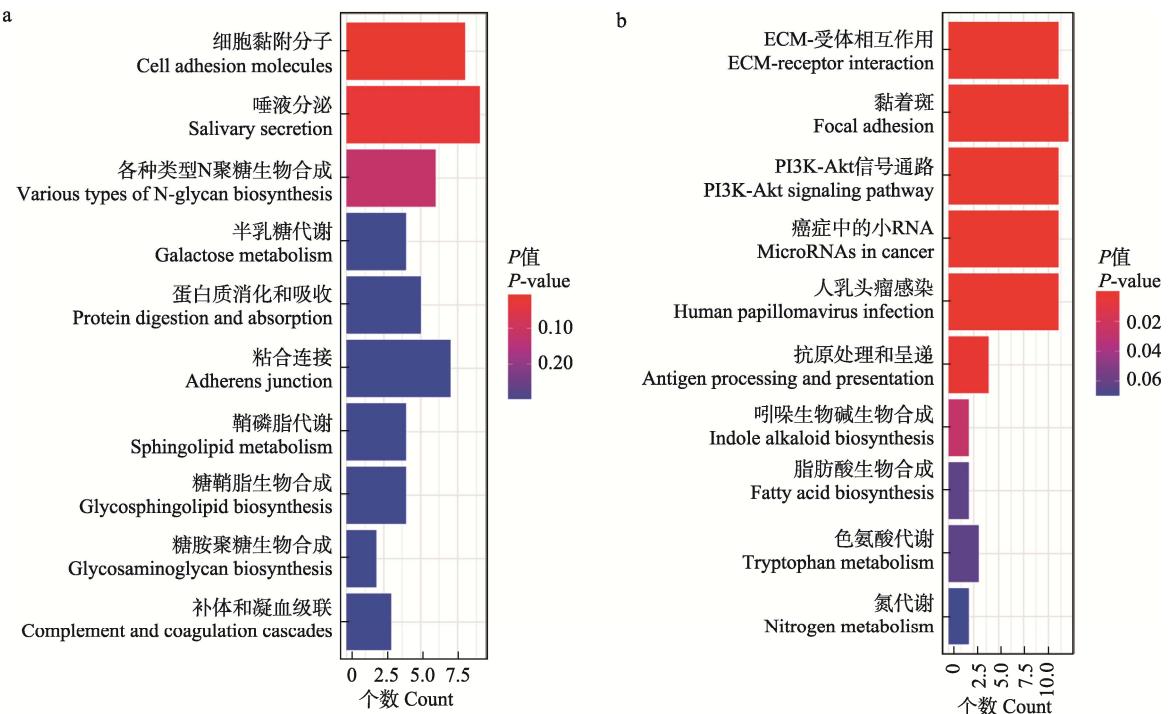


图 6 中国圆田螺干旱休眠状态下肾 (a) 及肝 (b) 组织中差异表达基因 KEGG 通路富集

Fig. 6 Pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in kidney (a) and liver (b) tissues of *Cipangopaludina chinensis* under drought stress

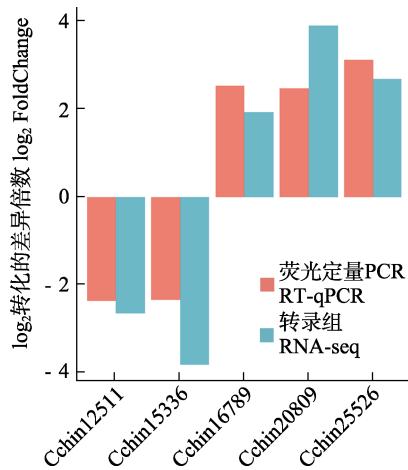


图 7 RT-qPCR 与 RNA-seq 相对表达量的对比分析

Fig. 7 Comparative analysis of relative expression of genes using RT-qPCR and RNA-seq

Y 轴代表干旱胁迫组基因表达量/对照组基因表达量后对其取 2 为底的对数得出的值, X 轴代表基因 ID。

Y-axis represents the gene expression of drought stress group/gene expression of control group, and the value was obtained by taking the logarithm of 2 as the base, and X-axis represents gene ID.

与转录组测定的 $\log_2\text{FoldChange}$ 值趋势一致, 说明本次实验高通量转录组测序数据可靠, 结果真实有效。

3 讨论

3.1 中国圆田螺干旱休眠重要通路分析

在干旱胁迫下, 中国圆田螺的肝和肾组织差异基因代谢通路主要与黏附分子通路、蛋白聚糖的合成与代谢、乳糖代谢、鞘脂代谢与生物合成等通路有关。PI3K-Akt 信号通路是细胞内一种信号转导途径, 对应细胞外信号, 促进代谢、生长等重要功能, 其中关键基因为磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 和蛋白激酶 b。蛋白丝氨酸苏氨酸激酶 (Akt) 与磷酸肌醇依赖性激酶 1 (PDK1) 在膜上与 PI (3, 4, 5) P3 的结合使这些蛋白质接近并促进 PDK1 对 Akt 的磷酸化。这种磷酸化刺激 Akt 的催化活性, 影响细胞生长、细胞周期维持和细胞存活的许多其他蛋白质的磷酸化。其中 TNR 基因是 PI3K-Akt

信号通路的重要关键基因, TNR 是细胞外基质糖蛋白 tenascin 家族的一员, 在神经突起的生长、神经细胞黏附或抗黏附中发挥作用 (Pesheva et al. 1993, Zacharias et al. 2006)。如小鼠 (*Mus musculus*) 实验中发现 TNR 排斥神经元细胞 (Zhao et al. 2012)。本研究中, 12 个 TNR (肌腱蛋白家族) 基因在 PI3K-Akt 信号通路中表达上调, 这与 Zhao 等 (2012) 发现盐度胁迫能诱导太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的细胞黏附相关基因表达结果类似, 推测 TNR 基因可以实现细胞间的识别与互作来调控中国圆田螺干旱休眠状态下适应过程。

鞘脂普遍存在于真核细胞中, 是生物细胞膜的重要组成部分, 鞘脂参与生物体发育调节、刺激感应和胁迫反应 (Liu et al. 2021)。在本研究中, 鞘脂代谢通路上的 S1P (磷酸化鞘脂编码基因) 基因显著上调, S1P 基因可以促进细胞内钙离子的流动性, 从而改变细胞的渗透压, 减少细胞内水分流失 (Ng et al. 2001)。Na⁺-K⁺-ATP 酶 β 1 亚基是一种膜泵, 通过质膜产生 Na⁺ 和 K⁺ 梯度, 从而驱动许多生理过程。Na⁺-K⁺-ATP 酶 β 1 亚基也是维持细胞渗透调节的关键因素。Na⁺-K⁺-ATP 酶 β 1 亚基在许多生物过程中起着关键作用, 其在蛋白质和酶水平上的调节是复杂的。在中国圆田螺中, Na⁺-K⁺-ATP 酶 β 1 亚基在干旱胁迫后显著上调。表明 S1P 基因和 Na⁺-K⁺-ATP 酶 β 1 亚基与中国圆田螺干旱休眠状态下调节细胞渗透压保水相关。

软体动物在受到生理与环境胁迫的情况下, 会提高热休克蛋白 (heat shock protein) 的表达量, 热休克蛋白是一种分子伴侣蛋白, 它的主要作用是维持细胞蛋白质平衡, 参与蛋白质的折叠、重折叠、组装、移位和降解。热休克蛋白的产生是为了对外部应激源 (如剧烈的温度变化、氨基酸类似物、重金属、自由基、环境污染物、免疫刺激剂、代谢能量抑制剂和各种疾病) 产生的急性细胞应激 (Piano et al. 2002, Farcy et al. 2009, Li et al. 2011)。先前

的研究认为热休克蛋白基因家族中一员 *Hsp70* 基因在免疫调节中起到重要作用 (Lindquist et al. 1988, Buchanan 2000, Cimino et al. 2002, Hartl et al. 2002, Hendrick et al. 2003, Robert 2003, Demeke et al. 2016)。在本研究富集到的免疫功能通路中, 干旱胁迫后 *Hsp70* 的表达量显著提升, 这与福寿螺在高温环境下, 鳃、肾以及腹足中的 *Hsp70* 基因表达量都有明显提升的研究结果一致 (Xu et al. 2014)。由此推断中国圆田螺在干旱休眠状态下, *Hsp70* 起到重要的免疫调节作用。Wang 等 (2006) 发现感染白斑病的白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 相较于健康的个体 *Hsp70* 的表达量明显上升, 本研究结论与其一致。

3.2 中国圆田螺干旱休眠重要差异基因的功能分析

休眠是生物为了应对极端恶劣环境而演化出的一套应对策略。研究发现, 动物在休眠过程中, 其生理生化过程发生变化, 代谢率、线粒体呼吸率、心率、细胞色素 C 氧化酶等基因表达量急剧下降, 同时抗氧化保护酶活性和总抗氧化能力明显下降, 而氧化应激、氧化损伤指标显著增加 (牛永刚 2019)。大型淡水螺类中国圆田螺在干旱情况下, 将自身厣甲闭合, 减少水分的散失, 呼吸代谢率明显下降。与对照组相比, 干旱胁迫组肝组织中 86 个基因上调, 84 个基因下调; 肾组织中, 有 110 个基因上调, 389 个基因下调。说明实验组中, 干旱胁迫对田螺肾的影响高于肝, 此外通过皮尔森相关系数分析, 也佐证了这一点。通过差异基因 GO 富集分析发现, 在干旱休眠组肝差异基因功能主要与消化、吸收、免疫、细胞黏附的调节、细胞外基质组织、神经元投射再生、轴突的再生以及外部结构组织有关, 肾组织差异基因功能与代谢过程、去磷酸化、细胞增殖调节、跨膜转移、组织重塑等功能有关。

在肾组织中, *SRCR* (清道夫受体富含半胱氨酸域)、*MSTN*、*SLC28A3* 基因呈显著差异。清道夫受体富含半胱氨酸域最早于 20 世

纪 90 年代被发现, 大小约为 100 个氨基酸 (Areschoug et al. 2009, Martinez et al. 2011)。根据半胱氨酸残基的数量, 可将清道夫受体富含半胱氨酸域分为两大类, 即 A 组类与 B 组类。通常, A 组 *SRCR* 具有 6 个半胱氨酸, 而 B 组 *SRCR* 具有 8 个半胱氨酸。*SRCR* 基因在人体、哺乳动物中研究较多。迄今为止, *SRCR* 结构域已在许多细胞表面受体、分泌蛋白和蛋白水解酶中被鉴定, 这些受体参与多种生理和病理过程, 包括负责病原体识别、对凋亡细胞的清除、细胞分化、先天免疫、脂质代谢和消化 (Canton et al. 2013, 甘艳艳等 2020)。*SRCR* 结构域在中国圆田螺干旱休眠状态下起到重要的免疫及生理调节作用, 中国圆田螺干旱休眠状态下该基因表达量上调, 表明田螺在干旱休眠状态下通过吞噬自身凋亡细胞在进行肌体清除的同时获取一定的能量。

MSTN (肌肉生长抑制素) 基因首先在小鼠的骨骼肌肉细胞中被发现 (McPherron et al. 1997), 是转化生长因子-β (TGF-β) 超家族成员之一。研究发现 *MSTN* 负调节骨骼和肌肉增长, 切除 *MSTN* 有利于肌肉的生长 (Qian et al. 2013)。在本研究中, 中国圆田螺在进入干旱休眠后 *MSTN* 基因的表达量呈现显著上调, 说明中国圆田螺在干旱休眠时其肌肉生长可能被抑制。

在肝组织中, *Poc1b*、*FASN*、*APMAP* 和 *TNR* 4 个基因呈极显著差异。这些基因功能多与代谢相关, 例如, *FASN* 是一种基本代谢酶编码基因, 其表达直接影响脂肪酸合成酶的多寡, 对控制动物体脂沉积具有重要意义 (周国利等 2008), 在脂肪酸合成中起很大作用, 对生物体储能、代谢有重要作用。前人从山羊 (*Capra hircus*) 基因组中克隆得到 *FASN* 基因, 并发现其表达量降低会导致甘油三酯的降解, 从而减少脂质的累积 (李君 2011)。中国圆田螺在受到干旱胁迫后 *FASN* 的表达量呈现下调, 说明田螺在干旱胁迫休眠后体内脂质积累可能减少。*APMAP* 是脂肪细胞膜相关蛋白编

码基因, 目前在人体中研究较多, 广泛表达于肝、肾、血液和神经系统等组织器官(黄婧婧等 2017)。目前认为 *APMAP* 负责维持脂肪细胞生理代谢功能, 在脂肪细胞分化过程中也扮演重要角色。Luo 等(2022)选取獭兔(*Oryctolagus cuniculus*)3个时期的多个组织与血液, 用 qPCR 和酶联免疫方法检测 *APMAP* 在各组织和血液中的表达量及含量, 结果发现在獭兔生长过程中, 随着脂肪的沉积, 各组织和血液中的 *APMAP* 表达量及含量都迅速增加。在本实验中, 中国圆田螺干旱休眠后 *FASN* 和 *APMAP* 表达量显著下调, 表明中国圆田螺干旱休眠状态下脂肪沉积速率下降。

Poc1b 是编码中心粒蛋白 b 的基因, 中心粒或纤毛基因的缺陷会引起纤毛病的发生(Zhang et al. 2015)。Zhang 等(2015)通过敲除斑马鱼(*Danio rerio*)的 *Poc1b* 基因, 发现 *Poc1b* 是斑马鱼光感受器感觉纤毛形成和正常视力所必需的。在本研究中, 中国圆田螺在受到干旱胁迫后 *Poc1b* 基因的表达量呈现显著下调, 从而隔离其对外界光线的感知, 协助田螺进入休眠。

综上所述, 本研究为了解中国圆田螺的干旱休眠特征, 从转录组层面对干旱胁迫下的中国圆田螺肝与肾组织进行研究分析。干旱胁迫处理 30 d 后, 相较于对照组, 对其进行 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析。发现中国圆田螺肝、肾组织差异表达基因功能主要与细胞黏附的调节、细胞外基质组织生长、神经元投射和轴突再生、碳水化合物代谢过程、去磷酸化、上皮细胞增殖调节、羟酸有机酸跨膜转移、组织重塑等功能相关; 差异表达基因通路主要富集在 PI3K-Akt 信号通路、蛋白聚糖、乳糖、鞘脂等合成代谢通路。经过分析, 得到 *Hsp70*、*SRCR*、*FASN*、*APMAP*、*MSTN*、*Poc1b*、*S1P*、 $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATP 酶 $\beta 1$ 亚基及 *SLC28A3* 等 9 个基因在中国圆田螺干旱休眠状态下起到重要作用。

参 考 文 献

- Areschoug T, Gordon S. 2009. Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial Pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 11(8): 1160–1169.
- Bolger A M, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114–2120.
- Buchanan K L. 2000. Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(4): 129–175.
- Canton J, Neculai D, Grinstein S. 2013. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(9): 621–634.
- Cimino E J, Owens L, Bromage E, et al. 2002. A newly developed ELISA showing the effect of environmental stress on levels of hsp86 in *Cherax quadricarinatus* and *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132(3): 591–598.
- Cooper E L, Wright R K, Klempau A E, et al. 1992. Hibernation alters the frog's immune system. *Cryobiology*, 29(5): 616–631.
- Demeke A, Tassew A. 2016. Heat shock protein and their significance in fish health. *Research and Reviews*, 2(1): 66–75.
- Du Z, Xin Z, Yi L, et al. 2010. AgriGO: A GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server issue): 64–70.
- Dutton C J, Taylor P. 2003. A comparison between pre- and posthibernation morphometry, hematology, and blood chemistry in viperid snakes. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 34(1): 53–58.
- Farcy E, Voiseux C, Lebel J, et al. 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress & Chaperones*, 14(4): 371–380.
- Feidantsis K, Anestis A, Vasara E, et al. 2012. Seasonal variations of cellular stress response in the heart and gastrocnemius muscle of the water frog (*Pelophylax ridibundus*). *Comparative Biochemistry & Physiology A: Molecular & Integrative Physiology*, 162(4): 331–339.
- Hartl F U, Hayer M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561): 1852–1860.

- Hendrick J P, Hartl F U. 2003. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1): 349–384.
- Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. 2008. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue): 480–484.
- Kim D, Paggi J M, Park C, et al. 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8): 907–915.
- Kiss A J, Muir T J, Lee R E Jr, et al. 2011. Seasonal variation in the hepatoproteome of the dehydration- and freeze-tolerant Wood Frog, *Rana sylvatica*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12): 8406–8414.
- Li Q, Han J, Du F, et al. 2011. Novel SNPs in *HSP70.41A* gene and the association of polymorphisms with thermo tolerance traits and tissue specific expression in Chinese Holstein cattle. *Molecular Biology Reports*, 38(4): 2657–2663.
- Liao Y, Smyth G K, Shi W. 2013. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*, 41(10): e108.
- Lindquist S, Craig E A. 1988. The heat-shock proteins. *Annual Reviews of Genetics*, 22(1): 631–677.
- Liu N J, Hou L P, Bao J J, et al. 2021. Sphingolipid metabolism, transport and functions in plants: recent progress and future perspectives. *Plant Communications*, 2(5): 1–12.
- Lu H F, Du L N, Li Z Q, et al. 2014. Morphological analysis of the Chinese Cipangopaludina species (Gastropoda; Caenogastropoda: Viviparidae). *Zoological Research*, 35(6): 510–527.
- Luo G, Mu J Z, Wang S H, et al. 2022. Association of blood APMAP content and meat quality trait in Rex rabbits. *Animal Biotechnology*, 1–6.
- Martinez V G, Moestrup S K, Holmskov U, et al. 2011. The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis. *Pharmacological Reviews*, 63(4): 967–1000.
- McPherron A C, Lee S J. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23): 12457–12461.
- Ng C K Y, Carr K, McAinsh M R, et al. 2001. Erratum: Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 410(6828): 596–599.
- Page M, Salway K D, Lp Y K, et al. 2010. Upregulation of intracellular antioxidant enzymes in brain and heart during estivation in the African lungfish *Protopterus dolloi*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systems and Environmental Physiology*, 180(3): 361–369.
- Pesheva P, Gennarini G, Goridis C, et al. 1993. The F3/11 cell adhesion molecule mediates the repulsion of neurons by the extracellular matrix glycoprotein J1-160/180. *Neuron*, 10(1): 69–82.
- Piano A, Asirelli C, Caselli F, et al. 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress & Chaperones*, 7(3): 250–257.
- Pratihar S, Kundu J K. 2011. Life in cold lane. Germany: Lambert Academic Publishing, 1–136.
- Qian H, Xiao M, Wang X, et al. 2013. cDNA cloning and expression analysis of myostatin/GDF11 in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 165(1): 30–39.
- Robert J. 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(6/7): 449–464.
- Sullivan K J, Biggar K K, Storey K B. 2015. Transcript expression of the freeze responsive gene fr10 in *Rana sylvatica* during freezing, anoxia, dehydration, and development. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 399(1/2): 17–25.
- Wang B, Li F H, Dong B, et al. 2006. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology*, 8(5): 491–500.
- Wang H, Zhou N Z, Zhang R, et al. 2014. Identification and localization of gastrointestinal hormones in the skin of the bullfrog *Rana catesbeiana* during periods of activity and hibernation. *Acta Histochemica*, 116(8): 1418–1426.
- Wu Q, Sugimoto K, Moriyama K, et al. 2002. Cloning of hibernation-related genes of Bullfrog (*Rana catesbeiana*) by cDNA subtraction. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 133(1): 85–94.
- Wu S B. 1999. Differential gene expression under environmental stress in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. Carleton University (Canada) doctoral dissertation.

- Xu Y, Zheng G, Dong S, et al. 2014. Molecular cloning, characterization and expression analysis of HSP60, HSP70 and HSP90 in the golden apple snail, *Pomacea canaliculata*. Fish and Shellfish Immunology, 41(2): 643–653.
- Zacharias U, Rauch U. 2006. Competition and cooperation between tenascin-R, lecticans and contactin 1 regulate neurite growth and morphology. Journal of Cell Science, 119(16): 3456–3466.
- Zhang C, Zhang Q, Wang F, et al. 2015. Knockdown of *poc1b* causes abnormal photoreceptor sensory cilium and vision impairment in zebrafish. Biochemical and Biophysical Research Communications, 465(4): 651–657.
- Zhao T, Xiong J, Chen W, et al. 2021. Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Cipangopaludina Cahayensis*. Iranian Journal of Biotechnology, 19(1): 121–127.
- Zhao X, Yu H, Kong L, et al. 2012. Transcriptomic responses to salinity stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. PLoS One, 7(9): e46244.
- 陈李婷, 杜雪松, 文衍红, 等. 2019. 广西地区3种螺的含肉率及营养成分分析. 肉类工业, 10(3): 20–22.
- 丛福君, 刘志文. 1993. 中国林蛙生殖休眠原因初探. 特产研究, 1993(2): 21–22.
- 甘艳艳, 关富仁, 刘静, 等. 2020. 清道夫受体与脑卒中的研究进展. 中国比较医学杂志, 30(4): 131–136.
- 韩微. 2012. 福寿螺对逆境胁迫的行为反应及生理生化反应研究. 南宁: 广西大学博士学位论文.
- 黄婧婧, 马宇航, 王育璠. 2017. 脂肪细胞膜相关蛋白的研究进展. 上海交通大学学报: 医学版, 37(11): 1548–1547.
- 李君. 2011. 西农萨能羊脂肪酸合酶(FASN)基因启动子结构和功能研究. 咸阳: 西北农林科技大学博士学位论文.
- 刘凌云. 2009. 普通动物学. 北京: 高等教育出版社.
- 罗辉, 陈李婷, 敬庭森, 等. 2022. 田螺科四种螺的肌肉主要营养成分. 水产学报, 46(11): 2177–2185.
- 牛永刚. 2019. 高山倭蛙冬眠的生理生化特征及分子机制. 兰州: 兰州大学博士学位论文.
- 张卫红. 2003. 陆生贝类的休眠与呼吸. 生物学通报, 38(2): 16–18.
- 周国利, 金海国. 2008. 脂肪酸合成酶基因(FASN)的研究进展. 安徽农业科学, 36(9): 3559–3578.
- 周康奇, 林勇, 庞海峰, 等. 2021. 中国圆田螺肌肉营养成分及消化酶活力比较分析. 淡水渔业, 51(6): 106–112.