

# 海洋线虫 *Litoditis marina* 酸性 pH 胁迫响应的 转录组分析\*

丛岩懿<sup>1, 2, 3, 4</sup> 谢玉素<sup>1, 2, 3</sup> 张留所<sup>1, 2, 3①</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室  
海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心 青岛 266071;  
4. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要** 工业革命以来, 二氧化碳排放导致了海洋酸化。海水 pH 下降对无脊椎动物的生长发育、繁殖、代谢和免疫等多个生命过程产生重要影响, 但海洋无脊椎动物如何感知和响应酸性 pH 胁迫的分子机制还很不清楚。本研究以团队建立的海洋线虫 *Litoditis marina* 品系为模型, 对其在不同酸性 pH 条件下的表型特征及转录组数据进行了分析。结果表明, 当 pH 从实验室最佳生长条件 5.92 下降到 5.33 时, *L. marina* 生长发育的速度明显减慢, 但依然可以产卵繁殖; 但当 pH 下降到 4.33 时, *L. marina* 的生长受到严重影响, 表现为不能长成成体且不能产卵繁殖。通过转录组数据分析, 发现当 pH 从 5.92 下降到 4.33 时, 海洋线虫 *L. marina* 脂肪酸  $\beta$ -氧化通路基因和不饱和脂肪酸合成相关基因表达上调; 表皮相关基因表达则呈现差异变化, 2 个 *nas* 基因和 6 个 *ptr* 基因表达显著上调, 表皮胶原基因 *col* 类基因的表达没有发生显著变化; 细胞色素 P450 通路相关基因、凝集素 C 基因和 HSP70 家族基因的表达量显著上调。当 pH 从 5.92 下降到 5.33 时, 上述提到的这些上调基因中的大多数没有发生显著变化。我们发现的海洋线虫应答酸化胁迫的主要调控模式, 为理解生物体能够在低 pH 环境中生存的分子机制提供了参考, 为筛选和识别生物体响应和适应酸化胁迫的关键基因奠定了基础。

**关键词** 海洋线虫; *Litoditis marina*; 酸性 pH 胁迫; 脂肪酸  $\beta$ -氧化; 物质代谢细胞色素 P450 通路  
**中图分类号** Q955; K826.15 **doi:** 10.11693/hyhz20200300070

海洋生物作为海洋生态系统的重要组成, 需要适应其生存环境的非生物因素, pH 就是常见非生物因素之一(隋永年, 1986)。自工业革命以来, 由于人类大量的开采使用煤、石油和天然气等化石燃料, 并砍伐了大量树木植被, 大气中的二氧化碳含量水平逐年上升。海洋吸收大气中的二氧化碳, 导致二氧化碳分压升高, 海水 pH 降低, 造成海洋酸化(Havenhand *et al.*, 2019)。化工生产, 矿物燃料的燃烧, 交通运输

等产生的酸性气体也会通过大气形成雨、雾、雪等向海洋输送, 使得近海和远海的表层海水的 pH 值降低(石强等, 2011)。污染物及工业废水的排放, 例如基于形成水合物策略的海水淡化技术中排放的酸性污水等, 也会导致近岸海水 pH 降低(Montgomery *et al.*, 2009)。

海水酸化的直接后果是对海洋生物的生长发育、代谢、钙化、行为等过程产生影响。当水体从 pH 8.3

\* 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 山东省重大科技创新工程课题, 2018SDKJ0302-1 号; 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 2018 年度青年科研人员特别资助项目, 2018.09-2020.08; 青岛创业创新领军人才项目, Grant 16-8-3-19-zhc 号; 中国科学院海洋大科学研究中心重点部署项目, 2019.11—2022.11。丛岩懿, 硕士研究生, E-mail: congyanyil7@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 张留所, 博士生导师, 研究员, E-mail: lzhang@qdio.ac.cn

收稿日期: 2020-03-12, 收修改稿日期: 2020-04-18

降低到 6.9 时, 凡纳滨对虾的肠道形态结构遭到破坏, 消化和代谢相关的酶的活性被诱导改变(Duan *et al.*, 2019)。低 pH 条件下, 极地鳕鱼的游泳能力下降(Kunz *et al.*, 2018)。当海水 pH 从 8.1 下降到 7.4 时, 珍珠贝 *Pinctada fucata* 壳的生长受到明显抑制, 壳基质蛋白基因表达显著下调(Liu *et al.*, 2017)。

海洋线虫 *Litoditis marina*, 曾用名(*Rhabditis marina*, *Pellioiditis marina*), 隶属于线虫动物门(Nematoda), 色矛纲(Chromadorea), 小杆目(Rhabditida), 小杆科(Rhabditidae), *Litoditis* 属; 与生物医学模式生物秀丽线虫属于同一个科。*L. marina* 为雌雄异体, 繁殖上限温度为 25°C, 在 9—25°C 范围内, 该物种的发育速度会随着温度的升高而加快(Moens *et al.*, 2000)。在 20°C 左右, 盐度为 20 左右的条件下 *L. marina* 产生的子代数最多(Moens *et al.*, 2000)。目前关于海洋线虫 *L. marina* 在不同 pH 条件下的生长发育及其调控机制尚未报道(曹绪文等, 2018; Xie *et al.*, 2020)。

酸性 pH 胁迫普遍存在并且会给生物体带来一系列负面影响, 因此研究生物体响应环境酸性 pH 胁迫的生物学机制意义重大。由于海洋两性繁殖无脊椎动物中还没有真正意义的模式生物, 所以目前关于海洋无脊椎动物应对海水酸性 pH 胁迫的分子机制的研究还不够深入。作者所在团队经过 3 年努力, 已经构建了成熟的海洋线虫模式体系(Xie *et al.*, 2020)。本研究以海洋线虫为研究对象, 通过线虫响应不同 pH 环境的表型实验与转录组分析, 以期探究无脊椎动物应答酸性 pH 胁迫的分子机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 品系的获得

海洋线虫 *Litoditis marina* 初始样本采集于山东青岛汇龙湾潮间带, 相较于常规的秀丽线虫 NGM 培养基(pH 为 6.33), *L. marina* 在海水 NGM 培养基(pH 为 5.92)的生长与繁殖更好。实验室也尝试通过添加 Tris-HCl 和 KOH 等试剂调节海水 NGM 培养基的 pH 至 7.7(汇龙湾海水的 pH 为 7.7 左右), 但 *L. marina* 的生长情况并不是很好。经过很多的摸索和尝试, 最终选择了海水 NGM 培养基(pH 为 5.92)作为 *L. marina* 的最佳培养基。本研究中使用的线虫是经过 2 年实验室驯化培养后的 *L. marina* 品系, 20°C 条件下培养于接种大肠杆菌 *E. coli* OP50 的海水 NGM 培养板。

### 1.2 海洋线虫的同步化

在已接种 OP50 的海水培养板上培养海洋线虫, 至平板上有大量虫卵分布时, 收集虫卵至 15 mL 离心管中, 3600g, 离心 2 min。弃上清后加入灭菌水清洗 2 次。在室温下用碱性次氯酸盐溶液处理虫卵 30 s, 1300g, 离心 1 min。用灭菌水清洗卵沉淀 2 次, 1300g, 离心 1 min 去上清后再加入海水(Da Silva, 2005)。用玻璃管转移卵液至空的培养基平板上(有 OP50, 1 滴卵液/板), 20°C 孵化过夜, 孵育 20 h 后得到大量同步化的海洋线虫 L1 幼虫。

### 1.3 海洋线虫表型实验

鉴于目前实验室海洋线虫最佳培养基的 pH 为 5.92, 本研究以 pH 5.92 为对照组, pH 5.33、pH 4.33 和 pH 3.33 为酸性胁迫组。配制特定 pH 的海洋线虫培养基小平板(1.7g Agar, 0.25g Peptone, 97.5 mL 海水, 0.1 mL 1 mol/L MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mL 1 mol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mL 5 mg/mL 胆固醇乙醇溶液, 通过适量 50% 盐酸溶液调节 pH, 加入 2.5 mL 1 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲溶液使其保持一个稳定的 pH), 每个 pH 小平板接种 10 μL 大肠杆菌 OP50。待菌液干燥后, 每个 pH 小平板转入 70 只同步化的 L1 幼虫, 观察它们的生长发育情况, 记录每个平板上观察到的最早出现海洋线虫成体的时间。每个 pH 条件进行 3 个重复。

### 1.4 RNA-seq 建库准备及 RNA-seq 分析

通过 1.2 的方法得到大量的同步化的 L1 海洋线虫幼虫后, 用 M9 溶液将 L1 幼虫从培养基上洗脱下来, 转入 15 mL 离心管中, 1300g, 离心 2 min 后弃上清。将收集的 L1 幼虫转移到已接种 OP50 的直径 9 cm 的 pH 平板上, 每个 pH 平板上放约 60000 只线虫。20°C 孵育 3 h 后用 M9 溶液分别洗脱在不同 pH 环境下的 L1 幼虫, 将洗脱液转入 15 mL 离心管中, 3600g 离心 2 min 去上清, 再加入 M9 溶液离心去上清, 如此反复, 洗涤三次, 去除大部分残留细菌。然后将 L1 线虫样品转移到 1.5 mL 的离心管中, 2000g 离心 5 min, 除去多余的上清。样品立即在液氮中冷冻 5 min, -80°C 保存。每个 pH 条件实验(pH 4.33, pH 5.33 和 pH 5.92)进行三次重复。

将样本用液氮迅速研磨后, 通过 Trizol 法提取 RNA。通过琼脂糖凝胶电泳和 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析样品 RNA 完整性及是否存在 DNA 污染; 通过 Qubit 2.0 Fluorometer 对 RNA 浓度进行精确定量。使用 Illumina 的 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit 试剂盒进行文库构建。把不同文库按照有效

浓度及目标下机数据量的需求pooling后进行Illumina测序,并产生150bp配对末端读数,测序片段被高通量测序仪测得的图像数据经CASAVA碱基识别转化为序列数据。通过HISAT2 v2.0.5构建参考基因组的索引,将配对末端clean reads与参考基因组比对(Kim *et al.*, 2015, 2019; Pertea *et al.*, 2016)。参考基因组为实验室测得的海洋线虫基因组。featureCounts v1.5.0-p3被用来计算映射到每个基因的读数(Liao *et al.*, 2014)。根据基因的长度计算每个基因的FPKM,并计算映射到该基因的读数。基于负二项分布,通过R程序包DESeq2(1.16.1)进行两个比较组合之间的差异表达分析(Love *et al.*, 2014)。使用Benjamini和Hochberg法来调整所得P值以控制错误发现率。通过DESeq2筛选出校正后的P值小于0.05( $P_{\text{adjusted}} < 0.05$ )的基因被分配为差异表达基因。显著差异表达的筛选标准为校正后的P值 $< 0.05$ 以及 $|\log_2 \text{foldchange}| > 1$ 。使用R程序包clusterProfiler实现差异表达基因的GO富集分析和KEGG通路分析,以校正后的P值小于0.05作为显著性富集的阈值(Yu *et al.*, 2012)。

## 2 结果与分析

### 2.1 海洋线虫 *L. marina* 在不同酸性 pH 条件下的生长发育比较

为了探究在不同酸性pH条件下海洋线虫*L. marina*生长发育的速度,我们进行了表型实验。将同步化的70只海洋线虫L1幼虫转移到不同pH平板上,每个pH条件三次重复,记录平板上出现成体的时间和成体数量。结果显示:在pH 5.92条件下,海洋线虫*L. marina*在第4天出现成体,成体率约为36%,后续可以产卵繁殖(图1);在pH 5.33条件下,第4天出现成体,成体率约为18%,也可以产卵繁殖(图1);在pH 4.33条件下,第4天线虫不能发育至成体,只能长至L4期幼体,最终在第6天死亡。在pH 3.33条件下,L1幼虫不能存活,2h内全部死亡。

### 2.2 海洋线虫 *L. marina* 在不同酸性 pH 条件下的转录组分析

我们通过高通量RNA测序(RNA-seq)来识别和

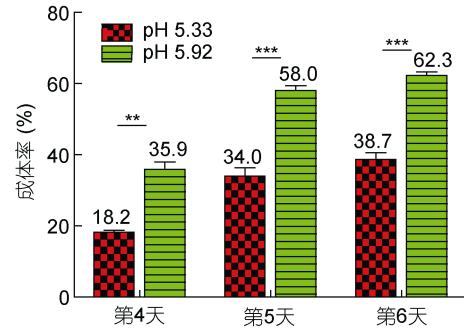


图1 海洋线虫在不同 pH 值的成体率

Fig.1 The adult rate of *L. marina* under different pH values  
注:误差条代表3次重复实验的标准误差(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

量化海洋线虫*L. marina*在不同pH条件下的差异表达基因。以pH 5.92为对照组,pH 5.33,pH 4.33分别为处理组,错误发现率 $FDR < 5\%$ 和 $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$ 作为差异基因筛选阈值。图2是差异表达基因的聚类热图。各比较组合中上调基因和下调基因的数量如表1所示。

### 2.3 脂肪酸代谢相关基因表达随 pH 的下降而升高

通过KEGG分析,我们发现当pH下降到4.33时,海洋线虫*L. marina*脂肪酸 $\beta$ -氧化通路涉及的关键酶(Watts *et al.*, 2017)基因表达显著上调(图3,图4a,图4b)。在秀丽线虫中,对应AMP-binding enzyme注释的绝大多数为酰基辅酶A合成酶家族基因(*acs*, acyl-CoA Synthetase),因此在海洋线虫*L. marina*中的这7个注释为AMP-binding enzyme的基因极有可能就是表达酰基辅酶A合成酶的基因(图4a)。酰基辅酶A合成酶可以催化脂肪酸与辅酶A形成硫酯键,形成脂酰-CoA,这是脂肪酸 $\beta$ -氧化的起始步骤(许雪梅等, 2009; Ellis *et al.*, 2010)。此外,随着pH的下降,我们还发现了3个与不饱和脂肪酸合成相关的基因的表达量显著升高(图3,图4c),其中EVM0000114属于ELO家族,秀丽线虫的脂肪酸延长酶基因*elo*参与了不饱和脂肪酸延长的主要步骤,因此海洋线虫EVM0000114基因很有可能也是编码脂肪酸延长酶的基因。

表1 每个比较组合中差异表达基因的数量  
Tab.1 The number of differentially expressed genes in each combination

各 pH 组的比较	总的差异基因数	上调基因数	下调基因数
4.33 vs 5.92	321	231	90
5.33 vs 5.92	61	47	14
4.33 vs 5.33	84	60	24

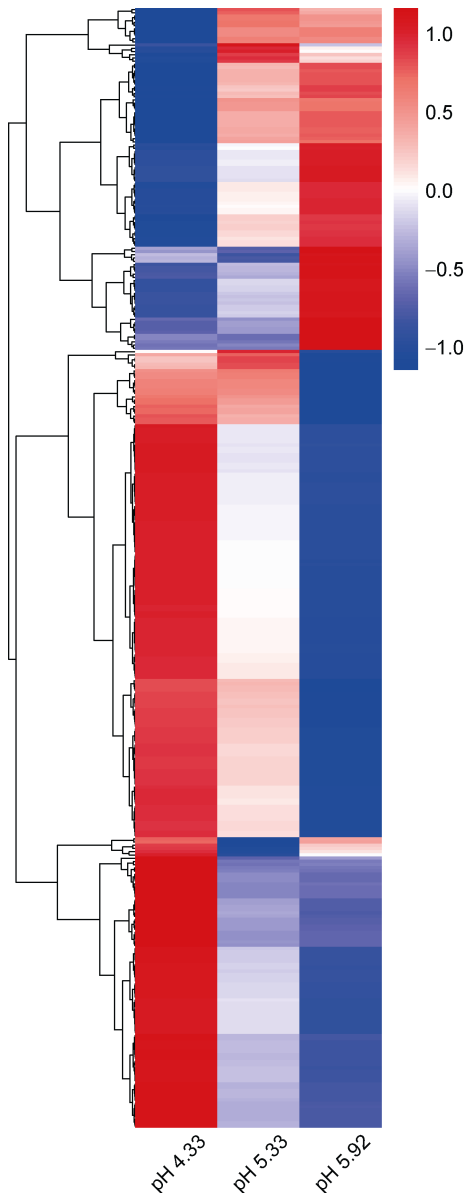


图2 海洋线虫在不同 pH 值下差异表达基因的聚类热图

Fig.2 Heatmap of differentially expressed genes of *L. marina* exposed to different pH values

注: 横坐标为样品名, 纵坐标为差异基因 FPKM 归一化后的数值, 红色表示上调, 蓝色表示下调

#### 2.4 表皮相关基因差异表达

当pH下降到4.33时, 海洋线虫*L. marina*表皮合成相关的2个虾红素(Astacin)基因*nas*和6个补丁家族基因(Patched family)*ptr*表达显著上调(图5a, 5b)。但是, 表皮胶原基因*col*类基因的表达没有发生显著变化(图5c)。

#### 2.5 细胞色素 P450 通路相关基因表达随 pH 的下降而升高

在pH 4.33的条件下, KEGG pathway分析结果显

示, 海洋线虫*L. marina*中细胞色素P450通路得到显著富集; 细胞色素P450氧化酶、黄素结合的单加氧酶、谷胱甘肽-S-转移酶、ABC转运蛋白等基因的表达量都显著升高(图3, 图6)。而在pH 5.33条件下, 细胞色素P450通路相关基因中仅EVM0009829、EVM0007061、EVM0012458、EVM0004308、EVM0011078表达上调。此外, 海洋线虫*L. marina*核激素受体基因*nhr*(nuclear hormone receptor)也在pH下降到4.33时表达量显著升高(图6)。

#### 2.6 凝集素 C 基因和热休克蛋白基因的表达随 pH 的下降而上调

在pH 4.33条件下, 海洋线虫*L. marina*中3个注释为HSP70和1个注释为HSP90的基因, 以及5个凝集素C基因的表达量显著升高(图7a, 7b)。但是, 在pH 5.33条件下, 这些基因的表达量并没有发生显著变化。

### 3 讨论

#### 3.1 脂肪酸 $\beta$ -氧化可能是海洋线虫响应酸性 pH 胁迫的主要途径

从分析结果中发现当pH下降到4.33时, 25个脂肪酸 $\beta$ -氧化通路基因表达显著上调(图4a, 图4b), 这些基因数目占鉴定出的所有上调基因的11%。脂肪酸 $\beta$ -氧化过程是一个高度的放能过程, 每一轮 $\beta$ -氧化会产生一个NADH, 1个FADH<sub>2</sub>和1个乙酰-CoA(Houten *et al.*, 2016), 每个乙酰-CoA经过氧化可产生10个ATP(Ashrafi, 2007; Braeckman *et al.*, 2009; Akram, 2014)。氧化的脂质底物可能是在海洋线虫*L. marina*生命早期阶段满足发育所需能量的主要来源, 脂肪酸 $\beta$ -氧化通路基因表达上调, 反映了海洋线虫*L. marina*动员能量储备来应对环境pH的下降。

pH 下降导致的脂肪酸分解代谢增加在不少文献中都有所报道。Hall 等(2008)的研究发现, 当pH从7下降到4, 秀丽线虫3个脂肪酸 $\beta$ -氧化通路基因表达量都显著升高, 包括酰基辅酶A合成酶(*acs-2*, *F28F8.2*), 酰基辅酶A氧化酶(*acox-1.5*, *F08A8.4*)和3-羟酰辅酶A脱氢酶(*hacd-1*, *R09B5.6*)基因。该研究认为pH下降影响了钠氢交换体NHX-2耦合H<sup>+</sup>浓度的营养物质的摄入, 导致线虫只能通过脂肪酸的分解来提供一种替代的能量来源(Hall *et al.*, 2008)。与海洋线虫*L. marina*相比, 秀丽线虫脂肪酸 $\beta$ -氧化通路上调的基因数量少很多(Cong *et al.*, 2020), 可见脂肪酸 $\beta$ -氧化虽然参与了秀丽线虫对酸性胁迫的响应,

但可能并不发挥主要作用。紫海胆在海水 pH 下降时, 脂肪酸氧化途径中的多个基因表达上调(Evans *et al*, 2017), 该研究认为酸性胁迫作用于代谢基因网络, 使 ATP 转向维持细胞内环境的酸碱平衡, 以此来增强生物体对海水酸化的耐受性(Evans *et al*, 2017)。

### 3.2 细胞色素 P450 通路基因参与海洋线虫对酸性 pH 胁迫的响应

细胞色素P450通路的物质代谢过程主要分为2个阶段。第一阶段: 亲脂性物质被细胞色素P450单氧化酶(CYP)等修饰成亲电或亲核物质。第二阶段: 经过

第一阶段反应产生的亲水性化合物在谷胱甘肽转移酶等的催化作用下与极性配体结合。最后由ABC转运蛋白把这些性状改变的化合物运输到细胞外(Barnes, 1960; Dieterich *et al*, 2008; Croom, 2012)。当pH从8.0降到7.3时, 长牡蛎Cytochrome P450 1A5和Glutathione S-transferase  $\Omega$ -1表达量显著升高(Timmins-Schiffman *et al*, 2014)。在本研究中, 当pH下降到4.33时, 10个物质代谢细胞色素P450通路基因表达显著上调(图3, 图6)。我们在秀丽线虫中也发现, 当pH从6.33(秀丽线虫正常培养基的pH)下降到3.13时, 32个细胞色素P450

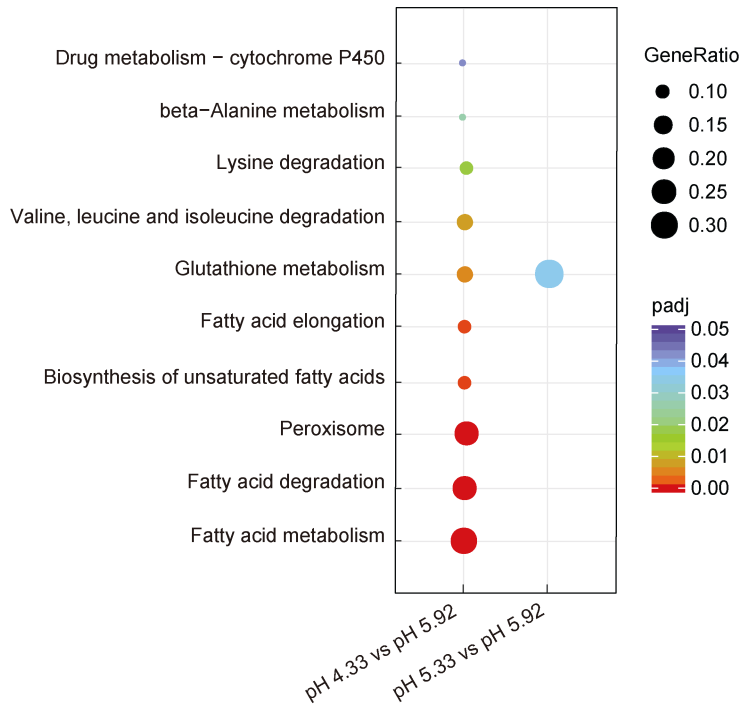
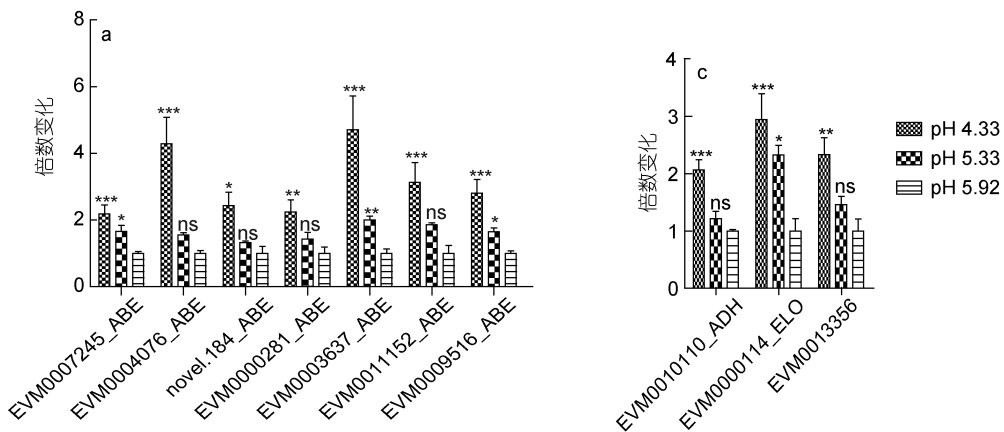


图 3 各比较组合中上调基因的 KEGG 富集情况

Fig.3 KEGG enrichment of up-regulated genes in each combination  
注: 由于下调基因数量较少, 所以下调基因并未被 KEGG 富集到任何通路中



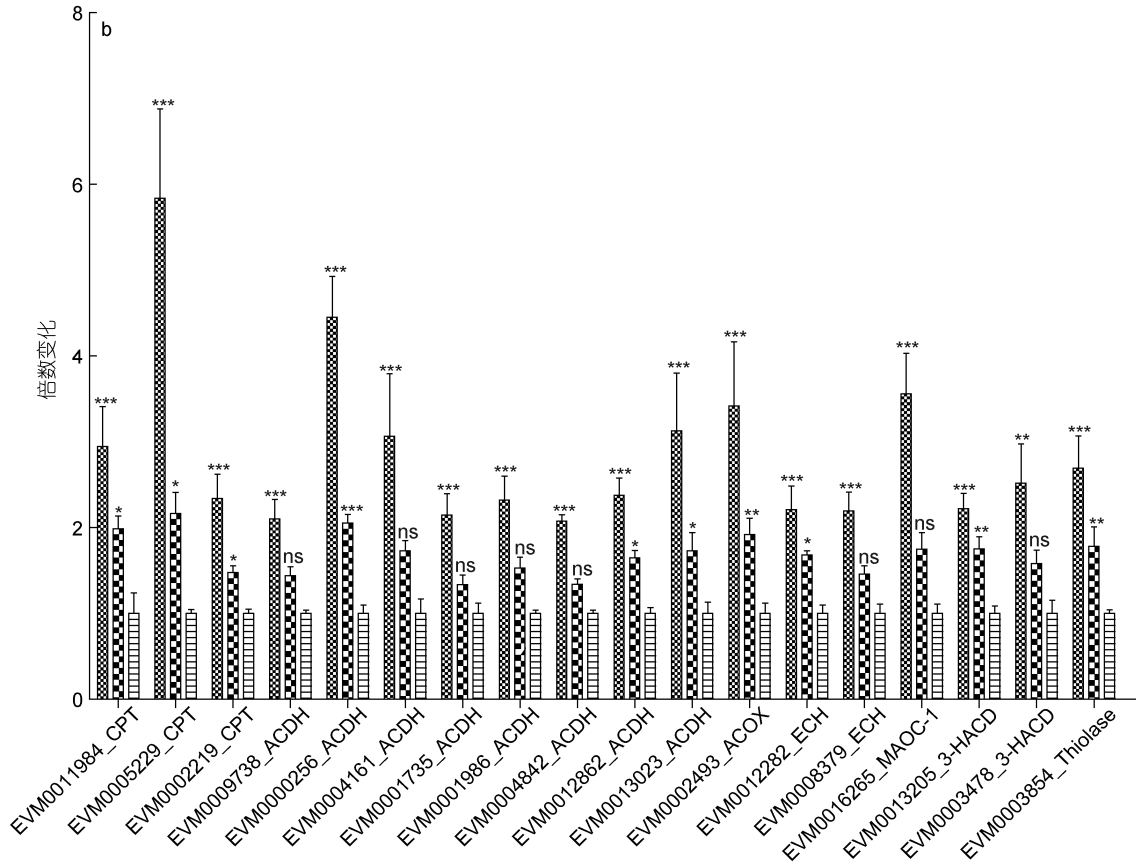
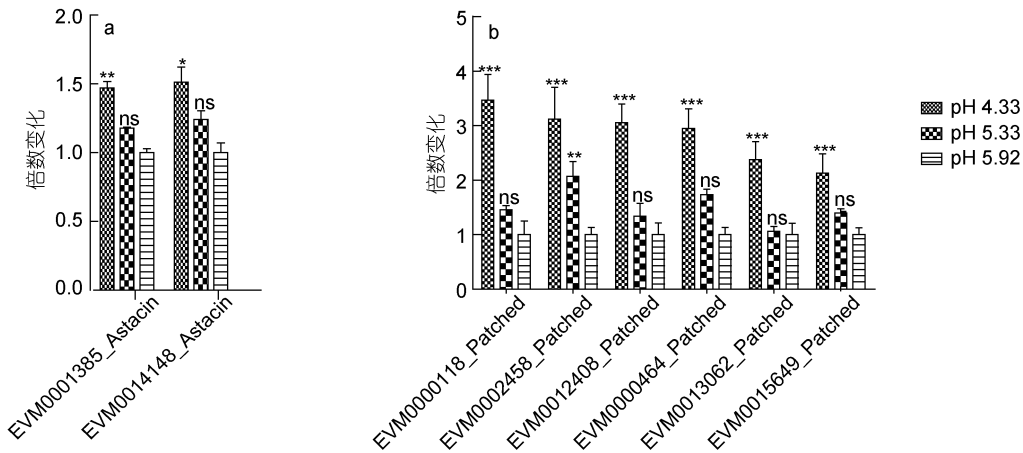


图 4 海洋线虫脂肪酸代谢相关基因的表达情况

Fig.4 Expression of the genes related to fatty acid metabolism in *L. marina*

注: a. 酰基辅酶 A 合成酶基因的转录水平; ABE. AMP-binding enzyme, AMP 结合酶; b. 脂肪酸  $\beta$ -氧化相关基因的转录水平; CPT. carnitine palmitoyl transferase, 肉碱棕榈酰转移酶; ACDH. acyl-CoA dehydrogenase, 酰基辅酶 A 脱氢酶; ACOX. acyl-CoA oxidase, 酰基辅酶 A 氧化酶; ECH. enoyl CoA hydratase, 烯酰辅酶 A 水合酶; 3-HACD. 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase, 3-羟酰辅酶 A 脱氢酶; Thiolase. 硫解酶; c. 海洋线虫不饱和脂肪酸合成相关基因的转录水平。ADH. Zinc-binding dehydrogenase, 锌结合的脱氢酶; ELO. fatty acid elongase, 脂肪酸延长酶。倍数变化表示处理组(pH 4.33, pH 5.33)与对照组(pH 5.92)的基因表达量的比值(处理组 FPKM 值/对照组 FPKM 值)。误差条代表 3 次重复实验的标准误差。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$



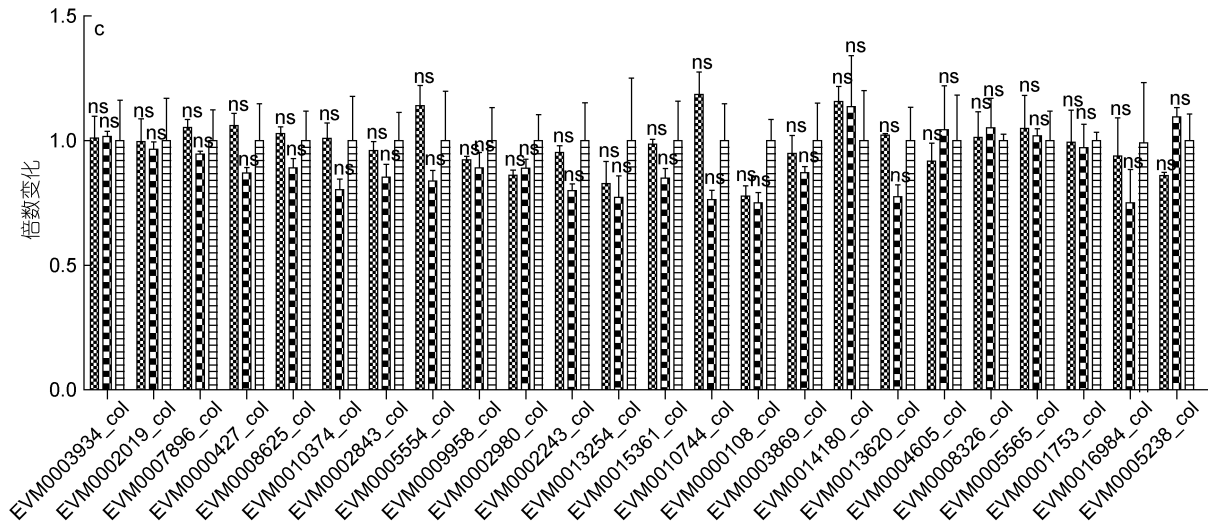


图 5 海洋线虫表皮相关基因的表达情况

Fig.5 Expression of cuticle related genes in *L. marina*

注: a. 线虫虾红素样金属蛋白酶基因 *nas* 转录水平; b. 补丁蛋白相关基因 *ptr* 转录水平; c. 胶原基因 *col* 的转录水平。倍数变化表示处理组(pH 4.33, pH 5.33)与对照组(pH 5.92)的基因表达量的比值(处理组 FPKM 值/对照组 FPKM 值)。误差条代表 3 次重复实验的标准误差。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

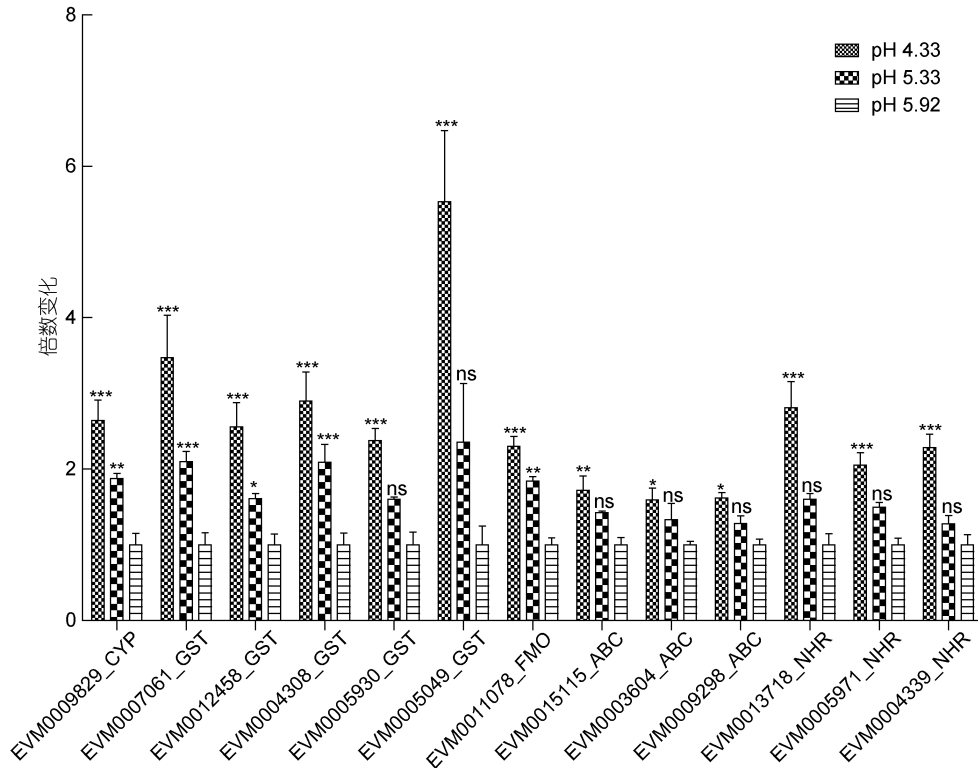


图 6 海洋线虫细胞色素 P450 通路相关基因及核激素受体基因的表达情况

Fig.6 Expression of drug-metabolism cytochrome P450 pathway genes and nuclear hormone receptors genes in *L. marina*

注: CYP. cytochrome P450 oxidase, 细胞色素 P450 氧化酶; FMO. Flavin-binding monooxygenase, 黄素结合的单体氧化酶; GST. glutathione-S-transferase, 谷胱甘肽-S-转移酶; ABC. ATP-binding cassette transporters, ABC 转运蛋白; NHR. nuclear hormone receptors, 核激素受体。倍数变化表示处理组(pH 4.33, pH 5.33)与对照组(pH 5.92)的基因表达量的比值(处理组 FPKM 值/对照组 FPKM 值)。误差条代表 3 次重复实验的标准误差。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

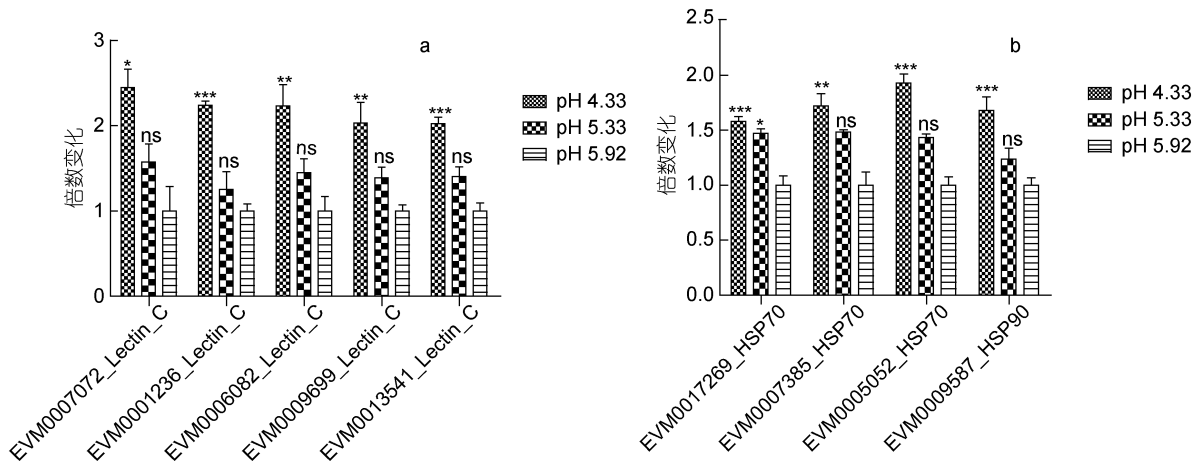


图 7 海洋线虫凝集素 C 基因(a)和热休克蛋白基因(b)的表达情况

Fig.7 Expression of lectin C genes (a) and *hsp* genes (b) in *L. marina*

注: 倍数变化表示处理组(pH 4.33, pH 5.33)与对照组(pH 5.92)的基因表达量的比值(处理组 FPKM 值/对照组 FPKM 值)。误差条代表 3 次重复实验的标准误差。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

通路基因表达上调(Cong *et al.*, 2020)。秀丽线虫在 pH 3.13 的条件下依然可以产卵繁殖, 而海洋线虫 *L. marina* 在 pH 4.33 的条件下不能长成成体, 海洋线虫表现得更不耐酸; 我们推测造成这种差异的原因是海洋线虫 *L. marina* 基因组中的细胞色素 P450 通路基因与陆生自由生活线虫相比, 发生了显著缩减(Xie *et al.*, 2020)。物质代谢细胞色素 P450 通路基因的启动表达很可能是为了保护生物体免受更酸的环境产生的有毒物质的侵害, 或清除因更酸的环境导致生理状态紊乱而积累在其体内的有毒物质。

核激素受体 NHRs 是参与多种生理过程的重要转录调控因子, 研究表明 NHRs 可以调节 P450 通路中 I 期和 II 期解毒基因 *cyp* 和 *gst*、*ugt* 等的表达(Fisher *et al.*, 2006), 它在调节解毒酶功能方面具有广泛的底物特异性, 在对内源及外源有毒物质的代谢过程中发挥着关键作用(Hoffmann *et al.*, 2015), 有毒物质很可能通过配体间接或直接与核激素受体结合, 然后激活外源物质解毒相关基因的表达(Lindblom *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2015)。

鉴于细胞色素 P450 通路基因可能在线虫应对极端酸性环境胁迫时可能发挥的重要作用, 并且该通路基因数量众多, 功能复杂, 本实验室在今后的研究中会着重开展此通路基因的筛选与鉴定, 通过大规模突变体筛选和 CRISPR 基因编辑技术探究决定线虫响应和适应酸性环境胁迫的关键基因, 以期生物能够在不断变化的 pH 环境中生存的分子机制的理解提供参考, 也可能会为提高评估和监测生态修复的

后果提供新的解决方案。

### 3.3 表皮相关基因、凝集素 C 基因及热休克蛋白基因共同参与海洋线虫对酸性 pH 胁迫的响应

在秀丽线虫中, *nas*(Nematode Astacin)编码一种类似虾红素的金属蛋白酶(WormBase, 2019), 它与表皮合成密切相关(Novelli *et al.*, 2004)。注释为 Patched family 的基因在秀丽线虫中绝大多数都是 *ptr*(patched-related protein)基因, 这些基因参与了线虫的表皮更替过程; *ptr* 基因的破坏会导致秀丽线虫的蜕皮障碍(Zugasti *et al.*, 2005)。在本研究中, *nas* 和 *ptr* 基因的表达上调说明表皮相关基因参与了海洋线虫 *L. marina* 对酸性 pH 胁迫的响应。我们前期的研究结果显示, 当 pH 下降到 4.33 时, 秀丽线虫中有大量表皮胶原基因 *col* 表达上调(Cong *et al.*, 2020); 但海洋线虫 *L. marina* 的 *col* 基因表达却没有发生显著变化(图 5c), 推测可能是由于两种线虫的表皮结构成分不同, 所以对酸性 pH 胁迫的响应不同。

C 型凝集素是一种  $Ca^{2+}$  依赖的糖结合蛋白(Drickamer, 1989)。当海水 pH 从 8.1 下降到 7.7 时, 翼足类动物 *Clio pyramidata* 的 C 型凝集素家族基因表达量也显著上调(Maas *et al.*, 2015), 特别的是, 这些 C 型凝集素家族基因的功能可能与生物的矿化作用相关。此外, C 型凝集素在维持机体稳态、免疫防御以及免疫监视等生理过程中也发挥着重要作用。当海水 pH 从 8.1 下降到 7.7 时, 紫贻贝 *Mytilus chilensis* 的 C 型凝集素基因的表达量也显著升高, 该研究认为海水酸化可能在紫贻贝感染致病菌 *Vibrio anguillarum* 的早期阶段



触发特定的免疫相关基因,促进抗菌肽和模式识别受体的转录(Castillo *et al*, 2017)。我们鉴定到的这5个上调的C型凝集素基因在海洋线虫对酸性pH胁迫的响应中究竟是发挥何种功能,有待于进一步研究。

热休克蛋白作为一种常见的细胞应激的指示蛋白,在许多刺激下如热休克、缺氧、重金属、寒冷、渗透、盐、紫外线、氧化应激和病原体感染等都会被诱导表达(Morimoto, 1998; Swindell *et al*, 2007)。Urbarova等(2019)的研究发现,海葵*Anemonia viridis*在低pH环境条件下,应激相关转录本的数量急剧增加,其中非常显著的就是热休克蛋白Hsp70和Hsp90的上调。本研究显示,热休克蛋白家族基因也参与了海洋线虫*L. marina*对酸性pH胁迫的响应,它们发挥的具体功能有待于进一步研究。

#### 4 结论

我们的研究表明,当pH从5.92下降到4.33时,海洋线虫*L. marina*通过大量脂肪酸 $\beta$ -氧化通路基因上调来响应酸化胁迫,细胞色素P450通路基因、凝集素C基因、表皮相关基因(*ptr*和*nas*)和HSP70家族基因等共同参与响应过程。这些基因的表达变化与表型实验的结果相吻合,当pH从5.92下降到5.33时,海洋线虫*L. marina*生长发育的速度明显减慢,但依然可以产卵繁殖,上述这些基因的表达并没有发生显著变化(只有其中几个基因表达上调);而当pH下降到4.33时,海洋线虫*L. marina*则不能长成成体,上述这些基因表达显著上调。我们在海洋线虫*L. marina*中发现的应答酸化胁迫的调控模式,为理解生物体能够在低pH环境中生存的分子机制提供了参考,同时为筛选和识别生物体响应和适应酸化胁迫的关键基因奠定了基础。

#### 参 考 文 献

- 石 强, 杨东方, 2011. 渤海夏季海水 pH 值年际时空变化. 中国环境科学, 31(S1): 58—68
- 许雪梅, 王大勇, 2009. 秀丽线虫脂肪积累调控的生理与分子机制. 生理科学进展, 40(2): 129—134
- 隋永年, 1986. 海水 pH 及其影响因素. 山东海洋学院学报, (S1): 146—159, 207—208
- 曹绪文, 张留所, 2018. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在线虫中的应用进展和展望. 中国科学: 生命科学, 48(5): 513—520
- Akram M, 2014. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. Cell Biochemistry and Biophysics, 68(3): 475—478
- Ashrafi K, 2007. Obesity and the regulation of fat metabolism. WormBook: the online review of *C. elegans* biology, 9: 1—20, doi: 10.1895/wormbook.1.130.1
- Barnes J M, 1960. Detoxication mechanisms. The metabolism and detoxication of drugs, toxic substances and other organic compounds. British Journal of Industrial Medicine, 17(3): 244
- Braeckman B P, Houthoofd K, Vanfleteren J R, 2009. Intermediary metabolism. In: WormBook: the Online Review of *C. Elegans* Biology, 1—24, doi: 10.1895/wormbook.1.146.1
- Castillo N, Saavedra L M, Vargas C A *et al*, 2017. Ocean acidification and pathogen exposure modulate the immune response of the edible mussel *Mytilus chilensis*. Fish & Shellfish Immunology, 70: 149—155
- Cong Y Y, Yang H W, Zhang P C *et al*, 2020. Transcriptome analysis of the nematode *Caenorhabditis elegans* in acidic stress environments. bioRxiv, doi: 10.1101/2020.03.06.980102
- Croom E, 2012. Chapter three-metabolism of xenobiotics of human environments. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 112: 31—88
- Da Silva A P, 2005. *Pristionchus pacificus* genetic protocols. In: WormBook: the Online Review of *C. Elegans* Biology, 1—8, doi: 10.1895/wormbook.1.114.1
- Dieterich C, Clifton S W, Schuster L N *et al*, 2008. The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism. Nature Genetics, 40(10): 1193—1198
- Drickamer K, 1989. Demonstration of carbohydrate-recognition activity in diverse proteins which share a common primary structure motif. Biochemical Society Transactions, 17(1): 13—15
- Duan Y F, Wang Y, Liu Q S *et al*, 2019. Changes in the intestine barrier function of *Litopenaeus vannamei* in response to pH stress. Fish & Shellfish Immunology, 88: 142—149
- Ellis J M, Frahm J L, Li L O *et al*, 2010. Acyl-coenzyme a synthetases in metabolic control. Current Opinion in Lipidology, 21(3): 212—217
- Evans T G, Pespeni M H, Hofmann G E *et al*, 2017. Transcriptomic responses to seawater acidification among sea urchin populations inhabiting a natural pH mosaic. Molecular Ecology, 26(8): 2257—2275
- Fisher A L, Lithgow G J, 2006. The nuclear hormone receptor DAF-12 has opposing effects on *caenorhabditis elegans* lifespan and regulates genes repressed in multiple long-lived worms. Aging Cell, 5(2): 127—138
- Hall R A, Vullo D, Innocenti A *et al*, 2008. External pH influences the transcriptional profile of the carbonic anhydrase, CAH-4B in *Caenorhabditis elegans*. Molecular and Biochemical Parasitology, 161(2): 140—149
- Havenhand J N, Filipsson H L, Niiranen S *et al*, 2019. Ecological and functional consequences of coastal ocean acidification: perspectives from the baltic-skagerrak system. Ambio, 48(8): 831—854

- Hoffmann J M, Partridge L, 2015. Nuclear hormone receptors: roles of xenobiotic detoxification and sterol homeostasis in healthy aging. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 50(5): 380—392
- Houten S M, Violante S, Ventura F V *et al*, 2016. The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation and its genetic disorders. *Annual Review of Physiology*, 78(1): 23—44
- Kim D, Langmead B, Salzberg S L, 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4): 357—360
- 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
- Kunz K L, Claireaux G, Pörtner H O *et al*, 2018. Aerobic capacities and swimming performance of polar cod (*Boreogadus saida*) under ocean acidification and warming conditions. *The Journal of Experimental Biology*, 221(21): jeb184473
- Liao Y, Smyth G K, Shi W, 2014. Featurecounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7): 923—930
- Lindblom T H, Dodd A K, 2006. Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305A(9): 720—730
- Liu W G, Yu Z H, Huang X D *et al*, 2017. Effect of ocean acidification on growth, calcification, and gene expression in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Marine Environmental Research*, 130: 174—180
- Love M I, Huber W, Anders S, 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12): 550
- Maas A E, Lawson G L, Tarrant A M, 2015. Transcriptome-wide analysis of the response of the thecosome pteropod *Clio pyramidata* to short-term CO<sub>2</sub> exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 16: 1—9
- Moens T, Vincx M, 2000. Temperature and salinity constraints on the life cycle of two brackish-water nematode species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 243(1): 115—135
- Montgomery M T, Boyd T J, Osburn C L *et al*, 2009. Desalination technology waste streams: effect of pH and salinity on metabolism of marine microbial assemblages. *Desalination*, 249(2): 861—864
- Morimoto R I, 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development*, 12(24): 3788—3796
- Novelli J, Ahmed S, Hodgkin J, 2004. Gene interactions in *Caenorhabditis elegans* define DPY-31 as a candidate procollagen C-proteinase and SQT-3/ROL-4 as its predicted major target. *Genetics*, 168(3): 1259—1273
- Pertea M, Kim D, Pertea G M *et al*, 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and ballgown. *Nature Protocols*, 11(9): 1650—1667
- Swindell W R, Huebner M, Weber A P, 2007. Transcriptional profiling of arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 8(1): 125
- Timmins-Schiffman E, Coffey W D, Hua W *et al*, 2014. Shotgun proteomics reveals physiological response to ocean acidification in *Crassostrea gigas*. *BMC Genomics*, 15(1): 951
- Urbarova I, Forêt S, Dahl M *et al*, 2019. Correction: ocean acidification at a coastal CO<sub>2</sub> vent induces expression of stress-related transcripts and transposable elements in the sea anemone *Anemonia viridis*. *PLoS One*, 14(6): e0218009
- Watts J L, Ristow M, 2017. Lipid and carbohydrate metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 207(2): 413—446
- WormBase, 2019. Explore Worm Biology. <https://wormbase.org>
- Xie Y S, Zhang P C, Xue B N *et al*, 2020. Establishment of a marine nematode model for animal functional genomics, environmental adaptation and developmental evolution. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.06.980219
- Yu G C, Wang L G, Han Y Y *et al*, 2012. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 16(5): 284—287
- Zugasti O, Rajan J, Kuwabara P E, 2005. The function and expansion of the patched- and hedgehog-related homologs in *C. elegans*. *Genome Research*, 15(10): 1402—1410

## TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF THE RESPONSE OF MARINE NEMATODE *LITODITIS MARINA* TO ACIDIC STRESS

CONG Yan-Yi<sup>1, 2, 3, 4</sup>, XIE Yu-Su<sup>1, 2, 3</sup>, ZHANG Liu-Suo<sup>1, 2, 3</sup>

(1. CAS Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Since the industrial revolution, carbon dioxide emissions have led to ocean acidification. The decrease in pH of seawater has important effects on the growth, reproduction, metabolism, and immune regulation of organisms. At present, the molecular mechanisms by which marine organisms perceive and respond to acidic stress remain largely unknown. In this study, marine nematode *Litoditis marina* was used as an animal model to analyze its phenotypic and transcriptome characteristics under different pH values. Our report provided a reference for exploring the regulatory mechanism of marine invertebrates in response to the acidic stress of seawater. We found that when pH decreased from 5.92 to 5.33 (the optimum growth condition of *L. marina* is 5.92 in laboratory), the growth and development rate of *L. marina* decreased significantly, but it could still spawn. In contrast, when pH dropped to 4.33, the growth of *L. marina* was seriously affected, showing that it could not grow into adulthood and spawn. Through transcriptome analysis, we found that when pH decreased from 5.92 to 4.33, the expression of the fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway genes and the unsaturated fatty acid synthesis genes were significantly up-regulated in *L. marina*. Furthermore, the expressions of 2 *nas* genes and 6 *ptr* genes were also significantly up-regulated, while the expression level of *col* genes were not changed. Additionally, we found that cytochrome P450 pathway genes, lectin C genes and HSP70 family genes were significantly up-regulated. However, when pH decreased from 5.92 to 5.33, most of the above up-regulated genes did not change significantly. This study may lay a foundation for the future study for identifying the master gene(s) responding and adaptation to an acidic stress in nematodes and other marine animals.

**Key words** marine nematodes; *Litoditis marina*; acidic stress; fatty acid  $\beta$ -oxidation; drug metabolism cytochrome P450