

海洋线虫 *Litoditis marina* 低氧胁迫响应的转录组分析*

李 博^{1, 2, 3, 4} 谢玉素^{1, 2, 3} 张留所^{1, 2, 3}

(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 山东青岛 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 山东青岛 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心 山东青岛 266071; 4. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 全球气候变化导致海洋氧含量降低, 海水低氧胁迫对海洋无脊椎动物的生长、发育和繁殖造成了严重的威胁。以海洋线虫 *Litoditis marina* 为实验对象, 观察了其在不同氧浓度(21%、3%、1%和 0.5%)条件下的生长发育速率, 并对不同氧浓度条件下的 L1 幼虫样品进行了转录组测序和分析。实验结果表明, 当环境氧浓度从 21%下降至 3%时, *L. marina* 的发育成熟速度明显加快, 进一步下降至 1%时, 产卵时间延长并和 21%氧浓度接近, 但当氧浓度为 0.5%时, *L. marina* 的产卵时间显著延迟。比较转录组分析表明, 相比于 21%氧浓度环境, 3%、1%和 0.5%低氧条件下 *L. marina* 的糖酵解、糖异生、硫代谢和线粒体碳代谢等通路相关基因的表达显著上调; 而寿命调控通路、细胞色素 P450 代谢通路和 ABC 转运蛋白相关基因的表达显著下调。研究结果发现的海洋线虫应对氧浓度胁迫的基因表达变化模式, 为深入理解海洋无脊椎动物应答低氧胁迫分子机制提供了重要参考。

关键词 海洋线虫; *Litoditis marina*; 低氧胁迫; 糖酵解; 硫代谢; 碳代谢通路

中图分类号 Q344 doi: 10.11693/hyh20220900225

人类活动导致温室效应加剧, 全球变暖日益严重。而升温则会造成海水溶氧量下降, 研究表明海洋低氧胁迫影响鲍(*Haliotis rufescens*)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)和硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)等海洋无脊椎动物的生长发育和生存(Kim *et al.*, 2013; Gobler *et al.*, 2014)。转录组分析显示低氧应答启动珊瑚低氧诱导转录因子 HIF-1 及其靶基因表达, 热激蛋白 HSP-70 和 HSP-90 在珊瑚低氧耐受中发挥重要作用(Alderdice *et al.*, 2021)。而严重缺氧显著提升双壳贝类 *Lembulus bicuspidatus* 无氧糖酵解、抗氧化和质量控制通路基因的表达(Amorim *et al.*, 2021)。小头虫 *Capitella teleta* 通过低氧感知蛋白 TRPA1 识别低氧胁迫的严重程度进而决定是否逃离低氧环境(Ogino *et al.*, 2019)。环节动物 *Hermodice carunculata* 在中度

缺氧胁迫下仅上调 HIF-1 α 亚基的表达水平, 在严重缺氧条件下 HIF-1 β 亚基的表达水平显著上调, 而在间歇性缺氧环境下其血红素转运功能相关基因显著上调(Grimes *et al.*, 2021)。

模式生物秀丽线虫 *Caenorhabditis elegans* 适应 1%和 0.5%低氧环境, 需要低氧诱导因子 *hif-1* 基因(Jiang *et al.*, 2001; Padilla *et al.*, 2002; Nystul *et al.*, 2004; Powell-Coffman, 2010)。研究发现秀丽线虫在低氧胁迫环境下 110 个基因的表达发生了显著变化, 其中 63 个依赖于 *hif-1* 基因(Shen *et al.*, 2005)。研究报道核激素受体 NHR-49 与低氧诱导因子 HIF-1 平行调控秀丽线虫低氧胁迫应答(Doering *et al.*, 2022)。此外, 蛋白翻译和胰岛素信号通路也参与调控秀丽线虫的低氧胁迫响应(Anderson *et al.*, 2009; Mabon *et al.*, 2009;

* 国家重点研发项目, 2018YFD0901301 号; 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。李 博, 硕士研究生, E-mail: libo195@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: 2022-09-01, 收修改稿日期: 2022-10-24

Itani *et al.*, 2021; Mulrone *et al.*, 2021; Hemphill *et al.*, 2022)。*ddx-52* 基因编码秀丽线虫 RNA 解旋酶参与核糖体 RNA 的加工, 该基因功能缺失型突变体具有低氧耐受表型, 研究表明核糖体和 tRNA 合成协同调控秀丽线虫低氧胁迫应答(Itani *et al.*, 2021; Mulrone *et al.*, 2021)。

海洋线虫 *Litoditis marina* 在世界各地的沿海和口岸广泛分布, 在海洋生态系统起着重要作用(Derycke *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021), 但 *L. marina* 响应低氧胁迫机制的相关研究尚无报道。本研究以 *L. marina* 为实验材料, 通过 RNA-seq 初步探讨了 *L. marina* 响应低氧胁迫的发育响应与转录组变化特征, 以期为进一步利用基因编辑等技术方法深入研究在全球气候变化背景下, 海洋无脊椎动物应答低氧胁迫的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 海水 NGM 平板制备

海水 NGM (Nematode Growth Medium) 培养基制备参照 Xie 等(2021)。新制备的海水 NGM 大板(直径 9 cm)于室温下放置 48 h 后接菌或者置于 4 °C 冰箱冷藏保存。每个用于高密度培养维持海洋线虫的海水 NGM 大板接种 15×浓缩的大肠杆菌 OP50 950 mL 并且用灭菌的涂布棒涂匀, 室温放置 48 h, 之后将涂菌的海水 NGM 大板置于 4 °C 冰箱冷藏备用; 用于氧浓度处理收样的大板则接种 500 μL 1×OP50 并用涂布棒涂匀, 室温放置 2 h 后直接使用或 4 °C 冷藏保存。表型观察使用的海水 NGM 小板(直径 3.5 cm), 制备后在室温放置两天后每板接种 30 μL 1×OP50 菌液, 室温放置 2 h 后置于 4 °C 冷藏备用。所有在 4 °C 冷藏保存的海水 NGM 平板使用前需要在室温放置 30 min。

1.2 海洋线虫 *L. marina* 的大规模同步培养和收样

待 NGM 大板培养的 *L. marina* 大量产卵时, 用灭菌海水将培养基上的线虫与卵洗涤至 50 mL 离心管内, 自然沉降 5 min, 转移底部沉降下来的成虫到新的大板上备用, 将含有虫卵的上悬液用玻璃管转移至另一个新的 50 mL 离心管中, 3 000 g 离心 2 min。

去上清, 保留底部沉淀和约 1 mL 的液体, 转移到新的 15 mL 离心管中, 加入灭菌水到 12 mL, 震荡重悬待底部沉淀散匀后 1 300 g 离心 1 min, 重复上述步骤 3 次。第三次洗涤完成后吸出上清液, 加入灭菌水直至 3 mL, 再加入 3 mL 的 bleach 液后震荡 90 s,

立刻加入灭菌水补到 12 mL, 1 300 g 离心 1 min。吸出上清液, 加入灭菌水至 12 mL, 震荡重悬后 1 300 g 离心 1 min。重复上述步骤 2 次, 最后将灭菌水替换为灭菌海水洗涤离心一次。

吸出上清液, 保留沉淀的虫卵和少许海水, 将卵吹散后, 通过 400 目网筛过滤, 转移至含 10 mL 灭菌海水的中培养皿(直径 6 cm)中孵育 20~22 h。通过 450 目网筛过滤, 将 L1 幼虫转移到 15×OP50 的海水 NGM 大板培养。第 5 天海水大板上 *L. marina* 大量产卵, 可用于扩大化同步培养或者 L1 幼虫样品收集。当海洋线虫的培养规模到达收样所需规模时可以进行多批次的液体 bleach 以及收样。

1.3 海洋线虫 *L. marina* 的生长观察实验

经过液体 bleach 虫卵, 孵化 20~22 h 后, 通过 450 目网筛过滤, 将 L1 幼虫转移到接种有 20 μL 大肠杆菌 1×OP50 的海水 NGM 小板(直径 3.5 cm), 每个小板转入 70 只同步化的新孵化 L1 幼虫。在 20 °C 条件下, 实验设为 21%、3%、1%和 0.5%四个氧浓度, 每个氧浓度设置三个生物学重复, 分别记录每个小板上的产卵时间。采用氧气控制设备型号为 BioSpherix C21, 生化培养箱型号为上海龙跃 LBI-275-N。

1.4 RNA-seq 测序及分析

RNA-seq 转录组测序实验包括样品检测、文库构建、文库质控和上机测序, 具体步骤参照 Xie 等(2021)。转录组数据分析前对测序获得 Reads 进行质控, 去除含有接头和低质量的 Reads。采用 DESeq2 进行样品组间的差异表达分析, 使用 edgeR 进行差异分析, 差异表达基因检测中将差异倍数(Fold Change) 1.5 以及错误发现率(False Discovery Rate, FDR) < 0.05 作为筛选标准。随后进行 KEGG 和 GO 富集分析。

1.5 荧光定量 PCR

本实验选取部分表达发生显著性差异的关键基因进行 qPCR 验证(*pck-2*、*pgk-1*、*pygl-1*、*mmcm-1*、*ctl-2*、*cysl-2*、*sdhb-1* 和 *mce-1*), 参考基因为 *cdc-42*。表 1 为相关引物序列, 实验步骤参照 Cao 等(2022)。荧光定量 PCR 基因表达倍数变化, 通过 delta-delta Ct method 计算各个实验组三个生物学样本平均值, 与相应基因在 21%氧气浓度下的比值, 使用 Graphpad Prism 9 通过双尾 t 检验计算 P 值, 显著性标准为 P<0.05。荧光定量 PCR 结果与 RNA-seq 间的相关性通过 Pearson correlation analysis 计算。

表 1 qPCR 验证基因的引物序列
Tab.1 The primer sequences of verification genes in qPCR

基因名	正向引物	反向引物
EVM0013809_ <i>cdc-42</i>	GCCACTAAGGCTATGTACGACCT	TTCAACGTGAACCTTCTTTTCAA
EVM0015867_ <i>pck-2</i>	GAAAGAGGCATGCTCTCTCCCT	ACACCGTCTGGTACTTGTCG
EVM0011074_ <i>pgk-1</i>	GAGGATGCAACCAGCAGTGT	AACGGTCTTTGCACGGAGCA
EVM0005891_ <i>pygl-1</i>	CTCTCCATTCGATCTTCTCA	GATTGGAGAGAAGCAGCCAG
EVM0005533_ <i>mmcm-1</i>	GTCGAGTCTGGCATGACGAA	CAATCGATACTTGTTCACTCC
EVM0011182_ <i>ctl-2</i>	GTGCTCACAATACGCAACGC	CCTGAGGCATGGAATACGCT
EVM0007291_ <i>cysl-2</i>	CTATGAGTGTGGAACGCAGA	TCCTTGGCTAGTTCCTTGAGCTC
EVM0008590_ <i>sdhb-1</i>	ATCTCGGTCTGCTGTACTCAT	GCAGTTCATGATGGTGTGACAT
EVM0002958_ <i>mce-1</i>	CAACTCGAAGCTAGAGCTCT	GTGGATGTCTTTCACCTCAA

注: *cdc-42* 为参考基因, 其余为验证基因

2 结果与分析

2.1 海洋线虫 *L. marina* 在不同氧气浓度条件下的产卵时间比较

将同步孵化的 70 只 *L. marina* L1 幼虫转移到接种有 20 μ L OP50 菌液的海水 NGM 小板上, 每个氧浓度均包括三次重复实验, 每次重复实验对象为 70 只幼虫。如图 1 所示, 在 21% 氧浓度条件下, *L. marina* 产卵的平均时间为 87.3 h (86、86 和 90 h); 3% 氧浓度条件下产卵时间均值为 79.7 h (78、80 和 81 h); 1% 氧浓度条件下产卵平均时间为 88 h (86、88 和 90 h); 0.5% 氧浓度条件下产卵的平均时间为 97.3 h (96、98 和 98 h)。结果显示与 21% 氧浓度相比, 在 3% 氧浓度下, 线虫发育显著加速, 而在 0.5% 氧浓度下, 发育速率显著延迟。

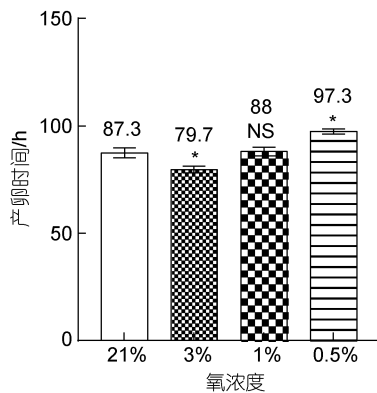


图 1 *L. marina* 在不同氧浓度下的生长速率

Fig.1 The growth rate of *L. marina* under different oxygen concentrations

注: 以 21% 为对照组, 采用 Dunnett 校正的单因素方差分析 (ANOVA with Dunnett's correction) 检验实验组和对照组之间的显著性, 误差条代表对照样本和重复实验的标准误差 (* $P < 0.05$)

2.2 海洋线虫 *L. marina* 在不同氧气浓度条件下的转录组分析

通过 RNA-seq 对海洋线虫 *L. marina* 不同氧浓度条件下的 L1 幼虫进行了转录组测序和分析, 各对比组中上调和下调基因的数量如表 2 所示。图 2 是差异表达基因的聚类热图。图 3 和图 4 分别是各对比组中显著上调和显著下调的 KEGG 富集通路。

2.3 低氧条件下糖酵解/糖异生通路相关基因的表达显著上调

通过 KEGG 富集分析发现, 相较于 21% 氧浓度环境, 糖酵解/糖异生通路多个基因 (*gpi-1*、*aldo-2*、*gpd-3*、*pgk-1*、*pyc-1*、*pck-2* 和 *fbp-1*) 在 3%、1% 和 0.5% 三个低氧浓度条件的表达发生了显著性上调 (图 5a)。其中糖酵解通路基因 *gpi-1*、*aldo-2*、*gpd-3* 和 *pgk-1* 分别编码葡萄糖-6 磷酸异构酶 (glucose-6-phosphate isomerase)、二磷酸果糖醛缩酶 (Fructose bisphosphate aldolase)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 和磷酸甘油酸激酶 (phosphoglycerate kinase), 而糖异生通路基因 *pyc-1*、*pck-2* 和 *fbp-1* 则分别编码丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase)、磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase) 和果糖 1,6 二磷酸酶 (fructose-1,6-biphosphatase)。

表 2 每个对比组合中差异基因的数目

Tab.2 The number of differentially expressed genes in each comparison set

氧浓度比较组	总差异基因数	上调基因数	下调基因数
3% vs 21%	931	434	497
1% vs 21%	1 759	1 143	616
0.5% vs 21%	827	416	411

2.4 低氧条件下硫代谢通路相关基因的表达显著上调

KEGG 富集分析发现, 相较于 21%氧浓度, 硫代谢通路多个基因在 3%、1%、0.5%低氧浓度下发生了显著上调, 包括 *ethe-1*、*mpst-1*、*cysl-2* 与 *cysl-3* (图 5b)。其中 *ethe-1* 编码过硫化物加双氧酶(ETHE1 persulfide dioxygenase), *mpst-1* 编码 3-巯基丙酮酸硫转移酶(3-mercaptopyruvate transferase), *cysl-2* 与 *cysl-3* 则是半胱氨酸合酶(cysteine synthase)编码基因。

2.5 低氧条件下线粒体碳代谢相关基因的表达显著上调

通过 KEGG 富集分析, 发现相较于 21%氧浓度, 碳代谢通路多个线粒体功能相关基因(*mce-1*、*mmcm-1* 和 *sdhb-1*)在 3%、1%和 0.5%低氧浓度处理

条件下的表达发生了显著上调(图 5c)。其中 *mce-1*、*mmcm-1* 和 *sdhb-1* 分别编码甲基丙二酰辅酶 A 差向异构酶(methylmalonyl-CoA epimerase)、甲基丙二酸单酰辅酶 A 变位酶(methylmalonyl-CoA mutase)和琥珀酸脱氢酶 B 亚基(succinate dehydrogenase complex subunit B)。

2.6 低氧条件下寿命调控通路相关基因的表达显著下调

相较于 21%氧浓度, 寿命调控通路相关基因如 *hsp-70*、*ctl-2* 和 *zip-3* 在 3%、1%和 0.5%氧浓度下发生了显著下调, 而 *daf-2* 基因在 3%和 0.5%氧浓度下发生了显著下调(图 6a)。其中 *hsp-70*、*ctl-2*、*zip-3* 和 *daf-2* 分别编码热休克蛋白、过氧化氢酶、bZIP 转录因子和类胰岛素生长因子受体。

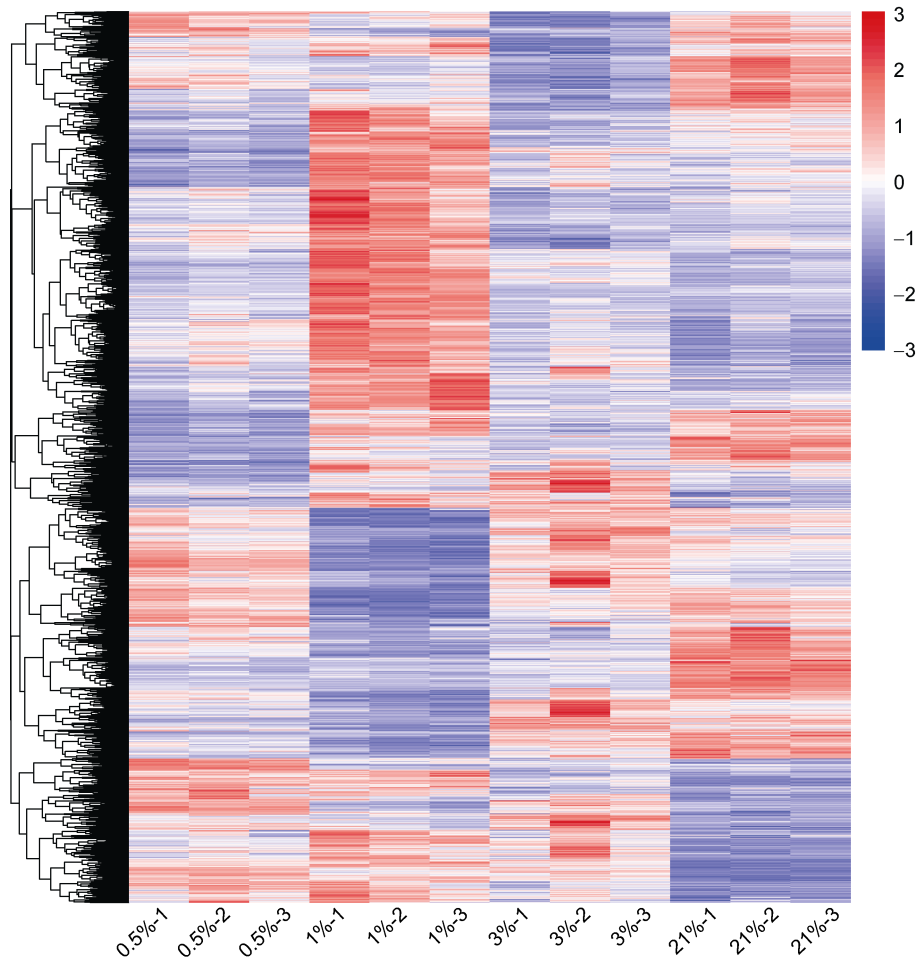


图 2 *L. marina* 在不同氧浓度条件下差异基因的聚类热图

Fig.2 Heatmap of differentially expressed genes of *L. marina* under different oxygen concentrations
注: 横坐标为样品名, 纵坐标为差异基因 FPKM 归一化后的数值, 红色代表上调, 蓝色表示下调

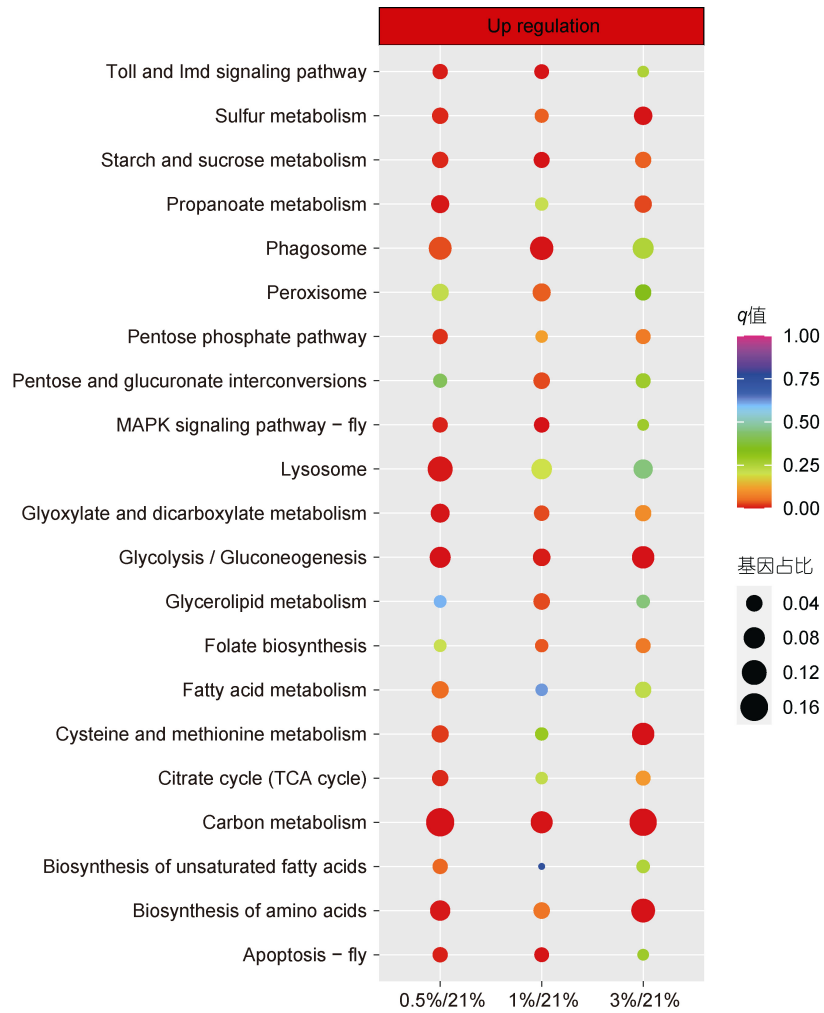


图 3 显著上调基因的 KEGG 富集通路

Fig.3 KEGG enrichment of significantly up-regulated pathways

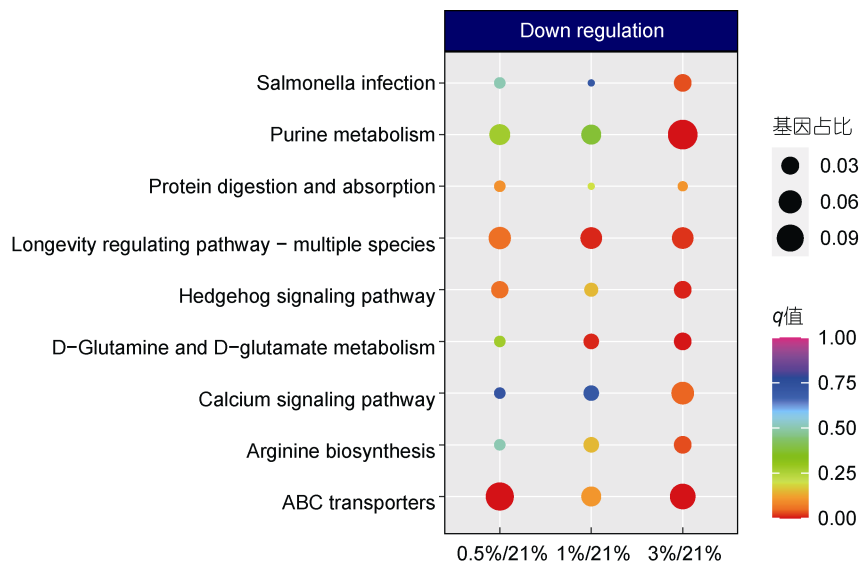


图 4 显著下调基因的 KEGG 富集通路

Fig.4 KEGG enrichment of significantly down-regulated pathways

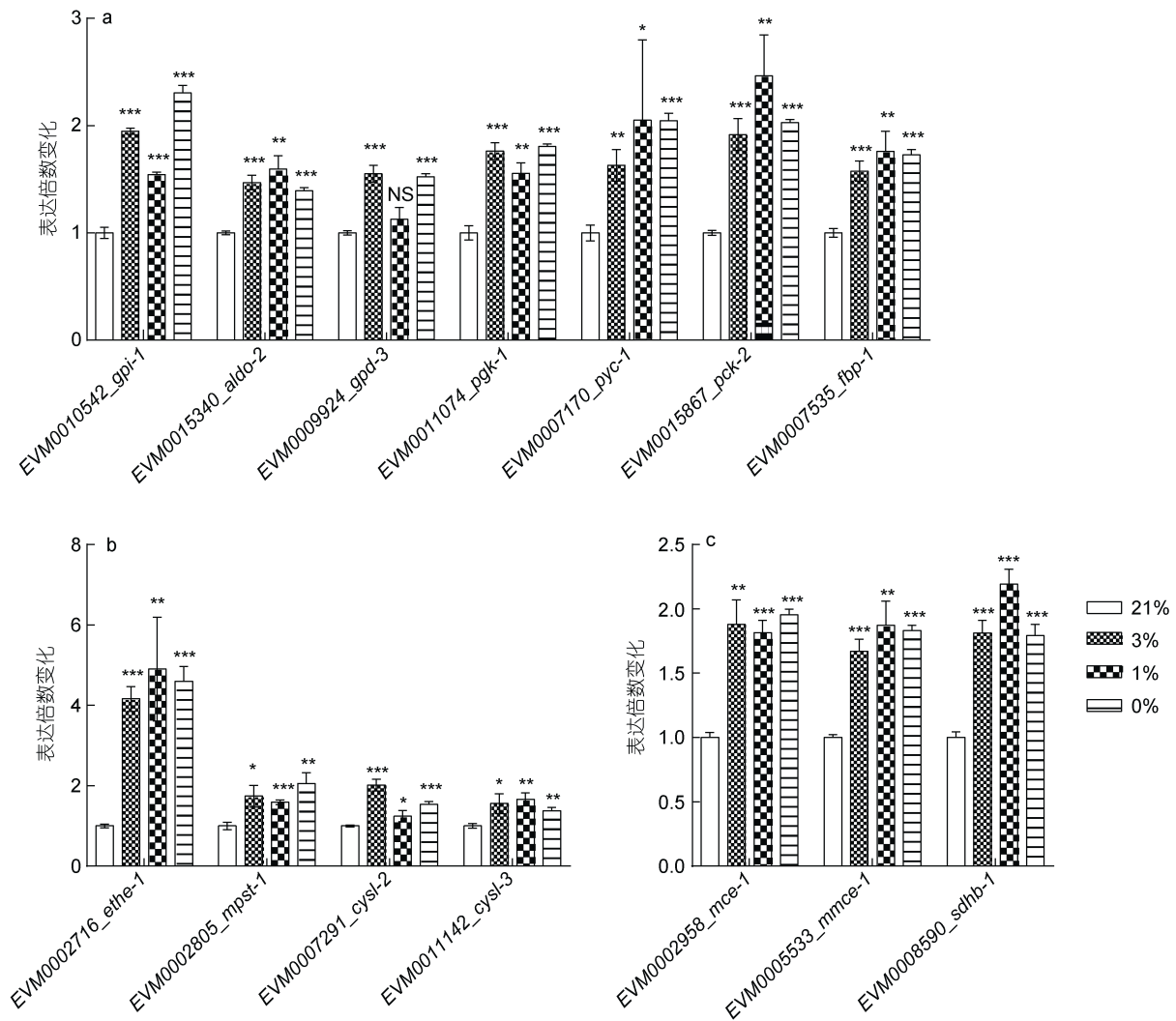


图 5 低氧胁迫环境下 *L. marina* 上调通路相关基因的表达

Fig.5 The expression of up-regulated pathway related genes of *L. marina* under hypoxia

注: a. 糖酵解/糖异生相关基因的表达水平; b. 硫代谢通路相关基因的表达水平; c. 线粒体碳代谢相关基因的表达水平。表达倍数变化表示处理组(3%、1%和0.5%)与对照组(21%)的基因表达量的比值(实验组 FPKM 值/对照组 FPKM 值)。采用独立样本 t-test 方法检验, 误差条代表 3 次重复实验的标准误差(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

2.7 低氧条件下细胞色素 P450 代谢通路与 ABC 转运蛋白相关基因的表达显著下调

KEGG 富集分析表明, 相较于 21%氧浓度, 细胞色素 P450 代谢通路的相关基因(*ugt-19*, *ugt-22*, *ugt-23* 与 *gst-5*)和 ABC 转运蛋白相关基因(*pgp-9*, *pgp-14* 和 *abt-4*)在 3%、1%和 0.5%氧浓度下发生了显著性下调(图 6b, 6c)。*ugt* 编码 UDP-葡萄糖醛酸基转移酶(UDP-glucuronosyltransferase), *gst-5* 基因编码谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione S-transferase)。*pgp* 基因编码 P-糖蛋白(P-glycoprotein), *abt-4* 编码 ABC 转运蛋白 ABCA3(ATP binding cassette subfamily A member 3)。

2.8 过氧化物酶体和蜕皮相关基因的表达在 0.5%氧浓度下发生显著下调

KEGG 富集分析表明, 相较于 21%氧浓度处理组, 过氧化物酶体通路的相关基因(*acs-5*, *acs-17*, *ctl-2*)和蜕皮相关基因(*acn-1*, *ptr-10*, *ptr-14*, *nas-28*, *nas-31*, *nas-36*)在 0.5%氧浓度下发生了显著下调(图 7a, 7b)。*acs* 基因编码酰基辅酶 A 合成酶(acyl-CoA synthetase), *acn-1* 编码血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme), *ptr* 编码 pathed 受体蛋白, *nas* 编码线虫虾红素类似物蛋白(nematode astacins-like protein)。

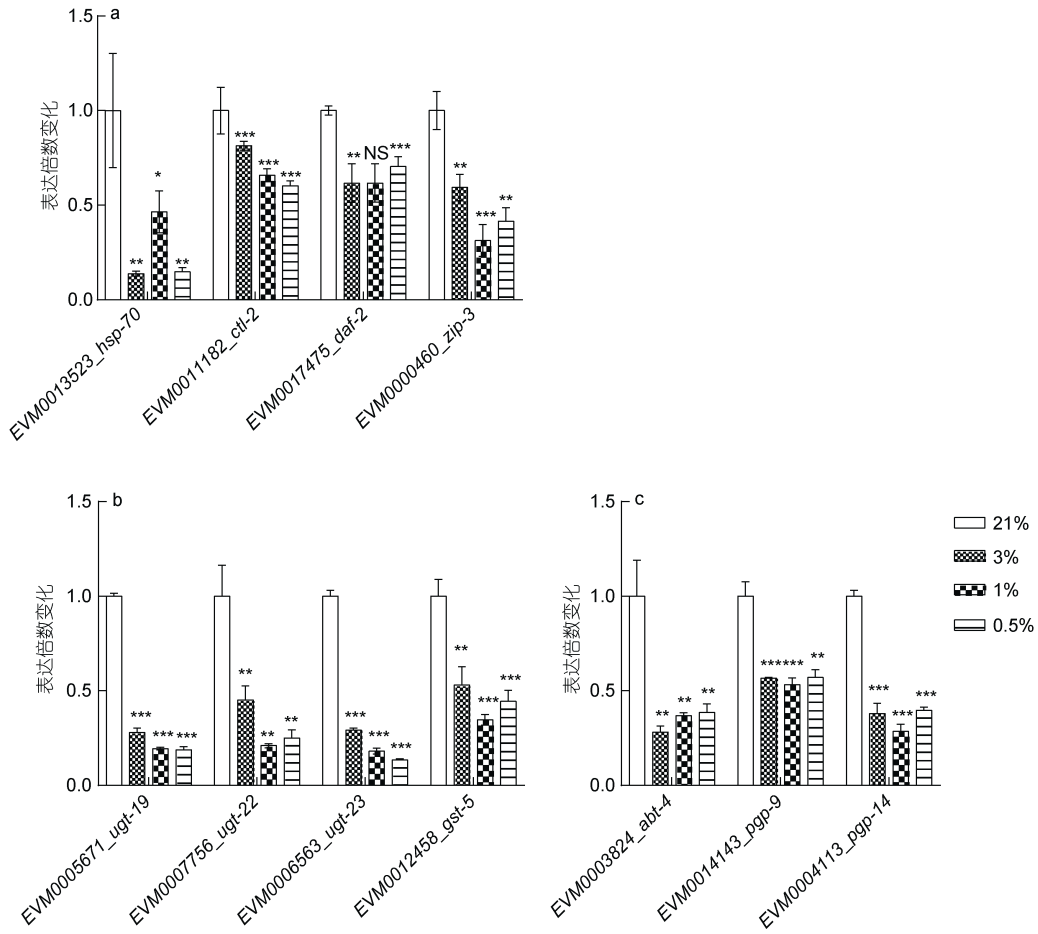


图 6 低氧胁迫环境下 *L. marina* 下调通路相关基因的表达

Fig.6 The expression of down-regulated pathway related genes of *L. marina* under hypoxia

注: a. 线虫寿命通路相关基因的表达水平; b. 细胞色素 P450 通路相关基因的表达水平; c. ABC 转运蛋白相关基因的表达水平。表达倍数变化表示处理组(3%、1%和 0.5%)与对照组(21%)的基因表达量的比值(实验组 FPKM 值/对照组 FPKM 值)。采用独立样本 t-test 方法检验, 误差条代表 3 次重复实验的标准误差(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

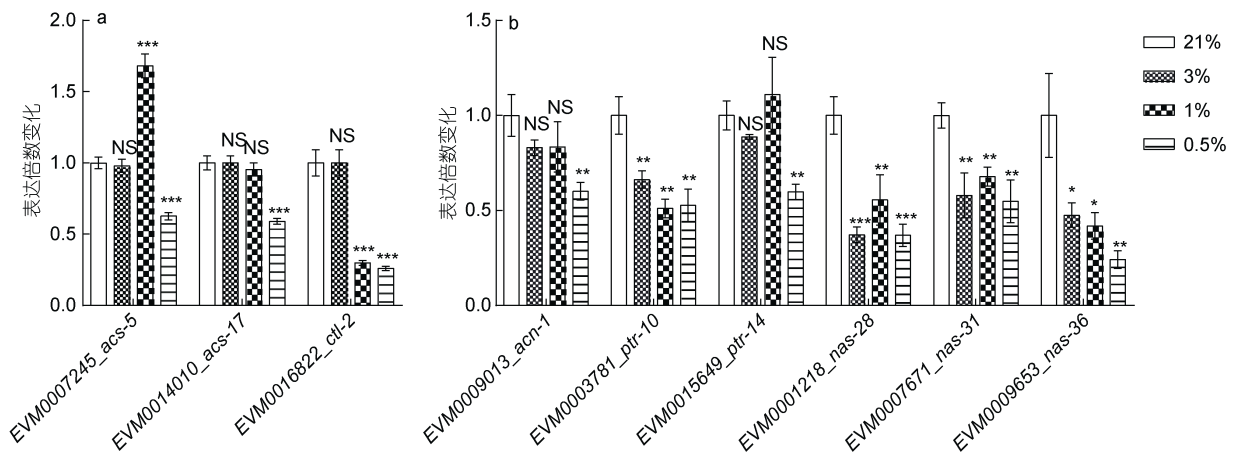


图 7 *L. marina* 过氧化物酶体和蜕皮通路相关基因的表达

Fig.7 The expression of genes related to peroxisome metabolism and molting of *L. marina*

注: a. 过氧化物酶体相关基因的表达水平; b. 蜕皮通路相关基因的表达水平。表达倍数变化表示处理组(3%、1%和 0.5%)与对照组(21%)的基因表达量的比值(实验组 FPKM 值/对照组 FPKM 值)。采用独立样本 t-test 方法检验, 误差条代表 3 次重复实验的标准误差(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

2.9 荧光定量 PCR 验证

如图 8a 所示, 本研究选取了糖酵解代谢相关的 *pgk-1* 基因、糖异生代谢相关的 *pck-2* 基因、淀粉与蔗糖代谢相关的 *pygl-1* 基因、硫代谢相关的 *cysl-2* 基因、线虫寿命调控相关的 *ctl-2* 基因以及线粒体代谢相关的 *mce-1*、*mmcm-1* 和 *sdhb-1* 基因对转录组数据进行了 qPCR 验证, 简单线性回归分析结果表明 qPCR 检测得到的基因表达趋势和 RNA-seq 的表达趋势高度一致(图 8b)。

3 讨论

3.1 糖酵解和糖异生通路相关基因可能参与调控海洋线虫 *L. marina* 的低氧胁迫环境响应

研究表明人体细胞在 1% 和 5% 低氧环境下, 糖酵解通路相关基因的表达显著上调(Jain *et al*, 2020)。与之对应的是, 本研究发现相较于 21% 氧浓度, 海洋线虫 *L. marina* 糖酵解通路的多个基因(*gpi-1*、*aldo-2*、*gpd-3* 和 *pgk-1*) 在 3%、1% 和 0.5% 低氧环境下的表达显著上调(图 5a)。此外有研究者发现 RNAi 敲低 *gpd-3*

基因的表达会对秀丽线虫低氧条件下的运动活力造成负面影响, 但敲降 *gpi-1* 与 *pgk-1* 基因则没有影响(Mendenhall *et al*, 2006)。在低氧条件下, 多数真核生物会改变代谢策略如线粒体呼吸作用供能减少, 糖酵解代谢上调以维持体内 ATP 水平的稳定, 这对于低氧胁迫下的细胞供能和生存至关重要(Kierans *et al*, 2021)。另外, 相较于 21% 氧浓度环境, 糖异生通路多个基因(*pyc-1*、*pck-2* 和 *fbp-1*) 在低氧环境下(3%、1% 和 0.5%) 的表达显著上调(图 5a)。与本研究相一致, Shen 等(2005)报道发现在低氧胁迫环境下秀丽线虫 *pyc-1* 基因的表达显著上调, 同时发现 *pyc-1* 表达上调不依赖于低氧应答转录因子 HIF-1。PCK-2 催化草酰乙酸转换为磷酸烯醇式丙酮酸, 是糖异生代谢途径的限速步骤(Goncalves *et al*, 2020), 研究发现, *pck-2* 过表达促进秀丽线虫运动能力, 而若 RNAi 敲低 *pck-2* 的表达水平, 则会损害秀丽线虫老年个体的运动能力, 并缩短平均寿命(Onken *et al*, 2020)。FBP-1 催化果糖 1, 6 二磷酸的磷酸酶水解, RNAi 敲低 *fbp-1* 基因的表达减弱秀丽线虫老年成体的运动能力并显著缩

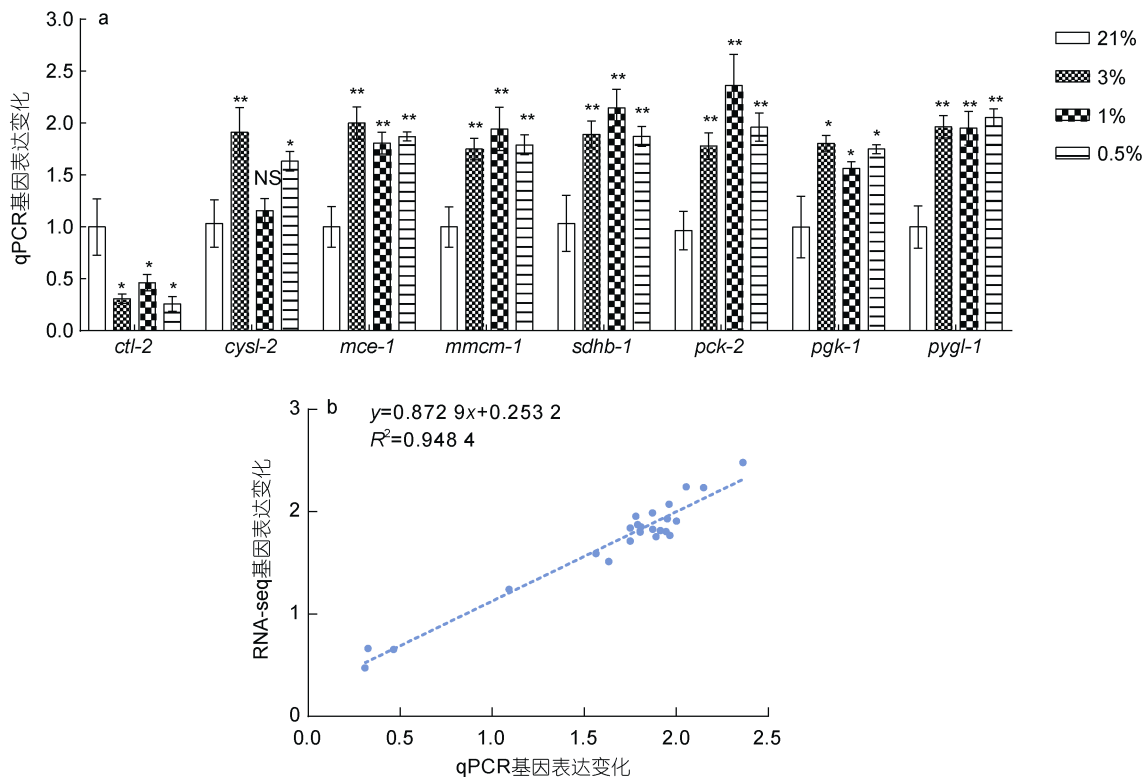


图 8 qPCR 验证 RNA-seq 数据

Fig.8 Validation of the RNA-seq results using qPCR
注: a. qPCR 检测结果; b. qPCR 和转录组表达数据间的关联分析

短其平均寿命(Onken *et al.*, 2020)。作者推测海洋线虫 *L. marina* 糖异生途径通过非碳水化合物生成的葡萄糖, 在低氧条件下很可能为显著增强的糖酵解途径提供原料且通过糖酵解供能应答低氧胁迫。

3.2 硫代谢途径相关基因可能参与了海洋线虫 *L. marina* 低氧胁迫响应

本研究发现相较于 21% 氧浓度, *ethe-1*、*mpst-1*、*cysl-2* 和 *cysl-3* 基因在 3%、1% 和 0.5% 低氧环境下的表达显著上调(图 5b)。*ethe-1* 基因编码的硫加双氧酶在氧气参与下将源于 H_2S 的多硫化物氧化生成硫代硫酸盐, 参与 H_2S 氧化通路 (Budde *et al.*, 2011)。*mpst-1* 基因编码 3-巯基丙酮酸硫转移酶, 秀丽线虫 *mpst-1* 功能缺失导致寿命缩减, 产卵量减少及 H_2S 含量降低, 外源添加 H_2S 可以营救寿命缩减表型 (Qabazard *et al.*, 2014)。*cysl-2* 与 *cysl-3* 编码硫化氢解酶, CYSL-2 利用半胱氨酸和 HCN 催化合成 H_2S 和 β -氰基丙氨酸 (Budde *et al.*, 2011)。研究报道在低氧胁迫环境下秀丽线虫 *cysl-2* 基因的表达显著上调, 同时作者发现 *cysl-2* 基因的表达上调依赖于低氧应答转录因子 HIF-1 (Shen *et al.*, 2006)。与上述研究结果一致, 本研究发现与 21% 氧浓度相比, *cysl-2* 基因在 3%、1% 和 0.5% 低氧浓度条件下的表达发生了显著上调(图 5b)。秀丽线虫 *cysl-2* 功能缺失突变体相比于野生型, 表现为产卵量减少, 内源性 H_2S 含量降低, 寿命缩短 (Qabazard *et al.*, 2013)。 H_2S 是一种具备重要生理学功能的生物体内源性小分子 (Kabil *et al.*, 2010)。内源性 H_2S 作为一种抗氧化剂促进秀丽线虫寿命延长 (Qabazard *et al.*, 2014), 研究发现适量的 H_2S 处理有助于激活秀丽线虫 HIF-1 因子 (Budde *et al.*, 2010)。作者推测 3-巯基丙酮酸硫转移酶基因 *mpst-1* 和硫化氢解酶基因 *cysl-2* 与 *cysl-3* 上调表达, 可能通过增加内源性 H_2S 的合成以应答低氧胁迫。

3.3 线粒体碳代谢相关基因可能调控海洋线虫 *L. marina* 对低氧胁迫的响应

研究表明秀丽线虫 *mce-1* 突变体相比于野生型抗氧化胁迫能力显著增强 (Kühnl *et al.*, 2005)。*mmcm-1* 编码蛋白催化 R-甲基丙二酸单酰辅酶 A 转换为琥珀酰辅酶 A (Bito *et al.*, 2016)。琥珀酰辅酶 A 是三羧酸循环的重要组成部分, 在琥珀酰辅酶 A 合成酶的催化下, 通过高能酸酐键水解反应, 释放大化学能从而引导 GTP 的合成。GTP 可以和 ATP 互相转化, 在能量供给和细胞信号传导中都发挥了重要作用。并且琥珀酰辅酶 A 也是血红素合成的基本原料之一, 作

为血红蛋白的组成成分, 血红素和血液氧气运输息息相关。*sdhb-1* 基因编码琥珀酸脱氢酶 B 亚基, 是线粒体呼吸链中复合体 II 的组成部分, 位于线粒体内膜, 参与 TCA 循环以及线粒体呼吸链的电子传递 (Rustin *et al.*, 2002)。秀丽线虫 *sdhb-1* 功能缺失突变体寿命缩短, 发育迟缓, 摄氧量降低, ATP 合成减少 (Sasköi *et al.*, 2020)。本研究发现相较于 21% 氧浓度, *mce-1*、*mmcm-1* 和 *sdhb-1* 基因在 3%、1% 和 0.5% 三个低氧浓度条件下的表达显著上调(图 5c), 推测线粒体碳代谢相关基因可能参与了调控海洋线虫对低氧胁迫的应答。

3.4 线虫寿命调控相关基因参与了海洋线虫 *L. marina* 对低氧胁迫的响应

KEGG 富集分析发现, 相较于 21% 氧浓度, 线虫寿命调控相关基因(*ctl-2*、*hsp-70*、*daf-2* 和 *zip-3*) 在 3%、1% 和 0.5% 三个低氧浓度条件下的表达发生了显著下调(图 6a)。*ctl-2* 编码氧化氢酶, 其功能是将具有细胞毒性过氧化氢分解为无毒无害的成分, 主要作用部位是过氧化物酶体 (Togo *et al.*, 2000)。研究表明 RNAi 敲低 *ctl-2* 基因的表达导致秀丽线虫低氧响应因子 HIF-1 蛋白在体内积累 (Xie *et al.*, 2012), 据此推测 CTL-2 可能通过低氧胁迫应答因子 HIF 调控海洋线虫低氧环境应答。HSP70 属于分子伴侣蛋白, 具有协助细胞内大分子组装和蛋白质折叠的功能, 其表达受多种环境胁迫的影响 (Wieten *et al.*, 2007)。研究发现在低氧胁迫环境下秀丽线虫 *hsp-70* 基因的表达显著上调, 同时发现 *hsp-70* 基因的表达上调不依赖于低氧应答转录因子 HIF-1 (Shen *et al.*, 2006)。与秀丽线虫低氧胁迫研究结果相反, 本研究发现海洋线虫 *hsp-70* 基因的表达在低氧胁迫环境下显著下调, 具体机制有待进一步研究。*daf-2* 编码胰岛素受体 (Kimura *et al.*, 1997)。*daf-2* 突变体增强了秀丽线虫对环境胁迫的抵抗能力, 并显著延长线虫寿命 (Kenyon *et al.*, 1993)。研究报道秀丽线虫 *daf-2* 突变体成体可以在 20 °C 缺氧环境处理 5 d 后, 仍保持较高的存活率 (Mendenhall *et al.*, 2006)。与已经报道的秀丽线虫 *daf-2* 基因功能一致, 海洋线虫 *daf-2* 基因在低氧环境下显著下调, 表明胰岛素通路可能调控海洋线虫 *L. marina* 的低氧胁迫应答。*zip-3* 基因编码转录因子, 秀丽线虫 *zip-3* 基因的下调表达激活线粒体未折叠蛋白反应 (mitochondrial unfolded protein response UPR^{mt}) (Deng *et al.*, 2019)。UPR^{mt} 是线粒体在外界环境因子或者病原体胁迫下, 由于线粒体内变性以及错误折叠蛋白质积累, 所激

发的由核 DNA 编码的线粒体应激反应, 目的是维持蛋白质稳态(Haynes *et al*, 2013)。因此作者推测在低氧胁迫环境下, 海洋线虫 *L. marina* 体内可能通过下调 *zip-3* 基因的表达维持蛋白质稳态。研究发现糖酵解抑制寿命和胁迫调控关键转录因子 DAF-16 并缩短秀丽线虫寿命(Onken *et al*, 2020), 本研究发现的寿命调控相关基因可能与糖酵解基因显著上调偶联。

3.5 细胞色素 P450 和 ABC 转运相关基因参与了海洋线虫 *L. marina* 对低氧胁迫的响应

细胞色素 P450 代谢通路的 *ugt-19*、*ugt-22*、*ugt-23* 和 *gst-5* 基因在低氧浓度条件下发生了显著下调, 研究报道 RNAi 敲低 *ugt-19* 的表达促进秀丽线虫在低氧胁迫环境下的生存能力(Ladage *et al*, 2016)。RNAi 敲低 *gst-5* 基因的表达导致秀丽线虫寿命缩短(Ayyadevara *et al*, 2007)。研究发现在低氧胁迫环境下秀丽线虫 *ugt-8* 基因的表达显著上调, 同时发现 *ugt-8* 基因的表达上调不依赖于低氧应答转录因子 HIF-1 (Shen *et al*, 2006), 与此研究结果相反, 本研究发现海洋线虫在低氧环境下多个 *ugt* 基因的表达显著下调, *ugt* 基因在低氧胁迫应答中的功能有待进一步研究。ABC 转运蛋白相关的 *pgp-9* 与 *pgp-14* 基因编码产物 P-糖蛋白属于 ATP 依赖性的跨膜外排泵, 可以将多种大分子物质排出细胞(Raza *et al*, 2016)。*abt-4* 基因编码的 ATP 依赖性转运蛋白参与脂质的跨膜运输(García-Montelongo *et al*, 2021)。作者推测在低氧胁迫环境下, 海洋线虫 *L. marina* 可能通过下调细胞色素 P450 代谢通路和 ABC 转运蛋白相关基因的表达调控特定大分子或脂类的生物合成和跨膜运输以应答低氧胁迫环境。

3.6 海洋线虫 *L. marina* 低氧胁迫响应与发育调控间的关联

本研究发现, 与 21%氧浓度相比, 在 3%氧浓度下, 线虫发育显著加速, 而在 0.5%氧浓度下, 发育显著延迟。通过 KEGG 富集分析(p value=0.004 5), 相较于 21%氧浓度, 过氧化物酶体通路相关基因(*acs-5*、*acs-17* 和 *ctl-2*)在 0.5%氧浓度下发生了显著下调(图 7a)。ACS-5 与 ACS-17 属于酰基辅酶 A 合成酶, 参与长链脂肪酸的代谢过程(Ruiz *et al*, 2019)。研究发现 RNAi 敲低 *acs-5* 基因抑制秀丽线虫由血清素处理引起的耗氧量增加(Srinivasan *et al*, 2008)。而 RNAi 敲低 *acs-17* 基因导致秀丽线虫产卵量下降, 胚胎致死率上升(Tischler *et al*, 2006)。与 21%氧浓度相比, 在 3%氧浓度下 *acs-5*、*acs-17*、*ctl-2* 基因表达没

有显著变化(图 7a)。我们推测上述过氧化物酶体相关基因的表达下调可能是 0.5%氧浓度下海洋线虫 *L. marina* 生长缓慢的主要原因之一。

通过 GO 富集分析(p value=0.000 2)发现, 相较于 21%氧浓度, 蜕皮通路相关基因(*acn-1*、*ptr-10*、*ptr-14*、*nas-28*、*nas-31* 和 *nas-36*)在 0.5%氧浓度下发生了显著下调(图 7b)。研究表明 *acn-1* 基因的表达对于秀丽线虫幼虫蜕皮是必需的(Brooks *et al*, 2003), RNAi 敲低 *acn-1* 基因的表达导致秀丽线虫幼虫发育缓慢(Kamath *et al*, 2003)。*ptr-10* 与 *ptr-14* 基因表达产物属于 patched 受体蛋白, RNAi 敲低 *ptr-10* 导致幼虫蜕皮缺陷, 并抑制生长发育(Tischler *et al*, 2006)。*ptr-14* 基因的 RNAi 敲低导致秀丽线虫生长过程中运动能力变差, 并抑制生长发育(Zugasti *et al*, 2005)。*nas-28*、*nas-31* 和 *nas-36* 基因编码线虫虾红蛋白酶(nematode astacins-like protease), 属于金属内肽酶(Möhrlen *et al*, 2003)。研究报道 *nas-36* 基因的 RNAi 敲低导致秀丽线虫蜕皮缺陷, 虫体后端难以蜕皮(Suzuki *et al*, 2004)。与 21%氧浓度相比, 在 3%氧浓度下 *acn-1* 和 *ptr-14* 基因表达没有发生显著变化(图 7b), 虽然 *ptr-10*、*nas-28*、*nas-31*、*nas-36* 等基因在 3%氧浓度下表达显著下调, 但这些基因总体上在 0.5%氧浓度下表达下调幅度更大(图 7b), 作者推测上述蜕皮相关基因的表达下调可能是 0.5%氧浓度下海洋线虫 *L. marina* 生长缓慢的主要原因之一。

4 结论

本研究结果表明, 相较于 21%氧浓度, 海洋线虫在低氧环境下糖酵解、糖异生、硫代谢和线粒体碳代谢等通路相关的多个基因的表达显著上调; 而线虫寿命调控、细胞色素 P450 和 ABC 转运蛋白等通路相关基因的表达在低氧胁迫条件下显著下调。海洋线虫 *L. marina* 中发现的低氧胁迫应答调控模式, 为理解海洋无脊椎动物适应低氧环境的分子机制提供了参考, 同时为筛选和验证生物体响应和适应低氧胁迫的关键基因奠定了重要基础。

参 考 文 献

- ALDERDICE R, SUGGETT D J, CÁRDENAS A, *et al*, 2021. Divergent expression of hypoxia response systems under deoxygenation in reef-forming corals aligns with bleaching susceptibility [J]. *Global Change Biology*, 27(2): 312-326.
- AMORIM K, PIONTKIVSKA H, ZETTLER M L, *et al*, 2021. Transcriptional response of key metabolic and stress

- response genes of a nuculanid bivalve, *Lembulus bicuspidatus* from an oxygen minimum zone exposed to hypoxia-reoxygenation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 256: 110617.
- ANDERSON L L, MAO X R, SCOTT B A, *et al*, 2009. Survival from hypoxia in *C. elegans* by inactivation of aminoacyl-tRNA synthetases [J]. *Science*, 323(5914): 630-633.
- AYYADEVARA S, DANDAPAT A, SINGH S P, *et al*, 2007. Life span and stress resistance of *Caenorhabditis elegans* are differentially affected by glutathione transferases metabolizing 4-hydroxynon-2-enal [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(2): 196-205.
- BITO T, WATANABE F, 2016. Biochemistry, function, and deficiency of vitamin B₁₂ in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 241(15): 1663-1668.
- BROOKS D R, APPLEFORD P J, MURRAY L, *et al*, 2003. An essential role in molting and morphogenesis of *Caenorhabditis elegans* for ACN-1, a novel member of the angiotensin-converting enzyme family that lacks a metallopeptidase active site [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52): 52340-52346.
- BUDDE M W, ROTH M B, 2010. Hydrogen sulfide increases hypoxia-inducible factor-1 activity independently of von Hippel-Lindau tumor suppressor-1 in *C. elegans* [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 21(1): 212-217.
- BUDDE M W, ROTH M B, 2011. The response of *Caenorhabditis elegans* to hydrogen sulfide and hydrogen cyanide [J]. *Genetics*, 189(2): 521-532.
- CAO X W, SUN P Q, ZHANG L S, 2022. Transcriptome analysis of the marine nematode *Litoditis marina* in a chemically defined food environment with stearic acid supplementation [J]. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(3): 428.
- DENG P, UMA NARESH N, DU Y G, *et al*, 2019. Mitochondrial UPR repression during *Pseudomonas aeruginosa* infection requires the bZIP protein ZIP-3 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(13): 6146-6151.
- DERYCKE S, DE MEESTER N, RIGAUX A, *et al*, 2016. Coexisting cryptic species of the *Litoditis marina* complex (Nematoda) show differential resource use and have distinct microbiomes with high intraspecific variability [J]. *Molecular Ecology*, 25(9): 2093-2110.
- DOERING K R, CHENG X J, MILBURN L, *et al*, 2022. Nuclear hormone receptor NHR-49 acts in parallel with HIF-1 to promote hypoxia adaptation in *Caenorhabditis elegans* [J]. *eLife*, 11: e67911.
- GARCÍA-MONTELONGO M, GONZÁLEZ-VILLARREAL S E, DEL RINCÓN-CASTRO M C, *et al*, 2021. Use of RNAi as a preliminary tool for screening putative receptors of nematocidal toxins from *Bacillus thuringiensis* [J]. *Archives of Microbiology*, 203(4): 1649-1656.
- GOBLER C J, DEPASQUALE E L, GRIFFITH A W, *et al*, 2014. Hypoxia and acidification have additive and synergistic negative effects on the growth, survival, and metamorphosis of early life stage bivalves [J]. *PLoS One*, 9(1): e83648.
- GONCALVES J, WAN Y F, GUO X Y, *et al*, 2020. Succinate dehydrogenase-regulated phosphoenolpyruvate carboxykinase sustains copulation fitness in aging *C. elegans* males [J]. *iScience*, 23(4): 100990.
- GRIMES C J, PETERSEN L H, SCHULZE A, 2021. Differential gene expression indicates modulated responses to chronic and intermittent hypoxia in corallivorous fireworms (*Hermodice carunculata*) [J]. *Scientific Reports*, 11(1): 11110.
- HAYNES C M, FIORESE C J, LIN Y F, 2013. Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond [J]. *Trends in Cell Biology*, 23(7): 311-318.
- HEMPHILL C, PYLARINOU-SINCLAIR E, ITANI O, *et al*, 2022. *Daf-16* mediated repression of cytosolic ribosomal protein genes facilitates a hypoxia sensitive to hypoxia resistant transformation in long-lived germline mutants [J]. *PLoS Genetics*, 18(5): e1009672.
- ITANI O A, ZHONG X F, TANG X T, *et al*, 2021. Coordinate regulation of ribosome and tRNA biogenesis controls hypoxic injury and translation [J]. *Current Biology*, 31(1): 128-137.
- JAIN I H, CALVO S E, MARKHARD A L, *et al*, 2020. Genetic screen for cell fitness in high or low oxygen highlights mitochondrial and lipid metabolism [J]. *Cell*, 181(3): 716-727.
- JIANG H Q, GUO R, POWELL-COFFMAN J A, 2001. The *Caenorhabditis elegans hif-1* gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14): 7916-7921.
- KABIL O, BANERJEE R, 2010. Redox biochemistry of hydrogen sulfide [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29): 21903-21907.
- KAMATH R S, FRASER A G, DONG Y, *et al*, 2003. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi [J]. *Nature*, 421(6920): 231-237.
- KENYON C, CHANG J, GENSCH E, *et al*, 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type [J]. *Nature*, 366(6454): 461-464.
- KIERANS S J, TAYLOR C T, 2021. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology [J]. *The Journal of Physiology*, 599(1): 23-37.
- KIM T W, BARRY J P, MICHELI F, 2013. The effects of intermittent exposure to low-pH and low-oxygen conditions on survival and growth of juvenile red abalone [J]. *Biogeosciences*, 10(11): 7255-7262.
- KIMURA K D, TISSENBAUM H A, LIU Y X, *et al*, 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 277(5328): 942-946.
- KÜHNEL J, BOBIK T, PROCTER J B, *et al*, 2005. Functional analysis of the methylmalonyl-CoA epimerase from *Caenorhabditis elegans* [J]. *The FEBS Journal*, 272(6): 1465-1477.

- LADAGE M L, KING S D, BURKS D J, *et al*, 2016. Glucose or altered ceramide biosynthesis mediate oxygen deprivation sensitivity through novel pathways revealed by transcriptome analysis in *Caenorhabditis elegans* [J]. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 6(10): 3149-3160.
- MABON M E, SCOTT B A, CROWDER C M, 2009. Divergent mechanisms controlling hypoxic sensitivity and lifespan by the DAF-2/insulin/IGF-receptor pathway [J]. *PLoS One*, 4(11): e7937.
- MENDENHALL A R, LARUE B, PADILLA P A, 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mediates anoxia response and survival in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 174(3): 1173-1187.
- MÖHRLÉN F, HUTTER H, ZWILLING R, 2003. The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 270(24): 4909-4920.
- MULRONEY T E, PÖYRY T, WILLIS A E, 2021. Hypoxia: uncharged tRNA to the rescue! [J]. *Current Biology*, 31(1): R25-R27.
- NYSTUL T G, ROTH M B, 2004. Carbon monoxide-induced suspended animation protects against hypoxic damage in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24): 9133-9136.
- OGINO T, TOYOHARA H, 2019. Identification of possible hypoxia sensor for behavioral responses in a marine annelid, *Capitella teleta* [J]. *Biology Open*, 8(3): bio037630.
- ONKEN B, KALINAVA N, DRISCOLL M, 2020. Gluconeogenesis and PEPCK are critical components of healthy aging and dietary restriction life extension [J]. *PLoS Genetics*, 16(8): e1008982.
- PADILLA P A, NYSTUL T G, ZAGER R A, *et al*, 2002. Dephosphorylation of cell cycle-regulated proteins correlates with anoxia-induced suspended animation in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 13(5): 1473-1483.
- POWELL-COFFMAN J A, 2010. Hypoxia signaling and resistance in *C. elegans* [J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(7): 435-440.
- QABAZARD B, AHMED S, LI L, *et al*, 2013. *C. elegans* aging is modulated by hydrogen sulfide and the sulfhydrylase/cysteine synthase *cysl-2* [J]. *PLoS One*, 8(11): e80135.
- QABAZARD B, LI L, GRUBER J, *et al*, 2014. Hydrogen sulfide is an endogenous regulator of aging in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(16): 2621-2630.
- RAZA A, BAGNALL N H, JABBAR A, *et al*, 2016. Increased expression of ATP binding cassette transporter genes following exposure of *Haemonchus contortus* larvae to a high concentration of monepantel in vitro [J]. *Parasites & Vectors*, 9(1): 522.
- RUIZ M, BODHICARLA R, STÅHLMAN M, *et al*, 2019. Evolutionarily conserved long-chain Acyl-CoA synthetases regulate membrane composition and fluidity [J]. *eLife*, 8: e47733.
- RUSTIN P, RÖTIG A, 2002. Inborn errors of complex II-unusual human mitochondrial diseases [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553(1/2): 117-122.
- SASKÓI É, HUJBER Z, NYÍRŐ G, *et al*, 2020. The SDHB Arg230His mutation causing familial paraganglioma alters glycolysis in a new *Caenorhabditis elegans* model [J]. *Disease Models & Mechanisms*, 13(10): dmm044925.
- SHEN C, NETTLETON D, JIANG M, *et al*, 2005. Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21): 20580-20588.
- SHEN C, SHAO Z, POWELL-COFFMAN J A, 2006. The *Caenorhabditis elegans rhy-1* gene inhibits HIF-1 hypoxia-inducible factor activity in a negative feedback loop that does not include *vhl-1* [J]. *Genetics*, 174(3): 1205-1214.
- SRINIVASAN S, SADEGH L, ELLE I C, *et al*, 2008. Serotonin regulates *C. elegans* fat and feeding through independent molecular mechanisms [J]. *Cell Metabolism*, 7: 533-544.
- SUZUKI M, SAGOH N, IWASAKI H, *et al*, 2004. Metalloproteases with EGF, CUB, and thrombospondin-1 domains function in molting of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biological Chemistry*, 385(6): 565-568.
- TISCHLER J, LEHNER B, CHEN N S, *et al*, 2006. Combinatorial RNA interference in *Caenorhabditis elegans* reveals that redundancy between gene duplicates can be maintained for more than 80 million years of evolution [J]. *Genome Biology*, 7(8): R69.
- TOGO S H, MAEBUCHI M, YOKOTA S, *et al*, 2000. Immunological detection of alkaline-diaminobenzidine-negative peroxisomes of the nematode *Caenorhabditis elegans*: purification and unique pH optima of peroxisomal catalase [J]. *European Journal of Biochemistry*, 267(5): 1307-1312.
- WIETEN L, BROERE F, VAN DER ZEE R, *et al*, 2007. Cell stress induced HSP are targets of regulatory T cells: A role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immunomodulators? [J]. *FEBS Letters*, 581(19): 3716-3722.
- XIE M, ROY R, 2012. Increased levels of hydrogen peroxide induce a HIF-1-dependent modification of lipid metabolism in AMPK compromised *C. elegans* dauer larvae [J]. *Cell Metabolism*, 16(3): 322-335.
- 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 [J]. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.06.980219.
- XIE Y S, ZHANG P C, ZHANG L S, 2021. Genome-wide transcriptional responses of marine nematode *Litoditis marina* to hyposaline and hypersaline stresses [J]. *Frontiers in Physiology*, 12: 672099.
- ZHAO L, GAO F, GAO S, *et al*, 2021. Biodiversity-based development and evolution: the emerging research systems in model and non-model organisms [J]. *Science China Life Sciences*, 64(8): 1236-1280.
- ZUGASTI O, RAJAN J, KUWABARA P E, 2005. The function and expansion of the patched- and hedgehog-related homologs in *C. elegans* [J]. *Genome Research*, 15(10): 1402-1410.

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

LI Bo^{1, 2, 3, 4}, XIE Yu-Su^{1, 2, 3}, ZHANG Liu-Suo^{1, 2, 3}

(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 Global climate change has led to ocean deoxygenation, and the hypoxic stress poses a serious threat to the growth, development and reproduction of marine invertebrates. In this study, the marine nematode *Litoditis marina* was exploited to analyze the impact of hypoxia to marine invertebrates. The *L. marina* L1 larvae were sampled for transcriptome sequencing and analysis and the growth and development rate under different oxygen concentrations (21%, 3%, 1% and 0.5%) were observed. Results showed that when ambient oxygen concentration decreased from 21% to 3%, the egg-laying time of *L. marina* was significantly accelerated, and when it further decreased to 1%, the egg laying time of *L. marina* was similar to that in 21% oxygen. When the oxygen concentration dropped to 0.5%, the egg laying time was significantly attenuated. The KEGG enrichment analysis showed that genes in several pathways such as glycolysis, gluconeogenesis, sulfur metabolism, and mitochondrial carbon metabolism were significantly up-regulated in 3%, 1% and 0.5% oxygen conditions, compared to those in 21% oxygen. However, the expression levels of genes in certain pathways such as nematode lifespan regulation, cytochrome P450 metabolism, and ABC transporters were significantly down-regulated under hypoxia conditions. This study provided a foundation to further study the functions of key genes in response or adaptation to hypoxia stress, in the context of global climate change and ocean deoxygenation.

Key words marine nematode; *Litoditis marina*; hypoxia stress; glycolysis; sulfur metabolism; carbon metabolism pathway