

## 研究报告

## Research Report

# 基于转录组分析红耳龟盐度适应的离子调节

洪美玲<sup>1</sup> 李江月<sup>1</sup> 江爱萍<sup>1</sup> 丁利<sup>1\*</sup> 史海涛<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 海南师范大学生命科学学院,海口,571158; <sup>2</sup> 中国科学院成都生物研究所,成都,610041

\* 通讯作者, dingli@hainnu.edu.cn

**摘要** 外来有害入侵物种红耳龟(*Trachemys scripta elegans*)原属于淡水龟类,但目前研究发现其可存活于半咸水环境中,这使得未来红耳龟可入侵的潜在范围及危害将增大。为了探究红耳龟对盐度适应的分子机制,本研究应用高通量转录组测序技术,分析其不同盐度环境中参与离子调节的主要基因及通路。我们设计了三个处理组:对照组(自来水)、低盐度组(0.5%,即盐度 5 组)和高盐度组(1.5%,即盐度 15 组),慢性胁迫 8 周后,分析血液中无机离子、葡萄糖及皮质醇含量,并对其肝脏转录组数据进行分析。结果表明,与对照组相比,盐度 5 组血液渗透压、[Na<sup>+</sup>]和血糖差异不显著( $p>0.05$ ),而盐度 15 组显著升高,血液[Cl<sup>-</sup>]三组间差异均显著;两个盐度处理组血液[K<sup>+</sup>]显著低于对照组( $p<0.05$ );但血液皮质醇含量在三组之间差异均不显著。GO (Gene ontology)富集分析发现,参与离子调节的基因主要有电压门控钾通道亚家族 5 (KCNH5)、电压门控钠通道 I (SCN1B)、利尿肽前体 A (NPPA)、ATP 酶(ATP6A, MTATP6, ATP6)、葡萄糖激酶(GSK)、盐诱导激酶(SIK)、脂联素(ACDC)和类固醇 17 $\alpha$ -单氧酶(CYP17A)等。所筛选出的基因大多被富集到与能量代谢、脂肪代谢、碳水化合物代谢以及内分泌系统等 KEGG 通路类别中。综上所述,红耳龟在盐度适应过程中参与离子调节的大部分 KEGG 通路以及相关的生理指标均未发生显著变化,说明它能较好地适应慢性低盐度胁迫(盐度 0.5%左右)。

**关键词** 盐度适应, 红耳龟, 离子调节, 转录组学

## Salinity Adaptation in Ions Adjustments of the Red-eared Slider Turtle Using Liver Transcriptomic Data

Hong Meiling<sup>1</sup> Li Jiangyue<sup>1</sup> Jiang Aiping<sup>1</sup> Ding Li<sup>1\*</sup> Shi Haitao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou, 571158; <sup>2</sup> Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, 610041

\* Corresponding authors, dingli@hainnu.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.037.004297

**Abstract** Red-eared Slider (*Trachemys scripta elegans*), as freshwater turtles, could survive in brackish water, which maybe augment the potential scope and endangerment of invasion in the future. To investigate the molecular mechanism of salinity adaptation in *T. s. elegans*, the high-throughput RNA-Seq was used to discover the gene expression profiles and pathways in the study. *T. s. elegans* were divided into different salinities groups of 0.5% (salinity 5 group), 1.5% (salinity 15 group) and control group (isopyknic tap-water) to conduct chronic salinity stress for eight weeks. The results showed that: Blood osmotic pressure, plasma glucose and [Na<sup>+</sup>] in the group of salinity 15 is significantly higher than those in the control, while no difference between salinity 5 and the control. Plasma [K<sup>+</sup>] in salinity 5 and 15 were significantly higher than the control, and plasma [Cl<sup>-</sup>] was significantly different

基金项目 本研究由国家自然科学基金项目(No. 31360642; No. 31760116)资助

引用格式: Hong M.L., Li J.Y., Jiang A.P., Ding L., and Shi H.T., 2018, Salinity adaptation in ions adjustments of the red-eared slider turtle using liver transcriptomic data, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 37(10): 4297-4306 (洪美玲, 李江月, 江爱萍, 丁利, 史海涛, 2018, 基于转录组分析红耳龟盐度适应的离子调节, *基因组学与应用生物学*, 37(10): 4297-4306)

between these three groups ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference in plasma cortisol between the three groups. Through the analysis of GO (Gene ontology), the genes involving in ions adjustment mainly include potassium voltage-gated channel Eag-related subfamily H member 5 (KCNH5), voltage-gated sodium channel type I beta (SCN1B), natriuretic peptide precursor A (NPPA), ATPase (ATPeFOA, MTATP6, ATP6), glucokinase (GCK), salt inducible kinase (SIK), adiponectin (ACDC) and steroid 17 $\alpha$ -monooxygenase/17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone deacetylase (CYP17A), etc. All of the screening genes were mainly enriched in the KEGG pathways of energy metabolism, lipid metabolism, carbohydrate metabolism and endocrine system. In conclusion, *T. s. elegans* can acclimatize itself to chronic salinity stress (about salinity 0.5%).

**Keywords** Salinity adaptation, *Trachemys scripta elegans*, Plasma ions adjustment, Transc-riptome

红耳龟(*Trachemys scripta elegans*)又名巴西龟, 全球最危险的 100 种外来入侵物种之一(ISSG/SSC, 2001), 其野生种群在中国大部分地区亦被发现(刘丹等, 2011, 生物学通报, 46(6): 18-21)。红耳龟生活在湖泊、沼泽、池塘及小溪等淡水中(Swingland and Gibbons, 1991)。李闯(2013)、杨江波(2014)野外调查发现红耳龟在海南南渡江入海口(盐度: 0.53%~14.6%)附近的沙滩产卵并孵出幼体, 室内养殖实验表明红耳龟在盐度低于 1.5%水环境中可存活三个月以上(Hong et al., 2014)。这说明红耳龟具有较强耐盐性, 可以在半咸水环境中存活。通常, 半咸水环境主要分布在滨海湿地、海湾、入海河口等重要的生态保护红线范围内, 该区域生物多样性丰富但生境敏感脆弱, 可见未来红耳龟入侵的潜在范围及危害将大增。因此, 深入研究淡水红耳龟对半咸水的适应机理及适应对策, 了解红耳龟的入侵机理, 并为红耳龟的防治提供理论依据。

目前对于红耳龟在盐度适应方面的研究主要集中在耐受性和渗透调节方面(舒超华等, 2012; Hong et al., 2014), 而渗透调节方面的研究主要集中在离子调节、非离子调节(氨基酸调节和尿素调节等)以及提供能量的糖代谢等(Hong et al., 2014), 但目前关于红耳龟盐度适应的分子机制方面的研究尚属空白。转录组的研究不仅可以在整体水平上揭示基因的结构

和功能, 而且可以对生物机体中的某种分子机制作全面深刻的解析, 此外, 转录组可以用于筛选机体在不同过程中的差异表达基因(刘红亮等, 2013)。本研究主要通过转录组 GO 和 KEGG 富集分析探讨红耳龟在盐度胁迫下可能参与非离子调节过程的主要基因及 KEGG 通路, 同时检测血液中主要离子浓度、血糖及血液皮质醇含量的变化等相关生理指标, 以进一步了解红耳龟适应半咸水的主要离子调节分子机制, 完善红耳龟响应盐度胁迫的渗透压调节机制研究。

## 1 结果与分析

### 1.1 慢性盐度胁迫对红耳龟血液离子浓度、渗透压、血糖及皮质醇的影响

对盐度环境下红耳龟血液离子浓度、渗透压的检测结果显示, 红耳龟血液渗透压随环境盐度的升高而升高, 但盐度 5 组的血液渗透压与对照组差异不显著, 仅盐度 15 组的血液渗透压显著高于对照组和盐度 5 组。血液中  $\text{Na}^+$  浓度与血液渗透压的变化趋势一致。而血液中  $\text{Cl}^-$  浓度随着环境盐度的增加而增加, 三组间两两差异显著( $p < 0.05$ )。而血液中  $\text{K}^+$  浓度随盐度增加而下降, 盐度 5 组和盐度 15 组的血液  $\text{K}^+$  浓度显著低于对照组( $p < 0.05$ ) (表 1)。

对盐度环境下红耳龟血糖和皮质醇含量的检测

表 1 慢性盐度胁迫对红耳龟血液渗透压和离子浓度的影响

Table 1 Effects of ambient salinity on blood osmotic pressure and inorganic ions concentration in *T. s. elegans*

盐度(%)	渗透压(mOsm)	$\text{Na}^+$ (mmol/L)	$\text{K}^+$ (mmol/L)	$\text{Cl}^-$ (mmol/L)
Salinity (%)	Osmotic pressure (mOsm)			
0.0	275.06 $\pm$ 4.83 <sup>a</sup>	126.90 $\pm$ 3.06 <sup>a</sup>	6.86 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>	93.42 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>
0.5	280.96 $\pm$ 5.58 <sup>a</sup>	130.90 $\pm$ 2.88 <sup>a</sup>	4.25 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	97.20 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>
1.5	307.13 $\pm$ 10.80 <sup>b</sup>	141.85 $\pm$ 4.36 <sup>b</sup>	3.30 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	106.12 $\pm$ 2.19 <sup>c</sup>

注: 同一列中不同上标字母(a,b,c)表示差异显著( $p < 0.05$ ), n=6

Note: The different superscripts (a, b, c) in the same column showed significant differences ( $p < 0.05$ ), n=6

结果可知,红耳龟机体中血糖含量随着盐度的增加而减少,但只有盐度 15 组的血糖含量显著低于对照组( $p < 0.05$ ),其余各组之间差异不显著。血液中皮质醇含量随着盐度的增加先减少后增加,但各组之间差异均不显著( $p > 0.05$ ) (图 1)。

### 1.2 红耳龟慢性盐度胁迫中与离子调节相关的 GO 词条

将差异表达基因按照生物过程、细胞组分和分子功能进行 GO 富集,结果显示在 0 vs 5 psu 和 0 vs 15 psu 分别获得 1 251 和 1 064 条 GO 词条,而富集显著分别有 122 和 106 条。其中 0 vs 5 psu 比对中差异基因富集到“生物学过程(Biological process)”类别的词条有 69 个,包括小分子代谢过程(Small molecule metabolic process)、离子膜转运(Ion transmembrane transport)、离子运输(Ion transport)等,“细胞组成(Cellular component)”类别的词条有 16 个,包括膜部分(Membrane part)、线粒体部分(Mitochondriad part)、呼吸链复合体 (Respiratory chain complex ),“分子功能(Molecular function)”类别的词条有 30 个,包括激素活性(Hormone activity)、离子结合(Ion binding)、激酶活性(Kinase activity) ; 0 vs 15 psu 比对中差异基因富集到“生物学过程”类别的词条有 50 个,“细胞组成”类别的词条有 25 个,“分子功能”类别的词条有 31 个。

进一步分析发现,与渗透调节相关的 GO terms 主要集中在离子调节及其参与离子调节的能量代谢和激素调节等方面,其中,参与离子通道调节的差异表达基因主要有电压门控钾通道亚家族 5 (voltage-gated channel Eag-related subfamily H member 5, KCN-H5)、电压门控钠通道 (voltage-gated sodium channel type I beta, SCN1B)、利尿肽前体 A (natriuretic peptide

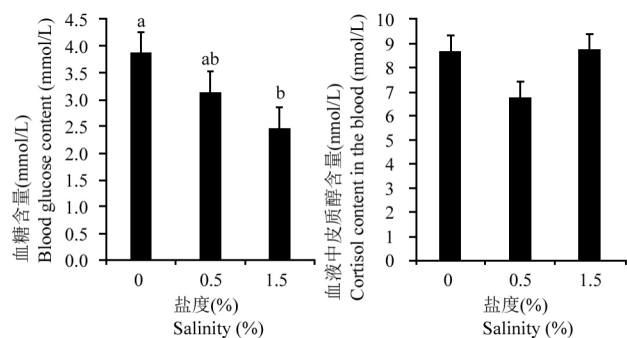


图 1 慢性盐度胁迫对红耳龟血糖和皮质醇含量的影响  
Figure 1 Effect of chronic salinity stress on plasma glucose and cortisol content in *T. s. elegans*

A, NPPA)等 ;与能量代谢及相关激素调节的基因有 ATP 酶(ATPeFOA, MTATP6, ATP6)、葡萄糖激酶(glucokinase, GCK)、盐诱导激酶(salt inducible kinase, SIK)、脂联素(adiponectin, ACDC)和类固醇 17 $\alpha$ -单氧酶/17 $\alpha$ -羟孕酮脱乙酰酶(steroid 17alpha-monooxygenase/17alpha-hydroxyprogesterone deacetylase, CYP17A)等。

### 1.3 红耳龟慢性盐度胁迫过程中与离子调节相关的 KEGG 通路

在 KEGG 数据库比对中,205 138 个 unigenes 中 16 603 个 unigenes 得到注释,而包含基因或转录本数量最多的前 20 个通路分别是,癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、HTLV- 感染、MAPK 信号通路、黏着斑、Ras 信号通路、亨廷顿氏病、内吞作用、癌症蛋白聚糖、EB 病毒感染、肌动蛋白细胞骨架调节、吞噬体、cAMP 信号通路、Rap1 信号通路、病毒性的致癌作用、癌症转录误调节、钙信号通路、刺激神经组织的配体 - 受体交互作用、cGMP-PKG 信号通路和结核病(图 2)。由此可见,包含基因或转录本数量最多的通路主要是与免疫相关。

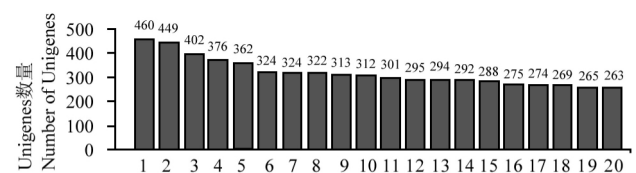


图 2 包含基因或转录本数目最多的前 20 个通路  
注:柱形图下方数字代表不同通路;1: 肿瘤通路;2: PI3K-Akt 信号通路;3: HTLV- 感染;4: MAPK 信号通路;5: 粘着斑;6: Ras 信号通路;7: 亨廷顿病;8: 内吞作用;9: 肿瘤蛋白聚糖;10: EB 病毒感染;11: 细胞骨架调节;12: 吞噬体;13: cAMP 信号通路;14: Rap1 信号通路;15: 病毒致癌作用;16: 肿瘤转录误调节;17: 钙信号通路;18: 神经活性配体 - 受体相互作用;19: cGMP-PKG 信号通路;20: 结核病

Figure 2 The top 20 pathways with the greatest number of annotated sequences

Note: Pathways is provided next to each column; 1: Pathways in cancer; 2: PI3K-Akt signaling pathway; 3: HTLV- Infection; 4: MAPK signaling pathway; 5: Focal adhesion; 6: Ras signaling pathway; 7: Huntington's disease; 8: Endocytosis; 9: Proteoglycans in cancer; 10: Epstein-Barr virus infection; 11: Regulation of actin cytoskeleton; 12: Phagosome; 13: cAMP signaling pathway; 14: Rap1 signaling pathway; 15: Viral carcinogenesis; 16: Transcriptional misregulation in cancer; 17: Calcium signaling pathway; 18: Neuroactive ligand-receptor interaction; 19: cGMP-PKG signaling pathway; 20: Tuberculosis



对差异表达基因进行 KEGG 富集分析,在 0 vs 5、0 vs 15 两两比对的结果中分别获得 129 和 155 个 KEGG 通路。对与离子调节相关且差异表达显著的基因进行 KEGG 生物学通路的注释与富集分析表明,这些生物学通路主要被划分到能量代谢(energy metabolism)、脂肪代谢(lipid metabolism)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)等与新陈代谢相关以及内分泌系统(Endocrine system)等类别中。其中 0 vs 5 组比对中参与能量代谢、碳水化合物、脂肪和内分泌代谢的 KEGG 通路个数分别为 4、6、8、10,且只有氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)、糖酵解/合成(Glycolysis/gluconeogenesis)、亚油酸代谢(Linoleic acid metabolism)、花生四烯酸代谢(Arachidonic acid metabolism)、 $\alpha$ -亚油酸代谢(Alpha-linolenic acid metabolism)的 KEGG 通路富集达到显著水平( $p < 0.05$ );而 0 vs 15 组比对中参与能量代谢、碳水化合物、脂肪和内分泌代谢的 KEGG 通路个数分别为 4、6、9、13,但只有氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)、半乳糖代谢(Galactose metabolism)、亚油酸代谢(Linoleic acid metabolism)、催乳素信号通路(Prolactin signaling pathway)、脂肪细胞因子信号通路(Adipocytokine signaling pathway)的 KEGG 通路富集达到显著水平( $p < 0.05$ ) (表 2)。

在所有被富集的 KEGG 通路中,参与离子调节的通路只有一个,为醛固酮介导的 Na 重吸收(Aldosterone-regulated sodium reabsorption,  $p = 0.999$ ),其中差异表达的基因只有 NEDD4L。

## 2 讨论

盐度是影响水生动物各种生理活动的重要环境因素,其变化会迫使水生动物机体产生一系列的变化,从而调整机体内渗透压的动态平衡(Chen and Chia, 1997)。在本研究中,红耳龟经过长达 8 周的慢性盐度胁迫后,血液渗透压随盐度的升高而升高,但盐度 5 组与对照组差异不显著,只有盐度 15 组显著高于其它两组。这说明红耳龟经较长时间盐度胁迫后,在低盐度下具有较好的适应力。已有的研究表明,无机离子是渗透压的主要效应物,而  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  则是主要的贡献者(Chen and Chia, 1997)。在本研究中,盐度 5 组的血浆渗透压与对照组差异不显著,  $\text{Na}^+$  变化趋势与渗透压的变化趋势一致,  $\text{Cl}^-$  在三组中两两差异均显著,而  $\text{K}^+$  浓度在盐度 5 组和盐度 15 组显著低于对照组。通过转录组 GO 富集分析发现,在红耳龟慢性盐度胁迫过程中参与离子通道调节的差异

表达基因主要有 KCNH5、SCN1B、NPPA 等。其中 KCNH5 是一种受膜电压变化调节的  $\text{K}^+$  通道,它在调节细胞生理、信号传导等生理活动中发挥重要作用(刘琼瑶和聂敏海, 2016, 临床口腔医学杂志, 32(12): 756-759)。SCN1B,作为电压门控性钠离子通道,对于调节机体  $\text{Na}^+$  浓度具有一定的作用(Makita et al., 1994)。ANP 具有促进水钠排泄、利尿、调节血管张力、对抗肾素-血管加压素-醛固酮系统(RAAS)及调节血管加压素、肾素、内皮素的分泌等作用(李晓斌等, 2006; 吴志俊等, 2012)。利钠肽(ANP)前体 A (NPPA)基因的缺失会导致高血压以及容量负荷增加后水钠排泄功能的受损(Franco et al., 2006)。本研究通过转录组的 KEGG 分析发现,直接被富集到的参与离子调节 KEGG 通路只有醛固酮介导的 Na 重吸收,但并未达到显著富集水平,并且并未发现与  $\text{Cl}^-$  调节相关的基因。因此,从血液生理指标和转录组分析结果均很好地说明红耳龟能较好地适应慢性盐度胁迫,直接参与离子通道调节的 KEGG 通路并未发生显著改变。

能量代谢是指生物体内糖、脂肪等物质在代谢过程中能量的释放、利用和转移等(任建安等, 2001, 中国实用外科杂志, 21(10): 631-637)。在盐度胁迫下,机体通过离子进行渗透调节需要能量。研究表明,当动物受到外界胁迫时,机会会通过儿茶酚胺的分泌来促进糖原分解成葡萄糖,进而为机体代谢提供能量(Sancho et al., 1997)。在本研究与能量代谢及相关激素的基因有 ATP 酶(ATPeFOA, MTATP6, ATP6)、葡萄糖激酶(GCK)、盐诱导激酶(SIK)、脂联素(ACDC)和类固醇  $17\alpha$ -单氧酶/  $17\alpha$ -羟孕酮脱乙酰酶(CYP17A)等。ATPeFOA 是三大 ATP 酶中的 F 型 ATP 酶,是能量代谢的关键酶,主要与离子转运相关。GCK 是葡萄糖代谢的关键酶,在肝脏和胰岛  $\beta$  细胞中具有葡萄糖感受器和代谢信息产生器的作用,主要参与糖代谢及胰岛素、胰高血糖素的代谢过程(Panaserat et al., 2001)。SIK 是一种盐诱导激酶,属于 AMPK 激酶家族,SIK 包括 SIK1、SIK2、SIK3,其中 SIK1 和 SIK2 这两种 SIK 异构体均可以在肝组织中表达,具有调节糖异生和脂肪合成的作用(Dentin et al., 2007; 徐文光, 2012; 余杰, 2013)。而这些酶的激活主要依赖磷酸化,这与本研究中参与盐度胁迫的能量代谢通路中只有氧化磷酸化通路富集达到显著水平的结果相一致。与此同时,本研究中糖代谢相关通路以及亚油酸代谢通路的富集亦达到显著水平。脂联素(ACDC),亦称脂连蛋白,它可以通过与其受体结合

表 2 红耳龟慢性盐度胁迫中与离子调节相关的 KEGG 通路

Table 2 The KEGG pathways related to ionic regulation of *T. s. elegans* in ambient salinity

类型 Type	词条 Terms	坐标 Id	对照组与盐度 5 组对比		对照组与盐度 15 组对比	
			<i>p</i>	基因 Genes	<i>p</i>	基因 Genes
排泄系统	醛固酮调节的钠重吸收	ko04960	-	-	0.653	NEDD4L
Excretory system	Aldosterone-regulated sodium reabsorption					
能量代谢	氧化磷酸化	ko00190	0.011	COX1 COX2 COX3 ATPeF0A, MTATP6, ATP6 COX1 COX1 COX3 CYTB, petB ATPeF0A, ATP6	0.043	COX1 COX3 ATPeF0A, MTATP6, ATP6 COX1 COX1 ND2 COX3 CYTB, petB ATPeF0A, MTATP6, ATP6
Energy metabolism	Oxidative phosphorylation					
	氮代谢	ko00910	0.209	glnA, GLUL E4.2.1.1	0.677	glnA, GLUL
	Nitrogen metabolism					
	光合作用触角蛋白	ko00196			0.382	LHCB1
	Photosynthesis-antenna proteins					
	光合作用生物体的固碳作用	ko00710	0.433	FBP, fbp GAPDH, gapA	0.590	GPT, ALT GAPDH, gapA
	Carbon fixation in photosynthetic organisms					
	甲烷代谢	ko00680	0.626	FBP, fbp	-	-
	Methane metabolism					
碳水化合物代谢	糖酵解/糖异生	ko00010	0.039	E1.2.1.5 FBP, fbp ADH1_7 ADH4 GAPDH, gapA GAPDHS	0.416	G6PC GAPDH, gapA GCK G6PC
Carbohydrate metabolism	Glycolysis/Gluconeogenesis					
	半乳糖代谢	ko00052	0.988	lacD	0.044	lacD G6PC G6PC GCK
	Galactose metabolism					
	戊糖和葡萄糖醛酸互变	ko00040	0.511	CRYL1	0.618	CRYL1
	Pentose and glucuronate interconversions					
	淀粉和蔗糖代谢	ko00500	-	-	0.309	G6PC G6PC GCK
	Starch and sucrose metabolism					
	戊糖磷酸盐途径	ko00030	0.612	FBP, fbp	-	-
	Pentose phosphate pathway					
	乙醛酸盐和二羧酸盐代谢	ko00630	0.676	glnA, GLUL	0.780	glnA, GLUL
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism					
	果糖和甘露糖代谢	ko00051	0.724	FBP, fbp		
	Fructose and mannose metabolism					

续表 2  
Continuing table 2

类型 Type	词条 Terms	对照组与盐度 5 组比对 0 vs 5 psu group			对照组与盐度 15 组比对 0 vs 15 psu group		
		坐标 Id	p	基因 Genes	坐标 Id	p	基因 Genes
	氨基糖和核糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ko00520	-	-	ko00520	0.505	E3.2.1.14 GCK
脂肪代谢 Lipid metabolism	亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	ko00591	0.006	PLA2G4, CPLA2 PLB1, PLB CYP2C  PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2	ko00591	0.018	PLA2G4, CPLA2 PLA2G, SPLA2 PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2 CYP2C
	花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	ko00590	0.006	PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2  PLB1, PLB PLA2G4, CPLA2 K15717  CYP2C	ko00590	0.063	PLA2G4, CPLA2 PLA2G, SPLA2 PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2 CYP2C
	α 亚油酸代谢 Alpha-Linolenic acid metabolism	ko00592	0.023	PLA2G4, CPLA2 PLB1, PLB PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2	ko00592	0.057	PLA2G4, CPLA2 PLA2G, SPLA2 PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2
	乙醚脂代谢 Ether lipid metabolism	ko00565	0.060	PLA2G4, CPLA2 PLB1, PLB PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2	ko00565	0.135	PLA2G4, CPLA2 PLA2G, SPLA2 PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2
	甘油磷脂代谢 Glycerol phospholipid metabolism	ko00564	0.161	PLA2G4, CPLA2 ACHE PLB1, PLB  PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2	ko00564	0.097	PLA2G4, CPLA2 PLA2G, SPLA2 PLA2G4, CPLA2 ACHE PLA2G4, CPLA2 AGXT2L1, ETNPPL AGXT2L1, ETNPPL
	脂肪酸降解 Fatty acid degradation	ko00071	0.101	ACADVL ADH4 ADH1_7	ko00071	0.770	ACADVL
	鞘脂类代谢 Sphingolipid metabolism	ko00600	-	-	ko00600	0.483	SGMS NEU2_3_4
	类固醇激素的合成 Steroid hormone biosynthesis	ko00140	0.698	CYP2C	ko00140	0.483	CYP17A CYP2C
	甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	ko00561	0.885	glpK, GK	ko00561	0.789	glpK, GK JPL
内分泌系统 Endocrine system	脂肪细胞因子信号通路 Adipocytokine signaling pathway	ko04920	0.842	ACDC	ko04920	0.044	ACDC G6PC SOCSS3, CIS3 SOCSS3, CIS3  G6PC ACDC
	GnRH 信号通路 GnRH signaling pathway	ko04912	0.561	PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2  PLA2G4, CPLA2	ko04912	0.558	PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2  PLA2G4, CPLA2 JUN
	催产素信号通路 Oxytocin signaling pathway	ko04921	0.684	PLA2G4, CPLA2 ACTB_G1 PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2	ko04921	0.560	PLA2G4, CPLA2 PLA2G4, CPLA2 FOS  JUN PLA2G4, CPLA2 ACTB_G1

续表 2  
Continuing table 2

类型 Type	项目 Items	对照组与盐度 5 组对比		对照组与盐度 15 组对比	
		<i>p</i>	基因 Genes	<i>p</i>	基因 Genes
内分泌系统	PPAR 信号通路	0.711	ACDC1 pK, GK	0.254	FOS SOCS3, CIS3 SOCS1, JAB  GCK
Endocrine system	PPAR signaling pathway				CYP17A  SOCS3, CIS3
	甲状腺激素信号通路	0.828	ACTB_G1 HIF1A	0.986	ACTB_G1
	Thyroid hormone signaling pathway				
	催乳素信号通路	0.830	SOCS1, JAB	-	-
	Prolactin signaling pathway				
	卵巢类固醇生成	0.152	PLA2G4, CPLA2 PLA2G4,	0.111	PLA2G4, CPLA2 CYP17A PLA2G4,
	Ovarian steroidogenesis		CPLA2 PLA2G4, CPLA2		CPLA2 PLA2G4, CPLA2
	甲状腺激素合成	0.870	PDIA4, ERP72	-	-
	Thyroid hormone synthesis				
	黑色素的生成	0.901	EDNRB	0.955	FZD5_8, fz2
	Melanogenesis				
	胰岛素信号通路	0.906	SOCS1, JAB FBP, fbp	0.296	G6PC SOCS3, CIS3 PPP1R3 SOCS1,
	Insulin signaling pathway				JAB GCK SOCS3, CIS3 G6PC
	雌激素信号通路	-	-	0.750	hspG, HSP90A FOS JUN
	Estrogen signaling pathway				
	孕酮介导的卵母细胞成熟	-	-	0.951	hspG, HSP90A
	Progesterone-mediated oocyte maturation				
	胰岛素的分泌	-	-	0.957	GCK
	Insulin secretion				
	血管紧张素系统	-	-	0.559	ANPEP
	Renin-angiotensin system				



进行糖摄取、抑制脂肪生成、胰岛素抵抗以及脂肪酸氧化等作用(万春燕等, 2009)。在本研究中, 红耳龟在盐度 15 胁迫下, 催乳素信号通路以及脂肪细胞因子信号通路发生的 KEGG 通路富集达到显著水平。CYP17A 是 CYP17 的一种亚型, 而 CYP17 是一种混合功能氧化酶, 具有 17 $\alpha$ -羟化酶(Cyp17A1)和 17, 20-裂解酶两种活性, 其中可以通过 Cyp17A1 活性, 将孕烯醇酮/孕酮转变成 17-羟孕烯醇酮/17-羟孕酮, 然后在多种不同酶的作用下合成皮质醇(Yang et al., 2006; Dhir et al., 2007)。除此之外, 肝脏 Cyp17A1 可在其产物 17-羟孕酮介导下上调糖异生关键酶基因的转录活性, 进而促进肝脏糖异生的过程(赵洁洁和李小英, 2016)。有研究表明, 机体遭受胁迫后, 皮质醇也可使机体各组织对葡萄糖的利用率降低, 加强肝脏的糖原异生作用, 从而使血糖含量升高(童燕等, 2007)。但是, 在本研究中, 各组血液皮质醇含量两两之间差异均不显著, 这也进一步说明红耳龟能较好地适应慢性盐度胁迫(盐度在 0.5%左右)。

综上所述, 参与红耳龟盐度胁迫离子调节的基因主要有(KCNH5)、(SCN1B)、利尿肽前体 A (NPPA)、ATP 酶(ATPeFOA, MTATP6, ATP6)、葡萄糖激酶(GCK)、盐诱导激酶(SIK)、脂联素(ACDC)和类固醇 17 $\alpha$ -单氧化酶/17 $\alpha$ -羟孕酮脱乙酰酶(CYP17A)等, 且多数富集到与能量代谢(energy metabolism)、脂肪代谢(lipid metabolism)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)以及内分泌系统(endocrine system)等类别中, 盐度 15 组血液渗透压、Na<sup>+</sup>浓度及血糖含量与对照组存在显著差异, 而盐度 5 组与对照组之间差异不显著; 且各组血液皮质醇含量两两之间差异均不显著。这说明红耳龟能较好地适应慢性的低盐度胁迫(盐度在 0.5%左右)。

### 3 材料与方法

#### 3.1 试验设计

实验材料来源于海南省海口东山养殖场, 于海南师范大学养龟池暂养两周后, 挑选健康个体(BW: 466.39 $\pm$ 69.61) g, 二龄)进行盐度胁迫实验, 随机分为 3 组(n=6): 对照组(自来水)、低盐度组(0.5%, 即盐度 5 组)和高盐度组(1.5%, 即盐度 15 组)。根据龟类的摄食习性, 每周定时投喂龟用饲料(用各组相应盐度的水 1:1 调制) 2 次, 投喂 24 h 后换水, 并用海水晶调节到相应盐度。每天用手持盐度计(WYY- , 成都泰华光学有限公司)监测水中盐度。实验持续 8 周。

#### 3.2 样品采集

经海南省生态环境教育中心动物伦理委员会批准, 红耳龟低温冷冻麻醉约 30 min, 心脏处取血, 未抗凝血经低温运输至海南医学院附属医院检验科进行血液生化指标检测(24 h 内完成)。取部分肝脏保存于液氮中, 以提取总 RNA 作转录组分析用。

#### 3.3 测定方法

##### 3.3.1 血液生理指标检测

血液渗透压、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>含量通过电极法进行测量, 在海南医学院附属医院血液生化分析仪(型号: Beckman, 美国)进行检测。血糖含量通过己糖激酶法进行测量; 皮质醇含量通过化学发光法(化学发光免疫分析仪 DXI800)进行检测。

##### 3.3.2 肝脏转录组分析

采用 Trizol 法提取肝脏总 RNA, 用 Nano-drop 2000 和琼脂糖凝胶电泳分别检测 RNA 的浓度和完整性。检验合格后, 送上海美吉生物有限公司进行转录组 Illumina Hiseq 4000 测序。使用 BlastX (Version 2.2.25)将拼接所得到的核苷酸序列与 GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org>)数据库进行比对, 按照每一组基因参与的生物过程、分子功能和细胞组分 3 个方面进行分类注释。

差异基因 GO 富集和表达分析: 采用 Fisher 精确检验法使用软件 Goatoools (<https://github.com/tanghaibao/GOatools>)进行 GO 富集分析 RSEM 利用比对软件 Bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>)进行表达量统计, 获得每个样品比对到每个基因上的 read count 数目, 经 FPKM 转换, 得到基因的表达水平。采用软件 edgeR (<http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/edgeR.html>)进行差异表达分析, 该软件使用 RSEM 得到的 gene read count 数据进行差异表达计算。在本研究中, 显著差异表达基因的筛选标准为: FDR<0.05 & log<sub>2</sub>FC $\geq$ 1 (FDR 指对 *p* 指校验的结果, log<sub>2</sub>FC 指基因在两样本间差异倍数以 2 为底的对数值)。

KEGG 注释 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 京都基因和基因组百科全书, <http://www.genome.jp/kegg/>)数据库可系统分析基因功能、联系基因组信息和功能信息, 其基因组信息主要是从 NCBI 等数据库中获得, 包括完整和部分测序的基因组序列, 存储于 KEGG GENES 数据库中; 更高级的功能信息包括图形化的细胞过程如代谢、膜转运、



信号传递、细胞周期等存储于 KEGG PATHWAY 数据库中;关于化学物质、酶分子、酶化反应等相关信息存储于 KEGG LIGAND 数据库中。

### 3.4 数据处理

采用软件 Excel 2003 和 SPSS16.0 进行数据处理与分析,所有数据均以 $\pm$ SE 表示。统计分析方法为单因素方差分析, LSD 法进行多重比较,差异显著临界值为 0.05。

### 作者贡献

洪美玲是本研究的实验设计和实验研究的执行人,洪美玲、李江月完成数据分析,论文初稿的写作;江爱萍、丁利及史海涛参与实验设计,试验结果分析;丁利是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由国家自然科学基金项目(No. 31360642; No. 31760116)资助。

### 参考文献

Chen J.C., and Chia P.G., 1997, Osmotic and ionic concentrations of *Scylla serata* (Forsk.) subjected to different salinity levels, *Comp. Biochem. Physiol.*, 117(2): 239-244

Dentin R., Liu Y., Seung-Hoi K., Susan H., Thomas V., Jose H., John Y., and Marc M., 2007, Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator *TORC2*, *Nature*, 449(7160): 366-369

Dhir V., Ivison H.E., Krone N., Krone N., Shackleton C.H., Doherty A.J., Stewart P.M., and Arlt W., 2007, Differential inhibition of *CYP17A1* and *CYP21A2* activities by the *P450* oxidoreductase mutant *A287P*, *Mol. Endocrinol.*, 21(8): 1958-1968

Franco V., Chen Y.F., Feng J.A., Li P., Wang D., Hasan E., Oparil S., and Perry G.J., 2006, Eplerenone prevents adverse cardiac remodelling induced by pressure overload in atrial natriuretic peptide-null mice, *Clin. Exp. Pharmacol. P.*, 33(9): 773-779

Hong M.L., Zhang K., Shu C.H., Xie D., and Shi H.T., 2014, Effect of salinity on the survival, ions and urea modulation in red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*), *Asian Herpetol. Res.*, 5(2): 128-136

Li C., 2013, The field research of reproduction of *Trachemys scripta elegans* in Wanquan river, Thesis for M.S., Hainan Normal University, Supervisor: Shi H.T., pp.4-6 (李闯, 2013,

海南万泉河红耳龟(*Trachemys scripta elegans*)野外繁殖研究, 硕士学位论文, 海南师范大学, 导师: 史海涛, pp. 4-6)

Li X.B., Gai L.E., and Ren Y.H., 2006, Advances in natriuretic peptide study, *Zhongguo Kangfu Lilun Yu Shijian (Chinese Journal Rehabilitation Theory Practice)*, 12(11): 968-971 (李晓斌, 盖鲁粤, 任艺虹, 2006, 利钠肽的研究进展, *中国康复理论与实践*, 12(11): 968-971)

Liu H.L., Zheng L.M., Liu Q.Q., Quan F.S., and Zhang Y., 2013, Studies on the transcriptomes of non-model organisms, *Yichuan (Hereditas)*, 35(8): 955-970 (刘红亮, 郑丽明, 刘青青, 权富生, 张涌, 2013, 非模式生物转录组研究, *遗传*, 35(8): 955-970)

Makita N., Sloan-Brown K., Weghuis D.O., Ropers H.H., and Jr G.A., 1994, Genomic organization and chromosomal assignment of the human voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta 1 subunit gene (*SCN1B*), *Genomics*, 23(3): 628-634

Panserat S., Capill E., Gutierrez J., Frappart P.O., Vachot C., Plagnes-Juan E., Aguirre P., Brèque J., and Kaushik S., 2001, Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 128(2B): 275-283

Sancho E., Ferrando M.D., and Andreu E., 1997, Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*, *Ecotox. Environ. Saf.*, 36(1): 57-65

Shu C.H., Zhang K., Hong M.L., Xie D., Liu Q.C., and Shi H.T., 2012, Effect of salinity stress on *trachemys scripta elegans* growth and blood biochemical ingredient, *Sichuan Dongwu (Sichuan Journal of Zoology)*, 31(6): 912-916 (舒超华, 张珂, 洪美玲, 谢迪, 刘启超, 史海涛, 2012, 盐度胁迫对红耳龟生长与血液生化指标的影响, *四川动物*, 31(6): 912-916)

Swingland I.R., and Gibbons W.J., 1991, Life history and ecology of the slider turtle, *J. Animal Ecology*, 60(2): 715

Tong Y., Chen L.Q., Zhuang P., Zhang L.Z., Peng S.M., Song C., and Li E.C., 2007, Cortisol, metabolism response and osmoregulation of juvenile *Acipenser schrenckii* to ambient salinity stress, *Shuichan Xuebao (Journal of Fisheries of China)*, 31(S): 38-44 (童燕, 陈立侨, 庄平, 章龙珍, 彭士明, 宋超, 李二超, 2007, 急性盐度胁迫对施氏鲟的皮质醇、代谢反应及渗透调节的影响, *水产学报*, 31(S): 38-44)

Wan C.Y., Liu F., and Fu Z.W., 2009, The progress in research on the physiological and pathophysiological role of adiponectin, *Xibao Shengwuxue Zazhi (Chinese Journal of Cell Biology)*, 31(2): 163-168 (万春燕, 刘芬, 傅正伟, 2009, 脂联素的病理生理学研究进展, *细胞生物学杂志*, 31(2): 163-168)

Wu Z.J., Jin W., Zhang F.R., and Liu Y., 2012, Recent advances in natriuretic peptide family genes and cardiovascular diseases, *Yichuan (Hereditas)*, 34(2): 127-133 (吴志俊, 金玮, 张凤如, 刘艳, 2012, 利钠肽家族基因与心血管疾病研究

新进展, 遗传, 34(2): 127-133)

Xu W.G., 2012, Expression of *SIK1* in the kidney of diabetic rats and intervention effects of metformin, Thesis for Ph.D., Huazhong University of Science and Technology, Supervisor: Wen X.Y., pp.18-23 (徐文光, 2012, *SIK1* 在糖尿病大鼠肾组织的表达及二甲双胍和贞清方的干预作用, 硕士学位论文, 华中科技大学, 导师: 文秀英, pp.18-23)

Yang J., Cui B., Sun S., Shi T., Zheng S., Bi Y., Liu J., Zhao Y., Chen J., Ning G., and Li X., 2006, Phenotype-genotype correlation in eight Chinese  $17\alpha$ -hydroxylase/ $17,20$  lyase-deficiency patients with five novel mutations of *CYP17A1* gene, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91(9): 3619-3625

Yang J.B., 2014, The ecological adaptability of *Trachemys scripta elegans* in brackish water of nandu river, Hainan Island, China, Thesis for M.S., Hainan Normal University, Supervi-

sor: Shi H.T., pp.26-30 (杨江波, 2014, 红耳龟(*Trachemys scripta elegans*)在海南南渡江半咸水区域的生态适应性研究, 硕士学位论文, 海南师范大学, 导师: 史海涛, pp.26-30)

Yu J., 2013, Effect of salt-inducible kinase 1 on diabetic rats with early glomerulopathy and the related mechanisms, Dissertation for Ph.D., Huazhong University of Science and Technology, Supervisor: Wen X.Y., pp.28-35 (余杰, 2013, *SIK1* 在糖尿病肾病大鼠肾小球早期病变中的作用及机制研究, 博士学位论文, 华中科技大学, 导师: 文秀英, pp.28-35)

Zhao J.J., and Li X.Y., 2016, Role and mechanism of hepatic *Cyp17A1* gene in regulation of hepatic gluconeogenesis, *Zhenduan Lilun Yu Shijian (Journal of Diagnosis Concepts and Practice)*, (4): 400-404 (赵洁洁, 李小英, 2016, 肝脏  $17\alpha$ -羟化酶在糖异生中的作用及机制研究, 诊断学理论与实践, 15(4): 400-404)

=====

## Journal of Mosquito Research (JMR)



Journal of Mosquito Research (ISSN 1927-646X) is an open access, peer reviewed journal published online by BioPublisher. The journal is publishing high quality original research on all aspects of mosquito and its affecting the living organisms, as well as environmental risk and public policy relevant to mosquito modified organisms. Topics include (but are not limited to) the research at molecular or protein level of mosquito, impact on the ecosystem, containing positive and negative information, natural history of mosquito, also publishing innovative research findings in the basic and applied fields of mosquito and novel techniques for improvement, as well as the significant evaluation of its related application field.

Email: [edit@jmr.biopublisher.ca](mailto:edit@jmr.biopublisher.ca)

Web: <http://jmr.biopublisher.ca>