

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16275

## 高温胁迫下仿刺参表观遗传调控相关基因的表达特征

李尚俊<sup>1,2</sup>, 孙国华<sup>1</sup>, 李雪燕<sup>1,2</sup>, 李根瑞<sup>1,2</sup>, 杨建敏<sup>1</sup>, 杨爽<sup>1,2</sup>

1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

**摘要:** 以仿刺参(*Apostichopus japonicus*)表观遗传调控相关基因—DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT1)、组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC3)和组蛋白甲基转移酶(histone methyltransferase, MLL5)为目的基因, 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术和相对定量  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法, 以刺参管家基因  $\beta$ -actin 为内参进行校正, 比较了高温胁迫下 3 个基因在呼吸树、消化道、体液、肌肉各组织中的表达情况。以 15℃ 条件下的刺参为对照组, 其目的基因表达量为基准 1, 在体液中, DNMT1 基因在 18℃ 时表达量上升不显著( $P>0.05$ ), 18~21℃ 时表达量上升极显著( $P<0.01$ ), 21~24℃ 时上升不明显( $P>0.05$ ), 30℃ 得到最大表达量为 3.26, 总体为上调表达; HDAC3 基因和 MLL5 基因在 24℃ 时的表达量显著( $P<0.05$ ), 之后随着温度升高其表达量稍有升高, 分别在 30℃ 得到最大表达量为 2.90 和 3.19。总体来看, 各基因随着温度的升高其表达量都增高, 上调表达趋势明显, 在 30℃ 达到最高表达量。对比 3 个基因在不同组织中的表达差异, 体液中表达变化较明显, 在 24℃ 以后均大于 2.5; 肌肉中最低, 在整个高温胁迫过程中基因表达变化量小于 2。在 30℃ 的温度胁迫条件下, 检测在 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、15 h 6 个时间点 3 个基因的表达量, 以 0 h 各基因的表达量为基准 1, 结果显示, 3 个基因的表达量都表现为上调表达, 除消化道的 HDAC3 在 6 h 时提前进入平稳期, 其他各组织各基因的表达量均在 0~9 h 内随着胁迫时间的延长呈现快速上升状态( $P<0.05$ ); 胁迫 9 h 以后, 各目的基因表达量变化不明显或稍有降低( $P>0.05$ )。不同组织中目的基因的表达趋势一致, 体液中 3 种表观相关基因的表达量最高值高于其他 3 种组织。本研究为从表观遗传修饰角度解析刺参的高温逆境应答反应机制奠定了基础。

**关键词:** 刺参; 高温胁迫; MLL5; DNMT1; HDAC3; 表观遗传

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)03-0470-07

仿刺参(*Apostichopus japonicus*), 又称刺参, 棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、刺参科(Stichopodidae)、仿刺参属, 主要分布在北纬 35°~44° 的广大西北太平洋沿岸, 包括中国黄渤海海域、俄罗斯东部沿岸、日本和韩国沿岸。刺参是典型的温带物种, 刺参的生长、发育和繁殖等受温度因子的调控, 温度波动对刺参生理活动有着重要的影响<sup>[1~3]</sup>, 水温不仅影响刺参的摄食、代谢和生殖发育, 并且当水温升高到一定范围后, 刺参将以长期进化形成的“夏眠”策略<sup>[4~5]</sup>来应

对高温环境。当环境温度持续升高并超过刺参的耐受范围, 会引起刺参大规模死亡, 所以高温环境下刺参安全高效养殖和刺参养殖业的健康可持续发展对刺参高温逆境响应机制研究提出了迫切需求。

生物响应机制包括某些代谢途径的改变和基因表达调控<sup>[6]</sup>, 而表观遗传在这个机制中起着重要的作用。表观遗传(epigenetic)是指基因的核苷酸序列没有发生改变, 通过对 DNA 或染色体的修饰, 使生物的基因表达模式发生变化<sup>[7]</sup>, 表观遗传的修饰机制种类较多, 如 DNA 甲基化、组蛋

收稿日期: 2016-09-12; 修订日期: 2017-01-03.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31602144); 山东省自然科学基金项目(ZR2013CM029); 山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-22-02); 黄河三角洲学者岗位; 山东省良种工程。

作者简介: 李尚俊(1993-), 男, 硕士研究生. E-mail: lishangjun1993@163.com

通信作者: 孙国华, 副研究员. E-mail: sgh\_smile@163.com

白修饰、染色质重塑、非编码 RNA 调控等, 在基因转录水平和基因转录后水平进行调控。关于高温逆境对刺参的影响以及刺参对温度变化响应等方面的研究多集中在生理学、行为学基本特征、生理代谢的变化规律及其内在基因表达调控机制方面<sup>[8~12]</sup>。海洋动物响应逆境胁迫的表观遗传研究目前还比较薄弱, 从表观遗传修饰角度进行刺参高温胁迫响应研究, 可为刺参逆境响应研究提供基础数据。本研究从刺参响应环境温度变化的表观遗传相关基因入手, 选取 3 个表观遗传调控相关基因: DNA 甲基转移酶 *DNMT1*(DNA methyltransferase, *DNMT1*, GenBank 登录号: HM751104.1), 组蛋白去乙酰化酶 *HDAC3*(histone deacetylase, *HDAC3*, GenBank 登录号: HM751109.1), 组蛋白甲基转移酶 *MLL5*(histone methyltransferase, *MLL5*, GenBank 登录号: HM751112.1), 以刺参看家基因  $\beta$ -actin(GenBank 登录号: EU668024.1)为内参, 采用实时荧光定量 PCR 技术, 利用相对定量  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对这 3 个基因在不同温度、不同胁迫时间刺激下在不同组织中的应激表达特性进行了分析, 以期从表观遗传修饰角度了解刺参的高温逆境应答反应机制, 进而丰富刺参适应环境变化的理论, 为高温环境刺参养殖提出有效的应对策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

刺参样品为 18 月龄成参, 平均体长约为 (16.4±3) cm, 取自山东长岛刺参养殖场, 挑选体态伸展结实、规格均一的个体在实验室养殖池暂养 7 日。暂养期间, 按常规养殖 1 日 2 次投喂, 连续充气, 每天换水 1/3~1/2。

表 1 实时定量 PCR 引物  
Tab. 1 Gene-specific real-time quantitative PCR primers

| 基因 gene   | 引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')                       | 片段长度/bp fragment length |
|---|--|-------------------------|
| DNA 甲基转移酶<br><i>DNMT1</i>                               | F: ATATGGCGTCCCACAGACTC<br>R: CACAGTGATGGTGCAGATTAGG     | 167                     |
| 组蛋白甲基转移酶<br><i>MLL5</i>                                 | F: AAAGATGAAGGGATAACGAGATGC<br>R: AACATTACAGCACGAGGTTACA | 171                     |
| 组蛋白去乙酰化酶<br><i>HDAC3</i>                                | F: AGGGTGTGACAGACTTGGATG<br>R: GAAGGGCAGTCTCGTACGTC      | 158                     |
| 管家基因 $\beta$ -actin<br>housekeeping gene $\beta$ -actin | F: CGGGAAATCGTTCGTGACA<br>R: AGGACAAAGTTGGCGTACA         | 262                     |

### 1.2 温度胁迫处理

不同胁迫温度: 将 50 只刺参放入温度为 15℃ 的水槽中 5 h, 然后用温控加热棒以 0.6℃/h 的速度将水温逐渐升至 18℃、21℃、24℃、27℃、30℃ 5 个温度, 刺参在每个温度中刺激 3 h。每个温度分别取出 5 只刺参解剖, 取其等量体液、纵肌、消化道和呼吸树等组织, 用液氮迅速冷冻后转移到-80℃冰箱以备用。

不同胁迫时间: 将 50 只刺参放到水温 20℃ 水槽中, 快速加热 3 h, 快升温至 30℃ 后, 分别在 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、15 h 6 个时间点取出 5 只刺参解剖, 取其等量的体液、纵肌、消化道和呼吸树等组织, 用液氮迅速冷冻后转移到-80℃冰箱以备用。

### 1.3 RNA 的提取与 cDNA 的合成

将组织在液氮中充分研磨, 加入适量 Trizol (Invitrogen) 提取总 RNA, 按照 M-MLV RT (Promega) 使用说明, 以含有 DNase I (Promega) 的 RNA 为模板加入 2×oligo dT (5'-GGCCACGCGTCGACT-AGTACT17-3') 作为引物, 在 42℃ 反应 1 h, 95℃ 5 min 以终止反应。所得的 cDNA 模板保存在 -80℃ 备用。

### 1.4 引物的设计与筛选

引物序列参考 Wang 等<sup>[13]</sup>, 其序列信息见表 1。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 用无菌水稀释到 10 μmol/L, -20℃ 保存备用。

### 1.5 荧光定量 PCR 及数据分析

荧光定量 PCR 在实时荧光定量 PCR 仪 (eppendorf Mastercycler ep realplex) 上进行, PCR 反应体系为 25 μL: 含 cDNA 模板 100 倍稀释液

2.5 μL, 12.5 μL 2×SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 正反引物各 1 μL 和 8 μL 水。反应条件: 94℃预变性 30s; 94℃变性 20 s, 60℃退火 10 s, 循环 35 次; 检测熔解曲线。以刺参  $\beta$ -actin 为内参, 运用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , 公式中  $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 实验组目的基因}} - C_{t \text{ 实验组管家基因}}) - (C_{t \text{ 对照组目的基因}} - C_{t \text{ 对照组管家基因}})$ , 计算目的基因的相对表达量, 结果用 *t* 检验进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同温度胁迫下的刺参表观调控相关基因的表达

以 15℃ 条件下的刺参为对照组, 其目的基因表达量为基准 1, 刺参不同组织中的 3 个表观遗传相关基因在不同温度胁迫下的相对表达量如图 1~4 所示, 在体液中, *DNMT1* 基因在 18℃ 时表达量上升不显著( $P>0.05$ ), 18℃ 到 21℃ 时表达量由 1.26 上升至 2.40, 上升表达极显著( $P<0.01$ ), 21℃ 到 24℃ 时上升不明显( $P>0.05$ ), 30℃ 得到最大表达量为 3.26; *HDAC3* 基因和 *MLL5* 基因在 24℃ 时的表达量差异显著( $P<0.05$ ), 之后随着温度升高

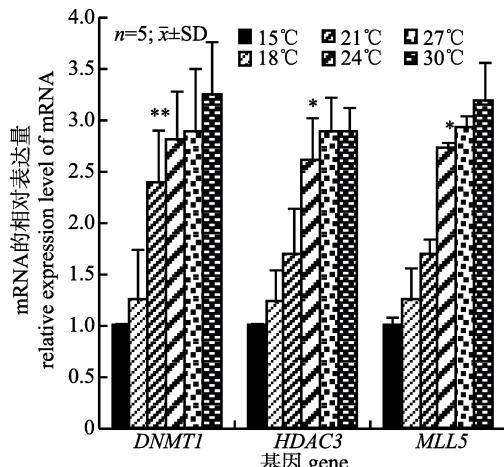


图 1 不同温度下各基因在体液中的表达

*DNMT1*: DNA 甲基转移酶基因; *HDAC3*: 组蛋白去乙酰化酶基因; *MLL5*: 组蛋白甲基转移酶基因. \*代表与前一温度相比差异显著( $P<0.05$ ); \*\*代表与前一温度相比差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 1 Gene expression in *Apostichopus japonicus* under different temperatures in body fluid

*DNMT1*: DNA methyltransferase gene; *HDAC3*: histone deacetylase gene; *MLL5*: histone methyltransferase gene.  
\* means the difference is significant compared with the previous temperature at the 0.05 level; \*\* means the difference is significant at the 0.01 level.

其表达量稍有升高, 分别在 30℃ 得到最大表达量为 2.90 和 3.19。在刺参体液、呼吸树、消化道和肌肉中各基因随着温度的升高其表达量都增高, 总体上调表达趋势明显, 均在 30℃ 达到最高表达量。在不同组织中, 各基因的表达量有所差异, 体液中 3 个目的基因表达变化较明显, 在 24℃ 以后均大于 2.5; 呼吸树和消化道中基因表达量的变化较体液少, 肌肉中最低, 在整个高温胁迫过程基因表达变化量小于 2。其中 *DNMT1* 基因表达量显著变化先于 *HDAC3* 基因和 *MLL5* 基因, 在 4 种不同组织中均在升温至 21℃ 时有显著上扬表达。

### 2.2 高温胁迫过程中表观遗传调控基因的表达

在 30℃ 的温度胁迫条件下, 检测在 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、15 h 6 个时间点 3 个表观遗传相关基因的相对表达量, 以 0 h 各基因的表达量为基准 1, 结果如图 5~8 所示: *DNMT1*、*HDAC3* 和 *MLL5* 三个基因在刺参不同组织中的相对表达量都表现为上调表达。图 5 所示, 体液中, 在热胁迫 0~9 h 时间内, 随着胁迫时间的延长, 三个目的基因相对表达量均呈现快速上升状态, 变化显著, 9 h 各基因相对表达量为 3.13、2.95 和 2.50; 随着

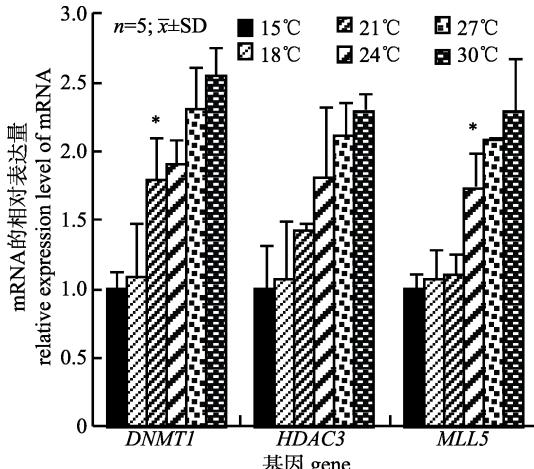


图 2 不同温度下各基因在呼吸树中的表达

*DNMT1*: DNA 甲基转移酶基因; *HDAC3*: 组蛋白去乙酰化酶基因; *MLL5*: 组蛋白甲基转移酶基因. \*代表与前一温度相比差异显著( $P<0.05$ ); \*\*代表与前一温度相比差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 2 Gene expression in *Apostichopus japonicus* under different temperatures in respiratory tree

*DNMT1*: DNA methyltransferase gene; *HDAC3*: histone deacetylase gene; *MLL5*: histone methyltransferase gene.  
\* means the difference is significant compared with the previous temperature at the 0.05 level; \*\* means the difference is significant at the 0.01 level.

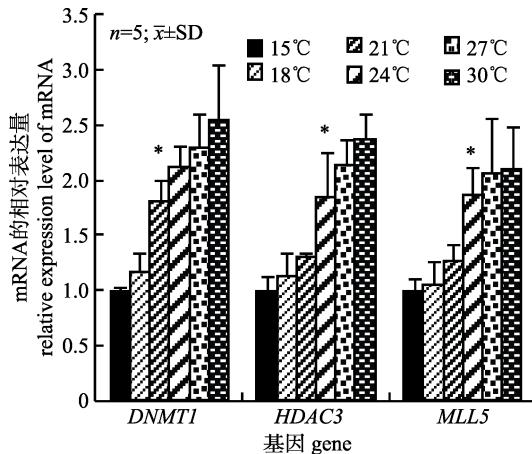


图3 不同温度下各基因在消化道中的表达

*DNMT1*: DNA 甲基转移酶基因; *HDAC3*: 组蛋白去乙酰化酶基因; *MLL5*: 组蛋白甲基转移酶基因. \*代表与前一温度相比差异显著( $P<0.05$ ); \*\*代表与前一温度相比差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 3 Gene expression in *Apostichopus japonicus* under different temperatures in intestine

*DNMT1*: DNA methyltransferase gene; *HDAC3*: histone deacetylase gene; *MLL5*: histone methyltransferase gene.

\* means the difference is significant compared with the previous temperature at the 0.05 level; \*\* means the difference is significant at the 0.01 level.

胁迫时间继续延长，目的基因表达量变化相对平缓，各目的基因表达量变化不明显或稍有降低。除消化道的 *HDAC3* 在 6h 时提前进入平台期，在刺参呼吸树、消化道和肌肉组织中，目的基因也均在 9 h 后进入相对平稳期，但其 9h 的表达值均低于在体液中相应数值。在体液和呼吸树中 3 种基因的表达形式类似，*DNMT1* 表达量最高，*HDAC3* 次之。

### 3 讨论

DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色体重塑和非编码 RNA 调控是主要的表观遗传调控机制，表观遗传修饰对生物生长发育及生理活动的调控研究已有一些报道。最近的研究表明，在逆境胁迫下表观遗传修饰可通过调控基因表达来提高生物的抗逆性。生物体在受到逆境胁迫时，可以诱导体内的各种表观遗传修饰发生变化，它们通过调控胁迫响应基因的表达来达到改变生物体的生理状态，最终达到适应环境的目的。例如，DNA 甲基化和组蛋白乙酰化均可以通过调控相关基因的表

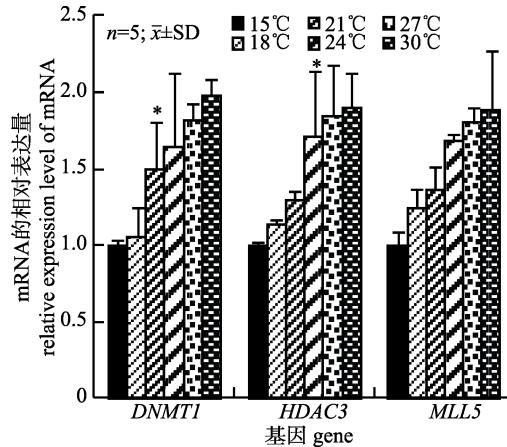


图4 不同温度下各基因在肌肉中的表达

*DNMT1*: DNA 甲基转移酶基因; *HDAC3*: 组蛋白去乙酰化酶基因; *MLL5*: 组蛋白甲基转移酶基因. \*代表与前一温度相比差异显著( $P<0.05$ ); \*\*代表与前一温度相比差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 4 Gene expression in *Apostichopus japonicus* under different temperatures in muscle

*DNMT1*: DNA methyltransferase gene; *HDAC3*: histone deacetylase gene; *MLL5*: histone methyltransferase gene.

\* means the difference is significant compared with the previous temperature at the 0.05 level; \*\* means the difference is significant at the 0.01 level.

达来响应盐胁迫和冷胁迫等逆境环境条件<sup>[14-17]</sup>。同样的，DNA 甲基化、组蛋白修饰等表观修饰的过程也是通过某些相关基因表达的功能酶类来实现的，DNA 的甲基化是在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的作用下完成的，组蛋白乙酰化与去乙酰化分别是由组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和去乙酰化转移酶(histone deacetylase, HDAC)催化<sup>[18]</sup>。组蛋白赖氨酸甲基化主要是由 MLL 家族组蛋白赖氨酸甲基转移酶(histone lysine methyltransferases, HKMTs)所介导<sup>[19]</sup>。从表观修饰相关基因的表达情况可间接体现表观修饰活动过程，本研究分别选取了 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化和甲基化过程的代表性相关酶基因 *DNMT1*、*HDAC3* 和 *MLL5* 为研究对象，通过表观修饰酶的表达情况可从一定程度上反映刺参应答高温胁迫过程的内在表观修饰活动状态。

刺参高温胁迫实验设计了 15~30°C 之间 6 个温度梯度，通过 RT-PCR 研究了 3 个表观遗传修饰相关基因的表达，并验证分析了基因的表达与温度变化的相关性。*DNMT1* 在 21°C 时的表达量与

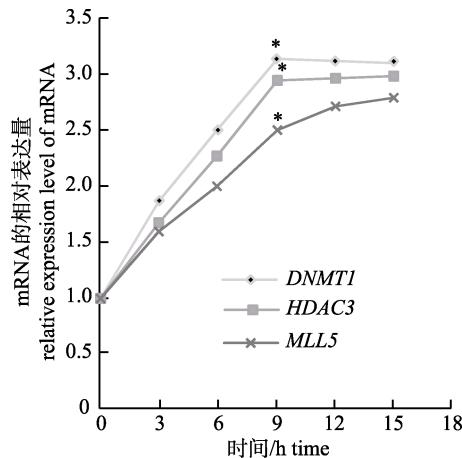


图 5 高温胁迫过程中各基因在体液中的表达  
DNMT1: DNA 甲基转移酶基因; HDAC3: 组蛋白去乙酰化酶基因; MLL5: 组蛋白甲基转移酶基因. \*代表与前一温度相比差异显著( $P<0.05$ ).

Fig. 5 Gene expressions in Body fluid of *Apostichopus japonicus* during heat stress

DNMT1: DNA methyltransferase gene; HDAC3: histone deacetylase gene; MLL5: histone methyltransferase gene. \* means the difference is significant compared with the previous temperature at the 0.05 level.

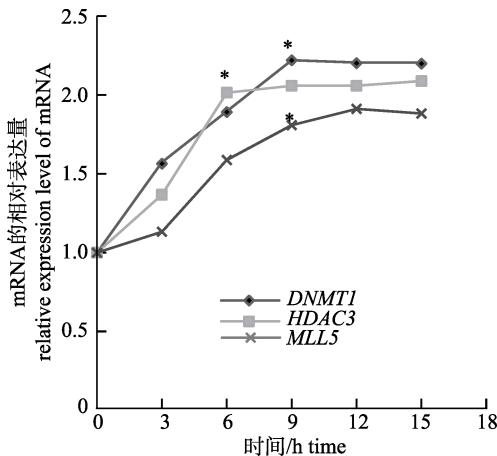


图 7 高温胁迫过程中各基因在消化道中的表达  
DNMT1: DNA 甲基转移酶基因; HDAC3: 组蛋白去乙酰化酶基因; MLL5: 组蛋白甲基转移酶基因. \*代表与前一温度相比差异显著( $P<0.05$ ).

Fig. 7 Gene expressions in intestine of *Apostichopus japonicus* during heat stress

DNMT1: DNA methyltransferase gene; HDAC3: histone deacetylase gene; MLL5: histone methyltransferase gene. \* means the difference is significant compared with the previous temperature at the 0.05 level.

18℃时的表达量差异显著, 而 HDAC3 24℃时才表现为与 18℃时的表达量差异显著, 这说明 DNMT1 在高温胁迫条件下的表达最快, 对温度影响最敏感, DNA 甲基化作为表观遗传修饰的主要形式,

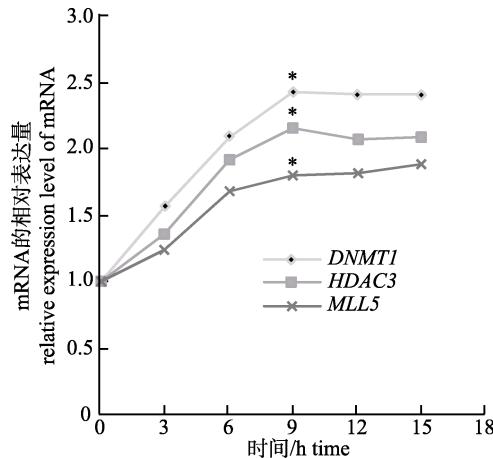


图 6 高温胁迫过程中各基因在呼吸树中的表达  
DNMT1: DNA 甲基转移酶基因; HDAC3: 组蛋白去乙酰化酶基因; MLL5: 组蛋白甲基转移酶基因. \*代表与前一温度相比差异显著( $P<0.05$ ).

Fig. 6 Gene expressions in respiratory tree of *Apostichopus japonicus* during heat stress

DNMT1: DNA methyltransferase gene; HDAC3: histone deacetylase gene; MLL5: histone methyltransferase gene. \* means the difference is significant compared with the previous temperature at the 0.05 level.

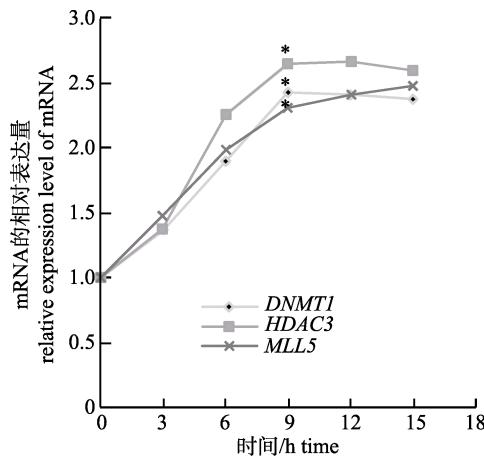


图 8 高温胁迫过程中各基因在肌肉中的表达  
DNMT1: DNA 甲基转移酶基因; HDAC3: 组蛋白去乙酰化酶基因; MLL5: 组蛋白甲基转移酶基因. \*代表与前一温度相比差异显著( $P<0.05$ ).

Fig. 8 Gene expressions in muscle of *Apostichopus japonicus* during heat stress

DNMT1: DNA methyltransferase gene; HDAC3: histone deacetylase gene; MLL5: histone methyltransferase gene. \* means the difference is significant compared with the previous temperature at the 0.05 level.

先于组蛋白修饰对高温逆境做出应答。总体看来, 高温应激下 DNMT1、HDAC3 和 MLL5 基因, 表达量均有所提升, 说明在高温逆境下, 刺参的表观遗传调控启动响应, 且 3 个基因的表达量都是

随着温度的升高而升高, 机体通过不断增加表观修饰相关酶类表达的方式来增强表观修饰的范围或强度, 使机体在温度胁迫下能够自我保护。在不同时间 30℃高温胁迫实验研究中, 随着时间的延长, 在刺参各组织中 3 个表观修饰相关基因的表达量首先都迅速上升, 除消化道的 *HDAC3* 6 h 提前进入平台期, 其他均在 9 h 后达到平稳期, 之后其表达量变化不明显或稍有降低, 说明刺参在高温胁迫下的表观遗传调控随着胁迫时间的延长最终趋于平稳, 可以推测此时刺参在表观遗传方面的调控已达极限或者表达调控程度已满足应对高温逆境。

刺参不同组织表观修饰相关基因表达量数据显示: 温度梯度胁迫试验中各基因的表达量在不同组织中有所差异, 由高到低依次是体液、消化道、呼吸树、肌肉, 说明在不同组织中甲基化和乙酰化程度不同, 而且不同组织在高温胁迫下的生理性变化也不同。已有研究证明, 消化道和呼吸树在高温胁迫下发生组织结构退化<sup>[5]</sup>, 在本研究中, 体液中的基因表达量最高, 可能与刺参体液是免疫防御第一道防线相关, 而在肌肉中的表达量最低则说明其在温度胁迫下的应激反应应答最不敏感。在 30℃高温长时间胁迫实验中, 体液和呼吸树中 3 种表观修饰相关基因的表达形式类似, 推测这与刺参的器官组织结构相关, 呼吸树浸润于体液, 这两种组织处于一个协同的环境状态, 其对外界的响应在一定程度上处于一致。总体来讲, 3 个刺参表观修饰相关基因在应对外界高温胁迫时, 都积极响应变化, 其表达变化过程总体趋势并无明显差异。苏玉等<sup>[20]</sup>认为 DNMT 与组蛋白修饰相关因子的相互作用是 DNMT 调控基因表达的重要手段, 在我们的研究数据也可以看出, DNA 甲基化及组蛋白修饰的 3 个代表基因协同表达, 表观修饰的各种形式是相互密切联系的, 刺参应对高温胁迫的表观遗传修饰是一个综合复杂调控的过程。

#### 4 展望

了解高温胁迫对刺参的影响和刺参的应答反应机制, 为高温环境刺参养殖提出有效的应对策略, 是摆在研究者面前最主要的问题。表观遗传

学的发展, 为深入认识刺参高温胁迫应答机制提供了新的研究思路。表观遗传变异在生物体应对逆境胁迫中发挥了重要的作用, 但表观遗传改变与非生物胁迫应答的研究才刚刚起步, 尚有诸多问题亟待解决, 如何利用这种机制调控和提高生物的抗逆性还有待研究, 人们希望通过这些表型变异进行选择以达到改良生物的目标。总之, 对表观遗传的进一步深入研究将有助于进一步揭示其在环境抗逆应答中的作用, 为利用表观遗传学进行育种奠定坚实的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Yang H S, Yuan X T, Zhou Y, et al. Effects of body size and water temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicas* (Selenka) with special reference to aestivation[J]. Aquac Res, 2005, 36: 1085–1092.
- [2] Dong Y W, Dong S L, Tian X L, et al. Effects of diel temperature fluctuations on growth, oxygen consumption and proximate body composition in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Aquaculture, 2006, 255(1–4): 514–521.
- [3] An Z H, Dong Y W, Dong S L, et al. Temperature effects on growth-ratio relationships of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)[J]. Aquaculture, 2007, 272: 644–648.
- [4] Mitsukuri K. Notes on the habits and life history of *Stichopus japonicus* Selenka[J]. Annot Zool Japan, 1903, 5: 1–21.
- [5] Liu S L, Ru X S, Xu Q Z, et al. Effects of high-temperature stress on several immune enzyme activities of *Apostichopus japonicus* thermotolerant and normal species[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(2): 344–351. [刘石林, 茹小尚, 徐勤增, 等. 高温胁迫对刺参耐高温群体和普通群体主要免疫酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(2): 344–351.]
- [6] Wang M, Wang Y F. Role of epigenetic modifications in plant stress response[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2013, 25(5): 1–6. [王敏, 王一峰. 表观遗传修饰在植物逆境胁迫响应中的作用[J]. 生命科学, 2013, 25(5): 1–6.]
- [7] Finnegan E J. Epialleles—a source of random variation in times of stress[J]. Curr Opin Plant Biol, 2001, 5(2): 101–106.
- [8] Asha P S, Muthiah P. Effects of temperature, salinity and pH on larval growth, survival and development of the sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel[J]. Aquaculture, 2005, 250: 823–829.
- [9] Dong Y W, Dong S L. Growth and oxygen consumption of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicas* (Selenka) at constant and fluctuating water temperatures[J]. Aquac Res, 2006, 37(13): 1327–1333.
- [10] An Z H, Dong Y W, Dong S L. Temperature effects on growth-ratio relationships of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)[J]. Aquaculture, 2007, 272: 644–648.

- [11] Ji T T, Dong Y W, Dong S L. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: Aestivation and temperature[J]. Aquaculture, 2008, 283(1): 180–187.
- [12] Dong Y W, Dong S L, Meng X L. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka)[J]. Aquaculture, 2008, 276(1–4): 179–186.
- [13] Wang T M, Yang H, Zhao H, et al. Transcriptional changes in epigenetic modifiers associated with gene silencing in the intestine of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka), during aestivation[J]. Chin J Oceanol Limnol, 2011, 29(6): 1267–1274.
- [14] Zhu J, Jeong J, Zhu Y, et al. Involvement of *Arabidopsis* HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(12): 4945–4950.
- [15] Choi C S, Sano H. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophos-
- phodiesterase-like protein in tobacco plants[J]. Mol Genet Genomics, 2007, 277(5): 589–600.
- [16] Chinnusamy V, Gong Z, Zhu J K. ABA-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses[J]. J Integr Plant Biol, 2008, 50(10): 1187–1195.
- [17] Agius F, Kapoor A, Zhu J K. Role of the arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(31): 11796–11801.
- [18] Strahl B D, Allis C D. The language of covalent histone modifications[J]. Nature, 2000, 403(6765): 41–45.
- [19] Morin P J, Storey K B. Evidence for a reduced transcriptional state during hibernation in ground squirrels[J]. Cryobiology, 2006, 53(3): 310–318.
- [20] Su Y, Wang X, Zhu W G. DNA methyltransferases: the role in regulation of gene expression and biological processes[J]. Hereditas, 2009, 31(11): 1087–1093. [苏玉, 王溪, 朱卫国. DNA 甲基转移酶的表达调控及主要生物学功能[J]. 遗传, 2009, 31(11): 1087–1093.]

## Characteristics of epigenetic regulation of related genes under high-temperature stress in sea cucumber *Apostichopus japonicus*

LI Shangjun<sup>1,2</sup>, SUN Guohua<sup>1</sup>, LI Xueyan<sup>1,2</sup>, LI Genrui<sup>1,2</sup>, YANG Jianmin<sup>1</sup>, YANG Shuang<sup>1,2</sup>

1. Shandong Marine Resources and Environment Research Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Yantai 264006, China;  
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Epigenetic regulation of the related genes DNA methyltransferase (DNMT1), histone deacetylase (HDAC3), and histone methyltransferase (MLL5) were used to analyze gene-expression quantity in the respiratory tree, intestine, coelomic fluid, and muscle tissue of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* under high-temperature stress conditions. The housekeeping gene  $\beta$ -actin of the sea cucumber was used for internal calibration, and the relative quantification  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method was employed using real-time fluorescent quantitative PCR. Sea cucumber kept at  $<15^{\circ}\text{C}$  were used as a control group, and the target gene-expression quantity of this group was used as benchmark-1. Increased expression of the DNMT1 gene was insignificant in the coelomic fluids at  $18^{\circ}\text{C}$ , but the expression rose significantly between  $18^{\circ}\text{C}$  and  $21^{\circ}\text{C}$ , thereafter the increase was less acute, until the expression quantity reached a maximum of 3.26 at  $30^{\circ}\text{C}$ . The expression quantity of the MLL5 gene and the HDAC3 gene were significant at  $2^{\circ}\text{C}$ , and then the expression quantity increased slightly as the temperature increased, reaching a maximum of 2.90 and 3.19, respectively, at  $30^{\circ}\text{C}$ . Overall, the expression quantity of the three genes increased with increasing temperatures, and this trend was obvious, reaching a maximum at  $30^{\circ}\text{C}$ . Comparisons of different tissues showed diverse expression quantities of the three genes. Expression of the genes was prominent in the coelomic fluids, at  $>2.5$ , above  $24^{\circ}\text{C}$ , while the expression quantity of the three genes in muscle tissue was  $<2$  in the whole spectrum of high temperatures. Under the stress conditions of  $30^{\circ}\text{C}$ , the gene-expression quantity of the three genes was detected at 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h and 15 h, and the expression quantity of every gene at 0 h was used as benchmark-1. The data showed that the expression quantities of the three genes were characterized by increasing expression with the extension of stress time during 0 to 9 h ( $P<0.05$ ), except expression of HDAC3 in intestine stabilized at about 6 h. The expression quantity was either not obviously or only slightly lower after 9 h. In addition, the trend in expression quantity was consistent in the different tissues, yet the maximum expression quantity of every gene was highest in the coelomic fluids than in any of the other tissues. This expression analysis of epigenetic-related genes under high temperatures lays a foundation for interpreting the mechanism of response to high-temperature stress in sea cucumber from the viewpoint of epigenetic regulation.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; high-temperature stress; MLL5; DNMT1; HDAC3; epigenetic

**Corresponding author:** SUN Guohua. E-mail: sgh\_smile@163.com