

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17258

高温胁迫下刺参肠道细胞应激颗粒标记蛋白 TIA-1 的表达特征

王莎莎¹, 王天明², 秦英惠³, 陈慕雁¹

1. 中国海洋大学 水产学院, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;
2. 浙江海洋大学 海洋科学与技术学院, 海洋生物种质资源发掘利用国家地方联合工程实验室, 浙江 舟山 316000;
3. 中国海洋大学 水产学院, 水产病害与免疫学研究室, 山东 青岛 266003

摘要: 产生应激颗粒是生物体遭受不利环境时细胞产生的一种自我保护机制, 基于此, 本研究开展了高温胁迫下刺参(*Apostichopus japonicus*)肠道细胞中应激颗粒(Stress granule)标记蛋白基因 *TIA-1* 表达特征的研究。采用 RACE 技术克隆了刺参 T 细胞胞内抗原-1 基因(*TIA-1*)全长 cDNA 序列。该基因 cDNA 全长为 3108 bp, 包括 16 bp 的 5' UTR, 1284 bp 的开放阅读框(ORF), 1808 bp 的 3'UTR, 编码 427 个氨基酸。结构分析表明, 刺参 *TIA-1* 基因编码 3 个 N 末端 RNA 识别基序(RRM)和 2 个类似蛋白聚集区的 C 末端区域(low complexity)。系统进化树分析表明, 刺参 *TIA-1* 与软体动物门鸭嘴海豆芽(*Lingula anatina*)TIAR 聚为一支, 具有最近的亲缘关系。使用 Western blotting 技术检测目的蛋白 *TIA-1* 在全细胞和亚细胞成分中的表达差异, 并且利用细胞免疫荧光技术检测细胞在高温胁迫下 *TIA-1* 的定位情况。研究结果表明, 刺参肠道细胞 *TIA-1* 在高温胁迫下在细胞质中表达量显著上升($P<0.05$), 且高温胁迫下 *TIA-1* 定位表达发生变化, 多分布在细胞核周围, 由此推断 *TIA-1* 在刺参高温应激时可能参与了应激颗粒的生成, 从而对刺参肠道细胞起到了保护作用。

关键词: 刺参; 肠道细胞; *TIA-1*; 应激颗粒; 高温胁迫

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2018)03-0494-09

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)又名刺参, 属于棘皮动物门 (Echinodermata), 海参纲(Holothuroidea), 楯手目(Aspidochirotida), 刺参科(Stichopodidae), 仿刺参属, 具有较高的营养价值和经济价值, 是中国北方海域重要的水产养殖品种之一^[1-4]。刺参是典型的温带物种, 作为无脊椎动物最高等类群棘皮动物门的代表物种, 对多变的海洋环境(温度, pH 值, 盐度等胁迫因子)具有高度的敏感性, 其中温度是影响刺参生长、摄食、繁殖及行为的最重要生态因子之一^[5-8]。夏季水温的急剧升高常常诱发刺参出现吐脏、化皮等应激反应。当水温超过耐热上限时, 最终会导致刺参出现热致死现象^[9-11], 近年来刺参因夏季高温导致的大面积死亡逐渐呈现常态化趋势, 不仅造成

了巨大的经济损失, 同时使刺参资源严重衰退, 制约了刺参产业的良性发展, 因而刺参高温逆境响应机制的研究亟待开展。

真核生物在响应逆境时体内会做出一系列生物应答反应, 如暂停蛋白质翻译系统, 从而使细胞能更好地适应环境压力。应激颗粒是细胞质内产生的蛋白-mRNA 复合体, 应激颗粒的形成是真核生物应对环境胁迫(如热休克、氧化应激、病毒感染等)时体内产生的一种重要的转录后细胞保护机制。该复合体的产生将胞质内 mRNA 转录本募集并包裹起来, 从而影响其翻译表达, 导致基因沉默。当环境胁迫因子解除时, 该 mRNA 即可释放并恢复翻译活性^[12-13], 参与一系列的生物学过程。*TIA-1* (T-cell-restricted intracellular antigen 1)

收稿日期: 2017-07-07; 修订日期: 2017-09-04.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31472257).

作者简介: 王莎莎(1991-), 女, 硕士研究生, 从事海洋无脊椎动物分子生物学研究. E-mail: wangshashaabcd@163.com

通信作者: 陈慕雁(1979-), 教授. E-mail: chenmuyan@ouc.edu.cn

作为应激颗粒形成的标志性蛋白, 是一类与 mRNA 稳定相关的 mRNA 结合蛋白, 属于连续激活的翻译沉默因子, 该蛋白一旦和 mRNA 连接, 翻译即被抑制并促进应激颗粒的形成, 对基因的转录后表达进行调控^[14-15]。关于刺参高温抗逆内在分子机制的研究目前主要集中在可逆磷酸化的修饰和热休克蛋白家族的调控机制方面, 而应激颗粒作为一种重要的动物抗逆转录后调控机制, 在海洋无脊椎动物的抗逆生理分子机制的研究中还未见有报道。

本研究以刺参肠道细胞为实验材料, 从应激颗粒重要标记蛋白 TIA-1 入手, 利用 RACE 技术首次克隆获得刺参 *TIA-1* 基因全长 cDNA 序列, 并进行了同源比对和系统进化树分析; 利用 Western blotting 技术测定了刺参肠道细胞 TIA-1 在高温胁迫下全细胞和亚细胞的表达变化模式, 通过细胞免疫荧光技术进一步确定了核心蛋白 TIA-1 的亚细胞定位。以期从应激颗粒的角度来探讨刺参高温抗逆分子应答机制, 实现刺参抗逆生理分子调控机制的新发现, 为刺参耐温品种与品系选育, 适宜生境选取和放流预警预报体系的构建提供理论指导和数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物和暂养条件

刺参成体, 购自青岛市南山市场, 体重(100±8) g, 低温运送至实验室, 并在实验室钢化水槽中(体积约 1 m³)暂养驯化, 在暂养驯化过程中, 水温控制到(15±1)℃, 盐度为 28~30, pH 为 8.0±0.3, 每天上午按时换水并清理粪便及残饵, 定量投喂人工配合饲料(海泥和鼠尾藻按比例混合而成), 以确保刺参尽快适应环境。

1.2 刺参肠道细胞的原代培养 将健康的刺参于 75%乙醇中浸泡 5 min, 在超净工作台中解剖获得肠道组织, 用抗生素溶液漂洗数次。机械分离获得体积 1 mm³ 大小的组织块, 将所有的组织小块移入预先加入 0.125%胶原酶消化液的 15 mL 离心管中, 于 23℃恒温水浴锅中消化 2~3 h, 300 g 离心 2 min, 去除未消化的组织块, 200 目滤网过滤收集消化液, 900 g 离心 10 min, 弃上清, 加入 5 mL

添加抗生素的过滤海水重悬, 900 g 再次离心 10 min, 随后加入 L15 改良型培养基制成细胞悬液。吸取 20 μL 细胞悬液和 20 μL 0.4%的台盼蓝溶液(过滤海水稀释), 吹打混匀后滴入血球计数板, 低倍显微镜下观察计数, 若细胞存活率大于 80%, 进行下一步实验。将细胞起始密度稀释至 10⁶/mL, 于 15℃简易培养箱中恒温静置稳定 0.5 h 后, 继续培养 4 h 作为对照组, 于 25℃金属浴中高温胁迫 4 h 作为实验组。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 全长克隆

采用 RNeasy mini kit 试剂盒(74104, Qiagen, Germany)提取刺参肠道细胞 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性, NanoDrop 1000 分光光度计(Thermo Scientific)检测总 RNA 样品浓度。根据刺参转录组中的 *TIA-1* 基因片段序列设计特异性引物如下, TIA-1F: 5'-TCCTTTACTTGTTCAGCCAGAT-3', TIA-1R: 5'-ACTGGGCTTCTCGCAAGC-3', 利用 SMART RACE cDNA 末端扩增试剂盒(634858, Clontech, USA)进行 *TIA-1* 基因 cDNA 全长克隆, 具体按照试剂盒说明书进行操作。利用 1%琼脂糖电泳分析检测结果, 割胶后利用 OMEGA 胶回收试剂盒(D250002, Omega, USA)进行目的片段的回收, 将纯化的基因产物连接至载体 pMD19-T 质粒上, 经冰水浴、热激等处理将连接产物转化至感受态细胞中(D9052, Takara, Japan), 复苏 1 h 后涂在预先制备好的含氨苄青霉素的 LB 平板上过夜培养。挑取阳性克隆于 SOC 液体培养基中培养 10 h。以菌液为模板进行 PCR 检测并送至 Sangon 公司测序。

1.4 序列分析

利用 DNASTar 软件进行序列拼接得到 *TIA-1* 基因 cDNA 全长序列, 并预测目的基因开放阅读框(open reading frame, ORF)。利用 <http://www.bio-software.net/sms/index.html> 在线软件将 cDNA 的开放阅读框翻译成氨基酸序列并进行同源比对分析。利用 http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool 在线软件预测对应蛋白质的等电点 PI 和相对分子量。利用 SMART version 4.0 (<http://www.smart.embl-heidelberg.de/>)预测推断氨基酸序列的功能结构域, 并用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel>.)

expasy.org/)预测蛋白质三级结构。利用 Clustal W 程序和 MEGA 6.0 程序进行基因的多序列比对和系统进化树构建。

1.5 Western blotting 测定 TIA-1 蛋白表达水平

收集对照组和实验组细胞, 分别利用 IP 细胞裂解液(P0013, Beyotime, Beijing)提取全细胞蛋白和 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents 试剂盒(78833, Thermo, USA)提取亚细胞蛋白。用 BCA 试剂盒(P0010S, Beyotime, Beijing)测定蛋白浓度, 取样品蛋白质 25~30 μg (全细胞蛋白为 25 μg , 亚细胞蛋白为 28 μg)经过 SDS PAGE 凝胶电泳分离蛋白质。湿转法将蛋白条带从 SDS PAGE 凝胶转至 PVDF 膜上, 5%的脱脂奶粉/TBST 室温封闭 4 h 后依次加入一抗, Rabbit anti-TIA-1 体积比为 1 : 500 (sc-28237, Santa Cruz, USA), β -Tubulin 体积比为 1 : 1000 (2146S, CST, USA), 4℃孵育过夜, HRP 标记的二抗室温孵育 1 h (体积比分别为 1 : 8000 和 1 : 10000, 7074S, CST, USA), 增强化学荧光(enhanced chemiluminescence, ECL)显影, 利用 Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, USA)软件分析条带灰度值。

1.6 免疫荧光检测 TIA-1 亚细胞定位

细胞接种在含有预先铺好盖玻片的 6 孔板内, 每孔接种 2×10^6 个细胞, 将 25℃ 高温胁迫 4 h 的细胞作为实验组, 将 15℃ 正常培养的细胞作为对照组。处理完毕后, 吸去培养液, 每孔加入 300 μL 4%多聚甲醛(过滤海水稀释), 室温固定 20 min 后用 0.1% TritonX-100 对细胞透化处理 15 min, 过滤海水洗 3 次, 每次 5 min, 然后用含 4% BSA 的 PBS 室温封闭细胞 1 h, 用 1 : 300 稀释的 TIA-1 兔一抗(sc-28237, Santa Cruz, USA) 4℃湿盒孵育 12 h, 过滤海水洗 3 次, 每次 5 min, 用 1 : 500 稀释的 Alexa Fluor 488 标记的二抗(126601, Jackson, USA)避光孵育 1 h, 过滤海水洗 3 次, 每次 5 min, 最后用含 1 : 500 稀释 DAPI 的 50%甘油封片, 荧光显微镜下观察并拍片。

1.7 数据分析

应用 SPSS19.0 统计处理软件进行统计分析, 结果以平均值 $\pm$ 标准误($n=3$; $\bar{x} \pm \text{SE}$)表示, 采用 Student's T test 分析, $P < 0.05$ 时认为差异显著, $P <$

0.01 时认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 刺参 TIA-1 基因结构分析

刺参 TIA-1 基因 cDNA 全长为 3108 bp, 其中包含 16 bp 的 5'UTR 区域和 1808 bp 的 3'UTR 区域。该基因开放阅读框(ORF)长度为 1284 bp, 编码了 427 个氨基酸, 蛋白质分子量为 48.07 kD, 理论等电点为 6.19(图 1) (GenBank 序列号: KY93-7959)。利用 SMART version 4.0 预测推断刺参 TIA-1 蛋白的功能结构域(图 1 和表 1), 编码 3 个 N 末端 RNA 识别原件(RRM), 2 个类似蛋白聚集区的 C 末端区域(low complexity)。RRM 结构域为高度保守的 RNA 识别基序, C 末端低复杂性区段(low complexity)功能域氨基酸 Q 含量极高, 分别占到了 80%和 40%, 由此推断和哺乳动物肌蛋白聚合区相似, 自寡聚体化抑制翻译。蛋白质三级结构预测如图 2 所示。

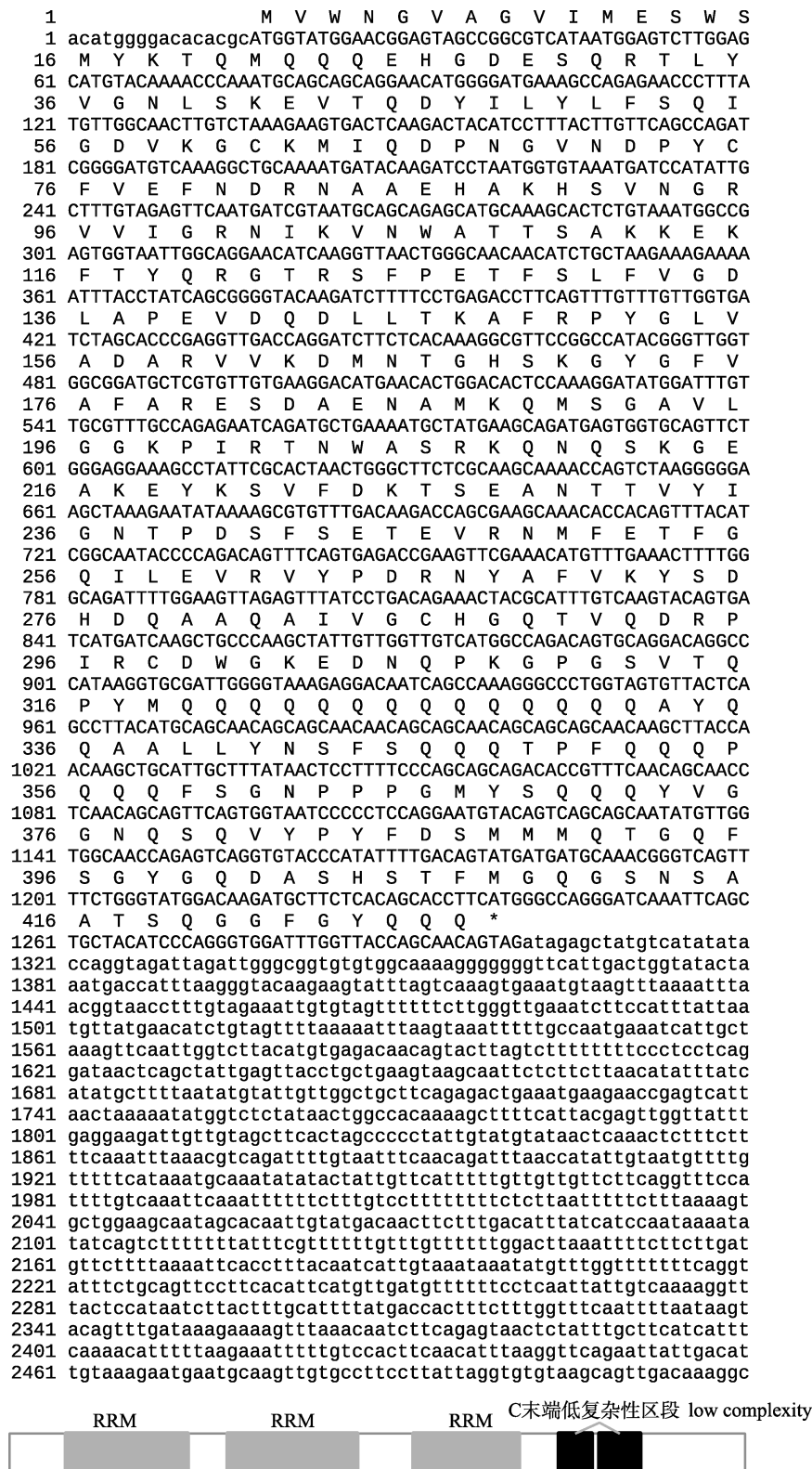
2.2 刺参 TIA-1 序列同源性与系统进化树分析

序列同源性分析表明, 刺参 TIA-1 序列与脊椎动物的 TIA-1 同源, 其中与多疣壁虎(*Gekko japonicus*)(XP_015276625.1)、大西洋鲱(*Clupea harengus*)(XP_012671393.1)、蟾蜍(*Xenopus laevis*)(XP_018106559.1)、人类(*Homo sapiens*) (NP_07-1505.2)、密西西比短吻鳄(*Alligator mississippiensis*) (XP_006272065.1)的同源性分别为: 49%、45%、49%、48%、48%(图 3)。

以刺参 TIA-1 和从 NCBI 上获得的其他物种的 TIA-1 和 TIAR 序列为基础, 利用 NJ (neighbor-joining)方法构建系统进化树(图 4)。结果表明: 刺参 TIA-1 与软体动物门鸭嘴海豆芽(*Lingula anatina*) TIAR 同源关系最为接近, 并与罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) TIA-1 和青鳉(*Oryzias latipes*) TIA-1 聚在一起, 同源关系较近。

2.3 全细胞和亚细胞 TIA-1 蛋白表达水平的检测

为了检测高温胁迫下刺参肠道细胞中应激颗粒的标志蛋白 TIA-1 的表达水平, 分别提取对照组和实验组全细胞和亚细胞的蛋白, 应用 Western blot 技术对其蛋白水平进行检测。结果表明, 相比于对照组, 全细胞 TIA-1 实验组表达量增加

图 1 刺参 *TIA-1* 基因结构序列及其编码的氨基酸序列

编码区用大写字母表示, 3'和 5'非编码区用小写字母表示; 星号代表终止密码子, 底部为刺参 *TIA-1* 功能结构域示意图。

Fig. 1 Nucleotide sequence of sea cucumber *TIA-1* cDNA and deduced amino acid sequences. ORF are indicated in uppercases, and 3'UTR and 5'UTR are shown in lowercases. The asterisk indicates the translational termination codon. At the bottom of the page is a schematic diagram of domains and characteristic motifs of the protein.

表 1 刺参 TIA-1 功能结构域位置
Tab. 1 Location of conserved amino acid domains in TIA-1

名称 name	起始位点 start	终止位点 end
RRM	33	105
RRM	130	203
RRM	232	299
low complexity	319	338
low complexity	343	365

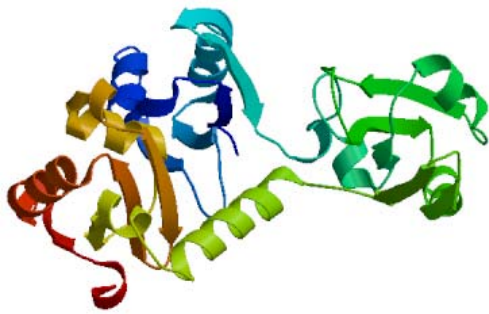


图 2 TIA-1 蛋白的三级结构预测

Fig. 2 The prediction of protein tertiary structure of TIA-1

1.16 倍 (图 5A)。胞浆蛋白 TIA-1 实验组(86.70%)相对于对照组(43.78%)显著增加了 42.92%，胞核蛋白 TIA-1 实验组(13.29%)相对于对照组(56.22%)

表达量显著降低了 42.93% ($P<0.05$, 图 5B)。

2.4 细胞免疫荧光检测应激颗粒的形成

为了进一步检测高温胁迫下 TIA-1 蛋白在亚细胞结构中的定位情况, 我们应用细胞免疫荧光技术进行分析。结果显示, 相对于对照组, 实验组 TIA-1 荧光标记大多集中围绕细胞核, 分布在细胞质中(图 6-B), 由此推断 TIA-1 有可能参与了细胞应激颗粒的形成。

3 讨论

产生应激颗粒是生物体受到外界环境压力时, 体内细胞产生的转录后调控的关键机制之一。研究发现在环境胁迫下例如病毒侵染, 应激颗粒的形成会包裹未翻译的 mRNA, 减少非必需蛋白的合成, 同时阻止蛋白的翻译, 保护宿主细胞免受侵害^[16]。热应激是细胞应激反应的一种, 关于热胁迫下无脊椎动物中应激颗粒保护机制的研究在锥体虫(*Trypanosoma brucei*)和轮虫(*Brachionus manjavacas*)中有过相关报道。Kramer 等^[17]研究发现热应激会使锥体虫细胞内形成不依赖于 eIF2 α

AJ_TIA-1	MVWNGVAGVIMESWSMYKTQMQQQEHGDESQRTLLVYGNLSKEVTDYILYLFSSQIGDVKGGCKMIQDPNGVNDPFCFVEFNDNRNAAEHAKH	90
AM_TIA-1	-----MDMKTYVGN-SRDVT-----ASGCKNCKMMDTAG--NDYCVYHRRHAASAAAMNGR	47
CH_TIA-1	-----MMGDKTYVGN-SRDVT-----MVAGCKSCKMADSAG--NDYCVYHNNHAAASAMNGR	50
GJ_TIA-1	-----MDMKTYVGN-SRDVT-----ASGCKNCKMMDTAG--NDYCVYHRRHAASAAAMNGR	47
HS_TIA-1	-----MDMKTYVGN-SRDVT-----ASGCKNCKMMDTAG--NDYCVYHRRHAASAAAMNGR	47
XL_TIA-1	-----MRTYVGN-SRDVT-----VSGCKSCKMMDTAG--NDYCV-HRHAASAA-NGR	43
AJ_TIA-1	SVNGRVVIGRNISKVNWATTSAKKEKFTYQGRTRSFPEFSLFVGDLAPVDDDLLTKAFRPYGLVADARVVKDMNTGHSKGYGFVAFARE	180
AM_TIA-1	KM-----GKVKVNWATTSKKD-----TSSSTVVNTRSDHHVVGSTT--DKAAAGRSDARVVKDMATGHSKGYG--VSNK	114
CH_TIA-1	K-----GKMKVNWASMSKKD-----TSN-----HHVVGSTTDDVRAAGKSDARVVKD-ATGHSKGYG--VSNK	108
GJ_TIA-1	KM-----GKVKVNWATTSKKD-----TSN-----HHVVGSTT--DKAAAGRSDARVVKDMATGHSKGYG--VSNK	105
HS_TIA-1	KM-----GKVKVNWATTSKKD-----TSSSTVVSTRSDHHVVGSTT--DKAAAGRSDARVVKDMATGHSKGYG--VSNK	114
XL_TIA-1	KM-----GKVKVNWATTSKKD-----ANSSSVSTRSDHHVVGSTTDD-KAAAGRSDARVVKDMTGTGHSKGYG--VSNK	111
AJ_TIA-1	SDAENAMKQMSGAVLGGKPIRTNWA SRKQNSKGEAKKEYKSVFDKTSEANTTVYIGNTPDSEFSETEVRNMFETFGQILEVRVVPDNYAF	270
AM_TIA-1	WDAN-AMGGWGGGR-----RTNWA TRKAKSTYSNTRSYDDVVNSS--NCTVYCGGVTSG-----TMRITSGMR-VDKGYSVRN--	182
CH_TIA-1	WDAN-AMGGWGGGR-----RTNWA TRKAKATSTNAKHSDDVNSS--NCTVYCGGVTSG-----HVMRTSGHMRVRKGYR-S--	177
GJ_TIA-1	WDAN-AMGGWGGGR-----RTNWA TRKAKNTYSNTRSYDDVVNSS--NCTVYCGGVTSG-----TMRITSGMR-VDKGYSVRN--	173
HS_TIA-1	WDAN-AMGGWGGGR-----RTNWA TRKAKSTYSNTRSYD-VVNSS--NCTVYCGGVTSG-----TMRITSGMR-VDKGYSVRN--	181
XL_TIA-1	WDANAAMGGWGGGR-----RTNWA TRKAKSTYSNAITYV--VNSS--NCTVYCGGVTSG-----TMRITSGMVRVDKGYSVR-S--	179
AJ_TIA-1	VKYSDDHDQAQAIVGCHGQTVDQRPILRCDWGKEDNQPKGPGSVTPPYMQQQQQQQQQQQQYQQAALLYNSFSQQQTFFQQQPQQQFS	360
AM_TIA-1	-----SHSAHAHVSVNG--TTGHHVVKCYWGKTD-----MSNGY-----	213
CH_TIA-1	-----TH-AAHAHVSVNGS-SVGHITVKCYWGKTDMS-----MNKVGYT-----	214
GJ_TIA-1	-----SHSAHAHVSVNG--TTGHHVVKCYWGKTD-----MNVNG-----	204
HS_TIA-1	-----SHSAHAHVSVNG--TTGHHVVKCYWGKTD-----MNVNG-----	212
XL_TIA-1	-----SHSAHAHVSVNG--TTGHHVVKCYWGKTD-----MNVVSS-----	211
AJ_TIA-1	GNPPPGLMYSSQQQYVGGNQSQVYPYFDSMMMQTGOISCYGQDASHSTFMGQGSNSAATSQGGFGYQQQ--	427
AM_TIA-1	-AYGWGWYGNASYMNG-----WVAYGMYG-TVNGN--TSSAAWMGASYGVGNGSVTNTGYRMAGT-48%	269
CH_TIA-1	-AYGWGWYGNSTGYVNG-----WVSYGYYGAAVNGYK-----45%	244
GJ_TIA-1	-Y YGWGWYGNAGYMNNG-----WVAYGMYG-AVNGN--TSSAAWMGASYGVGNGSVTSTGYRMAGT-49%	260
HS_TIA-1	-Y YGWGWYGNAGYMNNG-----WVAYGMYG-AVNGN--TSS-AWMGN-YGVGNGSMN-SGYRVAGYT48%	266
XL_TIA-1	-SYGWGWYGGASVYVNG-----WMAVGYG-AVNGYST-SAAATWVGN-YGVGNGTTN-TGYRMAGYT49%	268

图 3 刺参与其他物种 TIA-1 序列的同源性比对

黑色代表具有相同的氨基酸, 灰色代表具有相近的氨基酸。AJ: 刺参; GJ: 多疣壁虎;
CH: 大西洋鲱; XL: 蟾蜍; HS: 智人; AM: 密西西比短吻鳄。

Fig. 3 Comparison of the amino acid sequence of sea cucumber TIA-1 with TIA-1s from other species
Identical and similar amino acid residues in all the proteins are indicated by black and grey highlights. Gaps are marked by hyphens. Percent identity of amino acid sequence to sea cucumber TIA-1 is shown at the end. AJ: *Apostichopus japonicus*;
GJ: *Gekko japonicus*; CH: *Clupea harengus*; XL: *Xenopus laevis*; HS: *Homo sapiens*; AM: *Alligator mississippiensis*.

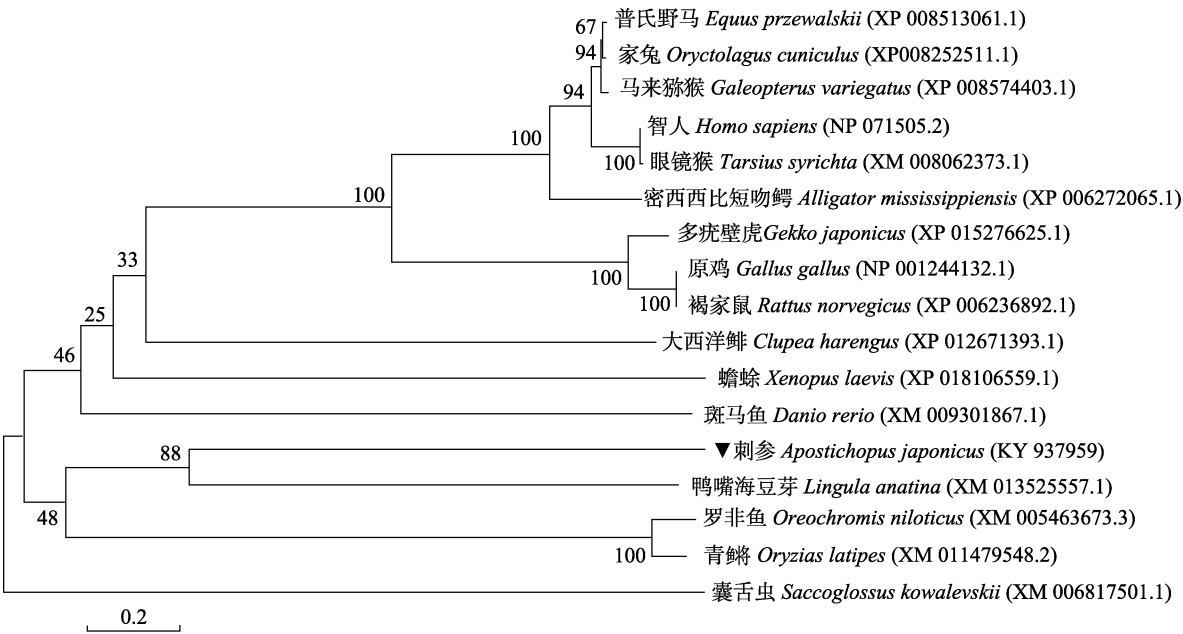


图 4 不同物种的 TIA-1 和 TIAR 系统进化树

系统发育树拓扑结构的可信度采用 1000 次重抽样来检测, 树形图分支上的数字代表其置信值。

▼表示刺参 TIA-1 氨基酸序列; 括号中为基因登录号。

Fig. 4 Consensus neighbor-joining tree based on the sequences of TIA-1 and TIAR from different species

The tree topology was evaluated by 1000 bootstrap replications and numbers on each branch of the tree represent the bootstrap support value. The mark ▼ means amino acid sequence of TIA-1 in *A. japonicus*. GenBank accession numbers are in brackets.

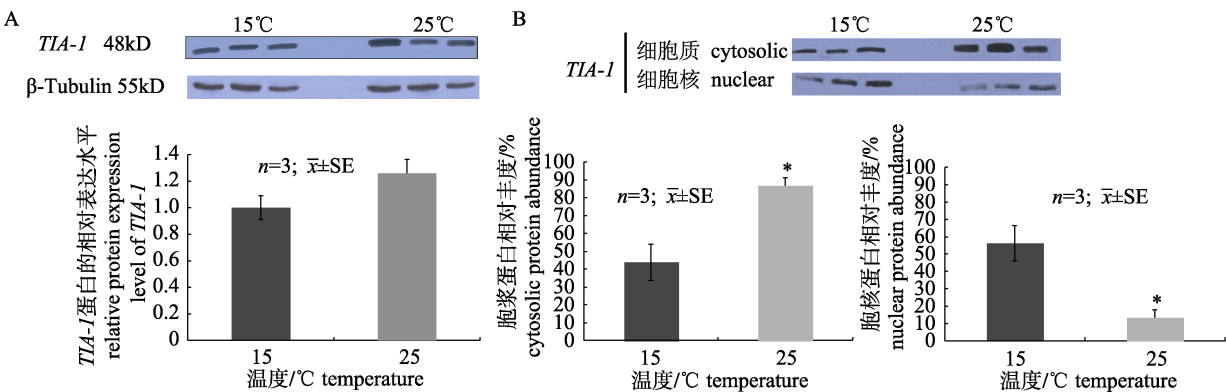


图 5 刺参肠道细胞 TIA-1 在不同温度处理下的蛋白表达差异性分析

A 为全细胞水平; B 为亚细胞水平。*表示实验组和对照组之间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 Relative protein expression levels of TIA-1 in intestinal cells of sea cucumber at different temperatures

A: whole cell, B: subcellular. “*” indicates significant differences from the corresponding control values ($P<0.05$).

磷酸化的应激颗粒, 在生命过程中发挥了重要的作用。Jones 等^[18]设置了不同的温度梯度对轮虫幼体进行不同时间的处理, 结果表明 eIF3B、eIF4E 和 TIA-1 蛋白在高温胁迫下可共同定位于 SG 中, 当温度恢复后, SG 也会随之消失。这些结果进一步支持了这种保护机制在真核生物进化早期就存在的观点, 也为我们研究的假设提供了可能性。

近几年对应激颗粒核心蛋白的分子调控研究日渐增多, 然而在海洋无脊椎动物中仍未见到报道。本研究重点关注高温胁迫下海洋无脊椎动物刺参肠道细胞中应激颗粒标志蛋白 TIA-1 的表达变化模式, 以期应激颗粒在海洋无脊椎动物高温耐受机制中的作用提供理论支持。

TIA-1 是应激颗粒组分中重要的核穿梭蛋白,

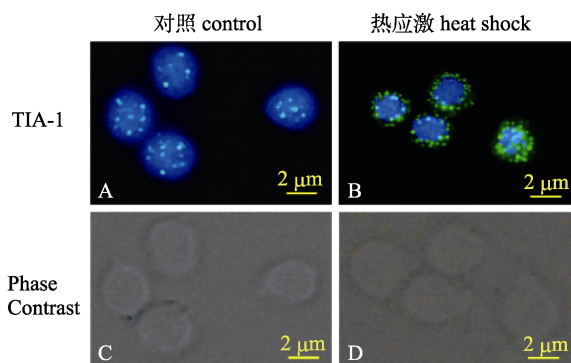


图 6 刺参肠道细胞 TIA-1 蛋白在不同温度处理下的亚细胞定位分析

A, B: TIA-1 为绿色荧光视野; C, D: Phase 为正常光视野, 放大倍数为 100 倍。

Fig. 6 Subcellular distribution of TIA-1 in cytoplasmic and nuclear fractions in intestinal cells of sea cucumber in response to heat shock comparing with the control

A and B: TIA-1 is green fluorescence field; C and D: the phase is normal light field, and the magnification multiple is 100 times.

应激情况下通过出核转运参与 SG 形成^[19]。本研究中我们利用胶原酶消化法获取刺参肠道细胞, 通过探究应激颗粒标记蛋白 TIA-1 的基因结构特征, 以及在 25℃ 高温胁迫下 TIA-1 的蛋白表达和定位情况, 揭示刺参在高温胁迫下可能存在的应激颗粒保护机制。本研究率先克隆得到刺参 *TIA-1* 基因 cDNA 全长序列, 结构分析表明刺参 *TIA-1* 含有 3 个 N 末端 RNA 识别基序(RRM)和 2 个 C 末端区域(Low complexity), 其结构域特征暗示刺参 TIA-1 具有在胁迫下可以自我聚集、直接结合目的 RNA 形成应激颗粒的潜能。序列同源性及系统进化分析表明, 刺参 TIA-1 序列与脊椎动物的 TIA-1 同源, 且与海洋无脊椎动物软体动物门鸭嘴海豆芽(*Lingula anatina*) TIAR 同源关系最为接近, 聚为一支。基于此, 我们进一步开展了刺参 TIA-1 在高温胁迫下的全细胞和亚细胞蛋白表达水平的变化及其定位情况, 研究结果表明刺参肠道细胞 TIA-1 在高温胁迫下表达量呈现升高趋势, 并且在细胞质中表达量显著上升, 且高温胁迫下 TIA-1 的表达定位发生变化, 多分布在细胞核周围的胞质中, 这说明刺参肠道细胞 TIA-1 基因在高温胁迫下的确发生了亚细胞位移。我们由此推断 TIA-1 在刺参高温应激时可能参与了应激颗粒的生成, 从而对刺参肠道细胞起到了保护作

用。此外, 我们观察到高温胁迫下刺参肠道细胞体积会变小, 这可能与刺参肠道细胞在热刺激下细胞内部结构发生明显的变化有关, 例如内质网应激-自噬反应。热胁迫下, 刺参肠道细胞为了维持稳态, 会不断降解功能失常或不需要的细胞结构, 如各种蛋白质、细胞器以及各种胞质组分。自噬过程中形成的自噬体会包裹这些细胞器将其运出体外。由此说明刺参肠道细胞在高温胁迫下细胞内会产生多种保护机制, 这方面的研究将是后续需要解决的问题。

除了短期应激外, 已有研究在休眠动物如冬眠的十三地松鼠(*Ictidomys tridecemlineatus*)中同样发现了应激颗粒核心蛋白的调控作用。Tssier 等^[20]在地松鼠肝脏中发现应激颗粒的核心蛋白 TIA-1、TIAR 和 PABP 在冬眠过程中蛋白表达水平显著变化, 并且 TIA-1 和 TIAR 蛋白在冬眠过程中发生了明显的亚细胞位移。这也暗示了应激颗粒在动物休眠过程中潜在的作用, 因而本研究也将为今后研究应激颗粒在高温诱导刺参夏眠的细胞保护机制中的作用提供了基础和可能。

参考文献:

- [1] Fei Y T, Li Q F, Zhang Y, et al. Environmental factors causing skin ulcer syndrome occurrence in pond-cultured *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(3): 682-692. [费聿涛, 李秋芬, 张艳, 等. 池塘养殖刺参腐皮综合征发病环境因素分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(3): 682-692.]
- [2] Chang Y Q, Sui X L, Li J. The current situation, problem and prospect on the *Apostichopus japonicus* aquaculture[J]. Fisheries Science, 2006, 25(4): 198-201. [常亚青, 隋锡林, 李俊. 刺参增养殖业现状, 存在问题与展望[J]. 水产科学, 2006, 25(4): 198-201.]
- [3] Liao Y L. Fauna Sinica, Phylum Echinodermata, Class Holothuroidea[M]. Beijing: Science Press, 1997: 334-335. [廖玉麟. 中国动物志, 棘皮动物门, 海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 334-335.]
- [4] Yang J, Wang Y, Jiang T, et al. Depolymerized glycosaminoglycan and its anticoagulant activities from sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 699-705.
- [5] An Z, Dong Y, Dong S. Temperature effects on growth-ratation relationships of juvenile sea cucumber *Apostichopus*

- japonicus* (Selenka)[J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1): 644-648.
- [6] Zhao Y J, Zhang H. Ingestion and absorption of organic deposition by *Apostichopus japonicus* at various water temperatures[J]. *Fisheries Science*, 2004, 23(7): 1-4. [赵永军, 张慧. 不同温度下刺参对有机沉积物的摄食与吸收[J]. *水产科学*, 2004, 23(7): 1-4.]
- [7] Tanaka Y. Seasonal changes occurring in the gonad of *Stichopus japonicus*[J]. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 1958, 9(1): 29-36.
- [8] Chen Y, Gao F, Liu G S, et al. The effects of temperature, salinity and light cycle on the growth and behavior of *Apostichopus japonicus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(5): 687-691. [陈勇, 高峰, 刘国山, 等. 温度、盐度和光照周期对刺参生长及行为的影响[J]. *水产学报*, 2007, 31(5): 687-691.]
- [9] Yu D X, Song B X. Variation of survival rates and growth characteristics of pond cultural juvenile *Apostichopus japonicus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, 6(3): 109-110. [于东祥, 宋本祥. 池塘养殖刺参幼参的成活率变化和生长特点[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(3): 109-110.]
- [10] Yu M Z, Chang Y Q. The effects of low temperature on some physiological phenomena in different populations of sea cucumber *Apostichopus japonicus* juvenile[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(1): 31-36. [于明志, 常亚青. 低温对不同群体仿刺参幼参某些生理现象的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2008, 23(1): 31-36.]
- [11] Viña J. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution[J]. *Biochemistry & Molecular Biology Education*, 2002, 30(3): 215-216.
- [12] Bond U. Stressed out! Effects of environmental stress on mRNA metabolism[J]. *Fems Yeast Research*, 2006, 6(2): 160-170.
- [13] Kedersha N, Anderson P. Mammalian stress granules and processing bodies[J]. *Methods in Enzymology*, 2007, 431: 61-81.
- [14] Anderson P, Kedersha N. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2002, 7(2): 213-221.
- [15] Waris S, Wilce M C J, Wilce J A. RNA recognition and stress granule formation by TIA proteins[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(12): 23377-23388.
- [16] Wu S, Zhong Z H. Virus infection and stress granules[J]. *Chinese Journal of Viral Disease*, 2012, 2(6): 460-464. [吴硕, 钟照华. 病毒感染与细胞应激颗粒[J]. *中国病毒病杂志*, 2012, 2(6): 460-464.]
- [17] Kramer S, Queiroz R, Ellis L, et al. Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2 α phosphorylation at Thr169[J]. *Journal of Cell Biology*, 2008, 121(18): 3002-3014.
- [18] Jones B L, VanLoozen J, Kim M H, et al. Stress granules form in *Brachionus manjavacas* (Rotifera) in response to a variety of stressors[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 166(2): 375-384.
- [19] Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, et al. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15(12): 5383-5398.
- [20] Tessier S N, Audas T E, Wu C W, et al. The involvement of mRNA processing factors TIA-1, TIAR, and PABP-1 during mammalian hibernation[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2014, 19(6): 813-825.

Expression character analysis of the stress granule marker TIA-1 in the intestinal cells of sea cucumber in response to heat stress

WANG Shasha¹, WANG Tianming², QIN Yinghui³, CHEN Muyan¹

1. The Key Laboratory of Mariculture (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China;

2. National and Local Engineering Laboratory of the Exploitation and Utilization of Marine Biological Germplasm Resources, Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China;

3. Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: In response to environmental stresses, such as heat shock, oxidative stress, and viral infection, arrest of translation initiation reduces energy-expensive cellular processes and conserves the energy required for the repair of cellular damage. Untranslated mRNAs that accumulate in these cells move to discrete cytoplasmic foci known as stress granules (SGs). SGs are characterized by the presence of translational initiation factors such as eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF4B, eIF3, eIF2, poly(A)-binding protein, and stalled 40S ribosomal units. The best-known proteins integral to SG formation are T-cell intracellular antigen (TIA) proteins, which are considered robust markers of SGs. The assembly of SGs, one of the most important post-transcriptional mechanisms, helps cells to survive under adverse environmental conditions. Currently, there is no information on the cell-protective roles of SGs in marine invertebrates under environmental stress. In the present study, we hypothesized that TIA-1, an mRNA-binding protein that can aggregate within granules, may play a significant role in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* in response to heat stress. We characterized the amino sequence of *A. japonicus* TIA-1. The full-length cDNA of TIA-1 is 3108 bp, comprising a 5'-untranslated region (UTR) of 16 bp, 3'-UTR of 1808 bp, and open reading frame (ORF) of 1284 bp. The ORF encodes 427 amino acids, with a calculated molecular mass of 48.07 kD and 6.19 theoretical isoelectric point. Structural analysis showed that *A. japonicus* TIA-1 has three N-terminal RNA-recognition motifs and two C-terminal low-complexity regions, which are related to prion proteins and have the capacity to form reversible aggregates. Phylogenetic analyses revealed that *A. japonicus* TIA-1 is closely related to *Lingula anatina* TIAR. Moreover, we detected whole-cell and subcellular protein expression levels of TIA-1 by using western blotting. The localization of TIA-1 to subnuclear structures was assessed using immunofluorescence analysis. The results showed that the expression level of TIA-1 in cytoplasmic fractions under heat stress (25°C) was significantly increased when compared with the control group (15°C). The fluorescence signals of TIA-1 were observed to be translocated from the nucleus to the cytoplasm in response to heat stress, which suggests that TIA-1 may be involved in the formation of SGs to protect the stressed intestinal cells of *A. japonicus* under high temperature conditions. We identified a potential novel cytoprotective mechanism in response to heat stress in *A. japonicus* from the viewpoint of post-transcriptional regulation, which may play an important role in reducing the translational rates and/or mRNA processing under unfavorable environmental conditions in marine invertebrates.

Key words: *Apostichopus japonicus*; sea cucumber intestinal cell; TIA-1; stress granule; heat stress

Corresponding author: CHEN Muyan. E-mail: chenmuyan@ouc.edu.cn