

硒化物在文蛤响应镉胁迫过程中作用的转录组学分析

郑年昊¹, 孙 铭², 姚琳琳², 荆圆圆², 张天文², 胡凡光², 王兴强¹, 刘广斌²

(1. 江苏海洋大学海洋生命与水产学院, 江苏 连云港 222005; 2. 山东省海洋科学研究院, 山东 青岛 266104)

摘要: 研究两种硒化物在文蛤富集、排出镉过程中的作用, 对文蛤进行转录组测序, 并进行生物信息学分析, 以探讨硒化物对 Cd²⁺代谢相关机制。硒化卡拉胶组和亚硒酸钠组共产出 587 855 条高质量 reads。基因本体分析功能注释到 15 380 条 unigenes, KEGG 通路注释到 18 866 条 unigenes。差异基因主要富集到肌球蛋白复合物(myosin complex)、离子通道抑制(ion channel suppression)等基因本体分析功能中。差异基因 KEGG 通路富集显示, 在嘌呤代谢(purine metabolism)、ECM 受体相互作用(extracellular matrix receptor interaction)、硒化合物代谢(metabolism of selenium compounds)等通路显著富集。从结果分析 Cd²⁺可以使文蛤体内蛋白转录修饰出现异常; 有机硒可以通过调控金属离子通道活性来排出细胞内的 Cd²⁺; 无机硒主要作用于文蛤细胞表面, 增强其表面活性抵御 Cd²⁺进入细胞; 差异基因 KEGG 注释结果表明有机硒与无机硒在文蛤重金属代谢中作用机制以及途径不相同。

关键词: 文蛤; 硒化卡拉胶; 亚硒酸钠; 转录组分析; 差异基因表达

中图分类号: P735 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2024)1-0025-11

DOI: 10.11759/hyhx20210415001

镉(Cd²⁺)是海洋污染的常见重金属, 也是极易在生物体内富集的重金属之一^[1]。联合国环境规划署和国际劳动卫生委员会将其列入重点研究的环境污染物, 世界卫生组织将其作为优先研究的食物污染物^[2]。近年来, 海水贝类中镉超标较为频发, 导致贝类产品质量安全受到影响^[3]。因此, 如何加快贝类体内镉代谢、提高产品质量安全是目前产业亟待解决的问题。

硒(Se)是水生动物的必需元素之一, 具有抗氧化、维持细胞膜稳定、拮抗重金属等功能, 作为重金属解毒剂用途较为广泛^[4]。研究表明, 使用 60 mg/L 的硒化卡拉胶对氯化镉胁迫的紫贻贝(*Mytilus edulis*)进行 Cd²⁺脱除, 6 d 后脱除率为 37.9%, 12 d 后脱除率达到 43.6%^[5]。酶活实验发现, 紫贻贝在镉富集之后加入硒化卡拉胶, 内脏团和血淋巴中的总超氧化物歧化酶、酸性磷酸酶、过氧化氢酶等酶的活性均明显提升, 提高紫贻贝在镉胁迫后的生理活力^[6]。铜离子和海水酸化胁迫后的魁蚶(*Scapharca broughtonii*)的转录组分析表明, 胁迫后的功能基因多富集于 DNA 复制和错配修复, 且海水酸化能促进由铜离子胁迫产生的功能基因表达^[7]。硒化物在贝类重金属代谢过程中作用的转录组学研究未见报道。研究分析硒化物等脱除剂在贝类重金属代谢相关机制和途径, 可为有效利用硒化物提高贝类脱除重金属的效率奠定基础。

文蛤(*Meretrix meretrix*)是中国重要经济滩涂贝类, 分布广泛、口味鲜美, 受到消费者的喜爱。本实验使文蛤暴露 Cd²⁺ 72 h 后, 分别设添加亚硒酸钠组、添加硒化卡拉胶组、自然海水组进行重金属排出实验, 将经过不同处理的文蛤进行高通量测序, 分析转录组数据, 以探求硒在文蛤抵御重金属毒害的生理防御机制, 为分子标记开发以及基因克隆提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 文蛤暂养

实验文蛤捕捞自东营市河口区近海, 于当地养殖场开展实验。选择壳长(30±2) mm、无破损、活力好的文蛤, 暂养 7 d。暂养期间海水盐度 32±2, 每日

收稿日期: 2021-04-15; 修回日期: 2021-05-06

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系贝类产业创新团队(SDAIT-14); “海生·河口”渔业科技提升工程

[Foundation: Supported by the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System in Shandong Province, No. SDAIT-14; Fishery Science and Technology Promotion Project of Hekou]

作者简介: 郑年昊(1995—), 男, 江苏连云港人, 硕士研究生, 主要从事养殖生态学方面的研究, E-mail: 496234530@qq.com; 刘广斌(1972—), 通信作者, 男, 山东东营人, 副研究员, 主要从事海水增养殖方面研究, E-mail: liuguangbin72@126.com

换水一次, 换水量为养殖水体的四分之三, 持续充氧, 及时挑选死亡或活力差的个体, 投喂浓度为 5×10^8 ind./mL 的角毛藻浓缩液。暂养结束后, 随机取 6 粒文蛤, 每 2 粒为一个重复, 液氮保存, 作为空白对照组(C)。

1.2 重金属富集实验

3 个 80 L 的养殖桶, 每桶中放入 100 粒文蛤, 加入含 0.1 mg/L 氯化镉(CdCl_2)的海水 50 L, 持续充氧。富集 3 d, 第 2 d、3 d 均换入含 0.1 mg/L 氯化镉的海水, 换水量为养殖水体的四分之三。富集结束后, 每桶随机选取 2 粒文蛤为一个重复, 各取 3 个重复, 液氮保存, 标记为 Cd^{2+} 富集末期组(A)。

1.3 硒化物添加排出实验

富集完成后, 随机向一个桶加入亚硒酸钠 1 mL, 再向另一个桶加入硒化卡拉胶溶液 100 mL, 使两只桶中海水硒含量均为 $7 \mu\text{g/L}$, 第 3 个桶使用正常海水。排出实验持续 4 d, 每天全量换水一次, 对应加入亚硒酸钠 1 mL 和硒化卡拉胶溶液 100 mL。实验完成后, 分别从三个桶中随机挑选 2 粒文蛤作为一个重复, 各取 3 个重复, 液氮保存, 并标记为自然海水排出末期(D1)、加亚硒酸钠排出末期(SS)、加硒化卡拉胶排出末期(SC)。

1.4 文库构建

文蛤冷冻样品研成粉末, Trizol 提取法提取总 RNA, 检测 RNA 降解程度、纯度和完整性并精确定量后, 使用 Oligo (dT) 磁珠富集待测样品中含有 polyA 的 mRNA, 再使用 SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit 将 mRNA 反转录为 cDNA 链。利用磁珠筛选片段进行大规模 PCR, 再经损伤修复、末端修复、连接 SMRT 哑铃型接头, 构建全长转录组文库。运用 PacBio Sequel 平台进行测序。

1.5 转录组测序与分析

下机数据通过 SMRTlink 软件进行处理, 先得到去除接头以及长度小于 50 bp 的 Subreads 序列, 再经

过多次自我校正获得后获得环形一致性序列(CCS)。通过 SMRTlink 软件挑选两端同时含有 3'引物和 5'引物, 以及 3'引物前含有 polyA 尾的全长序列, 经过进一步筛选去除嵌合序列, 得到全长非嵌合序列(FLNC)。使用同种类型类聚算法(ICE)将同一转录本的 FLNC 序列进行聚类去冗余得到 Consensus 序列, 经非全长序列校正, 获得高质量的 Polished consensus 序列进行后续分析。

在无参考基因组的情况下, 使用 CD-HIT 软件将得到的 Polished consensus 序列与二代 Illumina 测序数据对比校正去除冗余, 保留最长转录本。将得到的高质量转录基因, 利用 Nr、Nt、Pfam、KOG、Swiss-Prot、KEGG、GO 七大公共数据库进行功能注释。利用 animalTFDB 2.0 进行动物转录因子鉴定, 将转录本注释到已知转录因子蛋白序列, 确定转录因子的家族。

2 结果

2.1 数据质控

利用 PacBio Sequel 测序平台对每个实验组进行全长转录组测序, 共获得 587 855 条(49.13 GB)原始序列, 平均长度 83 576 bp, N50 为 149 987 bp, 经过数据质控得到 12 854 333 条 Subreads 序列(48.18 GB) 平均长度 3 749bp, N50 为 4 411bp。

通过插入序列聚类分析得到环形一致性序列、全长非嵌合序列等序列, 数量信息见表 1。使用同种类型类聚算法将同一转录本全长非嵌合序列进行聚类后校正, 得到 Polished consensus 序列 3 303 条, 最小长度 127 bp, 最大长度 14 717 bp, 平均长度 4 157 bp, N50 长度为 4 932 bp, N90 长度为 2 433 bp。将 Polished consensus 序列与二代 Illumina 测序数据对比校正后类聚, 将相似性 95% 的序列去冗余得到 unigenes 20 798 条, 最小长度 127 bp, 最大长度 14 715 bp, 平均长度 4 354 bp, N50 为 5 258 bp, N90 为 2 550 bp, 长度分布见图 1。

表 1 全长转录本分类统计表

Tab. 1 Statistical table of the transcripts

环形一致性 序列数量	非全长转录 本数量	全长序列 数量	全长非嵌合序 列数量	全长嵌合序 列数量	全长非嵌合序 列均长	全长非嵌合序列占环形一致性 序列的数量/%
495 789	130 713	365 076	362 963	2 113	4 126	73.21

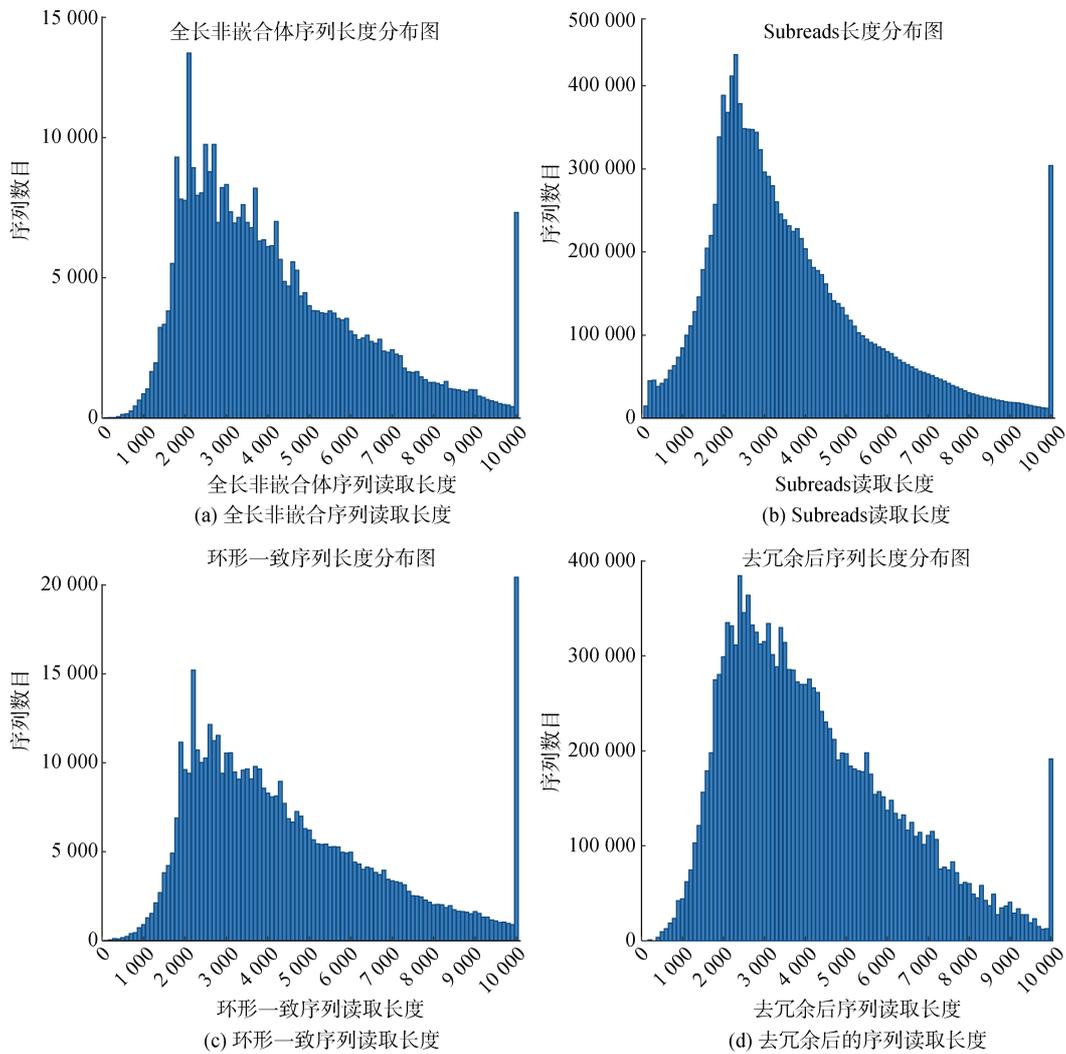


图 1 序列长度分布

Fig. 1 Sequence length distribution

2.2 基因功能注释

通过七大数据库的对比分析，对去冗余得到的 20 798 条 unigenes 进行基因功能注释，有 19 905 条 unigenes 至少被一个数据库所注释，有 5 440 条被所有数据库注释。NR 数据库注释到 19 288 条 unigenes, SwissProt 注释到 16 952 条, KEGG 注释到 18 866 条, KOG 注释到 14 137 条, GO 注释到 15 380 条, NT 注释到 7 283 条, Pfam 注释到 15 380 条。选取其中五大数据库注释到的结果绘制韦恩图，如图 2 所示。

KOG 功能分类结果如图 3 所示，主要注释到信号传导机制、一般功能预测基因、复制、重组和修复、细胞骨架、转录后修饰、蛋白质转换等。在 KOG 注释分类中，注释到含有钙结合 EGF 样结构域的纤维蛋白及相关蛋白(fibrillins and related proteins containing

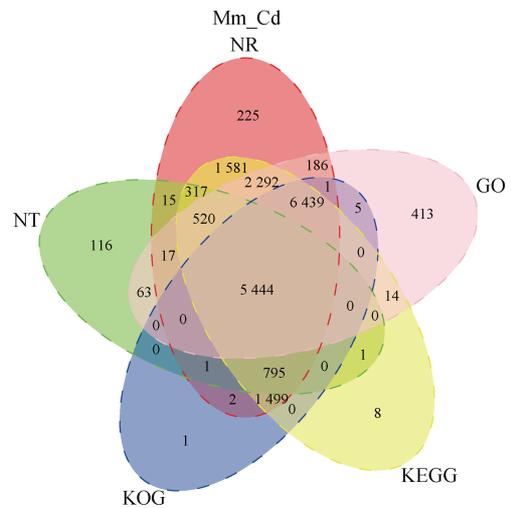


图 2 Unigenes 功能注释韦恩图

Fig. 2 Wayne diagram of the functional annotation of genes

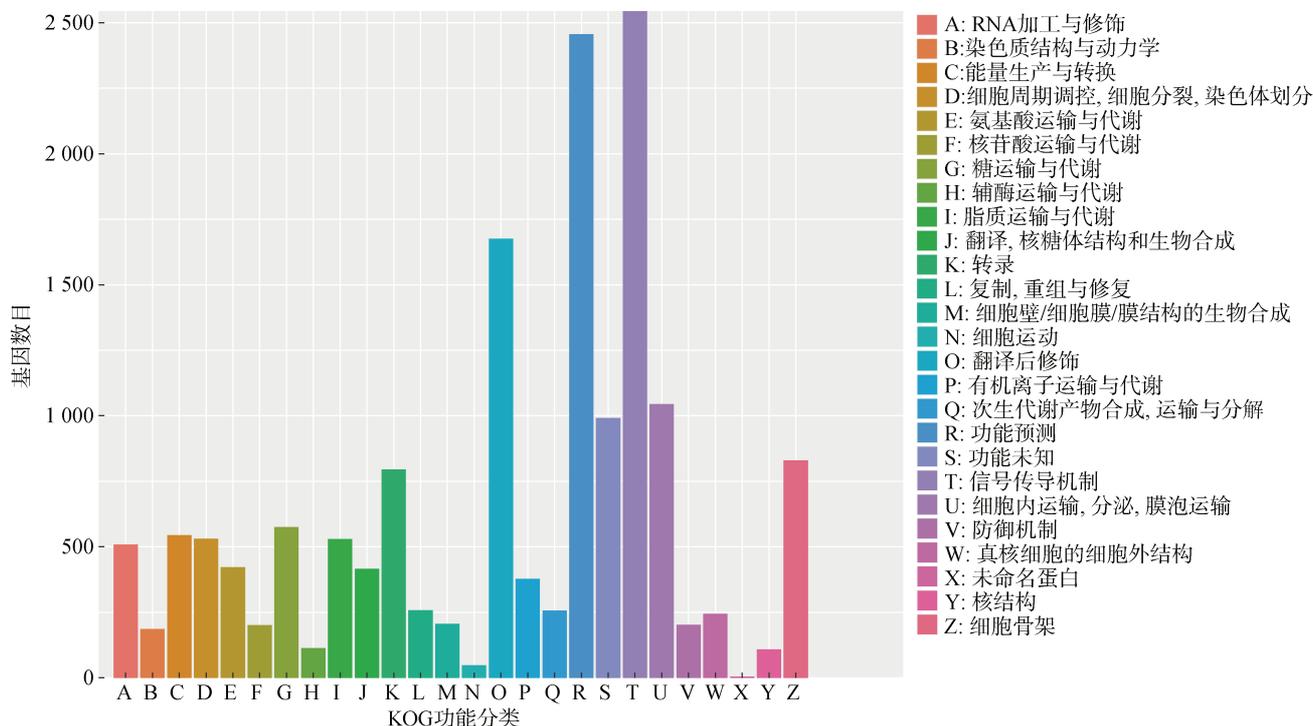


图3 Unigenes 的 KOG 功能分类
Fig. 3 KOG function classification of unigenes

Ca²⁺-binding EGF-like domains)的 unigenes 数量最多有 207 条, 其次为锌指结构(Zn-finger)有 198 条 unigenes。说明了重金属镉在文蛤体内与相关机制特异性结合, 并能产生自身代谢调节作用来保护机体安全。

KEGG 功能分布统计显示共注释到 18 866 条 unigenes。根据代谢途径可以分为细胞过程(cellular processes)、环境信息处理(environmental information processing)、遗传信息处理(genetic information processing)、人类疾病(human diseases)、代谢(metabolism)、有机系统(organismal systems)六个分组, 如图 4 所示。在环境信息处理分组中注释最多, 其中信号传导(signal transduction)被注释 1 900 条。

转录因子(transcription factor, TF)是与 DNA 特异性结合的一系列蛋白, 结合在 DNA 上启动子以及增强子之类控制转录的区域, 促进或抑制 DNA 上的遗传信息向 RNA 转录的过程, 人类的基因组上已经推定出约 1 800 个基因控制转录因子的编码。将本实验得到的 TF 数据对比到动物转录因子数据库(animalTFDB 2.0)中, 再利用 hmmsearch 进行鉴定, 最终得到转录因子家族名称注释, 如图 5 所示。共有 780 个转录因子被注释到 29 个家族中,

家族 199 个, ZBTB 家族 108 个, TF_bZIP 家族 74 个, 其他 THR-like 等家族均不足 50 个。

2.3 差异基因功能注释

差异基因筛选情况如表 2 所示。其中, 硒化卡拉胶投入组(SC)与重金属富集组(A)共有 12 条差异基因, 10 条上调, 2 条下调; 亚硒酸钠投入组(SS)与重金属富集组(A)共有 16 条差异基因, 14 条上调, 2 条下调; 硒化卡拉胶投入组(SC)与亚硒酸钠投入组(SS)共有 7 条差异基因, 3 条上调, 4 条下调。

2.3.1 差异基因基因本体分析富集分析

差异基因通过 GO 数据库进行注释, 结果见图 6。硒化卡拉胶投入组(SC)与空白对照组(C)的差异基因主要集中于分子功能, 注释为离子通道抑制活性(ion channel inhibitor activity)、通道调节活动(channel regulator activity)、通道抑制活性剂(channel inhibitor activity), 皆为下调基因, 在细胞代谢中有调节代谢的功能。重金属富集末期组(A)与自然海水排出末期组(D1)的差异基因主要集中于生物学过程, 注释为蛋白质三聚修饰(protein trimerization)、蛋白低聚特性(protein oligomerization), 基因功能为参与胞吐作用和调节跨膜钙通量作用。亚硒酸钠投入组(SS)与重

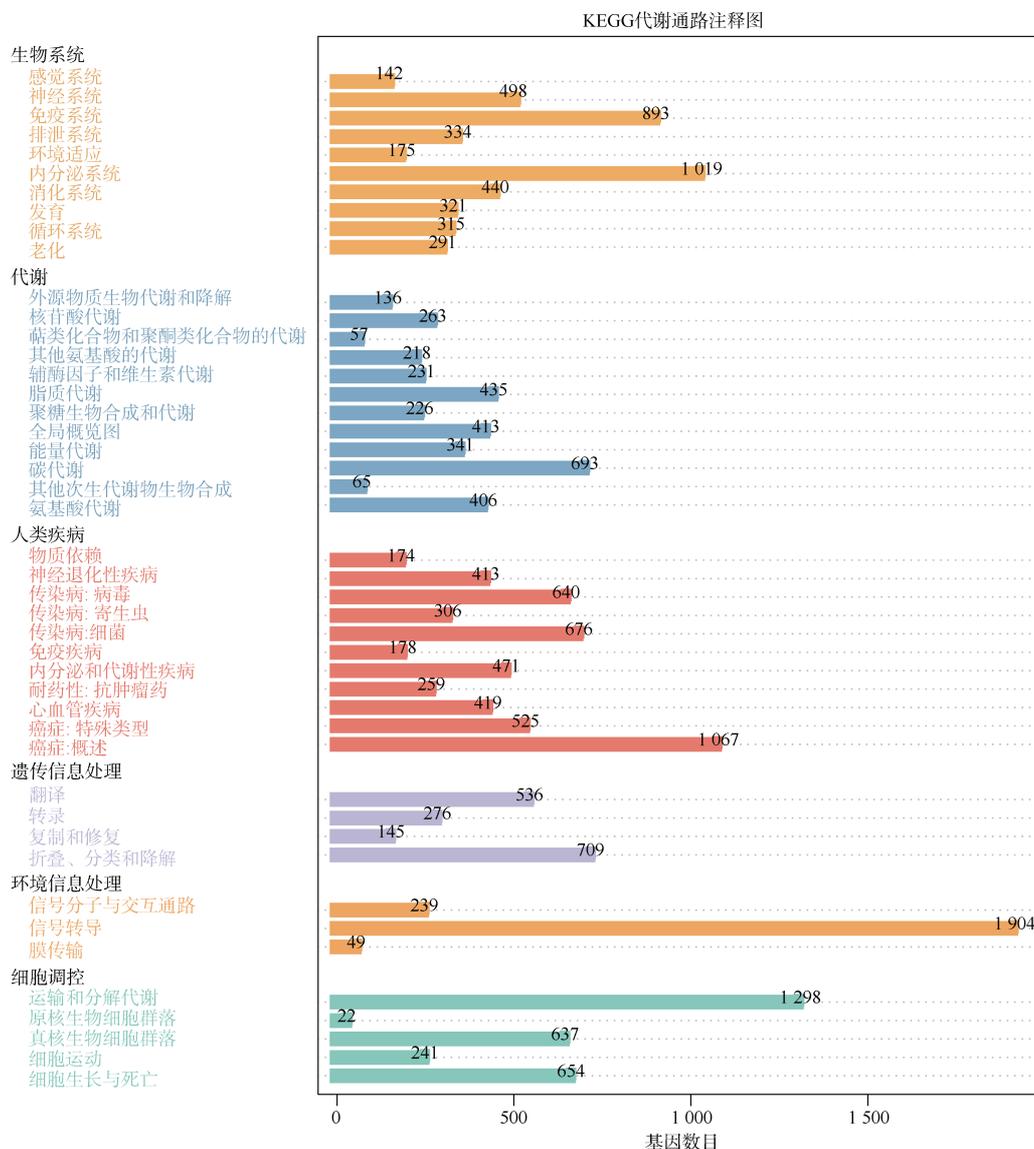


图 4 Unigenes 的 KEGG 功能注释

Fig. 4 KEGG function annotation of unigenes

表 2 差异基因筛选情况表

Tab. 2 Screening of the differential genes

处理组别	样品名称	上调的差异基因	下调的差异基因
空白对照组与重金属富集末期组	C 与 A	8	5
空白对照组与自然海水排出末期组	C 与 D1	13	8
空白对照组与亚硒酸钠投入组	C 与 SS	14	12
空白对照组与硒化卡拉胶投入组	C 与 SC	13	7
自然海水排出末期组与重金属富集末期组	D1 与 A	55	10
自然海水排出末期组与硒化卡拉胶投入组	D1 与 SC	7	6
自然海水排出末期组与亚硒酸钠投入组	D1 与 SS	6	7
重金属富集末期组与亚硒酸钠投入组	A 与 SS	14	2
重金属富集末期组与硒化卡拉胶投入组	A 与 SC	10	2
亚硒酸钠投入组与硒化卡拉胶投入组	SS 与 SC	3	4

注: C 为空白对照组样品; A 为重金属富集末期组样品; D1 为自然海水排出末期组样品; SS 为亚硒酸钠投入组样品; SC 为硒化卡拉胶投入组样品

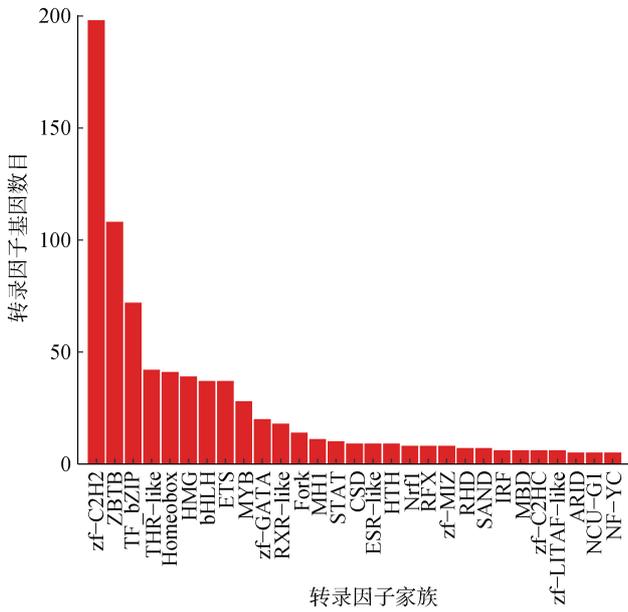


图 5 转录因子分析图

Fig. 5 Analysis of transcription factors

注: 横坐标为转录因子家族名称; 纵坐标为该家族下转录因子数量

金属富集末期组(A)的差异基因主要集中于细胞组分中的细胞表面活性(cell surface)。结果表明硒化卡拉胶和亚硒酸钠都参与了文蛤对 Cd²⁺代谢排出, 但作用机制不同。可推测 Cd²⁺进入文蛤体内阻滞了乙酰胆碱受体离子通道, 硒化卡拉胶的有机硒可以对其有缓解作用; 而亚硒酸钠中的无机硒可使文蛤细胞表面活性增强, 能降低 Cd²⁺浓度从而保护机体不受损伤。

统计实验组与对照组显著富集的 8 个节点, 结果见表 3。细胞表面、钙离子结合、蛋白质结合、离子通道抑制剂活性、钠依赖性磷酸盐转运等差异基因显著富集, 其中细胞表面包含的基因注释为调控细胞凋亡。

2.3.2 差异基因 KEGG 注释

经筛选, 各实验组的差异基因主要包括, 真核生物核糖体的生物合成、嘌呤代谢、ECM 受体相互作用、蛋白质消化吸收、吞噬体、硒化合物代谢等代谢通路, 如图 7。显著富集通路的详细信息见表 4 至表 7。

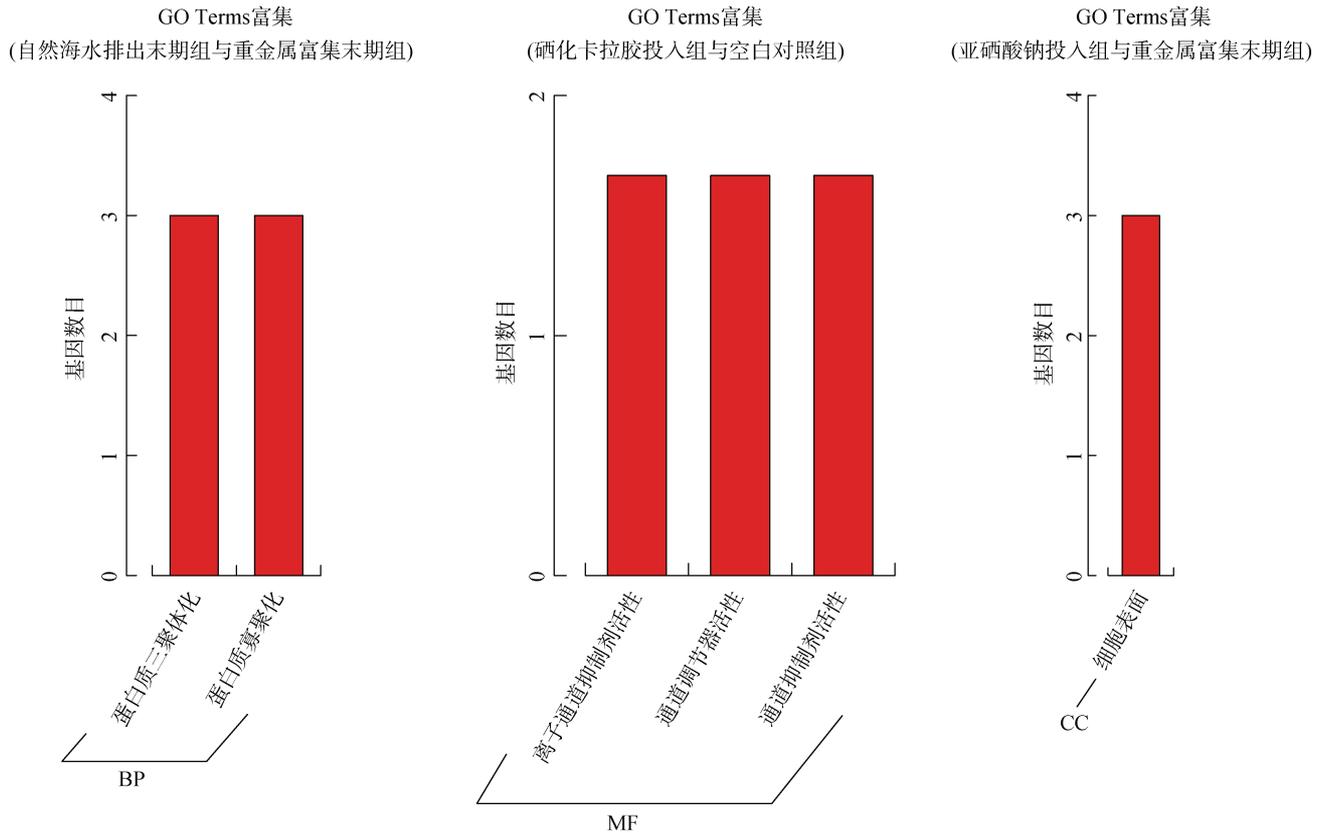


图 6 基因本体分析分类注释

Fig. 6 GO classification notes

表 3 差异显著基因基因本体分析富集结果

Tab. 3 Enrichment results of the go gene with significant differences

节点编号	节点名称	总基因数	DEG 基因数	分类	p 值
GO: 0009986	细胞表面	53/15 380	3/11	细胞成分	6.16×10^{-6}
GO: 0005509	钙离子结合	616/15 380	5/11	分子功能	3.55×10^{-5}
GO: 0005515	蛋白质结合	5233/15 380	10/11	分子功能	1.41×10^{-4}
GO: 0008200	离子通道抑制剂活性	14/15 380	2/17	分子功能	8.25×10^{-9}
GO: 0010941	细胞死亡的调控	148/15 380	3/12	生物学过程	1.8×10^{-4}
GO: 0015114	磷酸离子跨膜转运蛋白活性	31/15 380	2/12	分子功能	2.6×10^{-4}
GO: 0044341	钠依赖性磷酸盐转运	111/15 380	6/12	生物学过程	9.45×10^{-6}
GO: 0022857	底物特异性转运体活性	850/15 380	4/12	分子功能	0.003 207

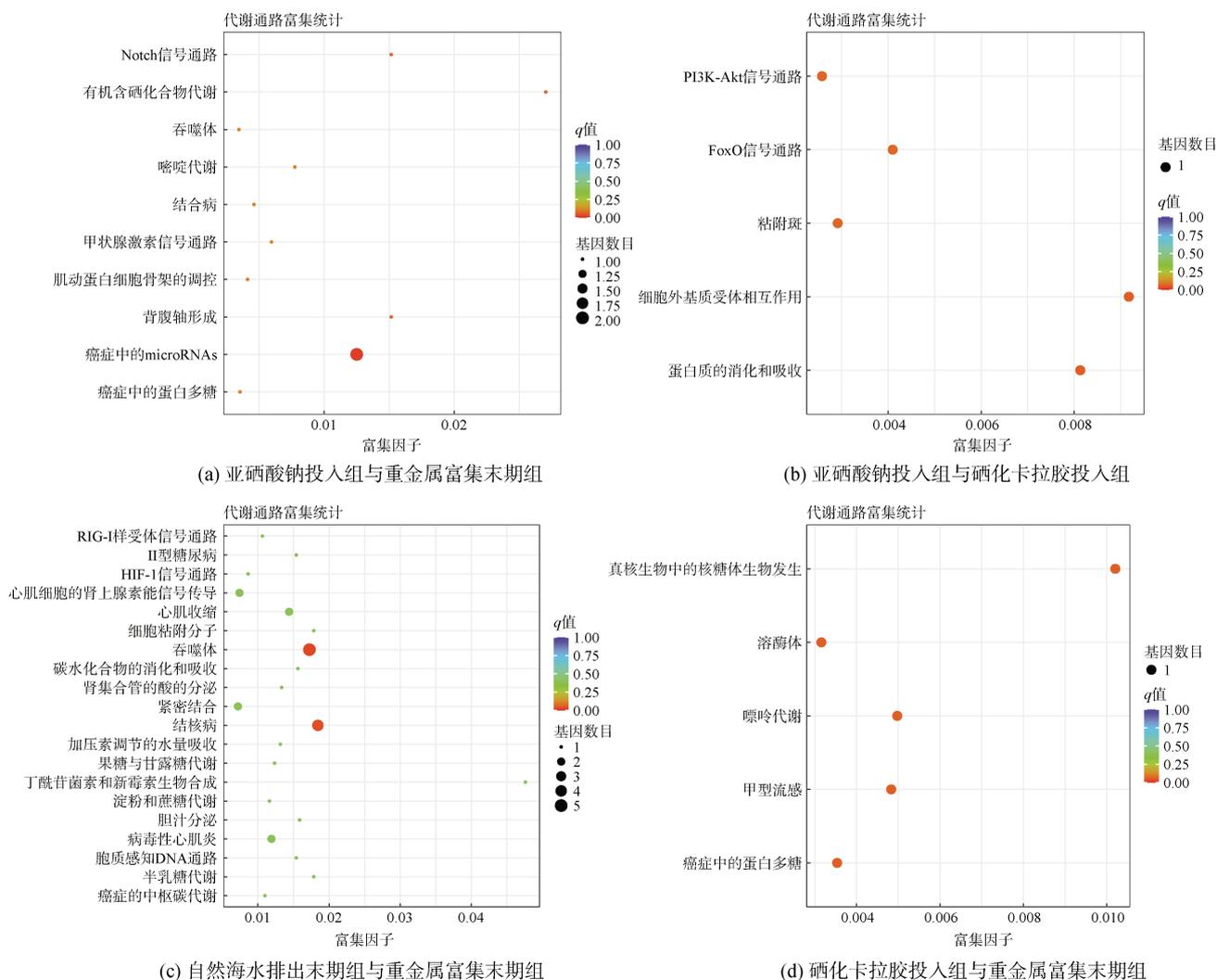


图 7 KEGG 通路富集

Fig. 7 KEGG pathway enrichment

在硒化卡拉胶实验组和亚硒酸钠实验组对比得到的差异基因主要富集于 ECM 受体相作用(ECM-receptor interaction)通路, 在细胞间的功能主要是细胞黏连以及信号传导, 当细胞发生癌变时 ECM 受体

相作用也会增强。该通路下注释到 Col6a3 基因家族, 通过 BLAST 到 NCBI 上得到的相关基因注解为 VI 型胶原蛋白, 主要作用为通过控制信号传导从而提高细胞内物质交换能力。Cd²⁺富集末期和自然海水排出组

表 4 硒化卡拉胶组和 Cd²⁺富集末期组差异基因富集结果

Tab. 4 Enrichment results of different genes in the selenocarrageenan and Cd²⁺ late enrichment groups

通路编号	通路名称	背景基因数	DEG 基因数	p 值	校正后 p 值
ko03008	真核生物核糖体的生物合成	98	1	0.017 683 8	0.055 91
ko00230	嘌呤代谢	201	1	0.035 815 7	0.055 91
ko05164	甲型流感	207	1	0.036 863 6	0.055 91
ko05205	癌症中的蛋白多糖	283	1	0.050 058 5	0.055 91
ko04142	溶酶体	317	1	0.055 914 4	0.055 91

表 5 硒化卡拉胶组和亚硒酸钠组差异基因富集结果

Tab. 5 Enrichment results of different genes in the selenocarrageenan and sodium selenite groups

通路编号	通路名称	背景基因数	DEG 基因数	p 值	校正后 p 值
ko04512	ECM 受体相互作用	109	1	0.019 633 1	0.055 27
ko04974	蛋白质消化吸收	123	1	0.022 109 6	0.055 27
ko04068	FoxO 信号通路	244	1	0.043 305 6	0.068 05
ko04510	粘合斑	343	1	0.060 373 0	0.068 05
ko04151	磷脂酰肌醇 3 酶	388	1	0.068 049 9	0.068 05

表 6 自然海水排出组和富集末期组差异基因富集结果

Tab. 6 Enrichment results of different genes in the natural seawater discharge and late enrichment groups

通路编号	通路名称	背景基因数	DEG 基因数	p 值	校正后 p 值
ko04145	吞噬体	290	5	0.000 509	0.025 96
ko05152	肺结核	217	4	0.001 501	0.038 28

表 7 亚硒酸钠组和富集末期组差异基因富集结果

Tab. 7 Enrichment results of different genes in the sodium selenite and late enrichment groups

通路编号	通路名称	背景基因数	DEG 基因数	p 值	校正后 p 值
ko05206	癌症中的编码 RNA	160	2	0.001 793	0.017 93
ko00450	硒化合物代谢	37	1	0.014 936	0.065 49
ko04330	Notch 信号通路	66	1	0.026 197	0.065 49
ko04320	背腹轴形成	66	1	0.026 197	0.065 49
ko00240	嘧啶代谢	129	1	0.050 258	0.100 52
ko04919	甲状腺激素信号通路	168	1	0.064 884	0.108 14

差异基因 KEGG 主要富集到吞噬体(phagosome)以及肺结核(tuberculosis)信号通路,其中 tuberculosis 富集较为显著共有三条差异基因显著富集,分别为 *MRC*, *CD206*, *CD280* 显著上调,定义为甘露糖受体(mannose receptor, MR),主要功能是通过胞外区识别和结合特定的糖类分子,在识别病原体、递呈抗原和保持内环境稳定中发挥作用^[8]。

3 讨论

通过对转录因子家族分类注解可以更深入地了解蛋白家族调控的主要功能。本实验得到的转录组数据共有 780 个 TF 被注释到 29 个家族中,其中 C2H2 型锌指(zf-C2H2)家族最多有 199 个, zf-C2H2

具有识别与结合特异性 DNA 片段的功能,参与基因表达与调控。项孙寰等对已开发的辣椒炭疽(*Pepper anthrax*)基因查找 19 个 zf-C2H2 家族成员并对其分析,并根据进化关系分为 7 个亚族,同时对其二级结构进行排序后发现辣椒炭疽 zf-C2H2 蛋白序列存在 8 个保守基因,为后续进一步分析提供科学依据^[9]。

差异基因通过 KEGG 数据库注释,可以获取胁迫后贝类产生的相关代谢途径等信息。张晶晶等通过 KEGG 数据库比对,发现镉胁迫后中国蛤蜊(*Macra chinensis*)的差异基因多集中在溶酶体、Wnt 信号通路、核糖体、泛素调节蛋白等^[10]。张钰昆等对美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)进行纳米氧化镍的胁迫,经过差异基因筛选注释获得在 Toll 样受体介

导、TNF 介导、色素细胞 P450、谷胱甘肽硫转移酶、金属硫蛋白和多药耐药蛋白上显著表达^[11]。本实验利用 KEGG 数据库对差异基因进行注释, Cd²⁺富集末期组和自然海水排出组的差异基因主要富集于吞噬体通路, 该通路中甘露糖受体基因显著上调。叶晟等通过转录组数据, 筛选出不同浓度下氯化镉胁迫后文蛤的功能基因, 主要富集到色素细胞 P450、谷胱甘肽过氧化酶、谷胱甘肽硫转移酶、过氧化氢酶、热休克蛋白 70 以及铜/锌超氧化物歧化酶这 6 个功能基因^[12]。本实验发现在 Cd²⁺代谢过程中文蛤甘露糖受体功能基因显著富集, 甘露糖受体主要通过胞外区识别和结合特定的糖类分子, 在识别病原体、递呈抗原和保持内环境稳定中发挥作用^[13]。所以根据测序信息推测 Cd²⁺进入文蛤体内后, 激活甘露糖受体产生免疫应答。张辉等对镉污染后栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的消化盲囊进行转录组分析, 通过对功能基因的筛选注释, 发现显著富集的功能蛋白为结合蛋白、催化活性蛋白和转运蛋白^[14]。本实验发现, 文蛤在镉富集后差异基因显著富集于蛋白质三聚修饰和蛋白低聚特性功能, 可推测镉进入贝类体内后, 对其自身蛋白合成与代谢造成直接影响, 从而导致免疫功能紊乱。

目前有关硒化物对贝类代谢重金属影响的报道较少, 仅有采用抗氧化酶测定的方式来鉴定硒化物能否在贝类体内与重金属发生拮抗作用。陈琳琳等对汞和硒暴露后的紫贻贝(*Mytilus edulis*)体内抗氧化酶进行测定, 发现硒暴露组的各项指标均超过汞暴露组和硒汞联合组, 而硒汞联合组的各项指标均高于汞暴露组, 说明硒在一定程度上与重金属进行拮抗作用, 增强紫贻贝的抗氧化酶活性^[15]。本实验选取文蛤作为实验对象, 通过对比亚硒酸钠组和 Cd²⁺富集末期组差异基因富集结果, 发现差异基因在癌症中的编码 RNA 信号通路富集明显, 筛选出 *Notch* 家族基因下调以及 RDX(Radixin)蛋白上调。在卵巢多药耐药性的研究中, RDX 蛋白激活抑癌基因 *P53* 活性、PI3K/Akt 通路、Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路, 从而增加耐药细胞对顺铂(Platinum, PT)的敏感性^[16]。RDX 蛋白在癌变细胞中显著表达, 而 *Notch* 家族基因控制细胞分化、凋亡、增殖以及边界的形成^[17-18]。徐行等通过研究 *Notch1* 和 *Notch2* 缺失的斑马鱼(*Brachydanio rerio*), 结果发现缺失相关基因的斑马鱼比正常斑马鱼致畸性更高、更易引发突变造成鱼鳔发育缺陷, 同时 *Notch1* 和 *Notch2* 影响斑马鱼的免

疫功能^[19]。杨童等发现 *Notch* 家族基因可以控制日本三角涡虫(*Dugesia japonica*)的细胞分化和自我修复功能, 在经过基因功能干扰后的日本三角涡虫中, 出现多眼点畸形、歪尾和黑斑等现象^[20]。这说明 Cd²⁺入侵文蛤细胞后通过抑制 *Notch* 信号通路降低细胞修复能力从而引发细胞死亡和癌变。硒化卡拉胶实验组和亚硒酸钠实验组对比得到的差异基因主要富集于 ECM 受体(ECM receptor interaction)通路, 在细胞间的功能主要是细胞黏连以及信号传导^[21]。在人类皮肤病的研究中, 原发性皮肤淀粉样变(Primary cutaneous amyloidosis)患者体内的差异基因, 显著富集于 ECM 受体介导和黏着斑等信号通路^[21]。该通路下注释到 *Col6a3* 基因家族(Collagen type VI α 3 chain, *COL6A3*), 通过 BLAST 到 NCBI 上得到的相关基因注解为 VI 型胶原蛋白, 主要作用为通过控制信号传导从而提高细胞内物质交换能力, 同时也可以作为多种疾病检测的指标之一^[22]。在肿瘤的研究中通过抑制 *Col6a3* 基因家族的 IV 型胶原 α 3、 α 6 链, 可以有效抑制肿瘤新生血管生成, 从而控制肿瘤扩散和生长^[23]。证明有机硒与无机硒在文蛤重金属代谢过程中的作用机制以及途径不同, 亚硒酸钠更利于促进细胞分化等方式恢复文蛤受损细胞活性, 硒化卡拉胶则在细胞交换能力以及维护细胞膜稳定的方式上缓解文蛤的重金属损伤。

参考文献:

- [1] 王晓宇, 王清, 杨红生. 镉和汞两种重金属离子对四角蛤蜊的急性毒性[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 24-29, 113.
WANG Xiaoyu, WANG Qing, YANG Hongsheng. Acute toxicity of cadmium and mercury to *Macrta veneriformis*[J]. Marine Sciences, 2009, 33 (12): 24-29, 113.
- [2] 杜克梅. 海南省近岸海域主要经济贝类重金属污染调查与评价[D]. 广州: 暨南大学, 2013.
DU Kemei. Investigation and evaluation on heavy metal pollution of main economic shellfish in coastal waters of Hainan Province[D]. Guangzhou: Jinan University, 2013.
- [3] 郑江平, 肖长峰, 李复煌. 重金属元素对动物和生态环境的影响研究[J]. 饲料研究, 2020, 43(8): 152-157.
ZHENG Jiangping, XIAO Changfeng, LI Fuhuang. Effects of heavy metals on animals and ecological environment[J]. Feed research, 2020, 43(8): 152-157.
- [4] 徐兆发, 王雨, 王家骏, 等. 亚硒酸钠对镉和汞肝肾氧化损伤影响的实验研究[J]. 微量元素与健康研究, 2008(5): 1-4.

- XU Zhaofa, WANG Yu, WANG Jiajun, et al. Experimental study on the effect of sodium selenite on oxidative damage of liver and kidney caused by cadmium and mercury[J]. Trace Elements and Health Research, 2008(5): 1-4.
- [5] 房传栋, 张宾, 吕丹丹, 等. 不同脱除剂对暂养紫贻贝体内重金属 Cd^{2+} 的脱除效果[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 44-48.
FANG Chuandong, ZHANG Bin, LV Dandan, et al. Removal effect of different removal agents on heavy metal Cd^{2+} in the body of *Mytilus edulis*[J]. Food Industry Science and Technology, 2018, 39(7): 44-48.
- [6] 邱愚衡, 孙孟辉, 王欣, 等. 不同暂养添加物对 Cd^{2+} 胁迫的紫贻贝机体免疫功能的调节作用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 10-16.
QIU Yujuan, SUN Menghui, WANG Xin, et al. Effects of different temporary feeding additives on immune function of *Mytilus edulis* under Cd^{2+} stress[J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(23): 10-16.
- [7] 李阳. 魁蚶 *Scapharca broughtonii* 对 Cu^{2+} 和海水酸化胁迫的生理响应[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
LI Yang. Physiological response of *Scapharca broughtonii* to Cu^{2+} and seawater acidification stress[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [8] RENU S, FELICIANO R N, PATIL V, et al. Immunity and protective efficacy of mannose conjugated chitosan-based influenza nanovaccine in maternal antibody positive pigs[J]. Frontiers in Immunology, 2021(12): 1-13.
- [9] 项孙寰. 辣椒炭疽 *zf-C2H2* 基因家族的生物信息学分析[J]. 农业技术与装备, 2020(7): 61-64, 67.
XIANG Sunhuan. Bioinformatics analysis of *zf-C2H2* gene family in Pepper Anthracnose[J]. Agricultural Technology and Equipment, 2020(7): 61-64, 67.
- [10] 张晶晶, 李宏俊, 秦艳杰, 等. 基于鳃的 microRNA 转录组研究中国蛤蜊对重金属镉的响应[J]. 海洋学报, 2016, 38(12): 118-131.
ZHANG Jingjing, LI Hongjun, QIN Yanjie, et al. Response of *Macra chinensis* to cadmium based on gill microRNA transcriptome[J]. Acta Oceanographica Sinica, 2016, 38(12): 118-131.
- [11] 张钰昆. 纳米氧化镍引起美洲牡蛎转录组表达变化特征分析[D]. 大连: 大连海事大学, 2019.
ZHANG Yukun. Characteristics of transcriptome expression in oyster *Crassostrea gigas* induced by nano NiO[D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2019.
- [12] 叶晟. 基于转录组学研究文蛤对 Cd^{2+} 的响应机制[D]. 大连: 大连海洋大学, 2017.
YE Sheng. Study on the response mechanism of *Meretrix meretrix* to Cd^{2+} based on transcriptomics[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2017.
- [13] 刘小玲, 王虹, 樊启学, 等. 黄颡鱼甘露糖受体基因的克隆和功能分析[J]. 水产学报, 2017, 41(7): 1036-1043.
LIU Xiaoling, Wang Hong, Fan Qixue, et al. Cloning and functional analysis of mannose receptor gene of *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Acta Fisheries Sinica, 2017, 41(7): 1036-1043.
- [14] 张辉, 翟毓秀, 姚琳, 等. 栉孔扇贝在镉污染胁迫下消化盲囊组织的转录组分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 802-810.
ZHANG Hui, ZHAI Yuxiu, YAO Lin, et al. Transcriptome analysis of digestive caecum of *Chlamys farreri* under cadmium stress[J]. Chinese Fisheries Science, 2017, 24(4): 802-810.
- [15] 陈琳琳, 张高生, 陈静, 等. 汞、硒暴露对紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 抗氧化酶系统的影响[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(4): 383-388.
CHEN Linlin, ZHANG Gaosheng, CHEN Jing, et al. Effects of mercury and selenium exposure on antioxidant enzyme system of *Mytilus edulis*[J]. Acta ecotoxicologica Sinica, 2011, 6(4): 383-388.
- [16] VLACHAKIS D, PAPAGEORGIOU L, PAPADAKI A, et al. An updated evolutionary study of the Notch family reveals a new ancient origin and novel invariable motifs as potential pharmacological targets[J]. PeerJ, 2020, 8: e10334.
- [17] 韦露薇. RDX、ITGA5 及其信号传导通路在卵巢癌多药耐药中的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
WEI Luwei. Study on RDX, ITGA5 and their signaling pathways in multidrug resistance of ovarian cancer[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2017.
- [18] WANG J, ZHANG Q B, LI S, et al. Low molecular weight fucoidan alleviates diabetic nephropathy by binding fibronectin and inhibiting ECM-receptor interaction in human renal mesangial cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 304-314.
- [19] 徐行. 斑马鱼 Notch1a 和 Notch3 分子的自然免疫功能研究及其对鱼鳔发育的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
XU Xing. Innate immune function of Notch1a and Notch3 in zebrafish and their effects on the development of swim bladder[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [20] 杨童. Notch 家族基因在日本三角涡虫中的功能研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2019.
YANG Tong. Study on the function of the Notch family gene in the Japanese delta vortex[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2019.
- [21] CAI D X, LI Y, ZHOU CH L, et al. Comparative proteomics analysis of primary cutaneous amyloidosis[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 14(4): 3004-3012.
- [22] 张竞, 谢扬, 王凤, 等. *COL6A3* 基因与胃癌免疫浸润水平及临床预后的相关性分析[J]. 消化肿瘤杂志,

2020, 12(4): 248-255.

ZHANG Jing, XIE Yang, WANG Feng, et al. Correlation analysis of COL6A3 gene with immune invasion level and clinical prognosis of gastric cancer[J]. Journal of digestive oncology, 2020, 12(4): 248-255.

[23] 唐晓, 宋娜玲, 贺欣. 源于IV型胶原 $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 链的肿瘤新

生血管生成抑制剂[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(10): 901-906.

TANG Xiao, SONG Na Ling, HE Xin. Tumor angiogenesis inhibitors derived from $\alpha 3$ and $\alpha 6$ chains of type IV collagen[J]. Chinese Journal of Biochemistry and molecular biology, 2011, 27(10): 901-906.

Transcriptomics analysis of the role of selenide in the response to cadmium stress in *Meretrix meretrix*

ZHENG Nianhao¹, SUN Ming², YAO Linlin², JING Yuanyuan², ZHANG Tianwen², HU Fanguang², WANG Xingqiang¹, LIU Guangbin²

(1. College of Marine Life and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Marine Sciences Research Institute on Shan Dong Province, Qingdao 266104, China)

Received: Apr. 15, 2021

Key words: *Meretrix meretrix*; selenium carrageenan; sodium selenite; transcriptome analysis; differential gene expression

Abstract: *Meretrix meretrix* transcriptome was sequenced, and bioinformatics analysis was performed to explore the mechanism of selenium (Se) on cadmium (Cd^{2+}) metabolism. The clams were first exposed to $CdCl_2$ for 3 d, followed by a depuration of 4 d. In depuration period, clams were divided into control, selenocarrageenan, and sodium selenite groups. A total of 587, 855 high-quality reads were obtained from the selenocarrageenan and sodium selenite groups. Overall, 15, 380 unigenes were annotated by Gene Ontology (GO), and 18, 866 unigenes were annotated by the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway. GO enrichment revealed that differentially expressed genes were mainly enriched in myosin complex, ion channel suppression, etc. KEGG pathway enrichment revealed ribosome biosynthesis in eukaryotes, purine metabolism, ECM receptor interaction, protein digestion and absorption, phagosome, and metabolism of Se compounds. Thus, Cd^{2+} can cause abnormal protein transcription modification in *M. meretrix*. Moreover, organic Se can excrete cadmium in cells by regulating the activity of metal ion channels. Inorganic Se mainly acts on the surface of clam cells and enhances its surface activity to resist the Cd^{2+} entering the cell, conducive to the discharge of heavy metals. Simultaneously, the difference in gene KEGG annotation results also proves that organic Se and inorganic Se have different mechanisms and pathways in the metabolism of heavy metals in clams.

(本文编辑: 杨 悦)