

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210930003

http://www.yykxjz.cn/

刘志峰, 马爱军, 孙建华, 朱理光, 包玉龙, 张涛, 俞兰良. 红鳍东方鲀 AFP、CIRP、HMGB1 和 YB-1 基因对低温胁迫的响应. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 58–67

LIU Z F, MA A J, SUN J H, ZHU L G, BAO Y L, ZHANG T, YU L L. Response of AFP, CIRP, HMGB1 and YB-1 gene of *Takifugu rubripes* to low-temperature stress. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 58–67

# 红鳍东方鲀 AFP、CIRP、HMGB1 和 YB-1 基因对低温胁迫的响应\*

刘志峰<sup>1,2</sup> 马爱军<sup>1,2①</sup> 孙建华<sup>1</sup> 朱理光<sup>1,2</sup> 包玉龙<sup>3</sup> 张涛<sup>3</sup> 俞兰良<sup>4</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 山东 青岛 266071; 3. 大连天正实业有限公司 辽宁 大连 116600; 4. 威海银泽生物科技有限公司 山东 威海 264404)

**摘要** 鱼类的生长和繁殖受环境条件的调节, 冬季的低温会给红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)产业带来不利影响。为研究红鳍东方鲀耐低温机制, 本研究利用实时荧光定量 PCR 技术, 分析抗冻蛋白(AFP)基因、冷诱导 RNA 结合蛋白(CIRP)基因、高速迁移蛋白家族蛋白(HMGB1)基因、Y-box 结合蛋白(YB-1)基因在不同温度条件下(18℃、13℃、8℃和 5℃), 在红鳍东方鲀的肝、脾、肾、脑、心、肠、肌肉、性腺和皮肤中的表达情况。结果显示, AFP 基因呈广泛性表达, 在肌肉中表达量最高( $P<0.05$ ), 随着温度的降低, 各组织中 AFP 基因的表达量基本呈显著升高的趋势, 在 5℃组达到最高值, 显著高于对照组( $P<0.05$ )。CIRP 基因在肌肉中表达量最高( $P<0.05$ ), 随着温度的降低, 各组织中 CIRP 基因的表达量的升降程度有所不同, 在肝、肾、脑、心、肠、皮肤中的表达量呈先升高后降低再升高的趋势, 在脾、肌肉和性腺中表达量呈上升趋势。HMGB1 基因在肌肉中表达量最高( $P<0.05$ ), 在脑、心、肝和皮肤中也有较高的表达量; 随着温度的降低, 除肝脏外, 各组织中 HMGB1 基因的表达量基本呈先升高后降低的趋势, 并在 8℃组达到最大值, 显著高于其他各组( $P<0.05$ )。YB-1 基因在肌肉中表达量最高( $P<0.05$ ), 在其他组织中表达量较低; 随着温度的降低, 大部分组织中(脑、心、肠、肾、肝、肌肉和脾)表达量呈先升高后降低再升高的趋势, 在 8℃组达到最小值( $P<0.05$ )。以上结果表明, 4 种基因表达水平因组织、温度的不同而不同, 反映了这 4 种基因的功能特异性; 在低温胁迫下, 4 种基因积极响应, 表达量均发生不同程度的变化, 表明 4 种基因在红鳍东方鲀低温环境适应中可能具有潜在的重要作用。另外, 从表达变化规律来看, 8℃可能是红鳍东方鲀应对低温胁迫的关键调控点, 过低的温度会造成其调控紊乱, 这可为研究红鳍东方鲀低温应答调控机制提供相关依据。

**关键词** 红鳍东方鲀; 低温胁迫; AFP; CIRP; HMGB1; YB-1; 荧光定量 PCR

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0058-10

\* 国家重点研发计划子课题(2018YFD0900301-12)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47-01)、国家自然科学基金项目(32002362)、山东省自然科学基金(ZR2019BC089)和中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD25)共同资助。刘志峰, E-mail: liuzf@ysfri.ac.cn

① 通信作者: 马爱军, 研究员, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-09-30, 收修改稿日期: 2021-10-25

鱼类的生长和繁殖受环境条件的调节,气候的变化可能给海水网箱养殖鱼类带来不利影响。已有大量研究表明,冬季的低温易导致鱼类生长性能降低,甚至大量死亡(Abdel-Tawwab *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2019、2020)。红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)主要分布在我国沿海地区、朝鲜半岛和日本海域,其肉质鲜美、营养丰富,已成为我国重要的经济型海水养殖鱼类之一。红鳍东方鲀作为暖温性鱼类,其适宜的生长温度为 16~25℃,然而,冬季水温的下降严重影响其生长性能,需要采用室内加热水进行养殖,但由于加热升温的方法会带来成本上升、环境压力等问题,养殖水温仍只能维持在较低水平。因此,研究该物种冷适应的分子机制及培育具有耐寒特性的品种,有助于减少因低温而出现大面积死亡的情况发生,从而提高养殖产量,提升经济效益。

受益于分子生物学手段的不断提升,针对鱼类低温耐受分子机制的研究越来越深入,一些与鱼类低温耐受相关的基因得以被发现及应用。本课题组前期通过分析红鳍东方鲀的低温转录组差异基因,筛选得到 4 个与低温耐受相关的基因。抗冻蛋白(AFP)基因作为研究较为深入的抗寒基因,普遍存在于鱼类、植物、昆虫、细菌和真菌中(Duman *et al.*, 1993; 崔杰等, 2019; 徐凯等, 2019; 张俊芳等, 2020)。AFP 对冰晶具有较高的亲和力,能够附着到冰晶表面,阻止冰晶长大,从而达到抗寒的目的(Raymond *et al.*, 1977; 汪少芸等, 2012)。在鱼类中,已有大量的相关研究,鱼源抗冻蛋白也得到了广泛应用(钟其旺等, 2002; 蔡路昀等, 2018)。冷诱导 RNA 结合蛋白(CIRP)是一种进化上保守的 RNA 结合蛋白, CIRP 基因作为一种分布广泛、作用性强的功能基因,参与机体抵御外界低温的过程,通过提高 mRNA 的稳定性,介导多种基因的转录翻译,从而保护机体免受低温损伤(Al-Fageeh *et al.*, 2006)。近年来,研究发现, CIRP 参与了一些鱼类的低温胁迫应答过程,包括黄姑鱼(*Nibea albiflora*) (Xu *et al.*, 2018)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (胡金伟等, 2015)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (苗亮等, 2017)等。高速迁移蛋白家族蛋白(HMGB1)作为一种高度保守的非组蛋白染色质相关蛋白,其功能是稳定核小体的形成(Lange *et al.*, 2009),并充当转录因子样蛋白,通过弯曲 DNA 和促进获得特定 DNA 靶点上的转录蛋白来调控基因的表达(Park *et al.*, 2003),包括一些与低温相关的基因(Vornanen *et al.*, 2005)。Y-box 结合蛋白 1 (YB-1)属于冷休克蛋白家族成员,在进化上高度

保守(Swamynathan *et al.*, 1998),是一类重要的功能蛋白。其可以作为转录因子与 DNA、mRNA 结合,也可以与其他转录因子发生蛋白互作,来完成基因转录与翻译的调控,进而参与机体的生理调控作用(Kloks *et al.*, 2002; Eliseeva *et al.*, 2011)。YB-1 基因作为一种胁迫响应基因,对不同物种的多种胁迫都会产生响应,包括冷胁迫、氧化应激、缺氧等(Rauen *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018)。关于 HMGB1 基因和 YB-1 基因的相关报道在海洋生物中较少,且集中在鱼类免疫方面(Cai *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2018; He *et al.*, 2019)。

本文以红鳍东方鲀为研究对象,采用荧光定量 PCR 的方法研究上述 4 种抗寒基因在不同温度、不同组织中的响应情况,从分子水平理解红鳍东方鲀的低温适应性,初步分析红鳍东方鲀幼鱼的抗寒分子机制,以期为筛选抗寒分子标记提供候选基因,进而为红鳍东方鲀耐低温育种研究和应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用红鳍东方鲀取自大连天正实业有限公司,挑选体长为(15.0±0.5) cm、体格健壮、无损伤、活力好的 360 尾幼鱼,于 12 个实验桶(500 L)暂养,静水充气方式饲养,每日换水 1 次,暂养 2 周。设置 4 个温度梯度(18℃、13℃、8℃和 5℃),18℃作为对照组,每个温度梯度设置 3 个平行,每个平行 30 尾幼鱼。暂养结束后,采用急性换水降温的方法,排掉海水的同时加入事先调至实验温度的海水,直到温度达到实验温度,使用亚美光 411-H 钛质加热器,控制温度在实验温度范围内,每隔 2 h 观察水温。实验过程中不投喂饵料,溶解氧为(6.80±0.12) mg/L,自然光照,胁迫 24 h 后结束实验。每个养殖桶取 3 尾,使用 200 mg/L MS-222 麻醉后,迅速在冰上完成解剖,每尾鱼分别取肝、脾、肾、脑、心、肠、肌肉、皮肤和性腺,浸入 10 倍体积的 RNA 保存液中(TIANGEN),4℃静置 24 h 后于-80℃保存。

### 1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链合成

使用 TIANGEN 总 RNA 提取试剂盒(DP419)进行 RNA 提取,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,使用紫外分光光度仪检测浓度。取 1 μg 总 RNA,按照 TransScript 反转录试剂盒(AT311-03)说明书合成 cDNA 第一链,将产物于-80℃冰箱保存,待下一步实验。

### 1.3 实时荧光定量 PCR

采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)的方法检测目的基因的表达情况,使用 Primer express 3.0 设计定量引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。参照 TransStart 说明书,在96孔板中配制20  $\mu\text{L}$  体系:2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10  $\mu\text{L}$ , 50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4  $\mu\text{L}$ , RNase-free ddH<sub>2</sub>O 7.4  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各0.6  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板1  $\mu\text{L}$ 。RT-qPCR 反应在 ABI StepOne plus 平台进行,PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性30 s, 二步法 PCR (94 $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环), 反应结束后绘制熔解曲线以确保扩增的特异性和准确性。

表1 RT-qPCR 用到的引物序列  
Tab.1 Primers used for RT-qPCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
$\beta$ -actin F	ATCGTTGGTCGCCCCAGGCACC
$\beta$ -actin R	CTCCTTGATGTCAGCACGATTC
AFP-F	TCACGAACGGAGGTCTTTCT
AFP-R	TGCCACTTGTTTGGCTTGTA
CIRP-F	ATGGCGACAGGAGTTATGGT
CIRP-R	GTTCGTATCCACCCTGCATC
HMGB1-F	GACAAGGACATCGTTGCGTA
HMGB1-R	ATCCTCGTCGTCATCGTCTT
YB-1-F	AGAGGCTTCCGACCAAGATT
YB-1-R	GTTGGTTCTGACCACCTTCG

### 1.4 数据处理与分析

$\beta$ -actin 作为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算相对表达量。采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 检验比较各实验组之间的差异,  $P < 0.05$  表示存在显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 低温胁迫下 AFP 基因在各组织中的表达

红鳍东方鲀 AFP 基因在 18 $^{\circ}\text{C}$  的表达情况如图 1 所示,在所检测的组织中,该基因呈现广泛性表达,在肌肉中表达量最高( $P < 0.05$ ),皮肤、肾脏次之,在性腺中表达量较低。各组织不同温度处理 24 h 后的结果如图 2 所示,随着温度降低,各组织中 AFP 基因的表达量基本呈显著升高的趋势,在 5 $^{\circ}\text{C}$  组达到最高值,相比对照组表达量升高且差异显著( $P < 0.05$ ),增幅较大,增幅最低的肾脏也在 18 倍以

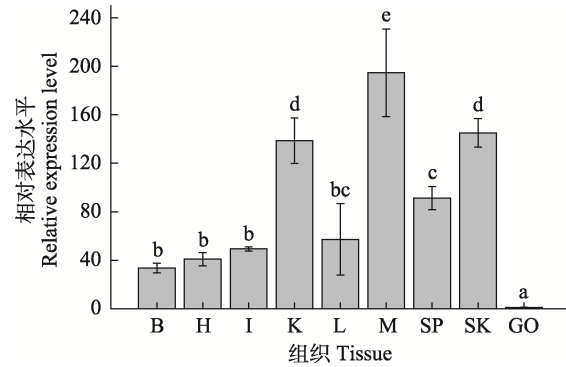


图1 AFP 基因的组织表达

Fig.1 Tissue-specific expressions of AFP gene

B: 脑; H: 心; I: 肠; K: 肾; L: 肝; M: 肌肉;  
SP: 脾; SK: 皮; GO: 性腺。

不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

B: Brain; H: Heart; I: Intestine; K: Kidney; L: Liver;  
M: Muscle; SP: Spleen; SK: Skin; GO: Gonad.

Different letters represent significant differences ( $P < 0.05$ ).  
The same as below.

上;在脑、心、肝、肌肉、性腺和皮肤中,5 $^{\circ}\text{C}$  组表达量显著高于 8 $^{\circ}\text{C}$  组( $P < 0.05$ ),在肾、肠、脾中 8 $^{\circ}\text{C}$  组和 5 $^{\circ}\text{C}$  组之间无显著差异。

### 2.2 低温胁迫下 CIRP 基因在各组织中的表达

红鳍东方鲀 CIRP 基因在 18 $^{\circ}\text{C}$  的表达情况如图 3 所示,在所检测的组织中该基因均有不同程度的表达,在肌肉中表达量最高( $P < 0.05$ ),在肠中表达量较低。各组织不同温度处理 24 h 后的结果如图 4 所示,随着温度的降低,各组织中 CIRP 基因的表达量的升降程度有所不同,肝、肾、脑的表达量呈先升高后降低再升高的趋势,在 13 $^{\circ}\text{C}$  组表达量显著高于对照组;心、肠和皮的表达量呈先升高后降低的趋势,在 8 $^{\circ}\text{C}$  组达到最大值,且 8 $^{\circ}\text{C}$  组和 5 $^{\circ}\text{C}$  组都显著高于对照组( $P < 0.05$ );在脾、肌肉和性腺中表达量呈上升趋势,在 5 $^{\circ}\text{C}$  组达到最高值,显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

### 2.3 低温胁迫下 HMGB1 基因在各组织中的表达

红鳍东方鲀 HMGB1 基因在 18 $^{\circ}\text{C}$  的表达情况如图 5 所示,在所检测的组织中该基因均有不同程度的表达,在肌肉中表达量最高( $P < 0.05$ ),在脑、心、肝和皮肤中也有较高的表达量,在其他组织中表达量较低。各组织不同温度处理 24 h 后的结果如图 6 所示,随着温度的降低,除肝脏外各组织中 HMGB1 基因的表达量基本呈先升高后降低的趋势,并在 8 $^{\circ}\text{C}$  组达到最大值,显著高于其他各组( $P < 0.05$ ),其中,最小的增幅出现在肌肉组织,增幅 3 倍以上;最大增幅出现

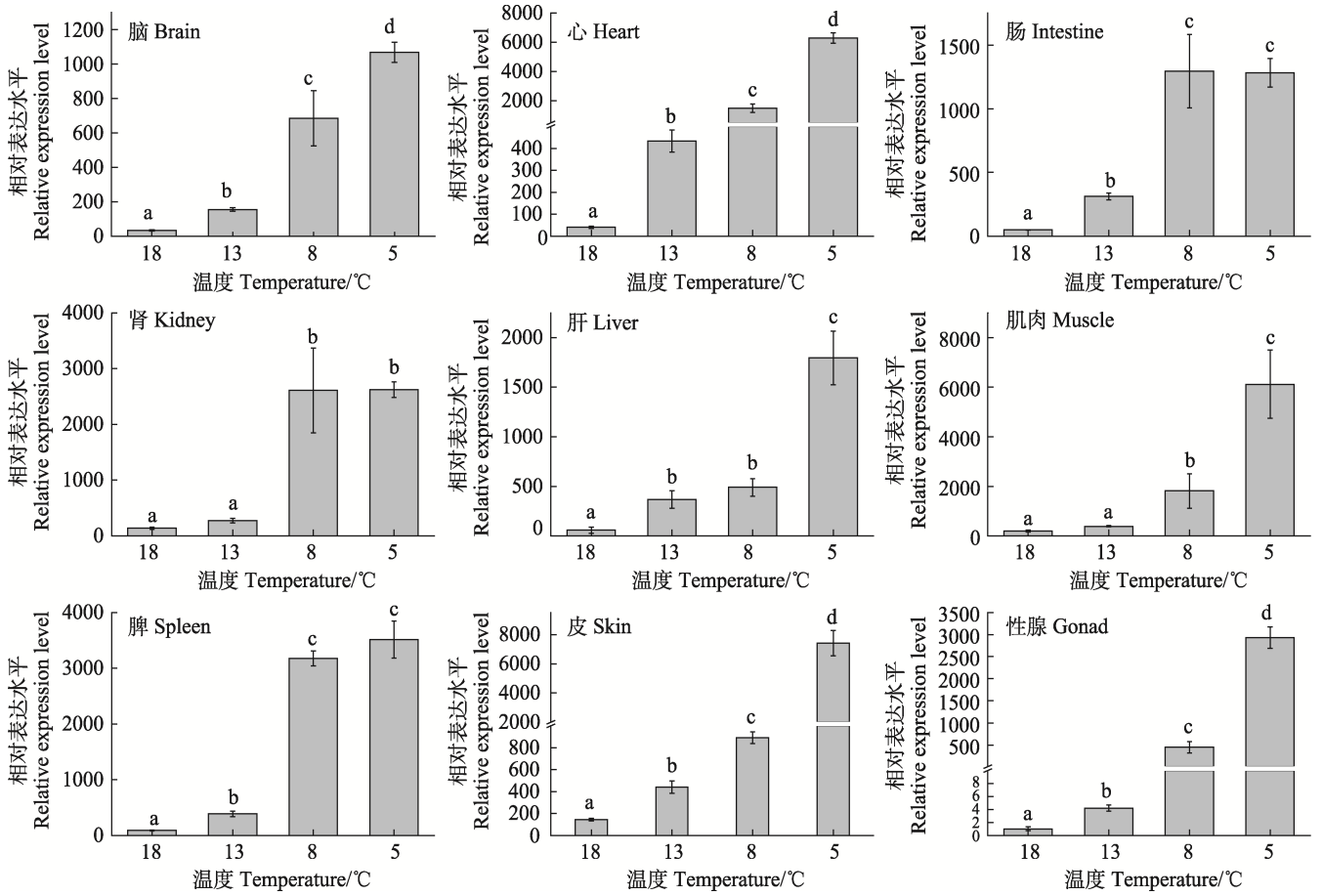


图 2 不同温度条件下 AFP 基因在红鳍东方鲀各组织中的表达

Fig.2 Expression of AFP gene in different tissues of *T. rubripes* at different temperatures

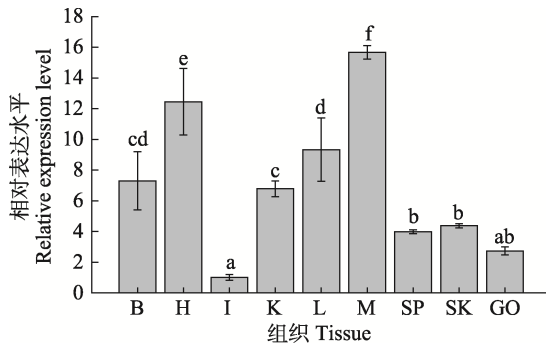


图 3 CIRP 基因组织表达

Fig.3 Tissue-specific expressions of CIRP gene

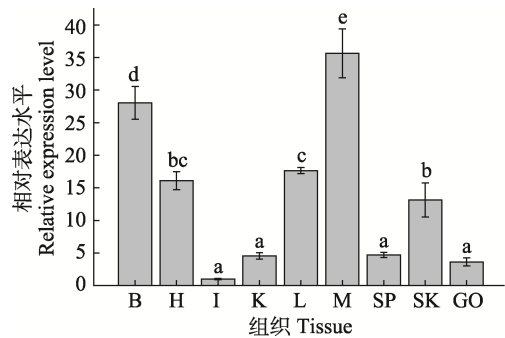


图 5 HMGB1 基因组织表达

Fig.5 Tissue-specific expressions of HMGB1 gene

在肠组织中, 增幅 70 倍以上; 肝脏中 HMGB1 基因的表达量在 13°C 组和 8°C 组表达量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 两组间无显著差异。

#### 2.4 低温胁迫下 YB-1 基因在各组织中的表达情况

红鳍东方鲀 YB-1 基因在 18°C 的表达情况如图 7 所示, 该基因在肌肉中表达量最高 ( $P < 0.05$ ), 在其他组织中表达量较低。各组织不同温度处理 24 h 后的

结果如图 8 所示, 随着温度的降低, 各组织中 YB-1 基因的表达量的升降程度有所不同, 在大部分组织中 (脑、心、肠、肾、肝、肌肉和脾) 表达量呈先升高后降低再升高的趋势, 在 8°C 组达到最小值, 其中, 主要表达组织 (肌肉) 中的表达量降幅超过 5 倍; 除肠外, 其他各组织在 8°C 组的基因表达量都显著低于其他各组 ( $P < 0.05$ ); 在皮肤和性腺中, 该基因的表达量在 5°C 组达到最大值, 显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ )。

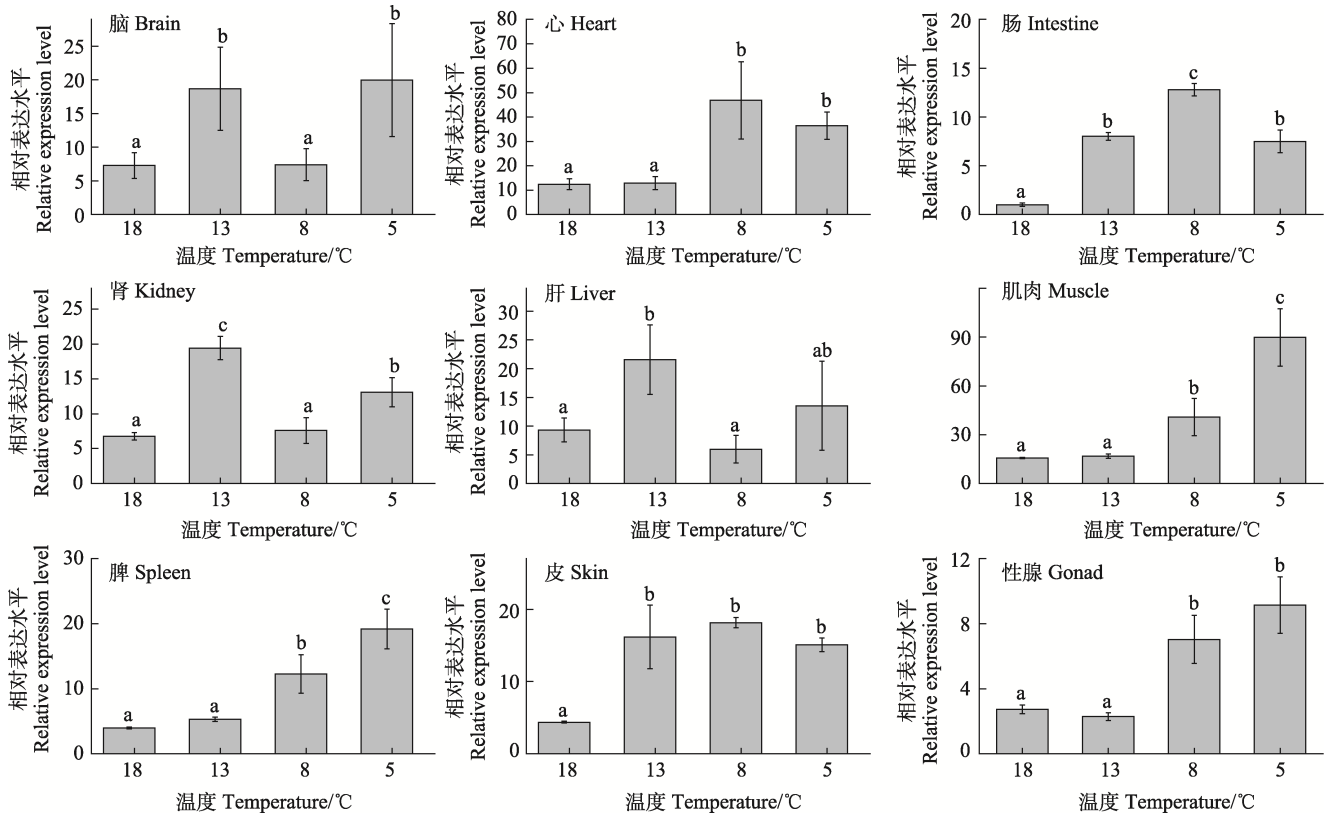


图4 不同温度条件下 CIRP 基因在红鳍东方鲀各组织中的表达

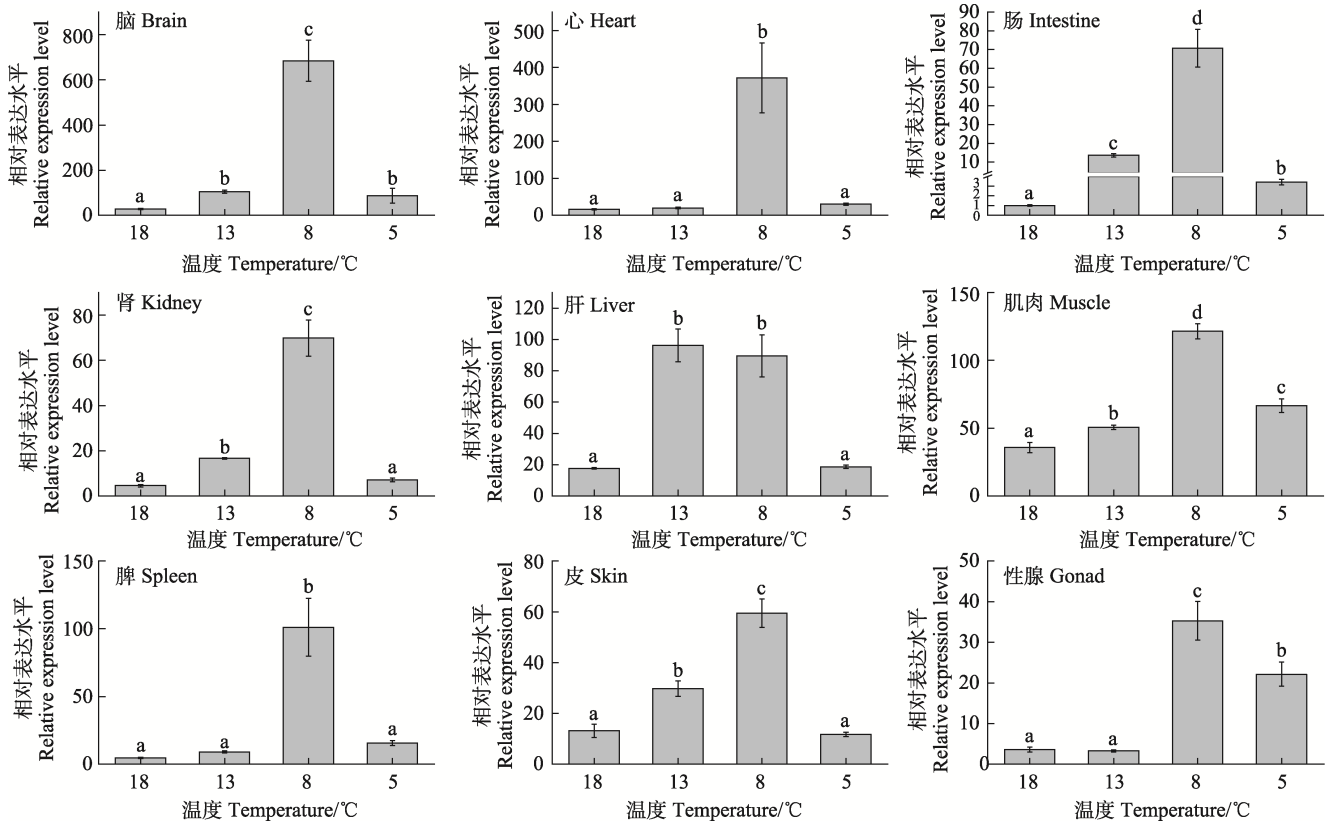
Fig.4 Expression of CIRP gene in different tissues of *T. rubripes* at different temperatures

图6 不同温度条件下 HMGB1 基因在红鳍东方鲀各组织中的表达

Fig.6 Expression of HMGB1 gene in different tissues of *T. rubripes* at different temperatures

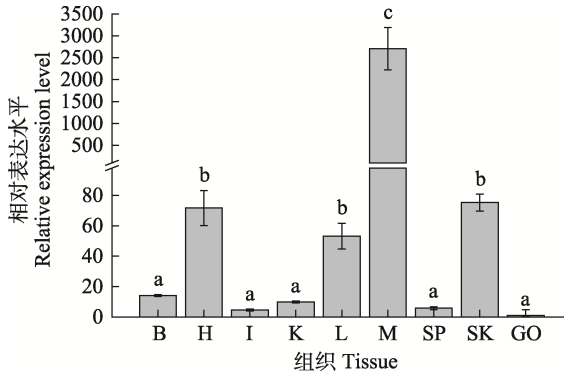


图 7 YB-1 基因组织表达  
Fig.7 Tissue-specific expressions of YB-1 gene

### 3 讨论

#### 3.1 低温胁迫下红鳍东方鲀 AFP 基因在各组织中的表达情况分析

抗冻蛋白具有控制冰晶的形成以及调节冰晶状态的作用, 分布比较广泛, 在动物、植物以及微生物中均可以发现 AFP 的存在(Duman *et al*, 2001; Bale

*et al*, 2002; Davies *et al*, 2016)。在抗寒应用方面, 转基因烟草、马铃薯获得了更高的抗冻能力(黄永芬等, 1997; 沈立晓等, 1998)。在斑马鱼胚胎的早期阶段, 将 AFPs 导入斑马鱼胚胎可增强细胞的冷冻保护(Martinez-Páramo *et al*, 2009)。在红鳍东方鲀中, 关于 AFP 基因与抗寒性关系的研究尚未见报道。本研究发现, 在所检测的组织中(肝、脾、肾、脑、心、肠、肌肉和性腺), 该基因呈现广泛性表达模式, 这与 Low 等(1998)在杜父鱼(*Myoxocephalus scorpius*)中的研究结果相一致。同时, 随着温度的降低, 各组织中 AFP 基因的表达量基本呈显著升高的趋势, 这可能是由于鱼类作为变温动物, 当环境温度降低时, 内部各组织都需面临低温的风险, AFP 基因在应对低温胁迫时具有组织广适性, 对各个组织都具有保护功能, 其广泛分布以及低温诱导表达有利于对各组织的保护。另外, 在本研究中, 低温胁迫下 AFP 基因表达在各组织中的变化趋势一致, 且都在最低温度 5℃ 组达到最高值, 据此推测, 红鳍东方鲀 AFP 基因更多是通过直接保护组织免受冻害的方式来完成其抗寒性能。

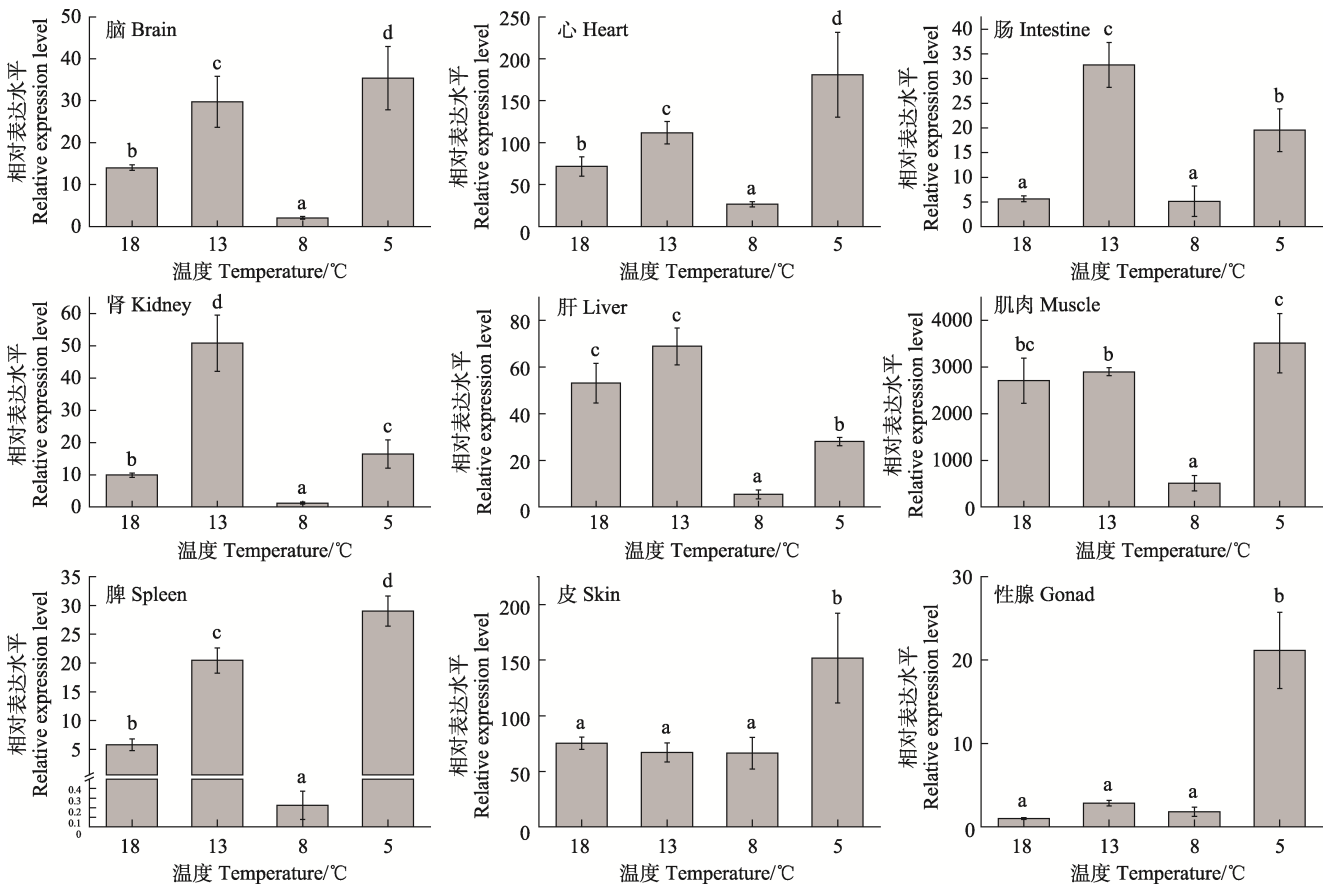


图 8 不同温度条件下 YB1 基因在红鳍东方鲀各组织中的表达  
Fig.8 Expression of YB-1 gene in different tissues of *T. rubripes* at different temperatures

### 3.2 低温胁迫下 CIRP 基因在各组织的表达分析

冷诱导 RNA 结合蛋白 CIRP 最早在哺乳动物中发现,是一种参与机体应激调节的蛋白(Nishiyama *et al*, 1997),其基因表达量在冷刺激下急剧增加,具有介导冷诱导细胞生长抑制作用,因此,被视为冷诱导的标记基因(Nishiyama *et al*, 1998)。本研究中,CIRP 基因在所检测的组织中均有不同程度的表达,在肌肉中表达量最高。这种广泛性表达的模式在多种鱼类的研究中都有发现,如牙鲆 CIRP 基因在脑、鳃、心、肌肉、肝、肠等组织都有不同程度的表达,具有较广的表达谱(胡金伟等, 2015);大黄鱼 CIRP 基因在肝脏中表达量最高,在肌肉、肾、鳃、皮肤、肠、脑、脾和心等组织中也有一定的表达(苗亮等, 2017),大西洋鲑(*Salmo salar*)肝、肾、心中也都能检测到 CIRP 基因表达,且组织间不存在显著差异(Feng *et al*, 2004)。以上结果表明,CIRP 基因的组织分布呈现广泛性,又具有物种特异性。另外,本研究还发现,随着温度的降低,各组织中 CIRP 基因的表达量的升降程度有所不同,呈现出不同的表达谱,这可能与不同组织的生理特性、行使的生物学功能不同等因素有关。皮肤和肌肉中 CIRP 基因在低温下都呈现升高的趋势,且 3 个低温组都显著高于对照组,这与大黄鱼(苗亮等, 2017)的研究结果相类似,大黄鱼皮肤和肌肉 CIRP 基因在整个降温过程中呈持续升高趋势,且在最低温度组中表达量最高。另外,苗亮等(2017)发现,脾和肠中 CIRP 基因的表达量较低,且表达量随温度降低而降低,与本研究的结果有所不同,其原因可能是 2 种鱼类的抗寒性能不同。本研究涉及到的低温过程并未超越红鳍东方鲀的耐受能力,在实验期间,CIRP 基因在大多组织中仍然能够发挥正常的调控作用。

### 3.3 低温胁迫下 HMGB1 基因在各组织的表达分析

HMGB1 是一种染色质相关的非组蛋白,对核小体形成、转录调控和炎症反应具有重要作用。在哺乳动物中,核 HMGB1 在核小体结构稳定性、DNA 错配修复和基因表达调控中发挥重要作用(Bustin *et al*, 1999; Stros *et al*, 2010; Tang *et al*, 2010)。在硬骨鱼中也有报道,其在鱼类早期发育以及免疫应答方面起到重要作用(Zhao *et al*, 2011; Cai *et al*, 2014)。本研究发现,在所检测的组织中,该基因均有不同程度的表达,在肌肉中表达量最高,在脑、心、肝和皮肤中也有较高表达量,在其他组织中表达量较低。类似表达模式在多种鱼类中有报道,如牙鲆(胡金伟等, 2015)、红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*) (Cai *et al*, 2014)、草鱼(*Ctenopharyngodon*

*idella*) (Yang *et al*, 2013)、金鱼(*Carassius auratus*) (Xie *et al*, 2014)等。本研究还发现,随着温度的降低,除肝脏外,各组织中 HMGB1 基因的表达量基本呈先升高后降低的趋势,并在 8℃组达到最大值,显著高于其他各组;在肝脏中也呈现相同的趋势,最高值出现在 13℃组且与 8℃组无显著差异。一方面,说明在低温胁迫下 HMGB1 基因发挥了调控功能(Vornanen *et al*, 2005);另一方面,5℃对红鳍东方鲀来说已经是难于生存的温度,因此, HMGB1 基因在 5℃组的低表达可能超越了该基因的调控极限。目前,在低温胁迫下鱼类 HMGB1 基因的研究报道仍然较少,更多的反应调节机制需要进一步研究。

### 3.4 低温胁迫下 YB-1 基因在各组织的表达分析

YB-1 基因作为一个胁迫响应基因,不同种类的应激,如冷休克、氧化剂应激、重金属应激、缺氧和紫外线照射等都能触发 YB-1 基因的响应(Koike *et al*, 1997; Kohno *et al*, 2003; Rauen *et al*, 2016; Li *et al*, 2018),在这些过程中,YB-1 基因可以作为转录因子调节应激反应基因的转录,也可以同 mRNA 结合调节翻译过程。本研究中,YB-1 基因在肌肉中表达量最高,显著高于在其他组织中的表达量。这种表达模式同其他物种的结果有所不同,如红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*) Y-box 基因转录活性最强的组织是神经,在心、肠和肌肉中的表达量很低(孟庆国等, 2012); Y-box 基因在中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*) 体腔液、管足、围口膜、雄性性腺、雌性性腺、肌肉和肠 7 个不同组织中均有表达,但差异不显著(田焱等, 2013);小鼠的 YB-1 基因在性腺中表达量最高,其次是肾、心、肌肉、肝等。以上结果表明,不同物种 Y-box 基因应对环境变化的方式有所不同,红鳍东方鲀 YB-1 基因可能在肌肉中发挥重要的环境调控作用。本研究还发现,在大多数组织中(其中包括主要的表达组织肌肉),8℃组的表达量最低,显著低于对照组,并且这些组织中 5℃组 YB-1 基因表达又有不同程度的回升,这些结果一方面说明 YB-1 基因在红鳍东方鲀中受冷诱导,在肌肉中以降低表达的方式应对低温胁迫;另一方面,8℃时该基因发挥主要的调节作用。

## 4 结论

本研究通过荧光定量 PCR 技术对红鳍东方鲀肝、脾、肾、脑、心、肠、肌肉、性腺和皮肤中 4 个与低温相关基因的表达量进行检测,结果显示,4 个基因在不同温度条件下、不同组织中均有不同程度的表

达, 其中, 皮肤和肌肉普遍呈现高表达, 且在低温胁迫下存在显著性变化, 这说明皮肤和肌肉作为外界环境的密切接触者, 在应对温度变化方面发挥重要的作用。另外, 从不同温度下 4 个基因的表达变化规律来看, 8℃ 可能是红鳍东方鲀应对低温胁迫的关键调控点, 过低的温度会造成其调控紊乱, 此结果可为研究红鳍东方鲀低温应答调控机制提供相关依据。

## 参 考 文 献

- ABDEL-TAWWAB M, WAFEEK M. Influence of water temperature and waterborne cadmium toxicity on growth performance and metallothionein-cadmium distribution in different organs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Thermal Biology*, 2014, 45: 157–162
- AL-FAGEEH M B, SMALES C M. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochemical Journal*, 2006, 397(2): 247–259
- BALE J S. Insects and low temperatures: From molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2002, 357(1423): 849–862
- BUSTIN M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Molecular Cell Biology*, 1999, 19: 5237–5246
- CAI J, XIA H, HUANG Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of high mobility group box1 (Ls-HMGB1) from humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 40(2): 539–544
- CAI L Y, NIAN L Y, CAO A L, *et al.* Research progress in the structure-function relationship of aquatic antifreeze proteins and its application in food processing and storage. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(22): 346–352 [蔡路均, 年琳玉, 曹爱玲, 等. 水产源抗冻蛋白构效关系及在食品加工储藏中应用的研究进展. *食品工业科技*, 2018, 39(22): 346–352]
- CAI X, GAO C, SU B, *et al.* Expression profiling and microbial ligand binding analysis of high-mobility group box-1 (HMGB1) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 78: 100–108
- CUI J, LI J L, WANG Z Y, *et al.* Cloning of gene of carrot antifreeze protein and its transformation to sugar beet. *China Beet and Sugar*, 2019(3): 18–22 [崔杰, 李俊良, 王琮玉, 等. 胡萝卜抗冻蛋白基因克隆及对甜菜遗传转化的研究. *中国甜菜糖业*, 2019(3): 18–22]
- DAVIES P L. Antarctic moss is home to many epiphytic bacteria that secrete antifreeze proteins. *Environmental Microbiology Reports*, 2016, 8(1): 1–2
- DUMAN J G, OLSEN T M. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology*, 1993, 30(3): 322–328
- DUMAN J G. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual Review of Physiology*, 2001, 63: 327–357
- ELISEEVA I A, KIM E R, GURYANOV S G, *et al.* Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Moscow)*, 2011, 76(13): 1402–1433
- FENG P, ZARATE J, CHOUDHURY A, *et al.* Osmotic stress of salmon stimulates upregulation of a cold inducible RNA binding protein (CIRP) similar to that of mammals and amphibians. *Biochimie*, 2004, 86(7): 451–461
- HE J, XIE T L, LI X, *et al.* Molecular cloning of Y-box binding protein-1 from mandarin fish and its roles in stress-response and antiviral immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 93: 406–415
- HU J W, YOU F, WANG Q, *et al.* Cloning and expression analysis of cold-tolerance related genes, CIRP and HMGB1, in *Paralichthys olivaceus*. *Marine Sciences*, 2015, 39(1): 29–38 [胡金伟, 尤锋, 王倩, 等. 牙鲆耐寒相关基因 CIRP、HMGB1 的克隆及表达特征分析. *海洋科学*, 2015, 39(1): 29–38]
- HUANG Y F, WANG Q Y, FU G R, *et al.* The research on introducing flounder antifreeze protein gene (*afp*) into tomato. *Chinese Biochemical Journal*, 1997, 13(4): 418–422 [黄永芬, 汪清胤, 付桂荣, 等. 美洲拟鲈抗冻蛋白基因(*afp*)导入番茄的研究. *生物化学杂志*, 1997, 13(4): 418–422]
- ISLAM M A, UDDIN M H, UDDIN M J, *et al.* Temperature changes influenced the growth performance and physiological functions of Thai pangas *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture Reports*, 2019, 13: 100179
- ISLAM M J, SLATER M J, BÖGNER M, *et al.* Extreme ambient temperature effects in European seabass, *Dicentrarchus labrax*: Growth performance and hemato-biochemical parameters. *Aquaculture*, 2020, 522: 735093
- KLOKS C P A M, SPRONK C, LASONDER E, *et al.* The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 316(2): 317–326
- KOHNO K, IZUMI H, UCHIUMI T, *et al.* The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays*, 2003, 25(7): 691–698
- KOIKE K, UCHIUMI T, OHGA T, *et al.* Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Letters*, 1997, 417(3): 390–394
- LANGE S S, VASQUEZ K M. HMGB1: The jack of all trades protein is a master DNA repair mechanic. *Molecular Carcinogenesis*: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center, 2009, 48(7): 571–580
- LI G, WANG L, WANG Y, *et al.* Developmental characterization and environmental stress responses of Y-box binding protein 1 gene (*AccYB-1*) from *Apis cerana cerana*. *Gene*, 2018, 674: 37–48
- LOW W K, MIAO M, EWART K V, *et al.* Skin-type antifreeze protein from the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius*. Expression and characterization of am r9, 700 recombinant



- protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(36): 23098–23103
- MARTÍNEZ-PÁRAMO S, BARBOSA V, PÉREZ-CEREZALES S, *et al.* Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology*, 2009, 58(2): 128–133
- MENG Q G, CHEN J, HUANG Y Q, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the cold shock protein Y-box coding gene of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Freshwater Fisheries*, 2012(6): 16–22 [孟庆国, 陈静, 黄艳青, 等. 红螯螯虾冷休克蛋白 Y-box 编码基因的克隆及表达分析. *淡水渔业*, 2012(6): 16–22]
- MIAO L, LI M Y, CHEN Y Y, *et al.* Cloning of cold inducible RNA-binding protein(CIRP) gene in *Larimichthys crocea* and its expression analysis under cold treatments. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(4): 481–489 [苗亮, 李明月, 陈莹莹, 等. 大黄鱼冷诱导结合蛋白(CIRP)基因 cDNA 克隆及低温胁迫对其时空表达的影响. *水产学报*, 2017, 41(4): 481–489]
- NISHIYAMA H, ITOH K, KANEKO Y, *et al.* A glycine-rich rna-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *Journal of Cell Biology*, 1997, 137(4): 899–908
- NISHIYAMA H, XUE J H, SATO T, *et al.* Diurnal change of the cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) expression in mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 245(2): 534–538
- PARK J S, ARCAROLI J, YUM H K, *et al.* Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2003, 284(4): C870–C879
- RAUEN T, FRYE B C, WANG J, *et al.* Cold shock protein YB-1 is involved in hypoxia-dependent gene transcription. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 478(2): 982–987
- RAYMOND J A, DEVRIES A L. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74(6): 2589–2593
- SHEN L X, CHEN L G. Research progress of cold resistance genetic engineering of plant. *Journal of Biology*, 1998, 15(6): 2–4 [沈立晓, 陈力耕. 植物抗寒基因工程的研究进展. *生物学杂志*, 1998, 15(6): 2–4]
- STROS M. HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1799(1/2): 101–113
- SWAMYNATHAN S K, NAMBIAR A, GUNTAKA R V. Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *FASEB Journal*, 1998, 12(7): 515–522
- TANG D, KANG R, ZEH H J, *et al.* High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2010, 14(7): 1315–1335
- TIAN Y, ZHANG B L, CHANG Y Q, *et al.* Molecular characteristics and expression analysis of Y-box gene from sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(3): 376–389 [田隼, 张丙龙, 常亚青, 等. 中间球海胆 Y-box 基因分子特性和表达分析. *水产学报*, 2013, 37(3): 376–389]
- VORNANEN M, HASSINEN M, KOSKINEN H, *et al.* Steady-state effects of temperature acclimation on the transcriptome of the rainbow trout heart. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2005, 289(4): R1177–R1184
- WANG S Y, LI X K, ZHOU Y F, *et al.* Research progress in antifreeze mechanism and genetic engineering of antifreeze protein. *Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science)*, 2012, 30(2): 58–63 [汪少芸, 李晓坤, 周焱富, 等. 抗冻蛋白的作用机制及基因工程研究进展. *北京工商大学学报(自然科学版)*, 2012, 30(2): 58–63]
- WEN B, JIN S R, CHEN Z Z, *et al.* Plasticity of energy reserves and metabolic performance of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) exposed to low-temperature stress. *Aquaculture*, 2017, 481: 169–176
- XIE J, HODGKINSON J W, LI C, *et al.* Identification and functional characterization of the goldfish (*Carassius auratus* L.) high mobility group box 1 (HMGB1) chromatin-binding protein. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 44(1): 245–253
- XU D, YOU Q, CHI C, *et al.* Transcriptional response to low temperature in the yellow drum (*Nibea albiflora*) and identification of genes related to cold stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2018, 28: 80–89
- XU K, CHEN D H, WANG Z, *et al.* Sequencing analysis and expression characteristics of AFP gene in *Bombus terrestris*. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science)*, 2019, 39(5): 74–81 [徐凯, 陈东海, 王志, 等. 熊蜂抗冻蛋白基因序列分析及表达特性研究. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(5): 74–81]
- YANG C, PENG L, SU J. Two HMGB1 genes from grass carp *Ctenopharyngodon idella* mediate immune responses to viral/bacterial PAMPs and GCRV challenge. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 39(3): 133–146
- ZHANG J F, TAO X F, HAN B S. Function, evolution, and application of antifreeze proteins in Antarctic fish. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(3): 355–361 [张俊芳, 陶筱帆, 韩兵社. 南极鱼抗冻蛋白功能和进化及其应用研究进展. *中国水产科学*, 2020, 27(3): 355–361]
- ZHAO X, KUJA-PANULA J, ROUHIAINEN A, *et al.* High mobility group box-1 (HMGB1; amphoterin) is required for zebrafish brain development. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(26): 23200–23213
- ZHONG Q W, FAN Q J. Advances in fish antifreeze protein research. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002, 34(2): 124–130 [钟其旺, 樊廷俊. 鱼类抗冻蛋白的研究进展. *生物化学与生物物理学报(英文版)*, 2002, 34(2): 124–130]

## Response of AFP, CIRP, HMGB1 and YB-1 Gene of *Takifugu rubripes* to Low-Temperature Stress

LIU Zhifeng<sup>1,2</sup>, MA Aijun<sup>1,2①</sup>, SUN Jianhua<sup>1</sup>, ZHU Liguang<sup>1,2</sup>, BAO Yulong<sup>3</sup>, ZHANG Tao<sup>3</sup>, YU Lanliang<sup>4</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Dalian Tianzheng Aquaculture Co., Ltd., Dalian, Liaoning 116600, China; 4. Weihai Yinze Biological Co., Ltd, Yantai, Shandong 264404, China)

**Abstract** Environmental conditions regulate the growth and reproduction of fish. The increase in sea temperature during winter may have adverse effects on *Takifugu rubripes*. To study the mechanism of low-temperature tolerance of *T. rubripes*, the expression of antifreeze protein (AFP) gene, cold-induced RNA binding protein (CIRP) gene, high mobility group protein box-1 (HMGB1) gene, and Y-box binding protein (YB-1) gene in the liver, spleen, kidney, brain, heart, intestine, muscle, gonad, and skin tissues of *T. rubripes* obtained from different temperatures [0](18°C, 13°C, 8°C, and 5°C) was analyzed by quantitative real-time PCR. The results showed that the AFP gene was widely expressed in tissues, with the highest expression in the muscle ( $P<0.05$ ). With the decrease in temperature, the expression of the AFP gene in each tissue showed a significant increasing trend, reaching the highest value in the 5°C group. The expression of the CIRP gene was the highest in the muscle ( $P<0.05$ ). With a decrease in temperature, the trend of CIRP gene expression in various tissues was different. The CIRP gene expression levels of liver, kidney, brain, heart, intestine, and skin showed a trend of initial increase, followed by a decrease, and then an increase. The expression levels in the spleen, muscle, and gonads showed an upward trend, reaching the highest value in the 5°C group. The expression of the HMGB1 gene was the highest in muscle ( $P<0.05$ ), followed by that in the brain, liver, heart and skin. As the temperature decreased, the expression of the HMGB1 gene in all tissues except the liver increased first and then decreased, and reached the maximum value in the 8°C group, which was significantly higher than that of the other groups ( $P<0.05$ ). The expression of the YB-1 gene was the highest in the muscle ( $P<0.05$ ), with the lowest expression level in other tissues. As the temperature decreased, the expression level of most tissues (brain, heart, intestine, kidney, liver, muscle, and spleen) increased first, then decreased, and then increased, reaching the minimum value in the 8°C group ( $P<0.05$ ). These results show that the expression levels of the four genes are different at different temperature, reflecting the functional specificity of these four genes. Under low-temperature stress, these genes responded positively. Their expression changed to varying degrees, suggesting that the four genes may have potentially important roles in the adaptation of *T. rubripes* to low temperatures. In addition, by analyzing the law of gene expression, 8°C may be the key regulatory point for *T. rubripes* to deal with low-temperature stress. Too low temperature may cause its regulation disorder. The results of this study can provide a relevant basis for studying the regulation mechanism of the low-temperature response of *T. rubripes*.

**Key words** *Takifugu rubripes*; Low-temperature stress; AFP; CIRP; HMGB1; YB-1; Quantitative real-time PCR

① Corresponding author: MA Aijun, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn