

HMG(High-Mobility Group Box Protein)在刺参 (*Apostichopus japonicus*)肠道再生期间的 表达情况分析*

缪婷¹ 孙丽娜² 杨红生² 王芳^{1①}

(1. 教育部海水养殖重点实验室 中国海洋大学水产学院 青岛 266003;
2. 海洋生态与环境科学重点实验室 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 测定了一种核酸内非组蛋白类蛋白 HMG(High-mobility group box protein)在刺参肠道再生第 30 分钟、1、2、6 小时、1、3、7 天的 mRNA 表达情况, 结果显示, 再生第 6 小时之前, 表达量与正常刺参肠道相比无显著变化, 再生第 1-7 天, 其表达量显著高于对照组, 并于第 7 天达到最大值。采用免疫荧光技术, 分析测定了 HMG 在刺参肠道再生各时期的蛋白表达情况, 结果显示, 再生第 2、6 小时, HMG 蛋白荧光信号弱, 仅在浆膜层和黏膜层有少量分布; 再生第 1-7 天, HMG 蛋白荧光信号逐渐增强, 再生第 1 天的 HMG 荧光主要分布在浆膜层和肌肉层, 再生第 3 天和第 7 天的荧光信号最强, 各层均有分布。结合 HMG 在其他物种组织修复再生中的作用, 推测 HMG 可使免疫系统识别损伤信号, 启动修复再生功能, 调控细胞外基质(ECM)成分的降解与生成, 诱导干细胞迁移、分化, 并可能在伤口愈合阶段过后参与细胞免疫。

关键词 刺参; HMG; 肠道再生; qRT-PCR; 免疫荧光

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)04-0148-07

再生是动物应对环境不适的一种适应能力, 且对动物存活具有重要作用, 可以认为是细胞、组织或器官的重新生长过程(Rychel *et al*, 2009; Sánchez Alvarado *et al*, 2006)。目前, 国内外有关无脊椎动物再生方面的研究多集中于腔肠动物门的水螅(*Hydra attenuate*) (Schmidt *et al*, 1986), 扁虫动物门涡虫类扁虫(*Schmidtea mediterranea*)、环节动物门寡毛类蚯蚓(*Enchytraeus japonensis*) (Agata *et al*, 1999; Alvarado *et al*, 2002; Norman *et al*, 2001; Yoshida-Noro *et al*, 2010), 棘皮动

物门海盘车(*Asterina Burtoni*; *Coscinasterias tenuispina*; *Oxycomanthus japonicus*)和海参(*Holothuria glaberrima*)等(Achituv *et al*, 1991; Alves *et al*, 2002; García-Arrarás *et al*, 1998; Rubilar *et al*, 2005; Shibata *et al*, 2010)。

刺参(*Apostichopus japonicus*)是我国一种经济价值极高的海珍品。组织器官损伤后, 刺参可以在短时间内完成重建。“吐脏”是刺参的一种特殊行为, 遇外界刺激或遇敌后, 其将肠道、呼吸树、生殖腺等内

* 国家自然科学基金(41406168; 41076103)资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41406168; 41076103)]. 缪婷, E-mail: daisyting629@163.com

① 通讯作者: 王芳, 教授, E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn

收稿日期: 2016-07-11, 收修改稿日期: 2016-08-02

1) Sun LN. Histocytological events and analysis of key genes during intestine regeneration in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013, 13-31[孙丽娜. 仿刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 消化道再生的组织细胞特征与关键基因分析. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2013, 13-31]

脏器官排出体外, 3周左右再生出完整的、功能完善的内脏器官(孙丽娜, 2013)¹⁾。

目前, 海参(Echinodermata, Holothuroidea)肠道再生的研究主要集中在肠壁组织层的起源与变化(Mashanov *et al.*, 2001; Rojascartagena *et al.*, 2007), 细胞起源、迁移与增殖等细胞学事件的发生(San Miguel-Ruiz *et al.*, 2007)。研究发现, 与海参肠道再生特异性相关的基因主要有细胞骨架基因(如 Actin)、和发育密切相关的基因(如 Wnt 和 Hox)(Sun *et al.*, 2013b)、对抗炎症反应和形态发生有重要作用的血清淀粉样蛋白 A (Serum Amyloid A Protein, SAA)同源物(Santiago *et al.*, 2000)、神经重塑有关的室管膜蛋白基因(Suarez-Castillo *et al.*, 2004)。近年来, 人们借助 EST 库的构建、芯片技术和高通量测序等技术, 构建了 EST 文库(Ortiz-Pineda *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2006)、再生转录组(Sun *et al.*, 2013a)、基因表达谱(Sun *et al.*, 2011), 以期在更高通量上对这一多基因调控过程的机制进行探索。

HMG(High-mobility group box protein)是一种多功能细胞因子, 也是一类核酸内非组蛋白类蛋白, 能与特异性的受体结合, 参与组织损伤修复、细胞迁移、再生等重要生命进程, 并应答炎症反应等, 已被证实再生行为中发挥作用(Kuehl *et al.*, 1979; De Mori *et al.*, 2007; Straino *et al.*, 2008; Limana *et al.*, 2005), 而在低等动物再生中的调控作用尚不清楚。在刺参再生转录组与表达谱研究中发现, HMG 参与了刺参肠道再生过程(Sun *et al.*, 2013a), 并测定了该基因在刺参肠道再生的第 3、7、14、21 天的 mRNA 水平表达情况: 再生期间 HMG 的表达量呈先增高后降低的趋势, 再生的第 7 天, HMG 表达量达到最大值, 为对照组的 4.5 倍, 后逐渐降低, 至第 21 天表达量基本恢复到正常水平, 推测其在肠道再生过程中使免疫系统识别损伤信号, 启动修复再生功能(孙丽娜, 2013)¹⁾。而刺参肠道再生过程中的 HMG 蛋白水平的表达情况还未见报道, 再生早期阶段的 mRNA 水平的表达情况也未知。

本研究采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术测定 HMG 在刺参肠道再生第 0.5、1、2、6 小时及第 1、3、7 天 mRNA 水平的表达情况, 并通过免疫荧光实验测定了 HMG 蛋白在刺参肠道再生关键时期的空

间表达情况, 以期更深入的探明 HMG 对刺参肠道再生的调控作用。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验用体重为 100–120 g 的刺参于 2015 年 11 月采集于青岛。实验前将刺参在实验室水池中暂养 7 d, 暂养水温为 15–17℃, 每日换水 1/2, 投饵 1 次。暂养结束后, 向刺参腹腔注射 0.35 mol/L KCl 溶液 1–2 ml, 诱导其吐脏, 吐脏后的刺参养于水池中, 水温为 15–17℃, 每日换水 1/2, 不投饵料。

分别在刺参吐脏后的第 0.5、1、2、6 小时, 第 1、3、7 天解剖刺参, 取出再生的肠道, 每次取样 15 只刺参。将肠道组织放入冻存管中, 经液氮速冻后保存于–80℃超低温冰箱, 用于后续 qRT-PCR 实验。用同样的方法取 15 只未刺激吐脏刺参的正常肠道作为对照组。

同时, 在吐脏后第 2、6 小时和第 1、3、7 天解剖刺参, 取出再生的肠道, 每次取样 10 只刺参。肠道置于 4%多聚甲醛固定液中浸泡过夜, 分别经过 25%、50%、75%、100%酒精梯度脱水后, 石蜡包埋, 4℃冰箱暂时保存, 用于后续免疫组化实验。以同样的方法取 15 只未刺激吐脏刺参的正常肠道作为对照组。

1.2 RNA 提取及基因表达定量

RNA 提取实验采用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction kit (TaKaRa, 日本)试剂盒, 根据说明书中的要求进行。RNA 的完整性和浓度分别通过 1%凝胶电泳与 Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)仪器测定。qRT-PCR 实验以提取的 RNA 为模板, 用 Prime-Script™ RT reagent kit with gDNA eraser 试剂盒 (TaKaRa)反转出第一链 cDNA 作为后续 qRT-PCR 实验的模板。每组 15 只刺参肠道样品, 5 只肠道混为 1 个样本, 每组共计 3 个样品。NADH 脱氢酶为本研究的内参基因。实验所需引物 NADH-F, NADH-R, HMG-F, HMG-R 的序列(表 1)参考孙丽娜(2013)¹⁾。实验体系及 PCR 程序参考 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit II 试剂盒(TaKaRa)说明书, 设置见表 2。qRT-PCR 程序: 95℃预变性 5 s; 95℃变性 10 s, 60℃复性 20 s, 72℃延伸 30 s, 共 40 个循环; 添加溶

1) Sun LN. Histocytological events and analysis of key genes during intestine regeneration in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013, 93–102 [孙丽娜. 仿刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 消化道再生的组织细胞特征与关键基因分析. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2013, 93–102]

表1 qRT-PCR 引物序列(孙丽娜, 2013)¹⁾Tab.1 Primers sequences for qRT-PCR (Sun, 2013)¹⁾

引物 Primer	序列 Sequence
HMG-F	5'-GAGGAAAGCCAAGTATGACAGG-3'
HMG-R	5'-CGATTCTTCTTCTTCTGTGCT-3'
NADH-F	5'-GTCCTACGACCCAATCTGGA-3'
NADH-R	5'-ATGAGCCTTGTTACGTTGG-3'

解曲线, 以检测扩增产物是否单一。每个反应设置4次平行并记录好对应的 Ct 值, 用于后续基因表达量分析。

实验前以5个稀释点(10倍稀释)的cDNA为模板, 绘制HMG基因的标准反应曲线并计算PCR反应的效率(The PCR efficiency, E)和相关系数(Correlation coefficient, R^2)。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法对HMG基因的相对表达量进行计算, 对照组与实验组之间的差异采用SPSS 18.0进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为显著差异。

表2 qRT-PCR 体系

Tab.2 Reagents for qRT-PCR

试剂 Reagents	用量 Amounts (μ l)
SYBR Green Master Mix	10
F引物(10 mmol/L)	0.4
R引物(10 mmol/L)	0.4
1 : 10 diluted cDNA	2.0
dH ₂ O	7.2

1.3 免疫组化

将包埋好的刺参肠道标本进行切片处理, 切好的蜡片贴附于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 60℃烘5 h使石蜡融化。免疫组化具体实验步骤: 将石蜡切片置于二甲苯中脱蜡5 min, 重复2次; 石蜡切片分别经过100%乙醇1 min、95%乙醇1 min、75%乙醇1 min、50%乙醇1 min、25%乙醇1 min、蒸馏水2 min、PBS 2 min \times 2次; 将切片置于柠檬酸钠抗原修复液中, 微波炉中火加热6 min至微沸, 重复4次; 将切片置于1%牛血清蛋白中, 室温轻摇封闭30 min; 一抗以1 : 1000稀释于封闭液中, 在切片上滴加稀释好

的一抗孵育液, 于湿盒中37℃孵育1 h, 实验用抗体为Anti-HMG rabbit polyclonal antibody (BBI Life Science); 用PBS充分清洗3次, 每次10 min, 用滤纸擦去标本外的PBS; 荧光二抗以1 : 2000稀释于PBS中, 在切片上滴加稀释好的二抗孵育液, 于湿盒中37℃避光孵育45 min, 实验用抗体为Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L); 用PBS充分清洗3次, 每次10 min, 用滤纸擦去标本外的PBS; 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 在荧光显微镜下立即观察。

2 结果

2.1 刺参肠道再生初始阶段 HMG mRNA 的表达

利用qRT-PCR技术分析测定了HMG mRNA在刺参肠道再生初始阶段的表达情况(图1)。qRT-PCR最后的溶解曲线为单峰, 证明扩增的PCR产物具有特异性。

qRT-PCR结果显示, 在刺参肠道再生的较早期阶段(吐脏后第30分钟、第1、2、6小时), HMG mRNA的相对表达量与正常刺参肠道相比并无显著变化; 从再生第1天开始, 该基因的表达量显著升高, 再生第7天达到最大值(图1)。

2.2 刺参肠道再生各阶段 HMG 蛋白表达情况

利用免疫荧光技术, 用多克隆抗体分别与再生各阶段的刺参肠道组织切片中的相应蛋白进行免疫反应, 分析HMG蛋白在刺参肠道再生各阶段的空间表达情况, 免疫荧光显色结果见图2(绿色荧光为杂交信号)。对照组刺参肠道各层(从外向内分别为: 浆膜层、肌肉层、黏膜下层、黏膜层)分化明显, 黏膜下层为最厚层, 肌肉层较薄, HMG蛋白荧光信号较弱, 主要集中于黏膜下层。再生过程中, 肠道组织结构发生巨大变化, 肠壁各层组织明显变薄且较为杂乱, 分化不明显。再生第2、6小时, HMG蛋白荧光信号弱, 仅在浆膜层和黏膜层有少量分布。再生第1-7天, HMG蛋白荧光信号逐渐增强, 再生第1天, HMG荧光主要分布在浆膜层和肌肉层, 再生第3、7天, 荧光信号强, 各层均有分布。

1) Sun LN. Histocytological events and analysis of key genes during intestine regeneration in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013, 93-102 [孙丽娜. 仿刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 消化道再生的组织细胞特征与关键基因分析. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2013, 93-102]

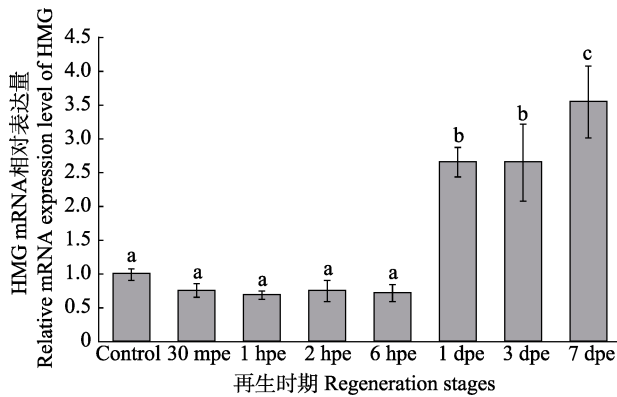


图 1 刺参肠道 HMG 基因相对表达量

Fig. 1 Relative expression levels of intestine HMG of *A. japonicus*

Control: 未经处理的肠道组织; 30 mpe、1 hpe、2 hpe、6 hpe、1 dpe、3 dpe 和 7 dpe 分别为刺激排脏后再生 30 min、1 h、2 h、6 h、1 d、3 d、7 d 的肠道组织; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 纵坐标值为平均值 \pm 标准差 ($n=3$)

Control: Non-eviscerated sea cucumbers; 30 mpe, 1 hpe, 2 hpe, 6 hpe, 1 dpe, 3 dpe, and 7 dpe were 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 6 hours, 1 day, 3 days, and 7 days post-evisceration, respectively. Different letters indicated significant differences ($P < 0.05$). The values of ordinate were shown as Mean \pm SD ($n=3$)

3 讨论

HMG 是一种多功能的细胞因子, 对高等动物胚胎发育、血管发生、血管再生、神经突生长、干细胞迁移、肿瘤发生等多种生物学进程都有重要作用(Degryse *et al*, 2001; Kim *et al*, 2006; Palumbo *et al*, 2004)。HMG 已被证实在许多再生行为中发挥重要作用, 如大鼠 (*Rattus norvegicus*) 肝脏再生(Kuehl *et al*, 1979)和骨骼肌肌肉再生(De Mori *et al*, 2007)、成年人皮肤再生(Straino *et al*, 2008)以及心肌再生(Limana *et al*, 2005)等, 而 HMG 对低等动物再生的调控作用尚未知。

HMG mRNA 表达量分析显示, HMG 在刺参正常的肠道中表达, 表明其基因产物是一种维持正常生命活动的转录因子。再生第 30 分钟, 第 1、2、6 小时, HMG mRNA 的表达量与正常刺参肠道相比并无显著变化; 免疫荧光结果显示, 肠道再生第 2、6 小时与对照组 HMG 蛋白的表达情况并无明显变化, 这与 HMG mRNA 表达情况一致。结合刺参 HMG mRNA 水平和蛋白的表达情况来看, 在肠道再生第 1 天以

前, HMG 可能并不发挥调控作用。再生的第 1、3、7 天, 该基因的 mRNA 表达量显著高于正常生理状态下, 于第 7 天达到最大值, 这与孙丽娜等(2013)¹⁾测定的 HMG 在刺参肠道再生过程中的 mRNA 表达情况相一致; HMG 蛋白荧光信号也逐渐增强, 浆膜层、肌肉层、黏膜下层、黏膜层均有荧光信号分布, 到第 7 天达到荧光亮度的最大值, 表明 HMG 蛋白在这一阶段大量积累。

在动物再生的过程中, 细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)成分往往会发生剧烈变化, ECM 降解与重建可以调控细胞活性和细胞迁移与分化(Brown *et al*, 2014)。高等动物 HMG 与再生相关研究表明, HMG 在组织受损修复的过程中可以通过激活糖基化终产物受体来调控 ECM 中胶原的合成与降解(Zhang *et al*, 2012)。被破坏的或者凋亡的细胞中, HMG 产物可以“被动释放”至细胞外基质中; ECM 中的 HMG 蛋白成为被先天免疫系统识别的“损伤标记物”, 当其含量过多时证实组织受损伤, 启动修复功能(Ulloa *et al*, 2006)。从本研究中可以看出, 从刺参肠道再生第 1 天开始, HMG 表达量相比对照组增多, 很有可能作为“损伤标记物”被先天免疫系统识别, 启动肠道再生修复的功能。

研究发现, 在组织修复再生的过程中, HMG 可以激活干细胞, 通过其蛋白浓度效应诱导干细胞迁移通过内皮屏障, 进入健康正常的组织中分化成普通的细胞(Palumbo *et al*, 2004)。刺参肠道再生第 0–2 天为肠系膜伤口愈合阶段, 第 2–5 天为原基形成阶段, 一般认为, 原基的形成是刺参肠道再生真正的起点。在刺参肠道再生早期, 新生组织的细胞来源于细胞去分化和细胞迁移, 原基细胞主要来源于肠系膜的间充质干细胞(Yang *et al*, 2015)。HMG 从肠道再生第 1 天开始表达量逐渐升高, 因此推测, HMG 可能对再生早期原基形成过程中的干细胞迁移起作用。Zhang 等(2012)研究发现, 在小鼠(*Mus musculus*)上皮组织伤口愈合过程中, HMG 在多种促炎因子的作用下释放到细胞外基质中, 在伤口愈合结束后又反过来诱导受损部位的细胞分泌后续免疫反应的相关调控因子及巨噬细胞免疫蛋白, HMG 可能在伤口愈合阶段(第 0–2 天)过后也参与了细胞免疫过程。

1) Sun LN. Histocytological events and analysis of key genes during intestine regeneration in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013, 93–102 [孙丽娜. 仿刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 消化道再生的组织细胞特征与关键基因分析. 中国科学院研究生院 (海洋研究所) 博士学位论文, 2013, 93–102]

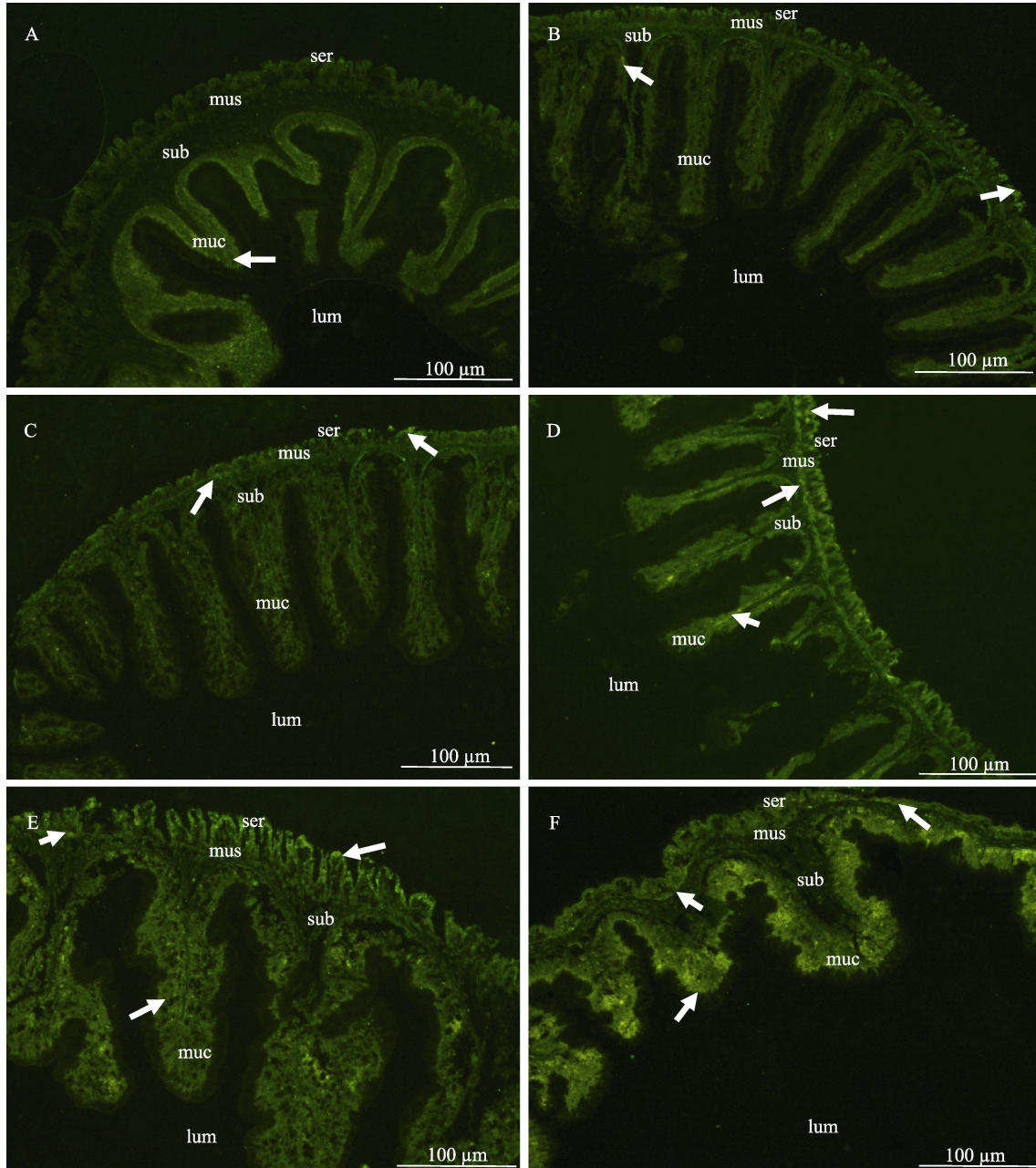


图 2 再生过程中刺参 HMG 在肠道组织的表达分布

Fig. 2 Expression of *A. japonicus* HMG protein at different regeneration stages

A: 对照组; B: 再生第 2 小时; C: 再生第 6 小时;

D: 再生第 1 天; E: 再生第 3 天; F: 再生第 7 天; 箭头表示荧光信号

A: Control; B: 2 hours post-evisceration (hpe); C: 6 hpe; D: 1 day post-evisceration (dpe); E: 3 dpe; F: 7 dpe;

Arrows indicated fluorescence signals; ser: 浆膜层 Serosa; mus: 肌肉层 Muscle;

sub: 黏膜下层 Submucosa; muc: 黏膜层 Mucosa; lum: 肠腔 Intestinal lumen

结合 HMG 在其他物种组织修复再生中的作用与其在刺参肠道再生过程中的表达变化来看, 推测 HMG 可能使免疫系统识别损伤信号, 启动修复再生功能, 调控 ECM 成分的降解与生成, 诱导干细胞迁移、分化, 并在肠道再生后期参与细胞免疫。

参 考 文 献

- Achituv Y, Sher E. Sexual reproduction and fission in the sea star *Asterina burtoni* from the Mediterranean coast of Israel. *Bulletin of Marine Science*, 1991, 48(3): 670-678
- Agata K, Watanabe K. Molecular and cellular aspects of

- planarian regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 1999, 10(4): 377–383
- Alvarado AS. The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development*, 2002, 129(24): 5659–5665
- Alves L, Pereira A, Ventura C. Sexual and asexual reproduction of *Coscinasterias tenuispina* (Echinodermata: Asteroidea) from Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Biology*, 2002, 140(1): 95–101
- Brown BN, Badylak SF. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Translational Research*, 2014, 163(4): 268–285
- De Mori R, Straino S, Di Carlo A, *et al.* Multiple effects of high mobility group box protein 1 in skeletal muscle regeneration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007, 27(11): 2377–2383
- Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, *et al.* The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology*, 2001, 152(6): 1197–1206
- García-Arrarás JE, Estrada-Rodgers L, Santiago R, *et al.* Cellular mechanisms of intestine regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothuroidea: Echinodermata). *Journal of Experimental Zoology*, 1998, 281(4): 288–304
- Kim JB, Choi JS, Yu YM, *et al.* HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *Journal of Neuroscience*, 2006, 26(24): 6413–6421
- Kuehl L. Synthesis of high mobility group proteins in regenerating rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254(15): 7276–7281
- Limana F, Germani A, Zacheo A, *et al.* Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit⁺ cell proliferation and differentiation. *Circulation Research*, 2005, 97(8): e73–e83
- Mashanov VS, Dolmatov IY. Regeneration of digestive tract in the pentactulae of the far-eastern holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota). *Invertebrate Reproduction & Development*, 2001, 39(2): 143–151
- Norman MD, Finn J. Revision of the *Octopus horridus* species-group, including erection of a new subgenus and description of two member species from the Great Barrier Reef, Australia. *Invertebrate Systematics*, 2001, 15(1): 13–35
- Ortiz-Pineda PA, Ramírez-Gómez F, Pérez-Ortiz J, *et al.* Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber. *BMC Genomics*, 2009(10): 262
- Palumbo R, Bianchi ME. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 68(6): 1165–1170
- Rojascartagena C, Ortizpineda PA, Ramirezgomez F, *et al.* Distinct profiles of expressed sequence tags during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Physiological Genomics*, 2007, 31(2): 203–215
- Rubilar T, de Ward CTP, de Vivar MED. Sexual and asexual reproduction of *Allostichaster capensis* (Echinodermata: Asteroidea) in Golfo Nuevo. *Marine Biology*, 2005, 146(6): 1083–1090
- Rychel AL, Swalla BJ. Regeneration in hemichordates and echinoderms. *Stem Cells in Marine Organisms*, 2009, 245–265
- Sánchez Alvarado A, Tsonis PA. Bridging the regeneration gap: Genetic insights from diverse animal models. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(11): 873–884
- Santiago P, Roig-López JL, Santiago C, *et al.* Serum amyloid A protein in an echinoderm: Its primary structure and expression during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Journal of Experimental Zoology*, 2000, 288(4): 335–344
- San Miguel-Ruiz JE, García-Arrarás JE. Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *BMC Developmental Biology*, 2007(7): 115
- Schmidt T, David CN. Gland cells in Hydra: Cell cycle kinetics and development. *Journal of Cell Science*, 1986, 85(1): 197–215
- Shibata TF, Oji T, Akasaka K, *et al.* Staging of regeneration process of an arm of the feather star *Oxycomanthus japonicus* focusing on the oral-aboral boundary. *Developmental Dynamics*, 2010, 239(11): 2947–2961
- Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, *et al.* High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: Involvement in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 2008, 128(6): 1545–1553
- Suárez-Castillo EC, Medina-Ortiz WE, Roig-López JL, *et al.* Ependymin, a gene involved in regeneration and neuroplasticity in vertebrates, is overexpressed during regeneration in the echinoderm *Holothuria glaberrima*. *Gene*, 2004, 334: 133–143
- Sun L, Chen M, Yang H, *et al.* Large scale gene expression profiling during intestine and body wall regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2011, 6(2): 195–205
- Sun L, Yang H, Chen M, *et al.* RNA-Seq reveals dynamic changes of gene expression in key stages of intestine regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *PLoS One*, 2013a, 8(8): e69441
- Sun LN, Yang HS, Chen MY, *et al.* Cloning and expression analysis of Wnt6 and Hox6 during intestinal regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Genetics Molecular Research*, 2013b, 12(4): 5321–34
- Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe. *Cytokine & Growth Factor Reviews*,

- 2006, 17(3): 189–201
- Yang H, Hamel JF, Mercier A. The sea cucumber *Apostichopus japonicus*: History, biology and aquaculture. Amsterdam: Academic Press, 2015
- Yoshida-Noro C, Tochinai S. Stem cell system in asexual and sexual reproduction of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida). *Development, Growth and Differentiation*, 2010, 52(1): 43–55
- Zhang Q, O’Hearn S, Kavalukas SL, *et al.* Role of high mobility group box 1 (HMGB1) in wound healing. *Journal of Surgical Research*, 2012, 176(1): 343–347
- Zheng FX, Sun XQ, Fang BH, *et al.* Comparative analysis of genes expressed in regenerating intestine and non-eviscerated intestine of *Apostichopus japonicus* Selenka (Aspidochirotida: Stichopodidae) and cloning of ependymin gene. *Hydrobiologia*, 2006, 571(1): 109–122

(编辑 马璀艳)

Expression Analysis of HMG (High-Mobility Group Box Protein) During the Intestine Regeneration of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

MIAO Ting¹, SUN Lina², YANG Hongsheng², WANG Fang¹①

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

2. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract High-mobility group box protein (HMG) is a novel cytokine that takes part in inflammation, cell migration, and tissue damage and regeneration. Regeneration usually involves the regrowth of cells, tissues and organs, and plays an essential role in the survival and adaptation of a species. Sea cucumbers *Apostichopus japonicus* (Echinodermata, Holothuroidea), which are phylogenetically related to invertebrates, are capable of regenerating damaged organs and body parts, such as the intestine, the respiratory tree, the gonads and the body wall. Sea cucumbers can eviscerate intestines and other organs through the cloaca in response to external stimulations. Within a few weeks after losing an organ or an appendage, the sea cucumber is able to regenerate the missing parts. These animals are thus excellent candidate models for research on organ regeneration. In this study, we analyzed the expression of mRNA and proteins of HMG during the intestine regeneration in sea cucumber using qRT-PCR and immunofluorescence techniques, respectively. The results showed that compared to the control group, there was no significant rise in the expression of either mRNA or proteins of HMG from 30-minute to 6-hour post-evisceration. HMG mRNA expression was significantly upregulated from 1-day to 7-day post-evisceration. The protein expression was higher as well compared to the control group. These results suggested that HMG was involved in the intestine regeneration of *A. japonicus* and could participate in the activation of the innate immune system in response to tissue damages, and hence was required in the processes such as repair, remodeling of extracellular matrix (ECM), and the induction of stem cell migration and differentiation.

Key words *Apostichopus japonicus*; HMG; Intestine regeneration; qRT-PCR; Immunofluorescence

① Corresponding author: WANG Fang, E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn