急性低氧胁迫下海月水母 *HIF-1 α* 基因的表达

王国善^①, 甄毓^②, 王敏晓^③, 王建艳^①, 石岩^②, 米铁柱^②, 孙松^{③④}, 于志刚^{④*}

① 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003;

② 中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 青岛 266100;

③ 中国科学院海洋研究所, 海洋生态与环境科学重点实验室, 青岛 266071;

④ 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 青岛 266100

* 联系人, E-mail: zhigangyu@ouc.edu.cn

2013-05-10 收稿, 2013-10-29 接受, 2104-04-28 网络版发表

国家重点基础研究发展计划(2011CB403602)和国家自然科学基金(41106133)资助

摘要 许多研究表明, 水母能够耐受低氧环境, 但是并不清楚其生理与分子机制. 本研究根据海月水母转录组测序结果, 获得了海月水母低氧诱导因子(HIF)的部分基因序列, 利用实时荧光定量 PCR 方法检测海月水母 *HIF* 基因在低氧条件下(溶解氧约为 0.5 mg L^{-1})的表达变化情况. 结果表明, 在低氧条件下, 海月水母幼体 *HIF-1 α* 的基因相对表达量经过一定时间的培养后显著高于对照组; 以管蛋白基因为内参基因, *HIF-1 α* 基因相对表达量在培养 3, 6, 12, 18, 48 和 72 h 时分别为对照组(饱和溶解氧)的 83.2%, 102.4%, 122.8%, 301.3%, 140.3% 和 150.7%. 表明低氧环境中海月水母 *HIF* 基因表达量在转录水平有极为显著的增加, 这为从分子水平揭示水母耐受低氧环境的机制提供了新的视点.

关键词

海月水母
低氧诱导因子
低氧

在海洋生态系统中, 随着海水中溶解氧降低到低氧水平, 进行有氧呼吸的生物会急剧减少^[1,2]. 因此, 出现在河口及其邻近海域的季节性低氧严重影响着近海生态系统的稳定^[3]. 据报道, 钵水母类(*Chryasora quinquecirrha*)在溶解氧为 0.5 mg L^{-1} 的海水中能够存活 48 h, 而栉水母(*Mnemiopsis leidy*)能够存活 96 h^[4]. 在低氧条件下(1 mg L^{-1}), 海月水母(*Aurelia aurita*)水母体(伞径为 $103.1 \pm 12.4 \text{ mm}$)的伞部收缩率相对于对照组(饱和溶解氧)无明显变化, 但捕食率却显著升高^[5,6]. 相对于其他海洋动物 2 mg L^{-1} 的平均半数亚致死溶解氧浓度, 水母能够明显地耐受小于 2 mg L^{-1} 的低氧环境. 许多学者推测, 正是此种低氧适应的特性使得水母能够在季节性低氧常发的河口及其邻近海域的生态系统中获得种群竞争优势, 进而导致其种群数量和出现频率的急剧增加^[4,7,8].

尽管某些水母能够耐受低氧并且频繁出现在低

氧海域, 但是对此现象的机制性研究并不多见^[9,10], 关于其分子调控机制的研究则尚未见报道. 最早, Semenza 和 Wang^[11~13]发现在哺乳动物和人类细胞中存在一类受低氧诱导表达的转录因子, 称之为低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF). 低氧诱导因子是由 *HIF-1 α* 和 *HIF-1 β* (芳香烃受体核转位子, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) 2 个亚基构成的异二聚体. 二者都包含基本的螺旋-环-螺旋结构域(helix-loop-helix, bHLH)、PAS(Per-Arnt-Sim)结构域、氨基末端氧依赖降解域(N-terminal oxygen dependent degradation domain, NODD)、羧基末端氧依赖降解域(C-terminal oxygen dependent degradation domain, CODD)和 C-末端转录激活结构域 (C-terminal transactivation domain, CTAD)5 个功能结构域^[14]. 其中, bHLH 和 PAS 结构域参与蛋白质-蛋白质和蛋白质-DNA 的结合, NODD, CODD 和 CTAD 结构域介导在有氧条件下 HIF 蛋白的降解^[15]. *HIF-1 β* (ARNT)在细

引用格式: 王国善, 甄毓, 王敏晓, 等. 急性低氧胁迫下海月水母 *HIF-1 α* 基因的表达. 科学通报, 2014, 59: 1715–1722

Wang G S, Zhen Y, Wang M X, et al. Hypoxia induced gene expression under acute hypoxic stress in *Aurelia* sp.1 (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 1715–1722, doi: 10.1360/972013-217

胞内组成型表达, 而 HIF-1 α 的稳定性受低氧诱导. 进一步的研究证实, 低氧诱导因子是维持细胞内氧稳态和响应细胞内低氧的重要调节因子^[16]. 组织或者细胞内缺氧会引起转录因子 HIF 的累积, 进而上调众多 HIF 靶基因的表达, 使得细胞内物质和能量代谢由有氧向无氧转变^[17,18], 从而使生物体更好地适应低氧环境. Loenarz 等人^[19]研究发现, 在现存的后生动物细胞内均有 HIF 的存在. 因此, 对水母耐受低氧的分子机制研究可以从 HIF 入手.

本文以海月水母转录组测序结果为基础, 通过克隆、测序获得海月水母 HIF 基因的部分序列, 然后利用实时荧光定量 PCR 方法检测海月水母 HIF 基因在低氧条件下的表达情况, 以期从分子水平揭示水母耐受低氧的机制, 为研究低氧环境与海月水母暴发的关系提供依据.

1 材料与方法

(i) 材料来源. 海月水母(*Aurelia* sp.1)水母体(伞径为 2.0 $\pm$ 0.3 cm)由中国科学院海洋研究所提供.

(ii) 海月水母低氧培养. 取过滤后的海水置于 2 个直径为 80 cm、厚度为 30 cm 的密闭培养缸中, 分别设置为对照组和低氧组. 对照组维持饱和溶解氧; 而低氧组则以纯度为 99.9% 的氮气通入过滤海水中, 持续鼓泡, 并检测海水溶解氧的变化. 控制低氧组培养缸中海水的溶解氧(dissolved oxygen, DO)为 0.5 mg L⁻¹ 左右, 用于后续实验. 实验过程中用 HQ30d 多参数水质分析仪(Hach, 美国)监控溶解氧变化.

将直径约为 2.0 cm 的海月水母幼体室温(18 $^{\circ}$ C)培养 12 h 后, 分别挑取活性较好的海月水母幼体 45 只分别放入对照组和低氧组培养缸中. 在培养 3, 6, 12, 18, 48 和 72 h 后分别从对照组和低氧组中随机取 3 只水母作为样本. 另外将低氧组培养 12 h 的海月水母随机选取 3 只放入一个培养容器中, 在与对照组相同的环境中(饱和溶解氧)培养 12 h 后取样, 设为恢复组. 实验用海水 pH 为 7.83 $\pm$ 0.05、盐度为 32.2 $\pm$ 0.15. 各组溶解氧测定结果显示, 实验过程中低氧体系能够维持较为稳定的低氧环境(约为 0.5 mg L⁻¹), 而对照组的溶解氧也一直维持在 8.5 mg L⁻¹ 左右, 直至实验结束.

(iii) HIF-1 α 序列的获得. HIF-1 α 序列来自中国科学院海洋研究所使用 Roche 454 Flex(瑞士)测得的海月水母转录组数据(未发表). 利用 DNAMAN 7.0 软

件, 按照标准基因组遗传密码, 查找 HIF-1 α 序列可读框(open reading frame, ORF)进行编码预测. 将得到的 HIF-1 α 氨基酸序列与其他物种进行同源性比对.

(iv) 定量引物设计与合成. 从美国国家生物技术信息中心 GenBank 数据库中获取海月水母管蛋白基因(α -tubulin)序列 (AY226057.1). 利用 Primer Premier 5.0 分别设计 α -tubulin 和 HIF-1 α 的定量 PCR 引物 Qtubulin YF 和 Qtubulin YR, QHIF YF 和 QHIF YR(表 1). 引物由铂尚生物技术(上海)有限公司合成.

(v) 总 RNA 提取和 cDNA 合成. 采用 TransZol 试剂(北京全式金生物技术有限公司)提取单个海月水母幼体总 RNA, 利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 质量, 利用核酸蛋白仪(Picdrop, 英国)测定 RNA 浓度. 提取的 RNA 样品置于-80 $^{\circ}$ C 保存待用. 采用快速反转录试剂盒(PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time), 宝生物工程(大连)有限公司), 将 RNA 样品逆转录成 cDNA. cDNA 样品置于-20 $^{\circ}$ C 保存待用.

(vi) 定量引物的验证. 分别利用 2 种基因的定量引物对 cDNA 进行定量 PCR 扩增, 反应采用 SYBR 荧光定量试剂盒(罗氏诊断, 上海)进行, 定量 PCR 反应体系见表 2, 定量 PCR 反应过程为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58 $^{\circ}$ C 退火和延伸 1 min, 40 个循环. 分析 2 种引物定量 PCR 的溶解曲线, 验证定量引物的特异性.

(vii) 定量 PCR 检测 HIF-1 α 的相对表达量. 以

表 1 定量 PCR 引物列表

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增长度 (bp)
Qtubulin YF	AGACAGAATCAGAAAGTTGGCAGA	220
Qtubulin YR	GTGAGTGGTCAGGATGGAGTTG	
QHIF YF	TATTGTATGGGCTGTTCTGCTC	280
QHIF YR	AGTAATGGGGTGCCAACTGCTA	

表 2 定量 PCR 反应体系

定量 PCR 反应成分	加样量(μ L)
SYBR 荧光定量试剂(含内参染料 ROX)	10.0
Primer F(上游引物)	0.6
Primer R(下游引物)	0.6
BSA(牛血清白蛋白)(2 mg mL ⁻¹)	2.0
模板 cDNA	1.5
超纯水	5.3

管蛋白(α -tubulin)基因为内参基因检测海月水母中 *HIF-1 α* 在低氧条件下经不同时间培养后的表达变化情况. 定量 PCR 反应体系和反应过程同上. 每个样本重复 3 次. 最后, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行 *HIF-1 α* 基因的相对表达量分析.

2 结果

2.1 *HIF-1 α* 部分基因的获得

将测得的海月水母转录组数据(未发表)拼接后获得长度为 1477 bp 的 *HIF-1 α* 片段序列. 该序列经 DNAMAN 7.0 翻译后得到长度为 482 个氨基酸的多肽(图 1). 将从 GenBank 数据库中获取的其他代表性物种 *HIF-1 α* 氨基酸序列(XP_002112392.1, XP_002167197.1, XP_001637921.1, XP_392382.4, XP_967427.2, ACU30154.1, ABF83561.1, XP_783102.3, NP_956527.1, NP_001080449.1, NP_989628.1, NP_034561.2 和 NP_001521.1)与海月水母比对并进行系统进化分析(图 2). 由图 2 可见, 最简单的原始多细胞动物丝盘虫(*Trichoplax adhaerens*)^[20] 单独形成一个分支; 刺胞动物门的大乳头水螅(*Hydra magnipapillata*)、海月水母和明星海葵(*Nematostella vectensis*)聚类到一个分支, 其中海月水母与大乳头水螅聚的亲缘关系更为接近; 节肢动物中的昆虫纲(*T. castaneum* 和 *A. mellifera*)和甲壳纲(*L. vannamei* 和 *C. magister*)形成一个重要的分支; 棘皮动物紫色海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)和脊椎动物大类归为一个大的分支.

2.2 样品总 RNA 检测和定量引物验证

经过培养, 共获得 42 个海月水母 RNA 样品. 经琼脂糖电泳和核酸蛋白仪检测, RNA 的纯度和完整性较好.

以定量引物进行 PCR 检测(图 3). 引物 Qtubulin YF 和 Qtubulin YR 扩增 cDNA 条带单一且大小约为 200 bp, 切胶后测序结果与 AY226057.1 比对, 证实该条带为 α -tubulin 的部分序列. 引物 QHIF YF 和 QHIF YR 扩增结果, 目的条带单一且大小约为 300 bp, 测序结果亦证实该条带为 *HIF-1 α* 的部分序列.

两对引物进行 qPCR 的溶解曲线(图 4)均呈现较为锐利的单一峰, 表明定量 PCR 无引物二聚体或非特异性扩增产生.

2.3 *HIF-1 α* 的相对表达量

将测得的低氧环境中培养过的海月水母 *HIF-1 α* 相对表达量除以同时刻对照组 *HIF-1 α* 相对表达量(即将对照组 *HIF-1 α* 相对表达量设为 100%), 即可获得低氧环境培养过的海月水母 *HIF-1 α* 相对表达量相对于对照组的百分数(图 5). 在低氧培养过程中, *HIF-1 α* 的基因表达发生了显著变化. 以管蛋白基因为内参基因, 3 h 低氧组 *HIF-1 α* 的相对表达量为对照组的 83.2%, 6 和 12 h 时 *HIF-1 α* 的相对表达量上升到对照组的 102.4% 和 122.8%, 在 18 h 低氧组 *HIF-1 α* 的相对表达量高达对照组的 301.3% ($P < 0.01$), 在 48 h 依然为对照组的 140.3% ($P < 0.05$), 在 72 h 时稳定到 150.7% ($P < 0.05$) (图 5). 就恢复组而言, 低氧处理 12 h 后再在饱和溶解氧的海水中培养 12 h, *HIF-1 α* 相对表达量为对照组的 74.7%. 由此可见, 经过低氧环境培养一段时间后, *HIF-1 α* 的相对表达量显著高于对照组, 即海月水母 *HIF-1 α* 能够通过转录水平上表达量的变化来应对体外低氧环境的出现.

3 讨论

已有研究表明, 墨西哥湾北部^[21]、美国切萨匹克湾^[4]、日本濑户内海^[22]、欧洲黑海^[23]、中国长江口及其邻近海域^[24]等区域, 近年来都频繁出现低氧区. 值得注意的是, 近些年水母聚集和暴发也多发生在这些典型区域^[25-28], 特别是在濑户内海, Shoji 等人^[22]发现, 海水水母分布区域与夏季低氧区的分布相一致. 在夏季低氧区内, 水母类由于避免被摄食而受到的竞争压力明显减小, 摄食效率却明显增加, 有性生殖和无性生殖成功率大大提高. 水母耐受低氧环境的优势能够使其占据近海海洋生态系统中的优势生态位. 这可能是水母暴发的重要环境诱导因子^[4,7,8].

有关低氧环境与水母暴发关系的研究, 目前主要集中在水螅体和水母体对低氧的耐受性以及低氧环境下的无性生殖和摄食等. 例如, 有研究表明, 钵水母类水螅状体在溶解氧 1.5 mg L^{-1} 以上的低氧(1.5, 2.5, 3.5 mg L^{-1})环境中培养 24 d 存活率都高于 78.5%, 并且能够进行无性生殖产生水母体^[29]. 对海月水母(*A. aurita*)水螅体的实验室和野外观测也得到了类似的结果^[30,31]. 除此之外, 还有研究表明, 低氧环境还能促进海月水母浮浪幼虫的附着, 提高水母体的捕食率^[30,31]. 这些研究都说明, 水螅体和水母体等均具

DNAMAN1的翻译结果 (28~1477)

通用密码

总氨基酸数: 482; 分子量: 54405

最大可读框从第 1 个氨基酸开始 (第 28 个核苷酸) 共编码 482 个氨基酸 (1446 个碱基); 分子量: 54405

```

10      20      30      40      50      60      70
1  ACATTTGCAAAAAGCACACAAGAAAAGATGGCAAGAAGACCTGATAGTGAATTCAAAAGAAGAAGTCTCGTGAT
1      M A R R P D S E I Q K K K S R D

85      95      105     115     125     135     145
76  GCAGCTCGACAAAGAAGAGGGCAACAAAATGATGAATTCGAGAGCTTGCAAGCCAGTTGCCTATCATTCCCAAG
17  A A R Q R R G Q Q N D E F S E L A S Q L P I I P K

160     170     180     190     200     210     220
151 ACAACATCAAAATCTAGACAGACTGTGTGTGATGAGATTGTCTAACAGCTTTGTAAGATGAACATATTATCAGA
42  T T S N L D R L C V M R L S N S F V K M K H I I R

235     245     255     265     275     285     295
226 CAGGTGACAGGTACACTTCATAATATAAGAAAAGTGAATTTGATCACTGCACCAGAACTGTCAATAATG
67  Q V T G T L H N I K K E V N F E S T A P E L S I M

310     320     330     340     350     360     370
301 GATGCCTTAGATGGTTTCATCTTTGTGCTGTCTGAAGATGGACAGTGTCTTTATGTTTCTCAAATGTGGCACAG
92  D A L D G F I F V L S E D G Q C L Y V S F N V A Q

385     395     405     415     425     435     445
376 TATCTTGAATTTCTCAGCTTGACATCACAGGATGCAGTTTCTACAAATATGTACCCATGTGACCAAGAAGAG
117 Y L G I S Q L D I T G C S F Y K Y V H P C D Q E E

460     470     480     490     500     510     520
451 CTTGCTCAACAGCTTGGTGGCCAGGTTCCTTTGGAGGACATGAAATATTTGATGGGCTGTTCTGCTCAGATTTG
142 L A Q Q L G G Q V P L E D M E I F D G L F C S D L

535     545     555     565     575     585     595
526 CCATCCGTGATGAAAGCACAGGGGAAGAAACCAAGTGTGCAAGAAAAGGCATTCTGATTGGGATGCATGCAGATCA
167 P S V M K A Q G K K P V C K K R H S D W D A C R S

610     620     630     640     650     660     670
601 TTCTTCATAAGAATGAAGAGCACTTTGACAAGCAGGGGAAAGAGTGTGAATCTCAATGCATCTATCTACAGGGTT
192 F F I R M K S T L T S R G K S V N L N A S I Y R V

685     695     705     715     725     735     745
676 ATTCATGCAATTGGTAAAGTGCAAGTTACAGACAAAGTTCTCATCTGCAATGATGAACATAACACGACATGT
217 I H C I G K V Q S Y Q T K F S S A N D E L N T T C

760     770     780     790     800     810     820
751 TTGGTAGCAGTTGGCACCCCACTTACTGGCATCCCAACGTTTGATGTTCCACTTGATAAAACGACCTTCACCTCA
242 L V A V G T P L L A S P T F D V P L D K T T F T S

835     845     855     865     875     885     895
826 ACACATACACTGGACTTGGCAGTTATAGACATGGAAAATATTGCCTACAACTCCTGGGGTATGGTGAGAAAGAA
267 T H T L D L R V I D M E N I A Y N I L G Y G E K E

910     920     930     940     950     960     970
901 TTTCTTGATAAGTCGTGTACCACTACATCCATACCAGCGATATAAACGTCGTAAGATGATGCCATGAGTTAATG
292 F L D K S W Y Q Y I H T S D I N V V K S C H E L M

985     995     1005    1015    1025    1035    1045
976 CTGAGCAAAGGCCAATCAGTCAGTGGTTATTATCGAGTCTTGACGAAACAGGGAGGCTGGATTGGATGCTGACA
317 L S K G Q S V S G Y Y R V L T K Q G G W I W M L T

1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
1051 AAAGGGAATATTGTTTACTCAAACACATCATTCAACCACAATACATTATTAACATCAATTATGTTGTAAGTGGT
342 K G N I V Y S N T S F Q P Q Y I I N I N Y V V S G

1135    1145    1155    1165    1175    1185    1195
1126 GTGGAAAACAAAGAGCAACTCCTTGCTCAGAGCAGATGCAAGCGTAATCAAAATTACRAAGCAGGGGTGTAA
367 V E N K E Q L L A S E Q M Q S V I K I T K H G C K

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270
1201 CGAGCCACGAGACATCCAATAATTCAAACGCTGAGGCTGTCAAATTTCAAAGAGGTTGTCGTTCCCTTCCCTCC
392 R A H E T S N N S N G E A V K F Q R G C R S L P S

1285    1295    1305    1315    1325    1335    1345
1276 ACGCCCGGAGTGATAGTTTCAGCTCTGAAGAAAGCCTAGCTTCATCTAGAATGGAAGAGCTGGAGAGGATTATC
417 T P G S D S F S S E E S L A S S R M E E L E R I I

1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420
1351 AAAAACCAGGAACACTACGAAGACTTACTTGTGTAACAATATTCGCGCAGCAATGATTACGACAGTAGCATGGAA
442 K N Q E H Y E D L L A E Q Y S R S N D Y D S S M E

1435    1445    1455    1465    1475
1426 GACGAGGTGCCTAAATTGGAGGTAATCGATTTTGGAAACGCAATAACAGCC
467 D E V P K L E V I D F G N A N N S

```

图 1 海月水母部分 *HIF-1α* 序列

图2 海月水母(*Aurelia* sp.1)(下划线标注)与其他物种 HIF-1 α 氨基酸序列的系统进化分析

图3 PCR 结果电泳图

M 为 DNA Marker Trans 2K; 1 为引物 Qtubulin YF 和 Qtubulin YR 扩增结果; 2 为引物 QHIF YF 和 QHIF YR 扩增结果; K 为阴性对照

有耐受低氧环境的能力, 在低氧环境下都具有较强的竞争优势, 从而改变该生态系统的优势种群和能量流通途径. 针对水母应对海洋低氧的生理学机制研究, 目前见诸报道的仅有 Thuesen 等人^[10]的研究成果. 该研究发现, 水母体的胶质成分可以作为氧储存库, 在无氧条件下, 该部分储存的氧气可以满足水母体 2 h 的代谢需求. 然而, 储存的氧气仅可以满足水母体 2 h 的代谢需求, 这无法解释水母体如何能够在低氧环境下存活 48 h 或更长时间, 当然更不能解释水螅体耐受低氧几天甚至几十天的情况. Childress 和

图4 2种引物 PCR 产物的溶解曲线

(a) Tubulin YF 和 Qtubulin YR 的扩增结果; (b) QHIF YF 和 QHIF YR 扩增结果

图5 低氧环境中海月水母 *HIF-1α* 相对表达量随培养时间的变化

α -tubulin 为内参基因. * $P<0.05$; ** $P<0.01$

Seibel^[32]曾经提出,海洋动物应对海洋低氧的生理学机制可能包括高效获取海水中的氧、降低新陈代谢率以及利用无氧代谢 3 种途径. Shoji 等人^[22]研究发现,西班牙鲭鱼(*Scomberomorus niphonius*)通过提高鳃通气率和降低游动速度来应对环境低氧. 根据这些研究可以推想,对于水母在低氧环境下能够存活、生长和生殖的更合理性解释,可能是其具有一种能够在有氧代谢和无氧代谢之间转换的机制. 高等动物在低氧条件下能够通过低氧诱导因子来调控有氧代谢和无氧代谢的转换,那么,水母类是否也存在类似的转录因子? 本研究的结果表明,在海月水母(*A. sp.1*)细胞内确实存在能够维持细胞内氧稳态和响应细胞内低氧状态的低氧诱导因子. 低氧诱导因子受低氧诱导表达,进而调节细胞内的物质和能量代谢. 因此,以低氧诱导因子为中心的信号转导途径可能参与水母耐受低氧的分子调控并发挥关键作用.

已有研究发现,对 *HIF-1α* 的转录活性调控是发生在翻译后的蛋白质水平^[12,18]. 在以分子氧作为电子受体的前提下,脯氨酰羟甲基化酶(prolyl hydroxylase domain protein, PHD)和 *HIF* 抑制因子(asparaginyl hydroxylase factor inhibiting *HIF*, FIH)能够催化低氧诱导因子的羟甲基化反应^[32-36]. 羟甲基化的低氧诱导因子便能够在细胞内迅速被希佩尔-林道氏蛋白(von Hippel-Lindau, VHL)介导识别并降解^[37]. 换言之,在低氧条件下 *HIF-1α* 的转录活性会由于蛋白质水平的调控而升高. 近来对一些模式生物的研究发现,低氧

也能够转录水平上调 *HIF-1α* 的表达. 如有研究发现,丝盘虫(*T. adhaerens*)暴露于 2% 低氧浓度中时,其 *HIF* 的相对表达量比暴露于 21% 氧浓度时有一定程度的增加^[19]. 台湾田鼠(*Microtus kikuchii*)各组织经过低氧处理之后, *HIF-1α* 相对表达量明显升高^[38]. 本研究也表明,海月水母在低氧环境中经过一定时间培养后,其 *HIF-1α* 相对表达量显著高于对照组,说明低氧环境能够诱导海月水母 *HIF-1α* 表达量在转录水平上发生显著性变化. 值得注意的是,在低氧环境中, *HIF-1α* 的表达量并没有出现一直上升的趋势,而是呈现先快速升高,随着时间的延长逐渐降低并趋于稳定的变化规律. 在本研究中,经过 18 h 急性低氧胁迫后, *HIF-1α* 的表达量升高到对照组的 301.3%,同时随着海月水母在低氧环境中生活时间的延长,转录因子 *HIF-1α* 的降解遭到抑制,两方面的因素共同导致 *HIF-1α* 蛋白含量显著增加以满足调控需要. 这样 *HIF-1α* 的转录表达可能会受到足量 *HIF-1α* 蛋白的反馈调节而逐渐下降并趋于稳定. 这种机制表明,水母类具有在急性低氧胁迫下快速适应的能力,以此满足其在低氧环境内运动捕食的能量需求. 至于低氧环境中培养 3 h 后 *HIF-1α* 的相对表达量相对于对照组有所降低,则可能是海月水母对环境突变的应激反应.

应当指出的是,在低氧环境下,一方面细胞内 *HIF-1α* 的表达量升高,另一方面脯氨酰羟甲基化酶(细胞内的氧浓度感受器)因缺失电子受体而不能羟甲基化 *HIF-1α*,使得转录因子 *HIF-1α* 不能被降解,这必然导致低氧环境下细胞内转录因子 *HIF-1α* 的累积. *HIF-1α* 作为转录因子不仅能提高糖酵解各个反应关键酶的转录,如己糖激酶(hexokinase)、磷酸果糖激酶、果糖二磷酸醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase, ALDO)、(磷酸烯醇)丙酮酸羧激酶(phosphoenol pyruvate carboxylase),而且能够提高无氧代谢乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)^[39]的表达,抑制有氧代谢 TCA(tricarboxylic acid cycle)过程中关键酶的表达^[40],从而进行有氧代谢和无氧代谢的转换. 因此,在探讨低氧环境对水母暴发影响的研究中,确定了影响机制的基础之后,下一步就需要开展更加系统和细致的研究,包括不同氧气含量的影响(急性胁迫和较为长期的影响进行对比)、低氧环境对水母及其主要捕食者的影响等.

参考文献

- 1 Raquel V S, Duarte C M. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 15452–15457
- 2 Deutsch C, Brix H, Ito T. Climate-forced variability of ocean hypoxia. *Science*, 2011, 333: 336–339
- 3 Diaz R J. Overview of hypoxia around the world. *J Environ Qual*, 2001, 30: 275–281
- 4 Purcell J E, Breitburg D L, Decker M B, et al. Pelagic cnidarians and ctenophores in low dissolved oxygen environments: A review. In: Rabalais N N, Turner R E, eds. *Coastal Hypoxia: Consequences for Living Resources and Ecosystems*. Washington D C: American Geophysical Union, 2001. 77–97
- 5 Shoji J, Masuda R, Yamashita Y, et al. Effect of low dissolved oxygen concentrations on behavior and predation rates on red sea bream *Pagrus major* larvae by the jellyfish *Aurelia aurita* and by juvenile Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius*. *Mar Biol*, 2005, 147: 863–868
- 6 Shoji J, Masuda R, Yamashita Y, et al. Predation on fish larvae by moon jellyfish *Aurelia aurita* under low dissolved oxygen concentrations. *Fisheries Sci*, 2005, 71: 748–753
- 7 Arai M N. Pelagic coelenterates and eutrophication: A review. *Hydrobiologia*, 2001, 451: 69–87
- 8 Mills C E. Jellyfish blooms: Are populations increasing globally in response to changing ocean conditions? *Hydrobiologia*, 2001, 451: 55–68
- 9 Rutherford L D Jr, Thuesen E V. Metabolic performance and survival of medusa in estuarine hypoxia. *Mar Ecol-Prog Ser*, 2005, 294: 189–200
- 10 Thuesen E V, Rutherford L D Jr, Brommer P L, et al. Intragel oxygen promotes hypoxia tolerance of Scyphomedusae. *J Exp Biol*, 2005, 208: 2475–2482
- 11 Semenza G L, Wang G L. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 1992, 12: 5447–5454
- 12 Wang G L, Semenza G L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, 1993, 268: 21513–21518
- 13 Wang G L, Semenza G L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 4304–4308
- 14 Wang G L, Jiang B H, Rue E A, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 5510–5514
- 15 Jiang B H, Rue E, Wang G L, et al. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 1996, 271: 17771–17778
- 16 Bunn H F, Poyton R O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*, 1996, 76: 839–875
- 17 Kaelin W G. Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 115–128
- 18 Semenza G L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 2012, 148: 399–408
- 19 Loenarz C, Coleman M L, Boleining A, et al. The hypoxia-inducible transcription factor pathway regulates oxygen sensing in the simplest animal, *Trichoplax adhaerens*. *EMBO Rep*, 2011, 12: 63–70
- 20 Srivastava M, Begovic E, Chapman J, et al. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*, 2008, 454: 955–960
- 21 Bianchi T S, DiMarco S F, Cowan J H Jr, et al. The science of hypoxia in the Northern Gulf of Mexico: A review. *Sci Total Environ*, 2010, 408: 1471–1484
- 22 Shoji J, Kudoh T, Takatsuji H, et al. Distribution of moon jellyfish *Aurelia aurita* in relation to summer hypoxia in Hiroshima Bay, Seto Inland Sea. *Estuar Coast Shelf Sci*, 2010, 86: 485–490
- 23 Lichtschlag A, Janssen F, Wenzhöfer F, et al. Effect of bottom water oxygenation on oxygen consumption and benthic biogeochemical processes at the Crimean Shelf (Black Sea). In: *GU General Assembly 2012, Geophysical Research Abstract*, 2012, 14: 9856
- 24 李宏亮, 陈建芳, 卢勇, 等. 长江口水体溶解氧的季节变化及底层低氧成因分析. *海洋学研究*, 2011, 29: 78–87
- 25 Mutlu E. Distribution and abundance of moon jellyfish (*Aurelia aurita*) and its zooplankton food in black sea. *Mar Biol*, 2001, 138: 329–339
- 26 Robinson K L, Graham W M. Long-term change in the abundances of northern Gulf of Mexico Scyphomedusae *Chrysaora* sp. and *Aurelia* spp. with links to climate variability. *Limnol Oceanogr*, 2013, 58: 235–253
- 27 Purcell J E, Uye S, Lo W T. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: A review. *Mar Ecol-Prog Ser*, 2007, 350: 153–174
- 28 Purcell J E. Jellyfish and ctenophore blooms coincide with human proliferations and environmental perturbations. *Annu Rev Mar Sci*, 2012, 4: 209–235
- 29 Condon R H, Decker M B, Purcell J E. Effects of low dissolved oxygen on survival and asexual reproduction of scyphozoan polyps (*Chrysaora quinquecirrha*). *Hydrobiologia*, 2001, 451: 89–95
- 30 Ishii H, Ohba T, Kobayashi T. Effects of low dissolved oxygen on planula settlement, polyp growth and asexual reproduction of *Aurelia aurita*. *Plankton Benthos Res*, 2008, 3: 107–113

- 31 Miller M C, Graham W M. Environmental evidence that seasonal hypoxia enhances survival and success of jelly fish polyps in the northern Gulf of Mexico. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2012, 432-433: 113-120
- 32 Childress A J, Seibel B A. Life at stable low oxygen levels: Adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *J Exp Biol*, 1998, 201: 1223-1232
- 33 Mahon P C, Hirota K, Semenza G L. FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Gene Dev*, 2001, 15: 2675-2686
- 34 Lando D, Peet D J, Gorman J J, et al. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Gene Dev*, 2002, 16: 1466-1471
- 35 Schofield C J, Ratcliffe P J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5: 343-354
- 36 Kaelin W G Jr, Ratcliffe P J. Oxygen sensing by metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell Rev*, 2008, 30: 393-402
- 37 Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. *J Biol Chem*, 1997, 272: 22642-22647
- 38 Jiang Y F, Chou C H, Lin E C, et al. Molecular characterization of hypoxia and hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) from Taiwan voles (*Microtus kikuchii*). *Comp Biochem Phys A*, 2011, 158: 183-188
- 39 Semenza G L, Jiang B H, Leung S W, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 1996, 271: 32529-32537
- 40 Hewitson K S, Lienard B M, McDonough M A, et al. Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *J Biol Chem*, 2007, 282: 3293-3301

Hypoxia induced gene expression under acute hypoxic stress in *Aurelia* sp.1

WANG GuoShan¹, ZHEN Yu², WANG MinXiao³, WANG JianYan¹, SHI Yan², MI TieZhu², SUN Song^{3,4} & YU ZhiGang⁴

¹Marine Life Science College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

²Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;

³Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

⁴Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Engineering, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China

Many studies have reported that jellyfish can tolerate low oxygen environments, but the mechanism by which this occurs has not been clarified. In this study, the partial gene of hypoxia inducible factor (HIF-1 α) from *Aurelia* sp.1 was obtained by transcriptome sequencing analysis. The expression of *HIF-1 α* in *A. sp.1* juveniles was then measured after cultivation in filtered seawater with 0.5 mg L⁻¹ dissolved oxygen. The relative gene expression of *HIF-1 α* decreased to 83.2% relative to the α -tubulin after 3 h when compared with a control group cultured in seawater with saturated dissolved oxygen, then increased to 102.4% after 6 h, 122.8% after 12 h, 301.3% after 18 h, decreased to 140.3% after 48 h, and finally stabilized at 150.7% after 72 h. When the samples were treated for 12 h in hypoxia and then cultivated in seawater with saturated dissolved oxygen for another 12 h, the relative gene expression of *HIF-1 α* decreased to 74.7% relative to the reference group. Overall, these findings indicate that the gene expression of HIF from *A. sp.1* varied obviously under hypoxic conditions.

***Aurelia* sp.1, hypoxia inducible factor (HIF), hypoxia**

doi: 10.1360/972013-217