

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190924001

http://www.yykxjz.cn/

曹梅, 王兴强, 秦传新, 沈晔, 张子杨, 钱诗悦. 脊尾白虾对低氧响应的转录组学分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 112-123
Cao M, Wang XQ, Qin CX, Shen Y, Zhang ZY, Qian SY. Transcriptome analysis of *Palaemon carincauda* subject to hypoxic stress. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 112-123

脊尾白虾对低氧响应的转录组学分析*

曹梅¹ 王兴强^{1①} 秦传新² 沈晔¹ 张子杨¹ 钱诗悦¹

(1. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院 连云港 222005;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东省渔业生态环境重点实验室 广州 510300)

摘要 本研究通过高通量测序, 分析低氧胁迫下脊尾白虾(*Palaemon carincauda*)某些基因的差异表达, 获得 10.62 Gb 高质量测序数据, 组装得到 155113 条转录本和 118953 条 Unigene。注释 Unigene 37580 条。其中, 33659 条 Unigene 与 Nr 蛋白数据库基因同源; 11275 条 Unigene 注释到 KEGG 数据库, 归类到 223 个代谢通路。低氧胁迫产生 1392 条差异表达基因, 包括 311 条上调基因和 1081 条下调基因, 784 条差异基因得到注释, 并富集到抗氧化活性、细胞连接、蛋白结合转录因子活性、多细胞生物过程、复制和生殖等过程, 表明低氧胁迫激活了虾体适应缺氧的一系列生理活动。其中, 低氧胁迫下, 低氧诱导因子 1(HIF1) 2 个亚基 *HIF1α* 和 *HIF1β* 表达量上调; 实时定量测定证实, 在胁迫的后期, 脊尾白虾肝脏和鳃 *HIF1α* 和 *HIF1β* 明显上调, 推测脊尾白虾细胞在低溶氧环境下诱导 *HIF* 产生, 刺激机体增加血液氧的供应能力。同时, 低氧胁迫下, 脊尾白虾差异基因富集到糖酵解/葡萄糖生成、精氨酸和脯氨酸代谢和丙酮酸代谢等通路, 表明虾体缺氧使糖酵解等无氧代谢途径增强, 同时促进了部分糖类和氨基酸的代谢。另外, 低氧胁迫下, 脊尾白虾溶酶体通路、吞噬通路、过氧化物酶体通路和内含作用通路的差异基因较多, 推测低氧诱导因子可能通过抑制线粒体生物合成和活化线粒体自噬来降低线粒体氧耗。

关键词 脊尾白虾; 低氧胁迫; 转录组分析; 差异基因表达

中图分类号 S917.4; S968.22 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)02-0112-12

溶解氧是对虾养殖环境中重要的环境因子, 直接影响对虾的存活、生长、代谢、消化和免疫能力。养殖环境中溶解氧受诸多因素的影响, 环境中浮游植物优势种群的突然改变或死亡、阴天暴雨及过量投饵造成的池塘水质污染等都会导致溶解氧急剧下降(郑慧等, 2014; 李根瑞等, 2016)。此时, 凡纳滨对虾

(*Litopenaeus vannamei*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)等抗氧化活性和免疫力发生显著变化(Han *et al.*, 2018)。低氧胁迫时, 日本沼虾有氧代谢减弱, 无氧酵解和抗氧化能力增强, 糖原和磷酸精氨酸大量消耗, 以维持机体能量需

* 江苏省海洋生物技术重点实验室开放基金(HS16005)、广东省渔业生态环境重点实验室开放基金(FEEL-2019-3)、江苏省大学生实践创新项目(SZ201811641105001; SY201811641105001)和连云港市“海燕计划”科研项目共同资助 [This work was supported by Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology Open Fund (HS16005), Fund of Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment (FEEL-2019-3), Practical Innovation Project for College Students in Jiangsu (SZ201811641105001; SY201811641105001), and Lianyungang “Petrel Project” Scientific Research Project]. 曹梅, E-mail: 593627216@qq.com

① 通讯作者: 王兴强, 教授, E-mail: wangxingqiang@jou.edu.cn

收稿日期: 2019-09-24, 收修改稿日期: 2020-02-14

要(Sun *et al.*, 2018)。其中, 低氧诱导因子 1 (*HIF1*)是虾体维持氧稳态的关键异二聚体转录因子, 由受氧调节的 α 亚基和组成型表达的 β 亚基组成, 最先由 Semenza(1992)在缺氧诱导的细胞核抽提物中发现, 参与许多重要的生物学反应。例如, *HIF1 α* 和 *HIF1 β* 亚基均参与虾类缺氧适应性反应(Terova *et al.*, 2010; 连春盎, 2016)。缺氧时, 凡纳滨对虾鳃 *HIF1 α* 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和肝胰脏磷酸果糖激酶、果糖-1,6-二磷酸酶表达量显著增高, 而 *HIF1 α* 或 *HIF1 α* 亚基的沉默阻断了鳃中己糖激酶表达和酶活性诱导(Camacho-Jiménez *et al.*, 2018)。通常情况下, *HIF1* 的稳定性和活性由 *HIF1 α* 决定, *HIF1 α* 的调节受多种因素影响, 且 *HIF1 α* 为专一受 O_2 调控的亚基。*HIF1 α* 的 N 末端用来介导 α 和 β 两亚基二聚化及与靶基因特异 DNA 序列结合, *HIF1 α* 的 C 末端用来介导降解和反式激活, 含有 2 个独立的反式激活结构域, 2 个结构域序列间为负调控反式激活结构域, 而中部是氧依赖降解结构域(Oxygen dependent degradation domain, ODDD), ODDD 决定 *HIF1 α* 的稳定性。在常氧条件下, 位于 *HIF1 α* ODDD 内的脯氨酸残基的羟基化可促进 *HIF1 α* 的泛素化和蛋白酶的降解, 这种羟基化作用由多聚羟化酶介导。其中, 脯氨酸羟化酶(PHDs)被认为在细胞质中广泛表达, 且在羟基化中作用最大。另一种羟基化酶是 *HIF1* 抑制剂, 主要进行天门冬酰胺残基的羟基化, 进而抑制 *HIF1 α* 的激活(李国青等, 2005)。转录组学可用于分析不同组织或生理状态下某些基因表达水平的差异, 发掘与特定生理功能相关的未知基因。本研究通过高通量测序, 分析低氧胁迫下脊尾白虾(*Palaemon carinicauda*)某些基因的差异表达, 可为进一步揭示虾体响应低氧胁迫的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验设计

1.1.1 低氧胁迫实验 实验前, 脊尾白虾暂养 1 周, 以适应实验室环境。暂养期间, 海水温度为 $22^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$ 、盐度为 29、pH 为 8.1, 人工增氧。随机挑选湿重为 (3.15 ± 0.26) g 的脊尾白虾 60 只, 分为 2 组, 每组 3 个重复, 每个水族箱(水体约 50 L)放养 10 只脊尾白虾, 人工增氧适应 24 h, 哈希(HACH) DR900 测定实验水体溶解氧浓度为 7.6 mg/L。实验开始时, 停止低氧胁迫组的人工增氧, 水族箱用 2 mm 厚液体石蜡封闭。胁迫约 3.5 h 后, 脊尾白虾虾体从尾部开始变白; 约 4 h 后, 开始侧卧游动, 猜测其处于昏厥

状态, 此时, 水体溶解氧浓度为 (1.13 ± 0.26) mg/L, 脊尾白虾整体取样, 速冻于液氮中备用。预实验表明, 低氧胁迫条件下, 白虾侧卧后约 10~20 min 死亡。为确保取到新鲜的样品, 白虾侧卧游动时马上取样。对照组保持人工增氧, 白虾游动正常, 溶解氧浓度为 (7.59 ± 0.66) mg/L, 同样取样冻存。

1.1.2 基因表达验证实验 实验前, 脊尾白虾暂养 1 周, 暂养条件同 1.1.1。随机挑选湿重为 (2.77 ± 0.34) g 的脊尾白虾 120 只, 分为 2 组, 每组设 3 个重复, 每个水族箱(水体约为 100 L)放养 20 只白虾, 人工增氧适应 24 h, 哈希(HACH) DR900 测得水体溶解氧浓度为 7.6 mg/L。实验开始时, 低氧胁迫组停止人工增氧, 水族箱用 2 mm 厚液体石蜡封闭, 在 0、10、20、40、120、240 和 480 min, 从每个箱中取 2 只虾, 解剖取出肌肉、鳃和肝胰脏, 液氮速冻, 取样时间点水体溶解氧浓度分别为 (8.05 ± 0.40) 、 (7.21 ± 0.23) 、 (6.71 ± 0.18) 、 (6.10 ± 0.22) 、 (5.81 ± 0.25) 、 (4.08 ± 0.47) 和 (2.03 ± 0.15) mg/L; 对照组保持人工增氧, 白虾游动正常, 溶解氧浓度为 (8.11 ± 0.42) mg/L, 同样取样冻存。

1.2 转录组测序

将 1.1.1 中冻存的低氧胁迫组和对照组样品分别在液氮中全虾研磨混合, 常规方法提取总 RNA。采用带有 Oligo (dT)的磁珠富集真核生物 mRNA, 加入破碎液, 将 mRNA 进行随机打断, 以 mRNA 为模板, 反转合成双链 cDNA 链。利用 AMPure XP beads 纯化 cDNA, 对纯化的双链 cDNA 进行末端修复、加尾并连接测序接头, 然后, 采用 AMPure XP beads 进行片段大小选择。最后, 通过 PCR 富集得到 cDNA 文库。送北京百迈客生物科技有限公司进行 HiSeq2500 高通量测序, 测序读长为 PE125。

1.3 生物信息学分析

对原始数据进行过滤, 去除其中的接头及低质量 Reads, 获得高质量的测序数据。将高质量测序数据通过 Trinity 软件进行序列组装, 获得该物种的 Unigene 库。将低氧胁迫组和对照组高质量的测序数据与组装得到的 Unigene 库进行序列比对和基因表达量分析, 筛选差异表达的基因。使用 BLAST 软件将 Unigene 序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG 和 KEGG 数据库比对, 获得 Unigene 及差异表达基因的功能注释信息。使用 TransDecoder 软件进行 Unigene 基因结构预测。

1.4 实时定量测定

常规方法提取 1.1.2 中的样品 RNA, 反转录成

cDNA。同时,设计引物进行实时定量 PCR,引物序列见表1;利用软件 SPSS 11 进行统计分析,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

表1 脊尾白虾实时定量所用引物序列
Tab.1 Sequences of *P. carincauda* qRT-PCR primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
HIF1 α -F	GCTAAAGGTGGGGCAAGTGG
HIF1 α -R	TGACGCCTACCTCGTTGGAT
HIF1 β -F	GTCTCGCTCGCCTTCTACAC
HIF1 β -R	TGCTCCTTCTGTTCCCAAGC
HIF1 α i-F	GCCCTGAACACTATGAGCG
HIF1 α i-R	AGCTGATCAAGCCCAGGGAA
PHDs-F	GGGGATGGCCGATGTATCAC
PHDs-R	AGGGTCCGTCTATCCGACC

表2 高质量测序数据评估统计
Tab.2 Statistics for evaluation of clean sequencing data

处理 Treatment	双向测序读数 Pair-ends reads	碱基数量 Base number	GC 含量 GC content(%)	Q30(%)
对照 Control	20926999	5270136419	44.29	90.21
低氧胁迫 Hypoxic stress	21257665	5352900655	44.42	90.35

注: Q30: 质量值 ≥ 30 的碱基所占的百分比

Note: Q30: Percentage of bases quality score which is greater than or equal to 30

表3 组装结果统计
Tab.3 Statistics of assembly results

项目 Items	转录本 Transcript	Unigene
200~300 nt	57076(36.80%)	50868(42.76%)
300~500 nt	39602(25.53%)	33316(28.01%)
500~1000 nt	26081(16.81%)	19088(16.05%)
1000~2000 nt	15506(10.00%)	9112(7.66%)
≥ 2000 nt	16848(10.86%)	6569(5.52%)
总数 Total number	155113	118953
总长度 Total length	135682981	73521294
N50 长度 N50 length	1940	928
平均长度 Mean length	874.74	618.07

2.2 Unigene 功能注释

对脊尾白虾 Unigene 进行功能注释,选择 BLAST 参数 $E \leq 10^{-5}$ 和 HMMER 参数 $E \leq 10^{-10}$, 获得 37580 条有注释信息的 Unigene (表3)。其中, COG 得到注释的 Unigene 12527 条, GO 13878 条, KEGG 11275 条。

与 Nr 蛋白数据库进行同源性比对,有 33659 条白虾 Unigene 与已知基因同源,在 Nr 蛋白数据库中,与虾类相关的注释信息较少(图 1)。相似序列比例最

2 结果

2.1 转录组测序数据组装

完成对照和低氧胁迫组脊尾白虾样品的转录组测序,获得 10.62 Gb 高质量测序数据,各样品高质量测序数据均达到 5.27 Gb,质量值 ≥ 30 的碱基所占的百分比(Q30) $\geq 90.21\%$ (表 2)。

应用 Trinity 对高质量测序数据进行组装,得到 155113 条转录本和 118953 条 Unigene,转录本与 Unigene 的 N50 分别为 1940 和 928 (表 2)。序列长度为 200~300 nt 的 Unigene 最多,占总数的 42.76%; 300~500 nt 的有 33316 条,占 28.01%; 500~1000 nt 有 19088 条,占 16.05%; 1000~2000 nt 有 9112 条,占 7.66%; 2000 nt 以上的 Unigene 有 6569 条,占 5.52%。

表4 Unigene 注释统计
Tab.4 Statistics of Unigene annotated

注释数据库 Annotated databases	Unigene	≥ 300 nt	≥ 1000 nt
COG	12527	9481	4182
GO	13878	10018	3941
KEGG	11275	8707	3995
KOG	24738	18260	8144
Pfam	23791	18817	8903
Swiss-Prot	22344	17618	8421
Nr	33659	25595	10923
合计 Total	37580	27426	11044

高为内华达古白蚁(*Zootermopsis nevadensis*) (2787 条, 8%), 随后依次是蚤状蚤(*Daphnia pulex*, 1765)、隆头蛛(*Stegodyphus mimosarum*, 1169)、文昌鱼(*Branchiostoma floridae*, 1046)、囊舌虫(*Saccoglossus kowalevskii*, 1019)、紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*, 965)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*, 871)、卡氏棘阿米巴(*Acanthamoeba castellanii*, 735)、海蠕虫(*Capitella teleta*, 644)、霸王莲花青螺(*Lottia gigantea*, 605)、凡纳滨对虾(217)、罗氏沼虾(107)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*, 92)和日本沼虾(*M. nipponense*, 79)。

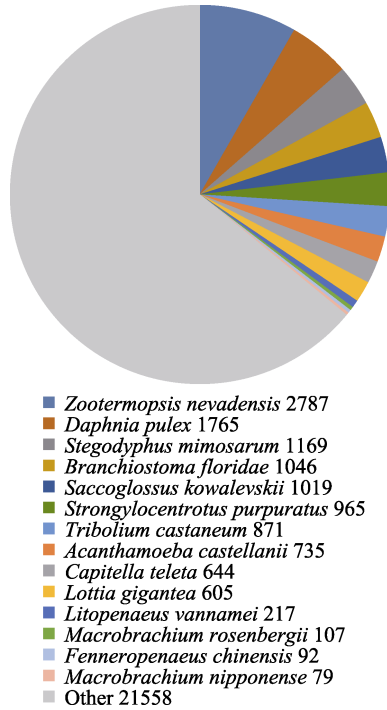


图 1 Nr 同源物种分布
Fig.1 Homologous species distribution of Nr

11275 条脊尾白虾 Unigene 注释到 KEGG, 归类为 223 个代谢通路, 其中, 基因数量排名前 20 的通路如图 2 所示, 包括核糖体、内质网中蛋白质加工、RNA 转运、剪接体、溶酶体、氧化磷酸化、糖酵解/糖异生、吞噬体、泛素介导的蛋白水解、嘌呤代谢、mRNA 监测、内吞、PI3K-AKT 信号通路、蛋白酶体、

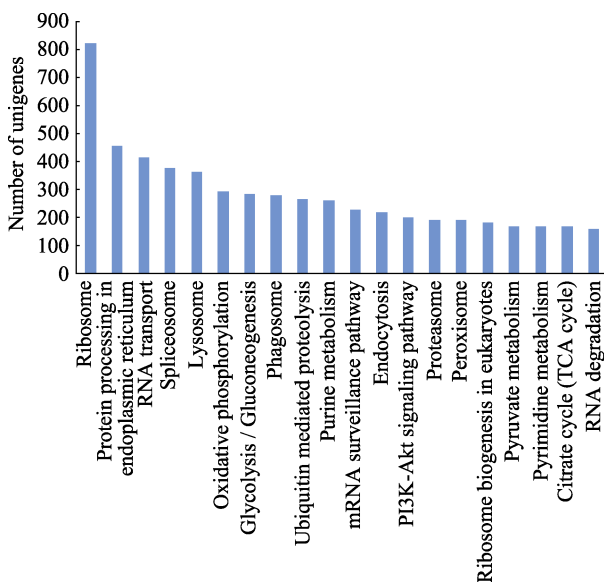


图 2 Unigene 的 KEGG 分析
Fig.2 KEGG analysis of Unigene

显示基因数量排名前 20 位的 KEGG 通路
Top 20 of gene number in KEGG pathway

过氧化物酶体、真核生物核糖体生物合成、丙酮酸代谢、嘧啶代谢、柠檬酸循环和 RNA 降解。另外, 在代谢通路中与低氧有关的还包括 Wnt 信号通路、mTOR 信号通路、自噬调节、p53 信号通路、癌症通路、HIF-1 信号通路和精氨酸与脯氨酸代谢。

2.3 差异表达基因分析

低溶氧胁迫脊尾白虾产生 1392 条差异表达基因, 包括 311 条上调基因和 1081 条下调基因。对脊尾白虾差异表达基因进行功能注释, 共注释到 784 条差异基因, 其中, COG 232 条, GO 240 条, KEGG 206 条, KOG 460 条, Pfam 587 条, Swiss-Prot 542 条, Nr 742 条。图 3 展示了白虾差异表达基因和所有基因在 GO 各二级功能中的注释情况, 发现差异基因主要富集到抗氧化活性、细胞连接、蛋白结合转录因子活性、多细胞生物过程、复制和生殖等过程。

利用 COG 对脊尾白虾差异表达基因产物进行直系同源分类, 发现碳水化合物运输和代谢、转录、复制、重组和修复、翻译后修饰、蛋白质周转和分子伴侣等 4 类富集的差异基因超过 20 个。其次, 无机离子转运与代谢、信号转导机制、氨基酸转运和代谢、细胞周期调控、细胞分裂和染色体分离、能量生产和转换、翻译、核糖体结构和生物合成、次生代谢产物生物合成、运输和代谢等过程富集的差异基因较多(图 4)。

按照 KEGG 通路类型分类, 脊尾白虾差异表达基因分别注释到环境信息处理、人类疾病、遗传信息处理、代谢、细胞过程和有机系统 6 个分支。其中, 遗传信息处理、代谢和细胞过程这 3 大类通路中脊尾白虾差异基因富集较多。在这些代谢通路中, 泛素介导的蛋白水解和溶酶体富集的差异基因最多, 分别为 11 和 10 条; 其次是吞噬(4)、过氧化物酶体(4)和内吞作用(3); 另外, 还包括糖酵解/葡萄糖生成(6)、精氨酸和脯氨酸代谢(4)、果糖和甘露糖代谢(4)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(4)和丙酮酸代谢(2)(图 5)。

表 5 为筛选出的部分脊尾白虾差异表达基因, KOG 分类注释包括 3 条氨基酸的运输和代谢基因(Amino acid transport and metabolism)、5 条碳水化合物的运输和新陈代谢基因(Carbohydrate transport and metabolism)、2 条防御机制基因(Defense mechanisms)、2 条能源生产和转化基因(Energy production and conversion)、7 条一般功能预测基因(General function prediction only)、6 条无机离子转运和代谢基因(Inorganic ion transport and metabolism)、3 条脂质转运和新陈代谢基因(Lipid transport and metabolism)、

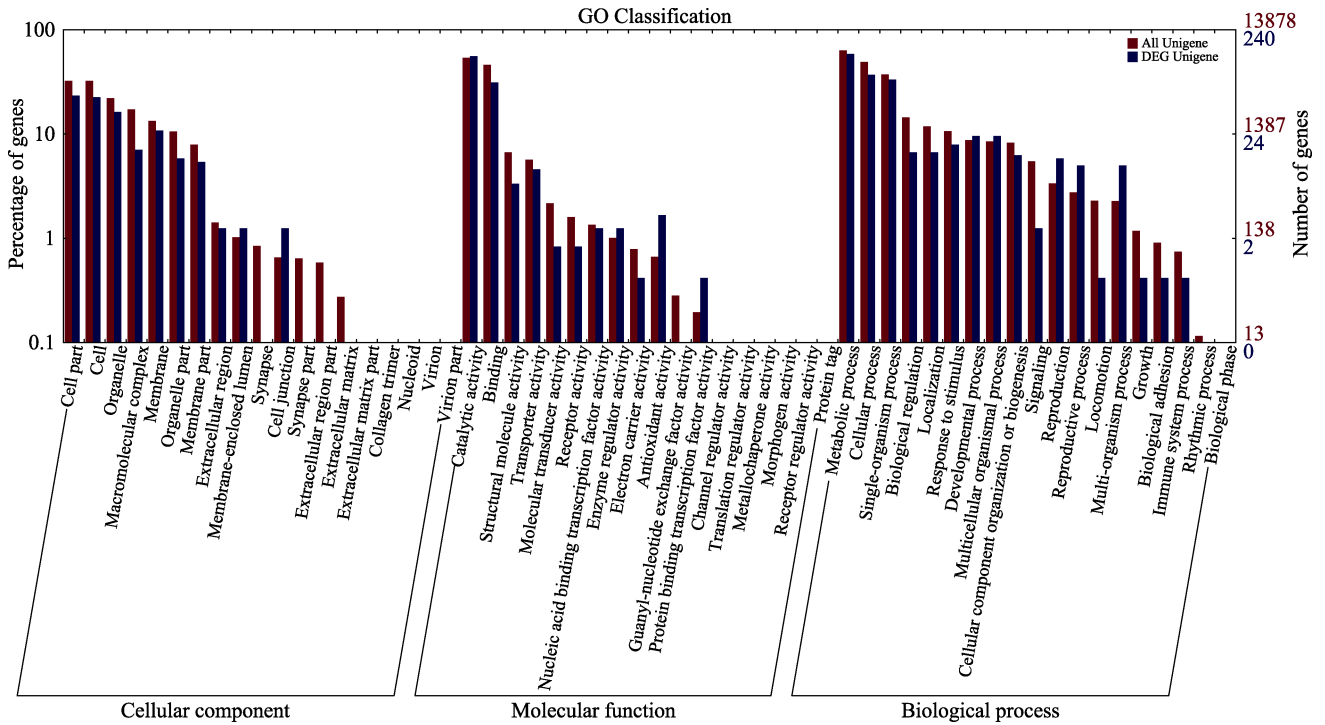


图 3 差异表达基因 GO 二级节点注释统计

Fig.3 Annotated statistical map of GO secondary node of differentially expressed genes

横坐标为 GO 三大分类下的二级节点，纵坐标表示注释到该节点的基因数目及占所有基因数目的百分比，红色柱体表示所有基因的注释情况，蓝色柱体表示差异表达基因的注释情况

The abscissa is the secondary node under the three categories of GO. The ordinates represent the number of genes annotated to the node and the percentage of all genes. The red column represents the annotation of all genes, and the blue column represents the annotation of differentially expressed genes

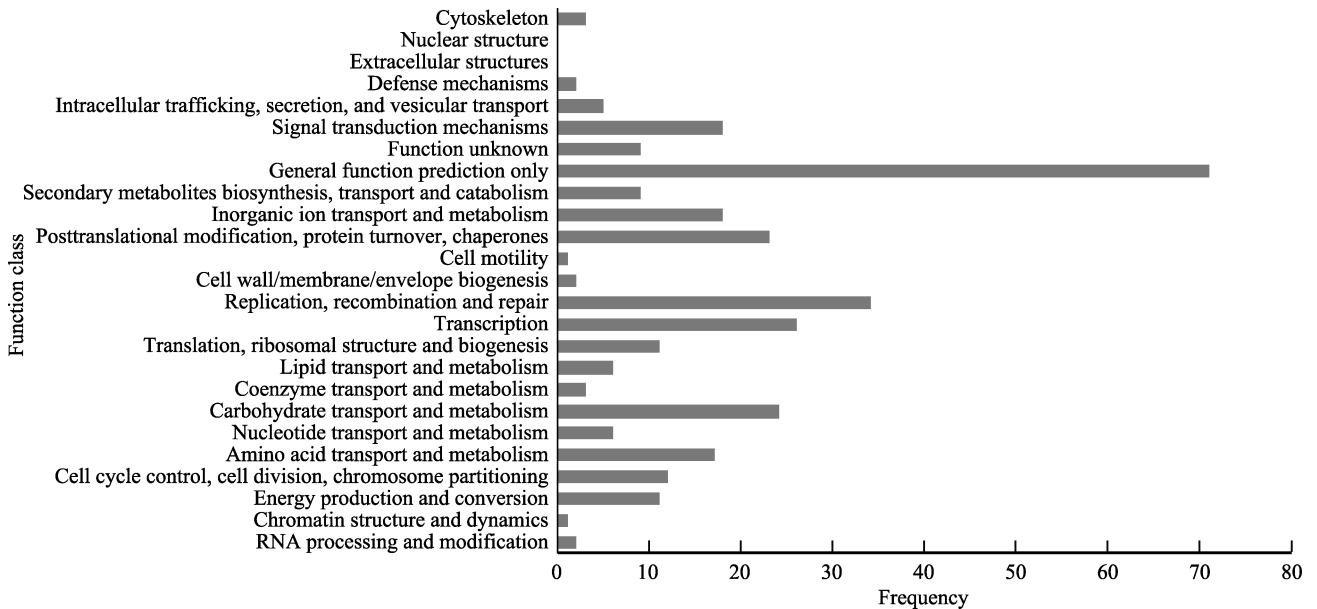


图 4 差异表达基因 COG 注释分类

Fig.4 Classification of COG annotations for differentially expressed genes

横坐标为 COG 各分类内容，纵坐标为基因数目

The abscissa is the classification content of COG, and the ordinate is the number of genes

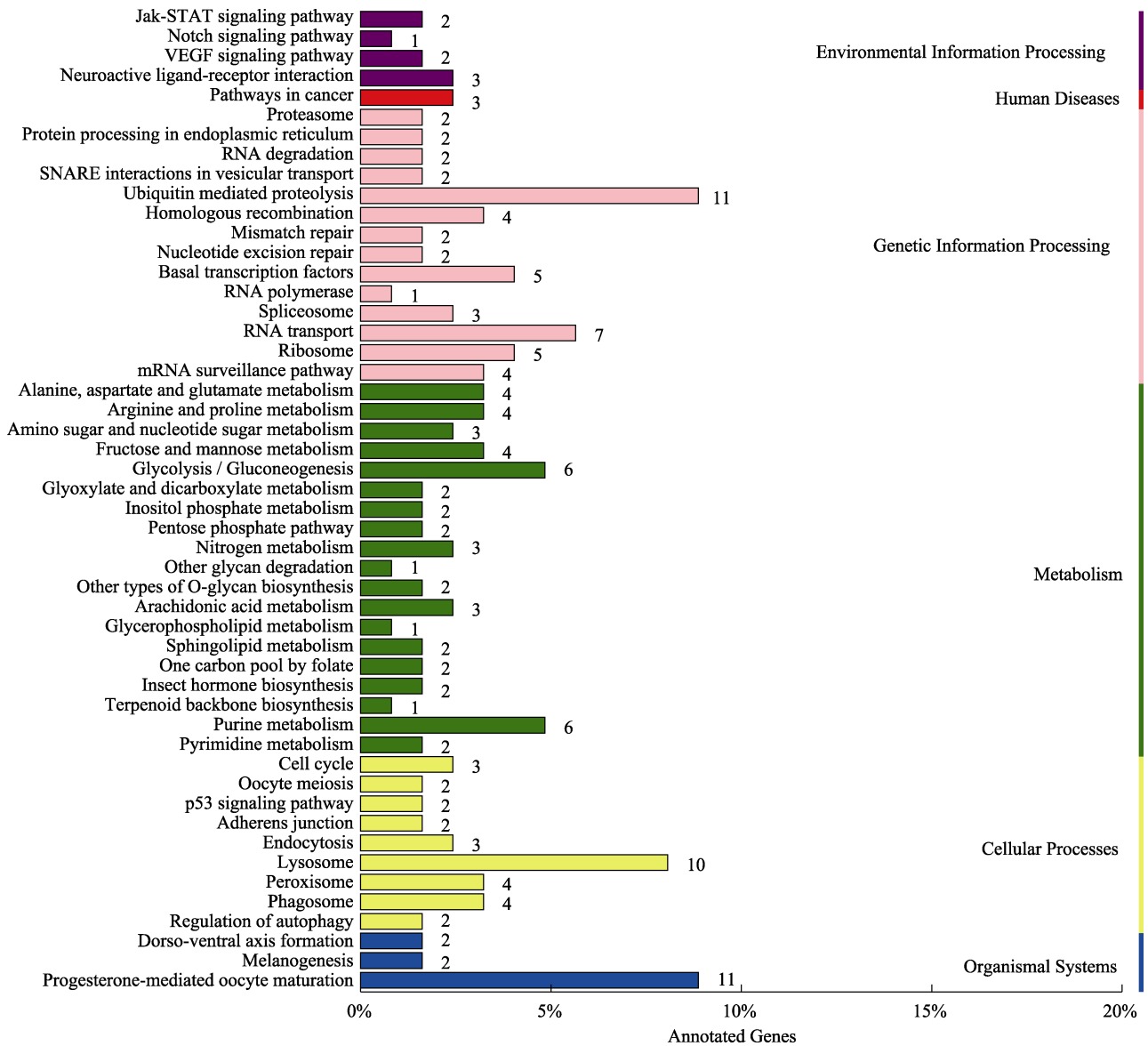


图 5 差异表达基因 KEGG 分类

Fig.5 KEGG classification map of differentially expressed genes

纵坐标为 KEGG 代谢通路的名称，横坐标为注释到该通路下的基因个数及其个数占被注释上的基因总数的比例
 The ordinate is the name of KEGG metabolic pathway. The abscissa is the number of genes annotated to the pathway and the proportion of the number of genes annotated to the total number of genes annotated

9 条翻译后修饰、蛋白质周转和蛋白质伴侣基因 (Posttranslational modification, protein turnover, chaperones)、1 条复制、重组和修复基因 (Replication, recombination and repair)、2 条次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢基因 (Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism)、7 条信号转导机制基因 (Signal transduction mechanisms)、1 条转录基因 (Transcription) 和 1 条翻译、核糖体结构和生物起源基因 (Translation, ribosomal structure and biogenesis)。log₂FC 数值最大的为丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (Serine/

threonine protein kinase), 为 4.98; 其次是 DNA 错配修复蛋白 (DNA mismatch repair protein), 为 3.38。log₂FC 数值最小的为组织蛋白酶 1 (Cathepsin 1), 为 -6.89; 其次是内切几丁质酶 (Endochitinase), -6.58。

2.4 低氧胁迫对 HIF1 信号通路基因表达的影响

本研究中, HIF1 密切相关的差异基因有 4 个, HIF1α 和 HIF1β 缺氧时表达量上调, 而 HIF1α 抑制剂 (HIF1ai) 和 PHDs 表达量下调。从转录组测序注释到的缺氧 HIF1 信号通路看出, HIF1α 的表达受 PI3K、mTOR 和 MARK 等信号通路关键因子的影响 (图 6)。

表5 部分差异表达基因
Tab.5 Part of differentially expressed gene

KOG 分类注释 KOG classification annotation	Unigene	对照组 FPKM 值 Control FPKM	低盐胁迫组 FPKM 值 Hypoxic stress FPKM	log ₂ FC
氨基酸的运输和代谢 Amino acid transport and metabolism	酚氧化酶原激活酶 Prophenoloxidase activating enzyme	16.60	65.77	2.13
	氨基酸转运体 Amino acid transporter	15.38	1.40	-3.27
	谷氨酰胺合成酶 Glutamine synthetase	3.77	0	-6.04
碳水化合物的运输和新陈代谢 Carbohydrate transport and metabolism	腺苷激酶 Adenosine kinase	1.84	0	-4.12
	磷酸甘油酸激酶 1 Phosphoglycerate kinase 1	1.21	0	-4.12
	糖原蛋白 1 Glycogenin 1	8.96	0.28	-4.64
	1,6-二磷酸果糖醛酸酶 Fructose 1,6-bisphosphate aldolase	5.22	0.08	-5.06
	甘油醛 3 磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	1.95	0	-5.13
防御机制 Defense mechanisms	丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serine proteinase inhibitor	37.19	2.97	-3.46
	丝氨酸蛋白酶 Serine protease	42.28	2.65	-3.84
能源生产和转化 Energy production and conversion	羟酸氧化酶 1 Hydroxyacid oxidase 1	0.90	0	-4.28
	苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	1.90	0	-4.56
一般功能预测 General function prediction only	促性腺激素释放激素受体 Gonadotropin releasing hormone receptor	5.53	0.80	-2.58
	绒毛膜过氧化物酶 Chorion peroxidase	17.91	2.01	-2.98
	锌指蛋白 Zinc finger protein	2.76	0.25	-3.18
	神经肽 Neuropeptide	1.97	0.17	-3.20
	翻译起始因子 Translation initiation factor	3.90	0	-5.53
	几丁质识别蛋白 Chitin recognition protein	11.77	0	-6.08
	内切几丁质酶 Endochitinase	20.70	0.10	-6.58
无机离子转运和代谢 Inorganic ion transport and metabolism	锌转运体 Zinc transporter	1.99	0.27	-2.49
	铜特异性金属硫蛋白 Copper specific metallothionein	21.23	0.5	-4.97
	铜伴侣 Copper chaperone	4.88	0	-4.99
无机离子转运和代谢 Inorganic ion transport and metabolism	过氧化氢酶 Catalase	1.77	0	-5.46
	碳酸酐酶 1 Carbonic anhydrase 1	11.61	0.14	-5.75
	金属硫蛋白 Metallothionein	9.54	0	-6.32
脂质转运和新陈代谢 Lipid transport and metabolism	脂肪酸合酶 Fatty acid synthase	17.14	6.66	-1.22
	鞘磷脂磷酸二酯酶 Sphingomyelin phosphodiesterase	1.71	0.11	-3.65
	肌醇 3 磷酸合酶 Inositol 3 phosphate synthase	1.40	0	-5.13
翻译后修饰、蛋白质周转和蛋白质 伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	过氧化物酶 1 Peroxidase 1	0	1.36	4.24
	热休克蛋白 20 Heat shock protein 20	5.93	0.38	-3.34
	硫氧还蛋白 2 Thioredoxin 2	1.63	0	-4.12
	谷胱甘肽过氧化物酶 Glutathione peroxidase	5.53	0.08	-5.00
	半胱氨酸蛋白酶 Cysteine proteinase	1.81	0	-5.43

续表 5

KOG 分类注释 KOG classification annotation	Unigene	对照组 FPKM 值 Control FPKM	低盐胁迫组 FPKM 值 Hypoxic stress FPKM	log ₂ FC
翻译后修饰、蛋白质周转和蛋白质伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	蛋白酶调节亚基 Protease regulatory subunit	15.38	0.22	-5.63
	谷胱甘肽 S 转移酶 Glutathione S transferase	4.43	0	-5.92
	组织蛋白酶 1 Cathepsin 1	46.67	0.30	-6.89
	腺苷三磷酸酶 ATPase	6.84	0	-7.23
复制、重组和修复 Replication, recombination and repair	DNA 错配修复蛋白 DNA mismatch repair protein	2.39	23.72	3.38
次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	山梨醇脱氢酶 Sorbitol dehydrogenase	2.38	0	-4.21
	依赖于 NADP 的醇类氢化酶 NADP dependent alcohol hydrogenase	12.52	0.27	-4.88
信号转导机制 Signal transduction mechanisms	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Serine/threonine protein kinase	0.11	5.97	4.98
	G 蛋白信号调节因子 Regulator of G protein signaling	2.52	6.72	1.54
	清道夫受体 B Scavenger receptor class B	53.43	5.47	-3.13
	卵黄蛋白原 Vitellogenin	50.02	3.23	-3.79
信号转导机制 Signal transduction mechanisms	卵黄蛋白原受体 Vitellogenin receptor	39.84	2.26	-3.99
	胰岛素受体 Insulin receptor	4.12	0.20	-4.11
	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Serine/threonine protein kinase mos	4.36	0.13	-4.38
转录 Transcription	拉长素 C Elongin C	43.65	2.01	-4.21
翻译、核糖体结构和生物起源 Translation, ribosomal structure and biogenesis	蛋白质翻译因子 Protein translation factor	25.49	0.28	-5.98

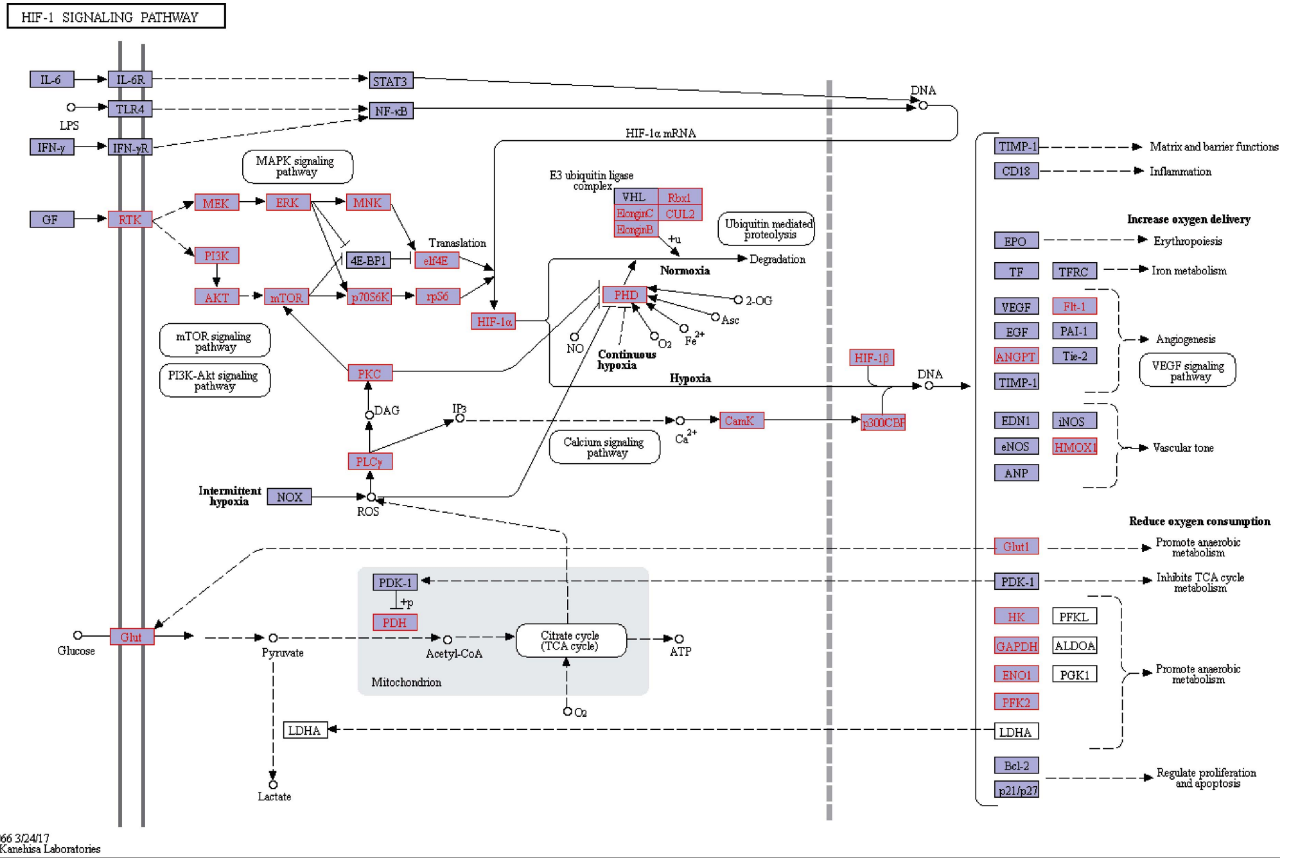
注: FPKM: 基因表达量; log₂FC: 基因表达量差异倍数的对数值

Note: FPKM: Gene expression level; log₂FC: Logarithm of differential multiple of gene expression level

由图 7 可以看出, 在 0~120 min 内, 随着低氧胁迫时间的延长, 脊尾白虾肝胰脏、肌肉和鳃 *HIF1α* 基因表达与对照组相比明显下调; 而在 240 min, 脊尾白虾肝胰脏、肌肉和鳃 *HIF1α* 基因表达与对照组相比, 明显上调; 其中, 低氧胁迫对脊尾白虾肝胰脏 *HIF1α* 基因表达影响显著 ($P < 0.05$)。在 10~20 min 时间范围内, 随着低氧胁迫时间的延长, 脊尾白虾肝胰脏、肌肉和鳃 *HIF1β* 基因表达与对照组相比明显下调; 其中, 低氧胁迫对脊尾白虾鳃 *HIF1β* 基因表达影响显著 ($P < 0.05$)。在 0~20 min 时间范围内, 随着低氧胁迫时间的延长, 脊尾白虾肝胰脏、肌肉和鳃 *HIF1αi* 和 *PHDEs* 基因表达与对照组相比明显下调; 其中, 低氧胁迫对脊尾白虾所有组织 *HIF1αi* 和 *PHDEs* 基因表达影响显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

曾地刚等(2013)通过 454 技术对凡纳滨对虾肝胰脏转录组测序, 获得 20225 条 Unigene。闫允君等(2020)利用 RNA-Seq 技术对中国对虾对照组和肌肉生长抑制素(*Mstn*)表达抑制组进行了测序分析, 发现 *Mstn* 表达被抑制后共筛选到 1657 个差异表达基因, 其中, 805 个显著上调, 852 个显著下调, 初步筛选出 29 个 *Mstn* 调控的与肌肉生长相关的基因, 为阐明对虾的肌肉发育调控机制提供了重要基础。刘欣(2016)获得日本沼虾 Unigenes 142560 条, 其中, 43038 条获得注释, 占总 Unigene 的 30.20%。本研究组装得到 155113 条转录本和 118953 条 Unigene, 获得 37580 条有注释信息的 Unigene, 占



04066 3/24/17
(c) Kazuhisa Laboratories

图6 缺氧 HIF1 信号通路
Fig.6 Hypoxic HIF1 signaling pathway

红色为转录组测序注释到的 Unigene
Red is the Unigene annotated by transcriptome sequencing

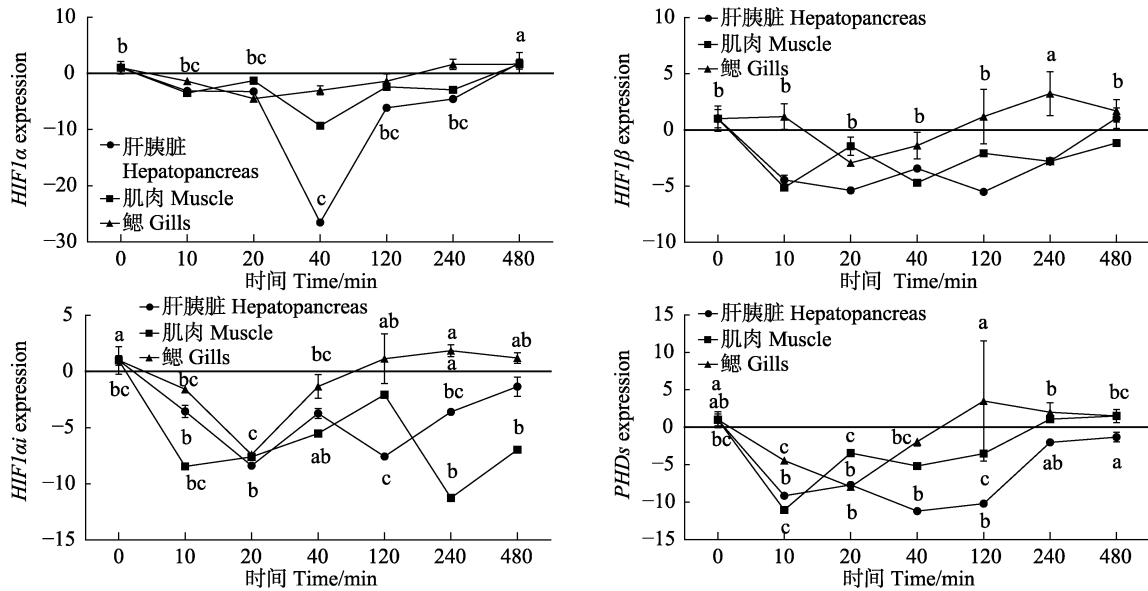


图7 低氧胁迫对脊尾白虾基因表达的影响
Fig.7 Effects of hypoxic stress on gene expression of *P. carincauda*

同一条线中具有不同字母的数据间差异显著 ($P < 0.05$)
Data with different letters in the same line is significantly different ($P < 0.05$)

31.59%,其中,COG 注释 Unigene 12527 条,GO 13878 条,KEGG 11275 条,Nr 33659 条;在 223 个 KEGG 代谢通路中,*HIF1* 信号通路、*Wnt* 信号通路、*mTOR* 信号通路、*p53* 信号通路、癌症通路、自噬调节、精氨酸与脯氨酸代谢等通路与低氧胁迫有关。未获得功能注释的 Unigene 81373 条,占 68.41%(表 2、表 3)。未注释的原因可能与组装的序列太短有关,转录组组装的 Unigene 长度在 500 nt 以下的占总量的 70.77%,增加了功能注释的难度。另外,各类数据库功能注释信息不够全面,使一些基因不能够得到相应的注释,例如,在 Nr 注释中,白虾 Unigene 仅与 217 条凡纳滨对虾、107 条罗氏沼虾、92 条中国对虾和 79 条日本沼虾基因同源。

机体为适应缺氧环境会诱导一些与红细胞生成/铁代谢、血管生成、葡萄糖代谢、细胞增殖/生存和凋亡等相关基因的表达(Terova *et al*, 2010)。本研究中,低氧胁迫产生 1392 条差异表达基因,784 条差异基因得到注释(表 5)。GO 和 COG 注释表明,抗氧化活性、细胞连接、蛋白结合转录因子活性、多细胞生物过程、复制和生殖等过程富集的差异基因较多。与 GO 和 COG 注释类似,富集差异基因较多的与免疫有关的 KEGG 通路包括泛素介导的蛋白水解,含 11 条差异表达基因,其次是溶酶体 10 条、吞噬 4 条、过氧化物酶体 4 条和内吞作用 3 条;而富集差异基因较多的与代谢有关的 KEGG 通路包括糖酵解/葡萄糖生成,含 6 条差异表达基因,其次是精氨酸和脯氨酸代谢 4 条、果糖和甘露糖代谢 4 条、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 4 条和丙酮酸代谢 2 条(图 5)。这些富集的差异基因表明,低氧胁迫激活了虾体适应缺氧的一系列生理活动,如诱导相关基因转录翻译,参与应激反应,增强白虾各类物质代谢。由表 5 可以看出,低氧胁迫条件下脊尾白虾酚氧化酶原激活酶、过氧化物酶 1、DNA 错配修复蛋白、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶和 G 蛋白信号调节因子等基因显著上调。低氧胁迫对碳水化合物的运输和新陈代谢基、防御机制、能源生产和转化、一般功能预测、无机离子转运和代谢、脂质转运和新陈代谢、次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢、转录和翻译、核糖体结构和生物起源等过程产生了抑制效应,表现为富集大量下调的差异表达基因。

转录因子 *HIF1 α* 是氧传感的核心成分, *HIF1 α* 还可作为许多基因的转录调节因子,这些基因在生理学和医学中至关重要(McNamee *et al*, 2016; Semenza, 2012)。 *HIF1 α* 抑制剂 PHDs 需要氧作为羟化作用的辅助因子,在正常条件下,PHDs 通过 PHD-HIF 途径羟甲基化 *HIF1 α* 保守的脯氨酸残基,从而靶向 *HIF1 α* 被泛

素蛋白酶体降解失活。然而,在缺氧或炎症条件下,PHD-HIF 途径失活,产生稳定的 *HIF1 α* 、*HIF1 α* 和 *HIF1 β* 组成转录活性二聚体 *HIF1* 移位至细胞核,与缺氧调节基因的启动子区域结合调控下游基因表达,这些区域通常是启动子内的“缺氧反应元件”;一方面,通过激活促红细胞生成素(EPO)基因表达促进红细胞生成,激活血清铁传递蛋白(TF)和转铁蛋白受体(TFRC)基因表达促进铁代谢,激活血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体(Flt1)、表皮细胞生长因子(EGF)、血管生成素(ANGPT)和金属肽酶抑制剂(TIMPI)等基因表达促进血管生成,激活血红素加氧酶 1(HMOX1)增强血管张力,通过以上调控增强氧的传递;另一方面,通过激活磷酸肌醇依赖的蛋白激酶 1(PDK1)抑制三羧酸循环代谢,激活磷酸甘油脱氢酶(GPDH)、己糖激酶(HK)、 α 烯醇化酶(ENO 1)、6-磷酸果糖激酶 2(PFK 2)和磷酸甘油酸激酶 1(PGK1)等表达促进厌氧代谢,激活 B 淋巴细胞瘤 2(*bcl2*)和 *p21/p27* 蛋白调节增殖凋亡、降低 O_2 消耗,通过以上调控,缓解机体对缺氧的不适(图 6)。当处于缺氧条件下,草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、石首鱼(*Sciaenidae*)、黑鲈(*Micropterus salmoides*)和河鲈(*Perca fluviatilis*)一些组织中 *HIF1 α* 转录水平显著上调(Terova *et al*, 2010)。任倩妍等(2018)研究发现,大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)在缺氧环境下 HIF 信号通路被激活,肝中低氧诱导因子表达量上调。Okamura 等(2018)研究发现,日本沼虾 *HIF1 α* 表达水平在缺氧刺激 24 h 后显著增加,缺氧刺激 6 h 后 *Von Hippel-Lindau* 肿瘤抑制剂基因表达显著下降。与以上研究类似,转录组数据分析发现, *HIF1 α* 和 *HIF1 β* 缺氧时表达量上调;低氧胁迫实时定量测定证实,在胁迫的后期,脊尾白虾肝脏和鳃 *HIF1 α* 和 *HIF1 β* 明显上调,表明脊尾白虾细胞在低溶氧环境下诱导 *HIF* 产生,刺激机体增加血液氧的供应能力。*HIF1 α* 还激活葡萄糖转运蛋白、糖酵解酶、血管内皮生长因子等,通过提高糖转运和促进糖酵解以适应缺氧环境(Zhou *et al*, 2018)。周晓黎等(2018)研究发现,阻断 *PI3K/AKT* 信号途径,结肠癌细胞中 *HIF1 α* 下调,并可导致糖酵解相关蛋白如葡萄糖转运蛋白-1 和乳酸脱氢酶 A 的表达下降,糖酵解代谢产物乳酸含量下降。本研究中,糖酵解/葡萄糖生成通路、精氨酸和脯氨酸代谢和丙酮酸代谢富集大量差异表达基因(图 5),也说明机体缺氧使糖酵解等无氧代谢途径增强,同时促进了部分糖类和氨基酸的代谢。

细胞自噬通过分解代谢和再循环来消除受损或有害成分,以维持营养和能量稳态,涉及细胞质、细胞器或胞质组分的溶酶体降解;该途径可通过多种形

式的细胞应激来刺激,包括营养或生长因子剥夺、缺氧、活性氧物质、DNA 损伤、蛋白质聚集体、受损细胞器或细胞内病原体(Kroemer *et al.*, 2010; 马骊等, 2018)。在自噬过程中,细胞形成双膜囊泡、自噬体、隔离细胞器,蛋白质或部分细胞等递送至溶酶体细胞质,溶解体中的隔离内容物被降解(He *et al.*, 2009)。自噬构成了一种主要的保护机制,使细胞能够在多种应激源的作用下存活,并有助于保护生物免受退化、炎症、感染和肿瘤疾病的侵害(Levine *et al.*, 2008; Mizushima *et al.*, 2008)。在 Snare 蛋白及小 Rab GTP 激酶的作用下,自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,发挥其降解功能(徐倩等, 2017)。缺氧可通过 *NF- κ B* 途径诱导自噬激活,从而调节细胞增殖和迁移,以诱导肺血管重塑(Jing *et al.*, 2018)。闫广伟等(2018)研究发现,低氧环境可能通过 *HIF-1 α /Bnip3* 途径诱导滋养细胞自噬水平增强。本研究代谢通路中,溶酶体通路、吞噬通路、过氧化物酶体通路和内吞作用通路富集的差异基因较多(图 5),这些差异基因的表达也证实可能与缺氧引起的自噬有关。推测 *HIF* 可通过抑制线粒体生物合成和活化线粒体自噬来降低线粒体氧耗。

综上所述,低氧胁迫可诱导脊尾白虾产生低氧诱导因子调控下游基因表达,进而激活虾体适应缺氧的一系列生理活动,增强脊尾白虾各类物质代谢,促进血管生成,增强血管张力,刺激虾体增加血液氧供应能力;另一方面,低氧胁迫促进厌氧代谢,缓解虾体对缺氧的不适,而低氧诱导因子可通过抑制线粒体生物合成和活化线粒体自噬来降低线粒体氧耗。

参 考 文 献

- Camacho-Jiménez L, Peregrino-Urriarte AB, Martínez-Quintana, JA, *et al.* The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning, characterization and expression during hypoxia. *Marine Environmental Research*, 2018, 138: 65–75
- Han SY, Wang MQ, Liu M, *et al.* Comparative sensitivity of the hepatopancreas and midgut in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to oxidative stress under cyclic serious/medium hypoxia. *Aquaculture*, 2018, 490: 44–52
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 67–93
- Jing X, Jiang T, Dai L, *et al.* Hypoxia-induced autophagy activation through *NF- κ B* pathway regulates cell proliferation and migration to induce pulmonary vascular remodeling. *Experimental Cell Research*, 2018, 368(2): 174–183
- Kroemer G, Guillermo, M, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, 2010, 40(2): 280–293
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132(1): 27–42
- Li GQ, Zhang Y. Recent advances in the study of biological characteristics of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Practical Medicine*, 2005, 22(8): 749–750 [李国青, 张育. 缺氧诱导因子-1 生物学特性的研究新进展. *实用医药杂志*, 2005, 22(8): 749–750]
- Li GR, Ren LH, Sun GH, *et al.* Effects of hypoxic stress on oxidative stress indices in *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 133–139 [李根瑞, 任利华, 孙国华, 等. 低溶氧胁迫对刺参(*Apostichopus japonicus*)氧化应激指标的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 133–139]
- Lian CA. Effects of dry exposure on the respiratory metabolism-related enzymes and HIF-1 in *Exopalaemon carinicauda*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [连春盎. 干露胁迫对脊尾白虾呼吸代谢相关酶和低氧诱导因子的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Liu X. High-throughput transcriptome analysis and immune gene discovery of *Macrobrachium nipponense*. Master's Thesis of Hebei University, 2016 [刘欣. 基于日本沼虾转录组的免疫基因发掘. 河北大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Ma L, Ge QQ, Xu Y, *et al.* Cloning of the translationally controlled tumor protein gene (TCTP) and expression analysis of autophagy regulatory related genes during the development of ovary in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 101–109 [马骊, 葛倩倩, 许杨, 等. 脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 TCTP 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 101–109]
- McNamee EN, Vohwinkel C, Eltzhig HK. Hydroxylation-independent HIF-1 α stabilization through PKA: A new paradigm for hypoxia signaling. *Science Signaling*, 2016, 9(430): fs11
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069–1075
- Okamura Y, Mekata T, Elshopekey GE, *et al.* Molecular characterization and gene expression analysis of hypoxia-inducible factor and its inhibitory factors in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 79(8): 168–174
- Ren QY, Zhang MZ, Li M, *et al.* Differential induction of gene expressions, protein contents and enzyme activities involved in hypoxic responsive in liver tissues of mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* exposed to acute hypoxia. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(4): 187–194 [任倩妍, 张木子, 黎明, 等. 急性缺氧对大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)肝脏中缺氧应答相关基因表达、蛋白含量及酶活性的影响. *海洋与湖沼*, 2018, 49(4): 187–194]
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 2012, 148(3): 399–408
- Sun SM, Guo ZB, Fu HT, *et al.* Based on the metabolomic approach the energy metabolism responses of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* hepatopancreas to acute hypoxia and reoxygenation. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 76
- Terova G, Rimoldi S, Ceccuzzi P, *et al.* Molecular characterization and in vivo expression of hypoxia inducible factor (HIF) 1 α in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to acute and chronic hypoxia. *Italian Journal of Animal Science*, 2010, 8(2s): 875–877
- Xu Q, Ha XQ. The protective function of autophagy in hypoxic stress and its regulatory mechanism. *Journal of Medical Research*, 2017, 46(2): 7–9 [徐倩, 哈小琴. 自噬在缺氧应激中的保护作用及其调控机制. *医学研究杂志*, 2017, 46(2): 7–9]

- Yan GW, Ding YZ, Xing JF, *et al.* Effects of hypoxia on expressions of HIF-1 α , BNIP3 and autophagy, invasion ability in trophoblasts. *Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)*, 2018, 227(2): 68–72 [闫广伟, 丁燕子, 邢金芳, 等. 低氧对滋养细胞 HIF-1 α 、BNIP3 表达及自噬和侵袭能力的影响. *郑州大学学报(医学版)*, 2018, 227(2): 68–72]
- Yan YJ, Lu X, Meng XH, *et al.* Screening of genes related to muscle growth under the Myostatin regulation by RNA-seq in *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20200324002> [闫允君, 卢霞, 孟宪红, 等. 基于转录组分析对中国对虾 Myostatin 基因调控的肌肉生长相关基因的筛选. *渔业科学进展*, <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20200324002>]
- Zeng DG, Chen XL, Xie DX, *et al.* Deep sequencing-based transcriptome analysis of *Litopenaeus vannamei*. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32(3): 308–313 [曾地刚, 陈秀荔, 谢达祥, 等. 基于高通量测序的凡纳滨对虾的转录组分析. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(3): 308–313]
- Zheng H, Li B, Rong XJ, *et al.* Effects of salinity and dissolved oxygen variation on the non-specific immune response of *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 118–124 [郑慧, 李彬, 荣小军, 等. 盐度和溶解氧对刺参非特异性免疫酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 118–124]
- Zhou J, Li C, Yao W, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent autophagy plays a role in glycolysis switch in mouse graulosa cells. *Biology of Reproduction*, 2018, 99(2): 308–318
- Zhou XL, Shu L, Liao Y, *et al.* Role of PI3K/AKT signal pathway in expression of hypoxia-inducible factor-1 α and glycolysis in colon cancer cells under hypoxia. *Acta Mediciniae Universitatis Scientiae et Technologiae Huazhong*, 2018, 47(2): 203–206 [周晓黎, 舒磊, 廖艳, 等. PI3K/AKT 通路在低氧环境下对结肠癌细胞 HIF-1 α 及糖酵解的作用. *华中科技大学学报(医学版)*, 2018, 47(2): 203–206]

(编辑 冯小花)

Transcriptome Analysis of *Palaemon carinicauda* Subjected to Hypoxic Stress

CAO Mei¹, WANG Xingqiang^{1①}, QIN Chuanxin², SHEN Ye¹, ZHANG Ziyang¹, QIAN Shiyue¹

(1. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment;

South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510300)

Abstract A rapid reduction in the dissolved oxygen concentration of water is an important factor contributing to disease in shrimps. In this study, we examined differential gene expression in the shrimp *Palaemon carinicauda* under conditions of hypoxic stress. We obtained 10.62 Gb of high-quality sequencing data, from which 155113 transcripts and 118953 unigenes were assembled. Among the unigenes, 37580 were annotated and 33659 were found to be homologous to genes in the Nr protein database. We also annotated 11275 unigenes using the KEGG database, which were further classified into 223 metabolic pathways. We detected 1392 genes that were differentially expressed in shrimps exposed to hypoxic stress, among which 311 and 1081 were up- and down-regulated, respectively, and 784 were annotated. The enrichment of differentially expressed genes in antioxidant activity, cell connection, protein-binding transcription factor activity, multicellular biological processes, replication, and reproductive processes indicated that exposure to hypoxia activated a series of physiological responses in shrimps associated with adaptation to low levels of dissolved oxygen. Among the genes up-regulated under hypoxic stress was hypoxic induction factor 1 (*HIF1*), which is comprised the two subunits *HIF1 α* and *HIF1 β* . RT-PCR analysis revealed that during the latter stages of hypoxic stress, there was a notable up-regulated expression of *HIF1 α* and *HIF1 β* in the hepatopancreas and gills of *P. carinicauda*. These observations indicated that *P. carinicauda* cells induced hypoxic induction factor production in a hypoxic environment, thereby inducing an increase in blood oxygen supply. We also detected an enrichment of differentially expressed genes in the glycolysis/glucose generation pathway, arginine and proline metabolism, and pyruvate metabolism in response to hypoxic stress, which indicated an upregulation of anaerobic metabolic processes such as glycolysis, and increased metabolism of certain carbohydrates and amino acids. In addition, we detected numerous differentially expressed genes associated with the pathways involving lysozymes, phagocytosis, peroxisomes, and endocytosis in *P. carinicauda* exposed to hypoxia, thereby indicating that HIFs might reduce mitochondrial oxygen consumption by inhibiting mitochondrial biosynthesis and activating mitochondrial autophagy.

Key words *Palaemon carinicauda*; Stress hypoxic; Transcriptome analysis; Differential gene expression

① Corresponding author: WANG Xingqiang, E-mail: hyxywxq@qq.com