

Djhs p70-4 基因在日本三角涡虫中的功能分析

董自梅,崔国震,陈广文,刘德增

(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

摘要:热休克蛋白 70(HSP70)在细胞保护等方面起着关键作用,但至目前为止,在日本三角涡虫(*Dugesia japonica*)中,HSP70 的具体功能尚不明确.以再生能力极强的日本三角涡虫为实验材料,从转录组数据库中筛选了在再生过程中显著调高的 *Djhs p70-4* 基因进行研究.实时荧光定量 PCR 结果显示:在受到外界刺激后,*Djhs p70-4* 基因的表达量显著上调.通过整体原位杂交技术,观察到 *Djhs p70-4* 基因在整体涡虫身体两侧及再生芽基处有较高的杂交信号.利用 RNA 干扰技术敲低 *Djhs p70-4* 基因的表达量后,整体及再生组涡虫出现头部溶解现象.综上所述,*Djhs p70-4* 基因可能在日本三角涡虫的稳态维持以及再生方面发挥重要作用.

关键词:日本三角涡虫;应激刺激;*Djhs p70-4* 基因;稳态维持;再生

中图分类号:Q952

文献标志码:A

虽然再生在动物界是一种普遍现象,但到目前为止,仍未发现有哪一类动物的再生能力能够与淡水涡虫相比^[1].淡水涡虫属于扁形动物门(Platyhelminthes),涡虫纲(Turbellaria),是最早出现两侧对称和三胚层的动物类群,具有极强的再生能力,已成为研究再生生物学的模式动物之一^[2].涡虫的再生能力主要依赖于其体内的多能干细胞(neoblasts)^[3].与脊椎动物体内的干细胞相似,neoblasts 呈卵圆状,体积较小,核大而质少且伴有许多游离的核糖体^[4].当涡虫的身体受到损伤后,neoblasts 被激活迁移至伤口处分裂增殖,形成具有生长,分化能力的再生芽基,最终完成损伤处的修复以及再生^[5-7].

热休克蛋白(Heat Shock Protein, HSP)广泛存在于原核和真核生物中,在进化上高度保守,从细菌到哺乳动物体内均可见其表达^[8].热休克蛋白(HSP)是一类分子伴侣,负责正常生理条件下蛋白质的正确折叠,以及在应激条件下细胞中被破坏的多肽的还原和再折叠.HSP 表达量的上调对于保持细胞内稳态并增加生物体的寿命具有重要作用^[9].依据分子量及氨基酸序列的不同,热休克蛋白被分为 6 个家族:小分子热休克蛋白(sHSP),热休克蛋白 40(HSP40),热休克蛋白 60(HSP60),热休克蛋白 70(HSP70),热休克蛋白 90(HSP90)和热休克蛋白 110(HSP110)^[10].在这些家族中,HSP70 的成员最保守,也最为丰富.HSP70 家族成员具有高度保守的结构,其包含两个不同的结构域,即 N 末端 45 kDa 的核苷酸结合结构域(NBD)和 C 末端 25 kDa 的底物结合结构域(SBD)^[11].HSP70 通过与不同底物蛋白相互作用参与多种生物学功能,当细胞中的 HSP70 被激活后,NBD 与 SBD 被一个双向的变构分子连接,形成胞间通讯;接着,ATP 结合至 NBD,进而通过 ATP 的水解作用,增加 SBD 对于不同底物的亲和力^[12].

在人类中,HSP70 在癌症患者中能够促进肿瘤干细胞的增殖,迁移,侵袭和凋亡,而这通常与恶性肿瘤的发展,复发和不良预后相关^[13].在日本三角涡虫中,经过 X 射线处理后的整体涡虫体内热休克蛋白 sHSP 广泛表达,但在 neoblasts 中不表达^[14];在地中海涡虫中(*Schmidtea mediterranea*),发现 HSP40 能够促进 neoblasts 的自我更新及增殖;而 HSP60, HSP90 在日本三角涡虫以及地中海涡虫中被干扰后分别出现了组织退化,无法进食与死亡,该现象可能与其在细胞保护与免疫调节方面的作用有关^[14-16].HSP70 在阳城多目

收稿日期:2020-02-11;修回日期:2020-06-10.

基金项目:国家自然科学基金(31570376; 31471965; u1604173);河南省高校科技创新团队支持计划(18IRTSTHN022).

作者简介:董自梅(1969-),女,河南浚县人,河南师范大学教授,博士生导师,研究方向为淡水涡虫中枢神经系统的再生机制, E-mail: dzmhjx@163.com.

通信作者:陈广文,教授,博士生导师, E-mail: chengw0183@sina.com.

涡虫(*Polycelis yangchengensis*)中有助于增强细胞保护作用,抵抗应激诱导的分子损伤,同时也参与了 neoblasts 的增殖和分化^[17].但至目前为止,在日本三角涡虫中,HSP70 的具体功能尚不明确.

本研究从转录组数据库中筛选了在再生过程中显著调高的 *Djhsp70-4* 基因,观察了其在日本三角涡虫应激保护及再生中的作用.研究结果发现:在冷热应激、切割损伤和离子液体处理后,*Djhsp70-4* 表达调高.*Djhsp70-4* 基因在涡虫体内广泛表达,主要在身体两侧及再生芽基处;干扰该基因后整体及再生涡虫出现头部溶解现象,*Djhsp70-4* 基因在细胞保护、稳态维持和再生过程中起重要作用.

1 材料与方法

1.1 实验动物的采集与培养

本研究中使用的涡虫物种属于日本三角涡虫(*D. japonica*),采集自河南省鹤壁市鱼泉村(海拔:208 m;水温:10~20 °C;pH:5.6).涡虫培养在 20 °C 的黑暗环境中,使用高压灭菌的自来水饲养;实验前饥饿两周.整体涡虫自咽前耳突后切割,观察其再生情况.

1.2 序列的同源性分析

以 *Djhsp70-4* 的 cDNA 序列推导其氨基酸序列,使用美国国立生物技术信息中心网页版(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)的 BLASTn 和 BLASTp 工具,对 *Djhsp70-4* 进行核苷酸和蛋白质序列的相似性分析.使用 DNASTar 软件中的 MegAlign 程序,计算蛋白质序列的同一性.*Djhsp70-4* 的序列已上传至 GenBank 中(MK882934).

1.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

通过 Primer Premier 5.0 软件设计 *Djhsp70-4* RNA 干扰及实时荧光定量检测引物,使用 *Djef2* 作为内参基因^[18].所有引物扩增出的 PCR 产物均条带明亮且单一,通过 DNA 测序验证序列无误后用于后续实验,根据以前报道的方法进行操作^[19].

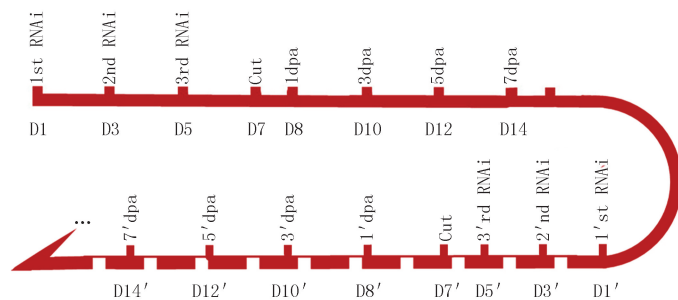
提取对照组整体以及切割后 12,24,36 h 再生涡虫的 RNA(10 只/组),使用反转录试剂盒将所提取的 RNA 反转录为 cDNA;基于实验室前期研究数据^[20],将离子液体[C8mim]Br 的质量浓度设定为 15.6 mg · L⁻¹,31.2 mg · L⁻¹,46.8 mg · L⁻¹ 分别对涡虫处理 2 d,将培养于高压灭菌水中的整体涡虫作为对照组.提取对照组和处理组涡虫的 RNA,反转录为 cDNA;将涡虫(10 只/组)的培养温度设定为 4 °C、10 °C、20 °C 和 30 °C,2 d 后提取 RNA 反转录为 cDNA;通过 qRT-PCR 技术观察 3 种不同的胁迫条件下,日本三角涡虫体内 *Djhsp70-4* 表达量的变化.

1.4 整体原位杂交(whole-in-situ hybridization, WISH)

使用地高辛 RNA 标记试剂盒(Dig-RNA labeling kit,Roche)合成 RNA 探针.对整体以及再生 1,3,5,7 d 的涡虫进行整体原位杂交,并使用体视显微镜(徕卡 M165C,德国)观察并记录结果,具体方法见以前报道^[21].

1.5 RNA 干扰(RNAi)

将构建好的含有 *Djhsp70-4* 保守区域序列的干扰载体 L4440,转化至大肠杆菌 HT115 并与牛肝匀浆混合喂食涡虫(30 只/组),喂食分为 2 轮,每轮 3 次(如图 1)^[22].并在最后一次喂食的 24 h 后对涡虫进行咽前耳突后切割.利用 WISH 和 qRT-PCR 证明 RNAi 的有效性.使用徕卡体视显微镜(M165C,德国)对干扰涡虫的形态进行观察拍照,并对再生 3,5,7 d 的对照与干扰组涡虫进行芽基测量,统计数据计算平均值与标准差.



D, D' 分别指第一轮,第二轮喂食天数;dpa, 'dpa 分别指第一轮,第二轮切割后的天数.

图1 日本三角涡虫RNA干扰喂食实验流程图

Fig.1 Flowchart of RNAi feeding and amputation schedules

1.6 实验数据的统计分析

使用 SPSS13.0 软件对实验数据进行统计分析,数据通过单因素方差分析和最小显著性法(LSD)进行多重比较,当差异在 $P < 0.05$ 时具有显著性(*),在 $P < 0.01$ 时具有极显著性(**).

2 实验结果

2.1 *Djhsp70-4* 基因的序列分析

Djhsp70-4 基因的 cDNA 长 1 982 bp,包含一个长 180 bp 的 5'末端非翻译区(UTR),一个长 38 bp 的 3'-UTR 以及一个长 1 764 bp 的开放阅读框(ORF),编码一个由 587 个氨基酸组成的相对分子量为 64.8 kDa 的蛋白质.HSP70 推导的氨酸含有该家族特有的两个序列标签:IFDLGGGTFDWSLL 和 IVLVGGSTR 以及多个磷酸化位点(如图 2).

```

1  gcaaaaggagccagcattggaattgaccttggaaascattatcatgtgtggggatggcgagacgctgttgaattattgccaatgatcagggaaacaggactacgcctgtat
124  gttggttaccagcaactgaanagattggttggagatggccnagaatcaggtggcATGAAATCCTACTAATACAGTGTTCGATGCAAAAGAGATTGATTGACGAAAATTTGACGATACAGAG
1  M N P T N T V F D A K R L I G R K F D D T E
247  GTTCAGAGCGATATGAAGCATTGGCCGTTCAAGGTTGTGAGAGAAAATTCAAAACAATCCGATGATCGAGTCGAGTATAGGGGAGAAATCAAGACATTTTCCCAGCAGAGATTTCGTCATG
270  V Q S D M K H W P F K V Y V R G N S N N P M I E V E Y R G E I K T F S P E Q I S S M
373  GTTTTGCACAAAGTAAAGAACAAGCAAGCATAATGGGAACGCCGATTACGAATCAGTGTATCAGGTCCCGCGTATTTCAAGCATCAGAGCCGCAAGCAAGGATCTCGAGAA
64  Y L S K M K E T A E A Y L G T P I T N A V I T V P A Y F N D Q Q R Q A K D S G E
493  ATATCCGGTCTCAAGGTCCTCCGGATCATCAAGCCGACTCGAGCAAGCAATCGCCTACGGTGTGGACAAGACTCAGAGTTGGAGAGAAAAGGTTGATATTGATTGGGTGGAGT
105  I S G L K V L R I I N E P T A A A I A Y G L D K T H E V G E K K V L I F D L G G G
616  ACATTTCAGCTGTCTTCTGTCGCCATCGATGGTCATATTGAAGTCAAAATCCACATGGGAGACACCACCCTGGAGGAGAAGATTTGACAATAGACTTGTCTCATTGTTCAGAG
146  T F D V S L L A I D G G I F E V K S T C G D T H L G G E D F D N R L V S H F V Q E
739  TTTCCAGAAAGTATAAAAAAGACATTTCAAAAAATCCGAGGTGCTTGTGTCGCTGCGAACCAGCGGTGTGAACGGGCCAAGAGTCTGTCTCAGCAACGAGGTCAGCATGAAATGAC
187  F Q R K Y K K D I S K N P R S L R L R L T A C E R A K R L S A T Q A S I E I D
862  TCGCTGCGGATGGAAATGATTCTATACAGCATTACC AGGGCGAGTTGGAAGAGCTGAATGCAGATTGTTCAGGTCTACTCGGAGCCATTGAAAAGGCAATGAGAGATGGAAGGTT
228  S L D G I D F Y T S I T R A R F E E L N A D L F R S T L E P I E K A L R D G K V
985  GATAAATCCAAGTCGATGAGATTGTTCTGTGGGGTTCTACCGGTATTCCAAAAGTTCAGAACTGTCCAGGACTTTTCGGGGGAAAAGAGCTCAACAAGTCAATCAATCCAGACGAG
269  D K S K V D E I V L V G G S T R I P K V Q K L V Q D F F G G K E L N K S I N P D E
1108  GCTGTTGCCATGAGCGCGGTTTCAGCGGCAATTCCTCAATGGAGACACTCGGAAAAGACTCGAGAGCTTCTGTGCTGGATGTTTGCTCTTCTTCTGGATTGAAACGGCAGCGGCT
310  A V A Y G A A V Q A A I L N G D T S E K T R D V L L L D V L P L S L G I E T A G G
1231  GTCATGACATCGATTGTCAGAGAACACCACAATCCAGTGGTTCAGACTCAGACGTTTCTACATATGCCGACAATCAACCGGTGTTTGTATACAGCTGTATGAGGAGAAGGACCATG
251  V M T S I V K R N T I P V V Q T Q T F S T Y A D N Q P G V L I Q V Y E G E R T M
1354  ACAAAAGACAACAATTTTGGGAAGTCCGAATGACTGGAATCCCGCCGCGCAAGGGGCGCTCGCTCAGGTGAAGTTACATTCGATATCGATGCAATGAAATTTGAAATGCAAGGCA
392  T K D N N L L G K F E L T G I P P A P R G V P Q V E V T F D I D A N G I L N V K A
1477  GTGGATAAAACAACAACAAGAAAGATGACATCAGAAATGACAGGGAAGACTGAGAGGAGAAATGAGAGATGCTGGATGAGCCCAAAAGTATAAGAAGATGATGAAGAG
433  V D K T T N N E R K I I T N D K G R L K E E I E R M V D E A Q K K K D D E E
1600  GTTAGCAGACAGTAAGTCCAGAAATGCAATGCAATGCTATGTTTACAGTCTAAAACAACAATTTGGACGATAAATACAGCAAGCAAGCTCGAGGAGCCGACAGCAAAAGCTCAAAAG
474  V R D R V A R N A L E S Y V Y S L K H T L D D N N T K S K L E E A D R T K L Q K
1723  GTGGTGGTAAACCAATTCGTGGTGTGACTGACTCAGGCTTCCAGGATGAGTATGAAAGTCGGCAAAAGAAATGGAAAGGATAGCGGACCTATATGACCAAGCTCAATCTCTCG
515  V V G E T I S V L D A S H Q A S K D E E S R Q K E L E G I A G P I M T K L H S S
1846  GGTATCCCAAGTGGATGCCAAGTGGATGCTGCGGATGCTGGTTCATCAGCATGACACCCCGGGCCAACTATTGAAGAGTCTGATttcgaactatttatgatgataaaa
556  G M P S G M P S G M P G G M P G S G H H D D T P G P T I E E V D *
1988  atttttattgagta

```

红色部分为该家族中保守的磷酸化位点,“*”标志的是终止密码子。

图2 *Djhsp70-4*基因核酸及其推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Djhsp70-4*

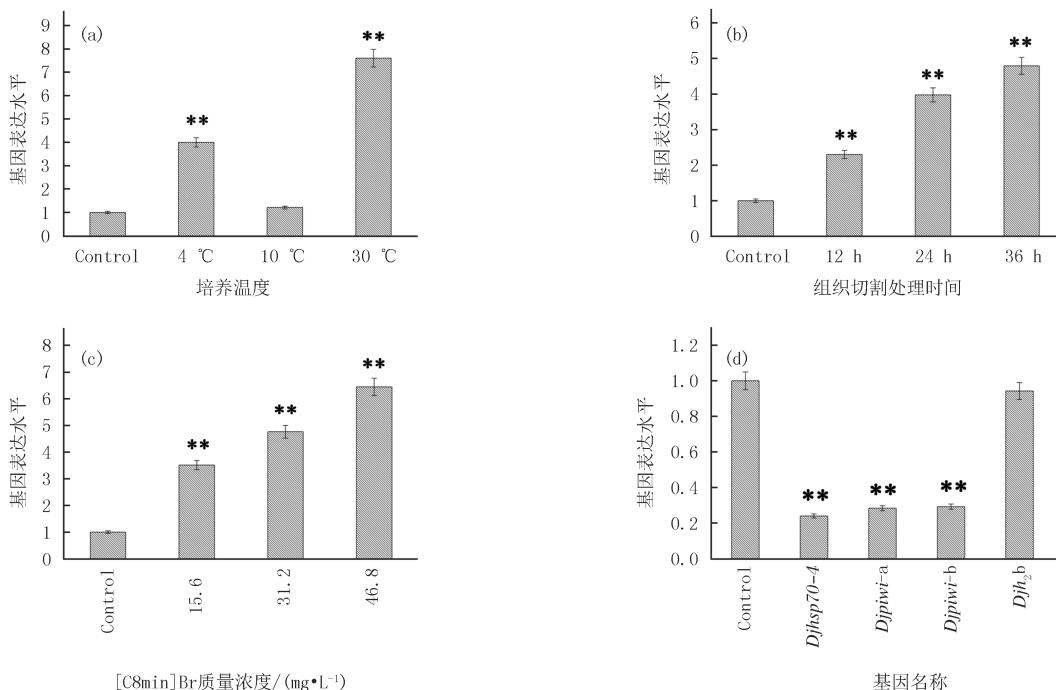
2.2 不同应激条件下 *Djhsp70-4* 基因的表达量

通过 qRT-PCR 检测了在各种外部应激条件刺激下 *Djhsp70-4* 基因的表达量.结果表明:在冷热应激条件下,与对照组(20 °C)相比,在 4 °C 和 30 °C 下培养的涡虫体内 *Djhsp70-4* 的表达量极显著增加;10 °C 下培养涡虫体内该基因表达量无明显变化,说明野外生存温度(10 °C),以及实验室培养温度(20 °C),均为日本三角涡虫的适宜生长温度(如图 3(a)).在切割组涡虫中,*Djhsp70-4* 基因的表达水平随切割时间的增加均极显著调高,并在切割后的 36 h 达到峰值(如图 3(b)).离子液体处理后的涡虫,其体内 *Djhsp70-4* 的表达量以剂量依赖的方式表现出明显上调(如图 3(c)).这些结果表明,*Djhsp70-4* 在外部应激环境中发挥了细胞保护的作用.

2.3 *Djhsp70-4* 在完整和再生涡虫中的表达模式

整体原位杂交(WISH)结果显示,在整体涡虫中,*Djhsp70-4* 主要分布于虫体除咽部以外的所有实质组

织,虫体两侧的信号尤其明显.在再生涡虫中,阳性信号在再生芽基处强烈表达.在 *Djhsp70-4* RNAi 实验组最后一次喂食后的第 7 天已基本无阳性信号表达,因此,认为实验所用到的 WISH 探针以及 RNAi 干扰载体均具有特异性(如图 4).



(a) 冷热应激; (b) 组织损伤应激; (c) 离子液体应激; (d) *Djhsp70-4* RNAi 后neoblasts相关标记基因的表达水平. *Djef2*为内参基因. 纵线表示误差值±SD(N=3). 星号表示该差异具有统计学意义(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

图3 *Djhsp70-4*基因在外界应激条件及干扰后干细胞标志基因的qRT-PCR结果
Fig.3 qRT-PCR analysis of *Djhsp70-4* in response to external stressors

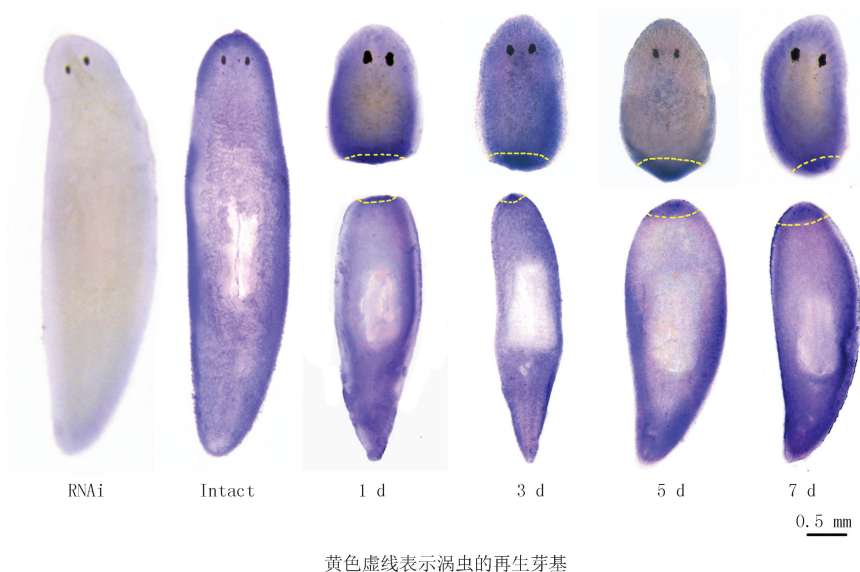


图4 *Djhsp70-4*基因在整体及再生涡虫中的表达模式

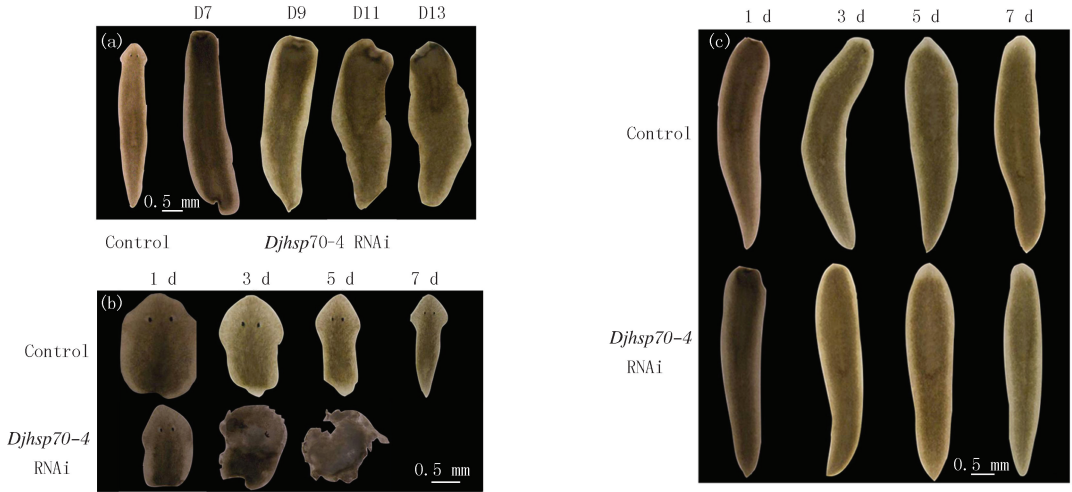
Fig.4 Expressions of *Djhsp70-4* intact and regenerating planarians by WISH

2.4 *Djhsp70-4* 在涡虫整体及再生中的作用

Djhsp70-4 基因的 RNAi 结果显示:整体组与头再生尾组涡虫均出现了明显的表型缺陷.与对照组相比,整体干扰组涡虫在最后一次喂食后的第 2 天(D7),涡虫头部出现了明显的溶解现象(12/30),到第 D9 头

部异常涡虫的比例增加到了 15/30,至第 6 天(D11)和第 8 天(D13)头部溃烂比例达到 17/30,且头部溶解处均未正常再生出芽基(如图 5(a));在干扰再生组中,头再生尾片段于最后一次喂食后的第 3 天开始逐渐出现溶解的现象,比例为 15/30.在第 5 天溶解的程度和比例继续增加,达到了 27/30,在第 7 天所有的头再生尾片段完全溶解消失(如图 5(b)).而与整体干扰组和再生干扰组中的头再生尾片段不同,尾再生头片段并未出现明显的异常现象,其芽基再生长度也与对照组无明显差别(如图 5(c),图 6).

为了进一步确定 *Djhsp70-4* 干扰后涡虫出现异常现象的原因,本研究选择了 3 个 neoblasts 标记基因 *Djpiwi-a*,*Djpiwi-b* 和 *Djh₂b* 进行检测.*Djhsp70-4* RNAi 处理后,*Djpiwi-a* 和 *Djpiwi-b* 的表达水平明显降低,而 *Djh₂b* 的表达水平与对照组相比变化不大(图 3(d)).



(a) 整体组; (b) 头再生尾组; (c) 尾再生头组.

图5 *Djhsp70-4* RNAi后涡虫的表型

Fig.5 The phenotypes observed following *Djhsp70-4* RNAi

3 讨论

本研究在日本三角涡虫转录组数据库中筛选了在再生过程中调高的 HSP70 家族基因:*Djhsp70-4*,它编码的蛋白质为 64.83 KDa,比 HSP70 家族成员相对分子质量(66~78 kDa)的要小一些,但 ORF 较完整,同时,*Djhsp70-4* 基因推导的氨基酸序列含有 HSP70 家族特有的序列标签,因此本文仍将其作为日本三角涡虫 HSP70 家族的一员.

热休克蛋白最初在果蝇(*Drosophila melanogaster*)幼虫唾液腺细胞受到热应激后的产物被发现^[23].研究发现,在生物体内,并不是仅仅在热应激的条件下才会诱导生成热休克蛋白;在其他不利因素下,如处于低温、缺氧或重金属污染的环境中、自身组织受到损伤、被紫外辐照等,甚至细菌和病毒的感染都能检测到热休克蛋白的高表达^[24],从而刺激细胞激活多种防御机制,其中,最广泛,最明显的反应就是形成分子伴侣^[25].目前认为 HSP70 是所有细胞中最保守,分布最广的蛋白结构保护的分子伴侣^[26].在日本三角涡虫受到冷热应激,切割损伤以及离子液体处理后,*Djhsp70-4* 的表达量极显著调高.因此,认为 *Djhsp70-4* 基因在日本三角涡虫中对于细胞的保护作用保守的.

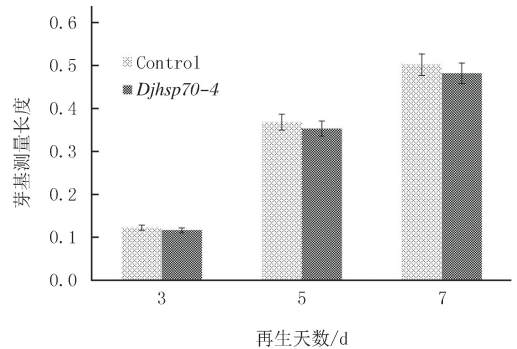


图6 *Djhsp70-4* RNAi后,尾再生头组再生芽基测量结果

Fig.6 Blastema analysis after *Djhsp70-4* RNAi

在涡虫中,再生主要依赖于被称为 neoblasts 的干细胞群体^[27].虫体受到损伤时可诱导 neoblasts 迁移到

伤口处,并通过增殖和分化形成缺失的组织^[28].neoblasts 主要分布在涡虫的实质组织中^[29].而 *Djhsp70-4* 的 mRNA 主要在分布在整体涡虫除咽部之外的实质组织以及再生芽基中,这与 neoblasts 的分布几乎完全重合^[30].在日本三角涡虫中,*Djpiwi-a* 主要在其背侧的实质组织中分布,是 neoblasts 的标志基因,其主要功能是保持涡虫体内具有一定数量的 neoblasts,从而维持涡虫组织平衡^[31].*Djpiwi-b* 在涡虫再生与细胞分化,尤其是体细胞的分化中起重要作用^[32].而 *Djhsp70-4* 基因被敲降后,*Djpiwi-a*,*Djpiwi-b* 的表达水平极显著下调,同时出现整体干扰组与再生干扰组中涡虫头部溶解的现象,可能是由于 *Djhsp70-4* 表达量降低后影响了 neoblasts 的增殖及分化,打破了涡虫体内 neoblasts 的平衡,而涡虫头部的 neoblasts 分布数量较少,且 neoblasts 的分化降低导致维持涡虫头部的正常细胞无法及时更新,不能及时补充至头部,最终导致了虫体头部的组织稳态被打破,造成头部溶解的现象.比较奇怪的是尾再生头片段没有出现明显异常现象,且组蛋白基因 *Djh₂b*,干细胞的另一个标记基因^[33] 的表达量却未有明显的变化,其原因可能是当头部被切除后,尾部片段原有 neoblasts 数量能够维持涡虫体内正常的细胞更新,尽管 *Djhsp70-4* 的敲降后影响了 neoblasts 的增殖及分化,但并不足以导致再生停止,其具体原因需要进一步探究.

综上所述,研究结果表明,*Djhsp70-4* 基因在日本三角涡虫体内不仅具有细胞保护作用,能够应对不利环境,而且可以通过调节 neoblasts 在体内的增殖和分化而影响涡虫组织稳态及再生,特别是维持头部的稳态平衡.但是目前,关于 *Djhsp70-4* 具体调控机制仍需要进一步的研究.

参 考 文 献

- [1] DAVIES E L, LEI K, SEIDEL C W, et al. Embryonic origin of adult stem cells required for tissue homeostasis and regeneration[J]. *Elife*, 2017, 6: e21052.
- [2] SAHU S, DATTANI A, ABOOBAKER A A. Secrets from immortal worms: What can we learn about biological ageing from the planarian model system?[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 70: 108-121.
- [3] BRAVO R, FRANK R, BLUNDELL P A, et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary of DNA polymerase-delta[J]. *Nature*, 1987, 326(6112): 515-517.
- [4] HAY E D, COWARD S J. Fine structure studies on the planarian, *Dugesia*[J]. *Journal of Ultrastructure Research*, 1975, 50(1): 1-21.
- [5] EISENHOFER G T, KANG H, SANCHEZ A A. Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(3): 327-339.
- [6] WENEMOSER D, REDDIEN P W. Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence[J]. *Development Biology*, 2010, 344: 979-991.
- [7] SALÓ E, BAGUÀ J. Regeneration and pattern formation in planarians II. Local origin and role of cell movements in blastema formation[J]. *Development*, 1989, 107: 69-76.
- [8] MAYER M P, BUKAU B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 670-684.
- [9] GUPTA A, BANSAL A, HASHIMOTO-TORII K. HSP70 and HSP90 in neurodegenerative diseases[J]. *Neurosci Lett*, 2020, 716: 134678.
- [10] KALMAR B, GREENSMITH L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61: 310.
- [11] DEULERLING, E, BUKAU, B. Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2004, 39(5/6): 261-277.
- [12] HARTL F U, BRACHER A, HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis[J]. *Nature*, 2011, 475: 324-332.
- [13] YUN C W, KIM H J, LIM J H, et al. Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy[J]. *Cells*, 2019, 9(1): 60.
- [14] ISOLANI M E, CONTE M, DERI P, et al. Stem cell protection mechanisms in planarians; the role of some heat shock genes[J]. *Int J Dev Biol*, 2012, 56(1/3): 127-133.
- [15] FERNÁNDEZ-TABOADA E, RODRÍGUEZ-ESTEBAN G, SALÓ E, et al. A proteomics approach to decipher the molecular nature of planarian stem cells[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 133.
- [16] DONG Z M, CHU G B, SIMA Y X, et al. *Djhsp90s* are crucial regulators during planarian regeneration and tissue homeostasis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 498: 723-728.
- [17] CHENG F, DONG Z, DONG Y, et al. Identification and expression analysis of a heat-shock protein 70 gene in *Polycelis sp.*[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2015, 20: 907-915.

- [18] MANNINI L, ROSSI L, DERI P, et al. Djeyes absent (Djeya) controls prototypic planarian eye regeneration by cooperating with the transcription factor DjSix-1[J]. *Dev Biol*, 2004, 269(2): 346-359.
- [19] DONG Z M, YUWEN Y Q, WANG Q H, et al. Eight genes expression patterns during visual system regeneration in *Dugesia japonica*[J]. *Gene Expr Patterns*, 2012, 12: 1-6.
- [20] DONG Z M, CHENG F F, YUWEN Y Q, et al. Identification and expression analysis of a Spsb gene in planarian *Dugesia japonica*[J]. *Gene*, 2015, 564: 168-175.
- [21] DONG Z M, SHI C Y, ZHANG H C, et al. The characteristics of sox gene in *Dugesia japonica*[J]. *Gene*, 2014, 544: 177-183.
- [22] DONG Z M, YUWEN Y Q, SIMA Y X, et al. Photokinesis and Djopsin gene expression analysis during the regeneration of Planarian eyes [J]. *Integr Zool*, 2017, 12: 157-164.
- [23] ASHBURNER M, BONNER J J. The induction of gene activity in drosophila by heat shock[J]. *Cell*, 1979, 17: 241.
- [24] FABRI E, FRANZELLITTI S, VALBONESI P. HSP expression in bivalves[J]. *Invertebrate Survival Journal*, 2008, 5: 135-161.
- [25] HARTL F U. Molecular chaperones in cellular protein folding[J]. *Nature*, 1996, 381(6583): 571-579.
- [26] BASILE A, SORBO S, CONTE B. Ultrastructural changes and Heat Shock Proteins 70 induced by atmospheric pollution are similar to the effects observed under in vitro heavy metals stress in *Conocephalum conicum* (Marchantiales-Bryophyta)[J]. *Environ Pollut*, 2013, 182: 209-216.
- [27] KIM I V, DUNCAN E M, ROSS E J, et al. Planarians recruit piRNAs for mRNA turnover in adult stem cells[J]. *Genes Dev*, 2019, 33(21/22): 1575-1590.
- [28] ROSSI L, SALVETTI A, BATISTONI R. Planarians, a tale of stem cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(1): 16-23.
- [29] GIRI B R, LI H, CHEN Y, et al. Preliminary valuation of neoblast-like stem cell factor and transcript expression profiles in *Schistosoma japonicum*[J]. *Acta Trop*, 2018, 187: 57-64.
- [30] GUEDELHOEFER O C, SÁNCHEZ A A. Planarian immobilization, partial irradiation, and tissue transplantation[J]. *J Vis Exp*, 2012(66): 4015.
- [31] SMOCK R G, BLACKBURN M E, GIERASCH L M. Conserved, disordered Cterminus of DnaK enhances cellular survival upon stress and DnaK in vitro chaperone activity[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 31821-31829.
- [32] BUCHBERGER A, SCHRÖDER H, HESTERKAMP T, et al. Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding[J]. *J Mol Biol*, 1996, 261: 328-333.
- [33] TYEDMERS J, MOGK A, BUKAU B. Cellular strategies for controlling protein aggregation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 777-788.

Function analysis of *Djhs*p70-4 gene in planarians

Dong Zimei, Cui Guozhen, Chen Guangwen, Liu Dezeng

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xixiang 453007, China)

Abstract: Heat shock proteins 70 (HSP70) play a key role in cell protection. But so far, in *Dugesia japonica*, the specific functions of HSP70 are unclear. In this paper, *D. japonica* with extremely high regeneration ability is used as experimental material. From the transcriptome database, the *Djhs*p70-4 gene significantly increased during the regeneration process were selected for research. The results of qRT-PCR showed that after being stimulated by the outside world, the expression of *Djhs*p70-4 gene was significantly increased. Through the whole-in-situ hybridization technique, it was observed that the *Djhs*p70-4 gene had a strong hybridization signal on both sides of the body of the whole planarian and at the regenerated blastma. After the RNA interference technique was used to reduce the expression of the *Djhs*p70-4 gene, head dissolution occurred in the whole and regenerated planarians. In summary, the *Djhs*p70-4 gene may play an important role in the maintenance and regeneration of *D. japonica*.

Keywords: *Dugesia japonica*; stress; *Djhs*p70-4 gene; homeostatic maintenance; regeneration

[责任编辑 王凤产 杨浦]