

# 细胞自噬基因 *Atg6* 在涡虫中枢神经系统再生中的功能研究

马克学, 李睿, 郭芳莹, 宋鸽鸽, 吴萌, 陈广文, 刘德增

河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007

**摘要:** 细胞自噬基因 *Atg6* 在细胞自噬过程中发挥重要作用, 其功能缺陷影响神经发生。涡虫是研究中枢神经系统(central nervous system, CNS)再生的良好模型, 其头部切除后 1 周就能再生出一个新的头部。因此, 研究 *Atg6* 基因在涡虫 CNS 再生中的作用对探究自噬调控神经发生具有重要意义。本研究首次报道了日本三角涡虫 (*Dugesia japonica*) *Atg6* 基因(*DjAtg6*)的分子特征, 并利用 RNAi 技术研究了其在涡虫 CNS 再生中作用。结果显示: *DjAtg6* cDNA 全长 1366 bp, 编码 423 个氨基酸。*DjATG6* 含有 ATG6/Beclin 1 蛋白家族的 Coiled-Coil 结构域和  $\beta$  折叠  $\alpha$  螺旋自噬功能结构域。涡虫沿咽前咽后切割后, *DjAtg6* 表达量显著增加, 其转录本主要在新再生的脑神经节表达。RNAi-*DjAtg6* 引起涡虫头部再生迟缓、脑神经结构偏小, 并下调神经相关基因的表达。此外, 本研究还发现, RNAi-*DjAtg6* 不影响涡虫干细胞的增殖, 但下调细胞迁移相关基因 *mmp1* 和 *mmp2* 的表达, 且干扰 *mmp1* 和 *mmp2* 的表达影响涡虫头再生。因此, 本研究结果表明, *DjAtg6* 在涡虫 CNS 再生的组织重构中发挥重要作用, 干扰 *DjAtg6* 影响涡虫 CNS 再生可能与细胞迁移有关, 其详细的分子机制尚需进行深入研究。

**关键词:** 涡虫; 细胞自噬; *Atg6*; 再生; RNA 干扰

## Functional analysis of autophagy-related gene *Atg6* in planarian central nervous system regeneration

Kexue Ma, Rui Li, Fangying Guo, Gege Song, Meng Wu, Guangwen Chen, Dezeng Liu

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

**Abstract:** Autophagy-related gene 6 (*Atg6*) plays an essential role in autophagy, and loss of its function impairs neurogenesis. Planarian is a good model for the study of the central nervous system (CNS) regeneration. It can regenerate a new head *de novo* in 1 week following decapitation. Therefore, functional analysis of *Atg6* in planarian CNS regeneration is very important for understanding of autophagy in the regulation of neurogenesis. In this work, we reported the molecular characteristics of *Atg6* in *Dugesia japonica* (*DjAtg6*) for the first time and examined its function by RNAi. The full-length

收稿日期: 2021-03-30; 修回日期: 2021-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31572267, 31471965)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31572267, 31471965)]

作者简介: 马克学, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 涡虫再生和抗逆性的分子机制。E-mail: makexue@sina.com

通讯作者: 陈广文, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 涡虫再生和资源保护。E-mail: Chengw0183@sina.com

DOI: 10.16288/j.ycz.21-118

网络出版时间: 2021/7/22 11:30:46

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210721.1145.002.html>

cDNA of *DjAtg6* is 1366 bp encoding 423 amino acids. The deduced amino sequence of *DjAtg6* contains the coil-coil domain and  $\beta$ - $\alpha$ -repeated autophagy-specific domain shared by ATG6/Beclin 1 family. Following amputation before and after the pharynx, *DjAtg6* transcripts increased and were mainly distributed in the newly regenerated brain structure. RNAi-*DjAtg6* delayed planarian head regeneration with a small size of brain, and decreased the expression levels of neural-related genes. In addition, our results revealed that RNAi-*DjAtg6* did not affect the stem cell proliferation, but down-regulated the cell migration-related genes *mmp1* and *mmp2*. Furthermore, RNAi-*mmp1* and RNAi-*mmp2* delayed planarian head regeneration. Therefore, our results suggest that *DjAtg6* is important for planarian CNS regeneration. The abnormal CNS regeneration caused by RNAi-*DjAtg6* may be related to cell migration, but the detailed mechanism needs to be further investigated.

**Keywords:** planarian; autophagy; *Atg6*; regeneration; RNA interference

细胞自噬是一种依赖溶酶体的蛋白质降解途径, 广泛参与细胞增殖、分化、迁移和细胞命运决定等重要的生物学过程<sup>[1,2]</sup>。神经发生涉及细胞形态和功能的转变, 细胞自噬参与其中<sup>[3,4]</sup>。研究表明, Beclin 1 (哺乳动物 ATG6 的同源蛋白) 在鼠(*Mus musculus*)侧脑室室下区表达, Beclin 1<sup>+/-</sup>小鼠神经球体面积缩小<sup>[5]</sup>。另有研究发现, Beclin 1 下调表达与神经退行性疾病有关<sup>[6]</sup>。上述研究说明, *Atg6/Beclin 1* 在神经发生和中枢神经(central nervous system, CNS)稳态维持过程中发挥重要作用。涡虫(Platyhelminthes, Turbellaria)是体内研究神经发生的理想实验动物, 它能在一周内再生出一个全新的脑结构<sup>[7]</sup>。涡虫的神经再生吸引无数学者关注, 虽然研究人员已经发现了一些调控涡虫 CNS 再生的关键基因<sup>[8-10]</sup>, 但其神经发生的分子机制仍不十分清楚。涡虫 CNS 再生是细胞增殖、分化、迁移和细胞死亡等诸多细胞生物学过程整合的复杂机制。虽然早有研究人员提出细胞自噬参与其中<sup>[11]</sup>, 但并没有相关研究报道。为了研究细胞自噬调控神经发生的分子机制, 本研究鉴定了日本三角涡虫(*Dugesia japonica*) *Atg6* 同源基因, 并用整体原位杂交和 RNAi 技术研究其在涡虫 CNS 再生过程中作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

日本三角涡虫来自本实验室无性繁殖, 实验前至少饥饿 7 d。再生实验的涡虫从咽前和咽后切成 3

段(头部片段、躯干片段和尾部片段), 20℃避光培养。

### 1.2 日本三角涡虫 *Atg6* cDNA 克隆和生物信息学分析

随机挑选 5~6 条涡虫, 在液氮中研磨成粉末, 加入 1 mL Trizol 试剂后按操作说明进行总 RNA 提取, 然后取 2  $\mu$ g 总 RNA 用于 cDNA 合成(PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis kit, 日本 TaKaRa 公司)。根据从日本三角涡虫转录组数据库筛选出来的 *DjAtg6* EST 序列设计 3'-RACE 和 5'-RACE 特异性引物(附表 1), 按照 Clontech RACE cDNA 试剂盒扩增 cDNA 片段。纯化的 PCR 片段连接 pMD19-T 后筛选阳性克隆进行测序分析。根据测序结果拼接出 *DjAtg6* 全长 cDNA 序列, 并利用 DNASTAR 软件预测开放阅读框(ORF)并推导出编码的氨基酸序列。*DjAtg6* 核苷酸序列和氨基酸序列同源性分析在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 网站进行, 蛋白质结构域分析采用 Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) 在线软件, 亚细胞定位预测利用在线软件 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>) 进行。

### 1.3 qRT-PCR 分析

挑选躯干片段的再生涡虫按上述方法进行总 RNA 提取和 cDNA 合成。实时荧光定量 PCR 在 ABI 7500 系统中进行, 反应体系为 20  $\mu$ L: 10  $\mu$ L 2  $\times$  TB Green Premix Ex Taq II (ROX plus, 日本 TaKaRa 公司), 上下游引物各 0.8  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), cDNA 模板 1  $\mu$ L, 灭菌超纯水 7.4  $\mu$ L。PCR 参数如下: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。

以 *Djef2* 为内参基因, 以  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法<sup>[12]</sup> 计算 mRNA 相对表达量, 实验重复 3 次。本研究检测的干细胞相关基因(*piwiA*、*mcm2*、*pcna*、*h2b*)和神经相关基因(*coe*、*soxB2*、*pax6*、*runt*、*hesl-3*)的引物序列见附表 1。采用 SPASS 10.0 软件进行单因子方差分析,  $P < 0.05$  表示显著性差异。

## 1.4 整体原位杂交

原位杂交探针的合成采用 digoxigenin-labeling kit (SP6/T7, 美国 Roche 公司), 扩增模板所用的引物序列见附表 1。整体原位杂交(whole mount *in situ* hybridization, WISH)根据文献<sup>[13]</sup>操作并稍微修改。主要步骤如下: 涡虫用 2% HCl 处死后立即用 4% 甲醛固定, 然后经过 6%  $H_2O_2$  漂白, 蛋白酶 K 处理, 然后加入 400 ng/mL 探针, 56℃ 杂交 > 16 h。杂交信号用 BCIP/NBT 显色, 用 Leica DFC300FX 显微镜拍照后用 Adobe Photoshop 处理。

## 1.5 dsRNA 干扰实验

双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 合成使用 MEGAscript RNAi Kit (Ambion 1626), 扩增模板所用的引物序列见附表 1。RNAi-*DjAtg6* 采用注射法, 纯化后的 dsRNA 按照文献<sup>[14, 15]</sup>中的操作方法注射涡虫, 涡虫隔天注射一次, 每次 4×46 nL, 共注射 5 次。注射结束后 24 h 切割涡虫, 观察再生表型, 用 Leica DFC300FX 显微镜拍照再生涡虫, 保存图片并用系统附带的测量工具测量再生胚基长度。测量数据采用 SPASS 10.0 软件进行统计学处理。干扰组和对照组总 RNA 提取和 qRT-PCR 检测方法见 1.2 和 1.3 部分, 检测相关基因的表达量所用引物见附表 1。阴性对照为 GFP dsRNA, 阳性对照为  $\beta$ -catenin-1 dsRNA。RNAi 实验至少重复 3 次。

基质金属蛋白水解酶(matrix metalloproteinases, MMPs)调控细胞外基质动态变化, 参与细胞迁移和细胞分化。已有研究表明, 干扰 *mmp1* 和 *mmp2* 的表达影响涡虫干细胞迁移<sup>[16]</sup>。为进一步验证这个实验结果, 本研究采用 Rouhana 等<sup>[17]</sup>提供的方法合成 *mmp1* 和 *mmp2* dsRNA (所用引物见附表 1) 并进行干扰实验。将合成的 10 mg dsRNA 与 30  $\mu$ L 牛肝匀浆混合后喂食 25 条左右长度为 3~4 mm 涡虫, 间隔 3 d 喂食一次, 共喂食 8 次。喂食结束后次日切割涡虫

观察再生表型, 用 Leica DFC300FX 显微镜拍照再生虫子并测量再生胚基长度。实验结果采用 SPASS 10.0 软件进行统计学处理。

## 1.6 免疫荧光

整体免疫荧光按照文献<sup>[18]</sup>中的方法进行操作。磷酸化组蛋白 H3(H3P)抗体(Millipore 06-870, 1:200 diluted in PBST)用于检测有丝分裂细胞, anti-SYNORF1 (3C11)抗体(DSH, 1:20 diluted in PBST)用于显示涡虫 CNS。二抗 goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 和 goat anti-mouse Alexa Fluor 488 1:400 倍稀释用于检测阳性信号, Stereo fluorescence microscope (Axio Zoom. V16, 德国蔡司公司)拍照并保存图片。统计 H3P<sup>+</sup>阳性细胞的数量采用 Image J 软件进行, 按照细胞数量/面积进行分析, 统计数据经 SPASS 10.0 软件进行分析处理。

# 2 结果与分析

## 2.1 日本三角涡虫 *Atg6* 基因的鉴定和生物信息学分析

本研究采用 RACE 技术解析了日本三角涡虫细胞自噬基因 *Atg6* (命名为 *DjAtg6*) 的全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: MG209579)。 *DjAtg6* cDNA 全长 1366 bp, 5'-末端有 26 bp 非翻译区, 3'-末端有 68 bp 非翻译区并含有 polyA 尾巴, 在 polyA 尾巴上游 9 bp 处可见 AATAAA 的加尾信号(图 1)。经 DNASTAR 软件分析, 该基因开放阅读框(ORF)长度 1272 bp, 编码 423 个氨基酸, 分子量 49 kDa。 Pfam 在线软件分析显示, *DjATG6* 蛋白含有 ATG6 蛋白家族 Coil-Coil 结构域(图 1, 下划线显示位于 104~229 位氨基酸残基)和自噬功能结构域(图 1, 双下划线显示位于 231~407 位氨基酸残基)。亚细胞定位分析显示该蛋白定位于细胞质中的囊泡(图略)。 Blast 检索显示, *DjATG6* 与已经报道的无脊椎动物和脊椎动物 ATG6 蛋白有很高的相似度(图略), 说明 *DjATG6* 属于 ATG6 蛋白家族成员。

## 2.2 *DjAtg6* 在涡虫再生过程中时空表达

涡虫的脑神经结构简单, 由 1 对脑神经节构成,

AAT CTA TAT AAC TAT TAT ATG GTA TA

```

27  [ATG]GAC GGG ATT CCA AAA GAT ATT TTA GTT AAT TGT AAA AAG TGT TCC TCA CCG TTA ATA TTG GAT TTG GAT CTA AGT TTA ATG AAA CCT
1  M D G I P K D I L V N C K K C S S P L I L D L D L S L M K P
117 CCT GTT GAT GAA AAA TTT TGT GAG GAA AAT CCA GAT ATT ATT ATA ATT CCA ACT ACA CAG CCA AAT GAA CCT CTT GAG TAT CAG GAA GTT
31 P V D E K F C E E N P D I I I I P T T Q P N E P L E Y Q E V
207 TCA TCT GAT TAT AGT CAT GAC AAT GTT GAC TAT GGA ACA ATT ATG GGA GAT GCT TCT GAT TTA TCA AGG AAA ATC AGG GTT GCT GAA GAA
61 S S D Y S H D N V D Y G T I M G D A S D L S R K I R V A E E
297 ATA TTC AAT TAT ATT AGT GGT AAA TCA ACT TCA GAT CAT CCC ATG TGT CAA GAT TGT GCA AAT ACT GTT ATT CAA AAT CAA GAA AAA CTT
91 I F N Y I S G K S T S D H P M C Q D C A N T V I Q N Q E K L
387 TTA AAT CAA ACT AAA TCG GAA ATT GAG TCA TTA GAA ATC TAT TTA TCA ACA CTC GAA ATT AAA CCA ATT ACT CAG GAT AAC TCA GAT GAG
121 L N Q T K S E I E S L E I Y L S T L E I K P I T Q D N S D E
477 TAT TCT AAG TTG GAA GAA GAA GAA CAG AGT TTA CTG GCG GAA TTG AAA AAT TTA CAA TTG GAA AAT GAT CAG TTA GAT AGA GAA ATA GCC
151 Y S K L E E E E Q S L L A E L K N L Q L E N D Q L D R E I A
567 GTA GAA AAT GCT ATA TTG GAA AGC AAA AAC ATT GAA TAC GAT AAA ATT GTG ATG AAT TAT AAT ACC AAA AAA CAA ATA CTG TGG GAT CTT
181 V E N A I L E S K N I E Y D K I V M N Y N T K K Q I L W D L
657 GAA GAT GAT ATT AGA TCA TTA AAT CAA CGT AAA AAA TAT CTT AGT TTC CTT GCA GAA AGA TTA AAG CGA ACT AAT TTA TTA AAC GTT CTT
211 E D D I R S L N Q R K K Y L S F L A E R L K R T N L L N V L
747 TTT CCA ATT TGG CAT GAG GAT CAC TTT GCA ACG ATT AAT GGT TTT AGA GTA GGT AAA TTA CCT GAA ACT CCA GTC GAA TGG CCA GAG ATT
241 F P I W H E D H F A T I N G F R V G K L P E T P V E W P E I
837 AAT GCT GGA TTA GGG CAA TGT GTC CTA TTA TTG CAG AAT ATT CTC AGG AAG ATG GAG ATG ACA CTA GAG AAC TAC AAA TTA GTT CCT TGT
271 N A G L G Q C V L L L Q N I L R K M E M T L E N Y K L V P C
927 GGA AAT TCT TCA TAT ATT GAA TCA TTG AAA GAC AAG AAA AAA TAT TCG CTT TTT AAG ACT AGT GGG TAT AGA ATT CTT GCA GAT AAA TTC
301 G N S S Y I E S L K D K K K Y S L F K T S G Y R I L A D K F
1017 GAT TAT GCT CTT ATA GCT TAT TTG GAT TGC TTA AAT CAA GTT ATA GTT CGA ATA GAA AAT CAC GAC ACT AAT TTC AAG TTT CCC TAT CGT
331 D Y A L I A Y L D C L N Q V I V R I E N H D T N F K F P Y R
1107 ATC TTC GAT AAA CAT AAA ATA GAT GAG CCT GGT GGA CCG GGA TAT TCA ATA AAG TTA TCA GGT AAT TCT GAC GAA AAT TGG ACT AAG GCA
361 I F D K H K I D E P G G P G Y S I K L S G N S D E N W T K A
1197 ATG AAA TTC ATG CTC ATT AAT CTT AAA TGG ATC ACA ACA TGG ATG GTC AAA GCA TCA TTC AAA CAG TAT TGT GAT TCA ATT AGA GAA CAA
391 M K F M L I N L K W I T T W M V K A S F K Q Y C D S I R E Q
1287 TCA TTA TCA [TAA]TGAATCTTCGAGATTAATCTATTTTCTTATGAAATAATTGTTTTT [AATAAA]TAATTTTTGAAAAA
421 S L S

```

图 1 日本三角涡虫 *Atg6* 基因核苷酸序列和编码区氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide sequence of *Atg6* gene and the amino acid sequence in the coding region from planarian *Dugesia japonica*

方框分别显示起始密码子、终止密码子和 polyA 加尾信号。下划线显示 ATG6 蛋白家族的标签序列 Coil-Coil 结构域, 双下划线显示自噬功能结构域。

呈倒“U”型(图 2B)。为了研究 *DjAtg6* 在涡虫脑神经再生中的功能, 本研究首先利用 qRT-PCR 方法检测了 *DjAtg6* 在涡虫再生过程中的表达变化, 结果显示切割后再生 3 d 的 *DjAtg6* 表达量显著增加, 再生 5~7 d 表达量维持在较高水平(图 2A)。进一步用 WISH 技术检测了 *DjAtg6* 转录本的分布模式, 结果显示涡虫再生 1 d 的 *DjAtg6* 阳性杂交信号开始在胚基前端出现(图 2D)。涡虫再生 3 d, 杂交信号非常清晰的显示出 1 对脑神经节(图 2D), 与涡虫 CNS marker 基因 *pc2* 的表达模式非常相似(图 2C)。涡虫再生 5~7 d, 特异性杂交信号清晰的显示出涡虫呈倒“U”型脑神经节(图 2D)。涡虫再生 10~15 d, 特异性杂交信号减弱但脑神经节仍隐约可见(图 2D)。结果表明, *DjAtg6* 可能参与涡虫脑再生组织结构的重

新构建。

### 2.3 RNAi-*DjAtg6* 对涡虫再生的影响

为研究 *DjAtg6* 在涡虫再生中的作用, 采用 RNAi 技术抑制该基因的表达。结果显示, RNAi-*DjAtg6* 导致大多数涡虫再生迟缓(图 3B, 56/78), 形成一个较小的头部, 且眼点不明显。本研究测量了对照组和 RNAi 组再生胚基的长度, 结果表明对照组胚基长度是  $0.547 \pm 0.062$  mm, 而 RNAi-*DjAtg6* 实验组胚基长度是  $0.332 \pm 0.051$  mm。与对照组相比, 实验组新再生的胚基长度缩短了约 40% (图 3C)。本研究采用 qRT-PCR 检测了内源性 *DjAtg6* 的表达, 结果显示 RNAi 组 *DjAtg6* 表达量降低了约 80% (图 3D), 且干扰  *$\beta$ -catenin-1* 的阳性对照组涡虫能够再生出



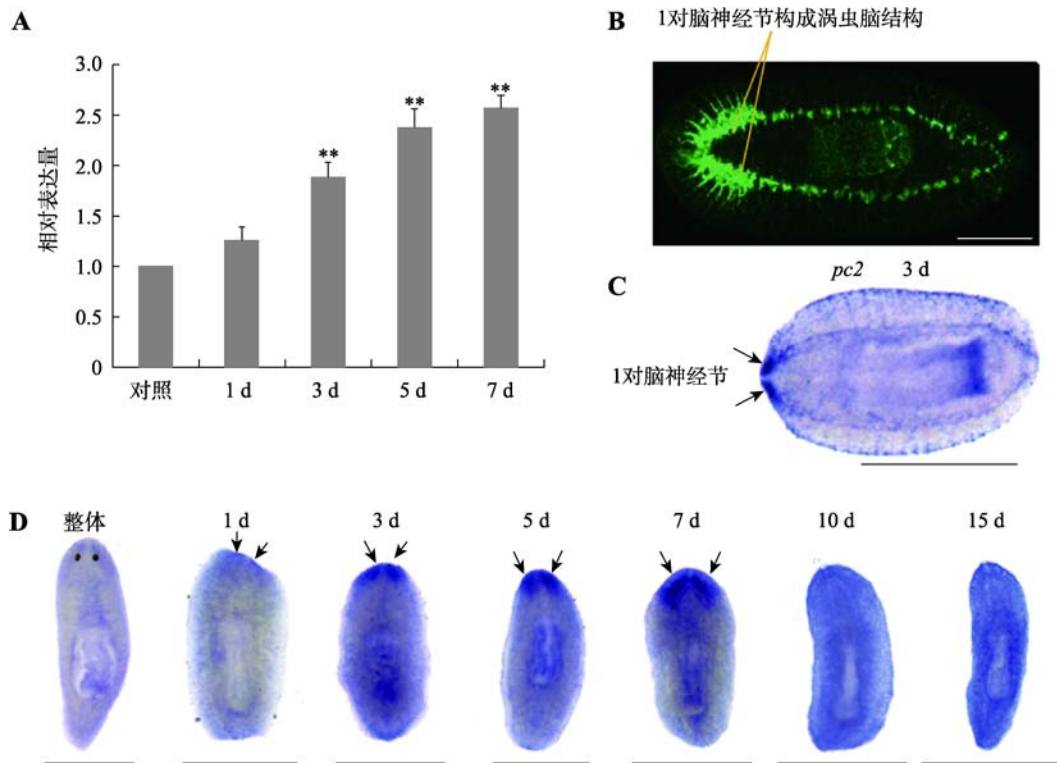


图 2 *DjAtg6* 的时空表达模式

Fig. 2 Spatiotemporal expression pattern of *DjAtg6*

A: qRT-PCR 检测 *DjAtg6* 在涡虫再生过程中的表达变化。以再生 0 h 的涡虫为对照, 收集躯干片段再生涡虫提取 RNA 进行检测, 实验重复 3 次,  $**P < 0.01$ 。B: anti-SYRNORF1 抗体显示涡虫脑结构: 1 对脑神经节组成。C: 涡虫 CNS marker 基因 *pc2* 探针显示 1 对脑神经节(再生 3 d)。D: 整体和再生涡虫中 *DjAtg6* 表达模式。箭头显示 1 对脑神经节, 标尺: 1 mm。

双头涡虫表型(图 3B, 22/22)。上述结果说明, 本研究的干扰方法可靠, RNAi 有效抑制了 *DjAtg6* 的表达。

#### 2.4 RNAi-*DjAtg6* 对涡虫 CNS 再生和神经相关基因表达的影响

为进一步研究 RNAi-*DjAtg6* 对涡虫 CNS 再生的影响, 本研究采用 anti-SYRNORF1(3C11)抗体显示涡虫脑神经结构<sup>[18]</sup>。结果如图 4A 所示, *DjAtg6* 干扰组脑神经结构显著小于对照组, 脑神经节较短且不明显。此外, 本研究进一步采用 qRT-PCR 检测了几个与神经相关的转录因子的表达(图 4B)。Coe 基因编码的转录因子对动物 CNS 发育非常重要<sup>[19]</sup>, 干扰后其表达量下降了约 30%, 是对照水平的 0.66 倍。已有研究证明, *soxB2*、*pax6* 和 *runt* 编码的转录因子对涡虫脑神经再生非常重要<sup>[10]</sup>, 干扰后它们的表达量分别是对照水平的 0.51 倍、0.47 倍和 0.33 倍。*Hesl-3* 编码的转录因子在涡虫脑神经节表达<sup>[10]</sup>, 干

扰后其表达量是对照水平的 0.58 倍。可见, 干扰 *DjAtg6* 降低了涡虫脑神经相关基因的表达。

#### 2.5 RNAi-*DjAtg6* 对涡虫干细胞相关基因表达的影响

涡虫再生是以干细胞的增殖和分化为基础。为了验证干扰 *DjAtg6* 引起小头表型是否与干细胞的增殖活性降低有关, 本研究首先检测了细胞有丝分裂指数的变化。H3P<sup>+</sup>阳性细胞是反映细胞有丝分裂数量的常用指标<sup>[20]</sup>。免疫荧光显示, H3P<sup>+</sup>阳性细胞的数量对照组是  $220 \pm 35/\text{mm}^2$ , 而实验组是  $235 \pm 24/\text{mm}^2$  (图 5, A 和 B), 两侧相比没有显著性差异。本研究进一步采用 qRT-PCR 技术检测了涡虫干细胞相关基因的表达变化。结果显示, 与对照组相比, 干扰组涡虫干细胞 markers 基因(*piwiA*、*mcm2*、*pcna*、*h2b*)的表达量没有明显降低(图 5C)。为了验证干扰 *DjAtg6* 是否影响了干细胞迁移, 本研究检测了两个与细胞迁移相关的基因<sup>[16]</sup>, 结果显示 *mmp1* 和 *mmp2*

基因的表达量分别降低了约 40% 和 30%，是对照水平的 0.55 倍和 0.68 倍。上述研究结果说明，干扰

*DjAtg6* 不影响干细胞的增殖活性，但可能影响干细胞的迁移和分化。

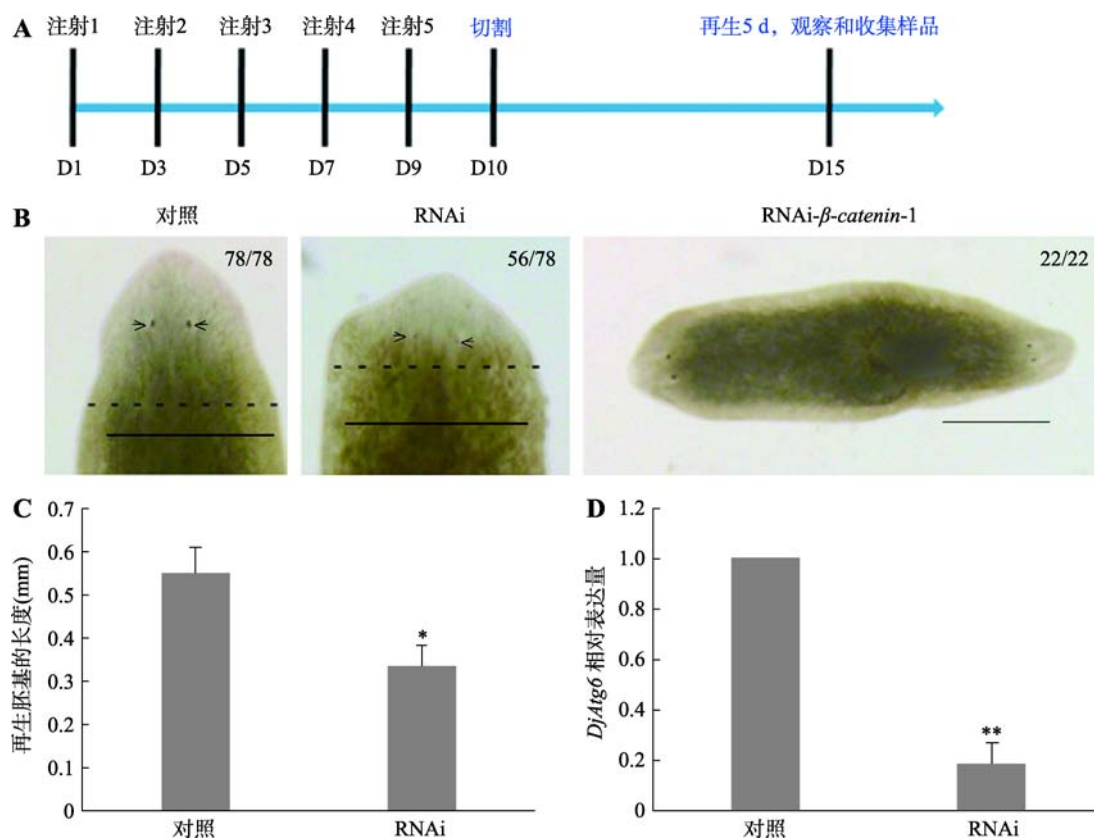


图 3 RNAi-*DjAtg6* 对涡虫再生的影响

Fig. 3 Effects of RNAi-*DjAtg6* on planarian regeneration

A: RNAi 干扰方案和再生观察时间点示意图。B: 涡虫再生(5 d)表型。56/78 表示 78 条涡虫中有 56 条表现出再生迟缓表型。箭头指示眼点位置, 黑色断续线显示新旧组织分界线。以 RNAi-GFP 为阴性对照, RNAi-β-catenin-1 为阳性对照。标尺: 0.5 mm。C: *DjAtg6* 干扰组和阴性对照组胚基再生长度的比较。\* $P < 0.05$ 。D: qRT-PCR 检测干扰后内源性 *DjAtg6* 相对表达量。GFP dsRNA 为对照, 实验重复 3 次, \*\* $P < 0.01$ 。

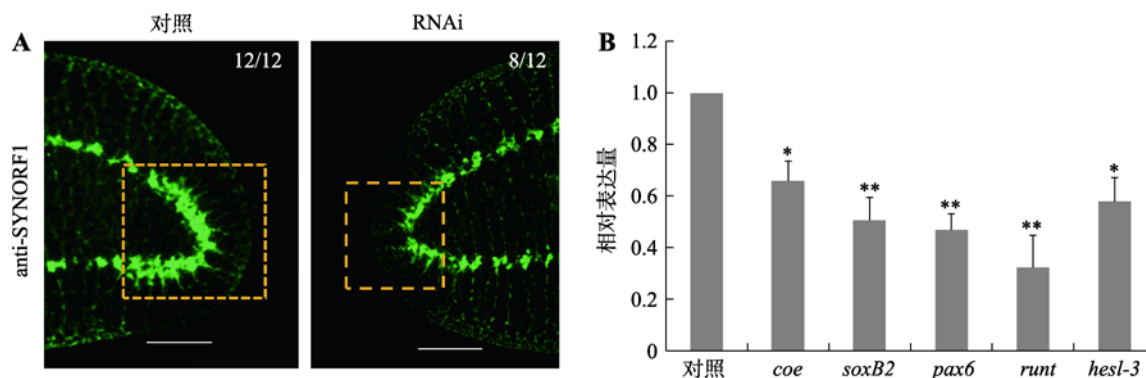


图 4 RNAi-*DjAtg6* 对 CNS 再生和神经相关基因表达的影响

Fig. 4 Effects of RNAi-*DjAtg6* on CNS regeneration and expression of neural related genes

A: anti-SYNORF1 免疫荧光显示涡虫脑神经结构。标尺: 200 μm。B: qRT-PCR 检测神经相关基因的相对表达量。实验重复 3 次, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

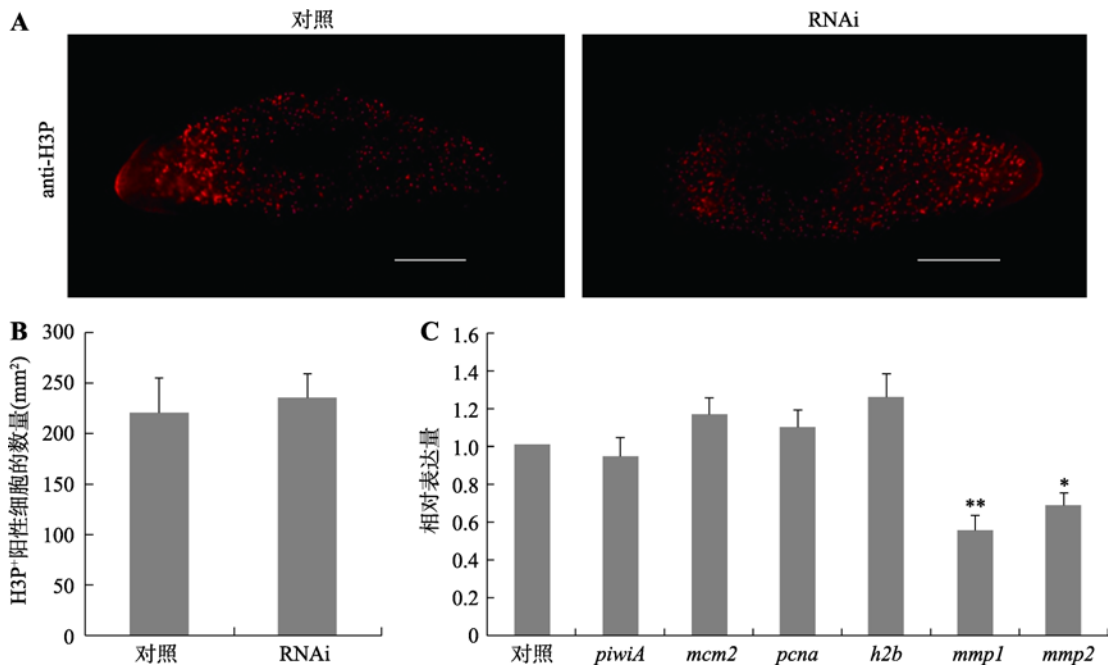


图 5 RNAi-*DjAtg6* 对有丝分裂指数和干细胞相关基因表达的影响

Fig. 5 Effects of RNAi-*DjAtg6* on mitotic index and expression of stem cell related genes

A: H3P<sup>+</sup>免疫荧光显示对照组和干扰组有丝分裂细胞。再生 5 d 涡虫，标尺：200 μm。B: 定量统计对照组和干扰组 H3P<sup>+</sup>阳性细胞数量，没有显著性差异。n=6。C: qRT-PCR 检测干细胞相关基因的相对表达量。实验重复 3 次，\**P*<0.05，\*\**P*<0.01。

## 2.6 RNAi-*mmp1* 和 RNAi-*mmp2* 对涡虫再生的影响

已有研究表明，RNAi-*mmp1* 和 RNAi-*mmp2* 影响涡虫再生<sup>[16]</sup>。为了验证这一结果，本研究采用喂食 dsRNA 方法对涡虫 *mmp1* 和 *mmp2* 进行干扰实验。结果表明：RNAi-*mmp1* 后约 36% 的躯干片段(7/19)头再生迟缓，约 57% 的尾部片段(11/19)头再生异常(图 6A)；RNAi-*mmp2* 后约 45% 的躯干片段(10/22)头再生迟缓，约 59% 的尾部片段(13/22)头再生异常(图 6B)。进一步测量了对照组和干扰组再生胚基的长度，结果表明对照组胚基长度是  $0.584 \pm 0.047$  mm，RNAi-*mmp1* 组胚基长度是  $0.318 \pm 0.082$  mm，RNAi-*mmp2* 组胚基长度是  $0.366 \pm 0.064$  mm。与对照组相比，RNAi-*mmp1* 组和 RNAi-*mmp2* 组新再生的胚基长度分别缩短了约 50% 和 40%。本研究结果进一步证明，RNAi-*mmp1* 和 RNAi-*mmp2* 影响涡虫再生。

## 3 讨论

人和其他脊椎动物 CNS 再生能力很弱，受到创

伤后很难修复。涡虫是少数 CNS 能够完全再生的动物。因此，涡虫 CNS 再生受到众多学者关注并发现了大量影响涡虫 CNS 再生的基因<sup>[10]</sup>。涡虫 CNS 再生涉及到干细胞的增殖、分化、迁移等诸多细胞生物学过程。干细胞向神经前体细胞到神经细胞的转变涉及到细胞质动态的变化和不断重塑，而细胞自噬介导的蛋白质降解系统必定参与其中，但细胞自噬调控涡虫 CNS 再生相关的研究尚未见报道。本研究首先克隆了日本三角涡虫 *Atg6* 同源基因 cDNA 序列，该序列编码的蛋白质含有 ATG6/Beclin 1 蛋白家族的 Coil-Coil 结构域和自噬功能结构域<sup>[21]</sup>。其他研究表明，细胞自噬蛋白 Beclin 1 (ATG6 同源蛋白)参与调控神经发生<sup>[5]</sup>。因此，本文重点研究了自噬基因 *Atg6* 在涡虫 CNS 再生中的作用。研究发现，该基因在正常涡虫个体表达较弱，切割涡虫后其表达量随再生过程逐渐增加，且其转录本在新再生的 CNS 表达。由此推测，*DjAtg6* 上调表达促进了涡虫 CNS 再生。干扰 *DjAtg6* 引起涡虫头部再生迟缓、脑神经节偏小，且干扰引起神经发育相关基因的表达下降。本研究结果揭示 *DjATG6* 是涡虫 CNS 再生的重要调控因子。但是，干扰 *DjAtg6* 并不影响涡虫干

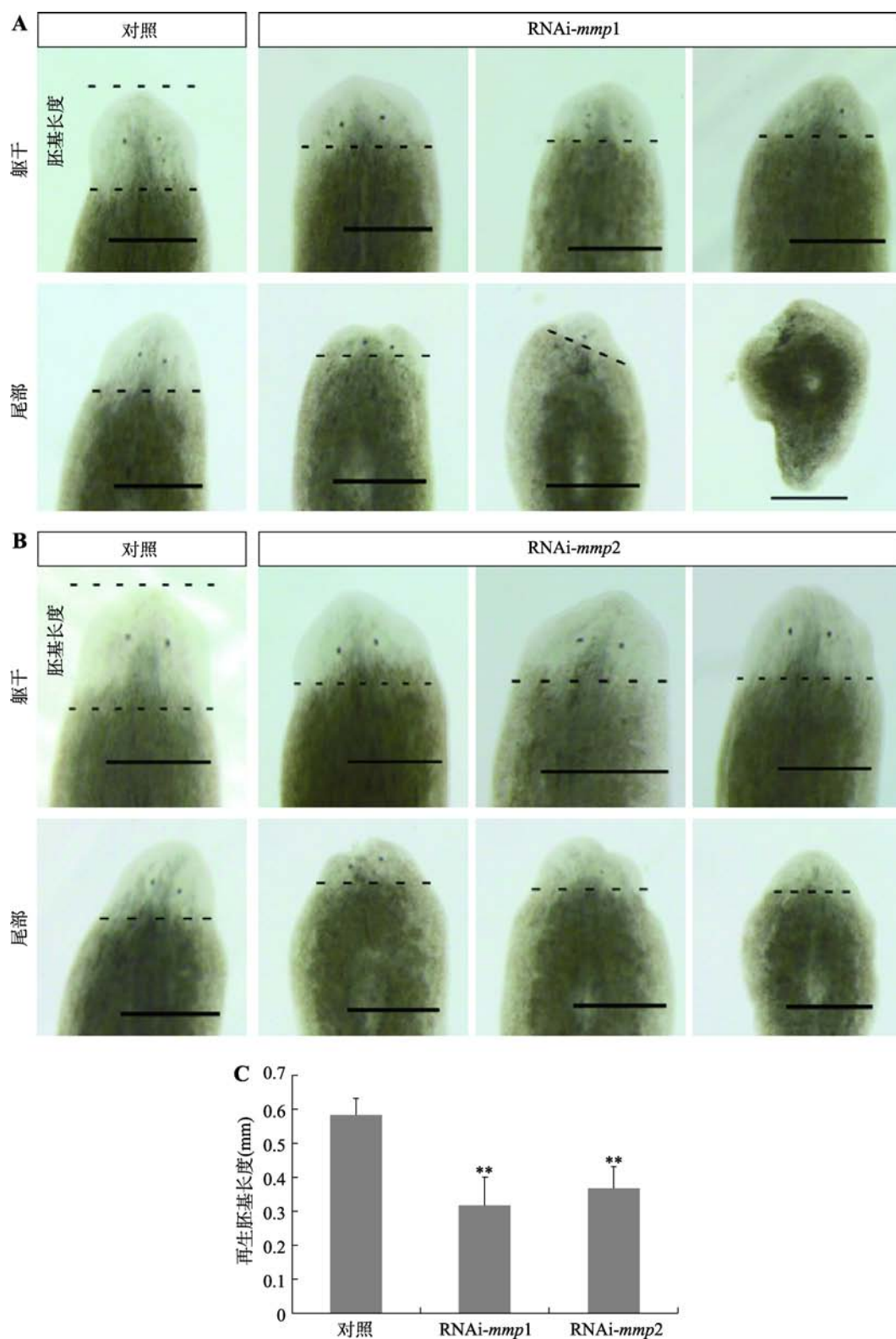


图 6 RNAi-*mmp1* 和 RNAi-*mmp2* 对涡虫头部再生的影响

Fig. 6 Effects of RNAi-*mmp1* and RNAi-*mmp2* on planarian head regeneration

A: RNAi-*mmp1* 对涡虫躯干片段和尾部片段头部再生的影响。B: RNAi-*mmp2* 对涡虫躯干片段和尾部片段头部再生的影响。C: 干扰组和对照组胚基再生长度的比较。黑色断续线显示新旧组织分界线, 标尺: 500  $\mu\text{m}$ , \*\* $P < 0.01$ 。



细胞的增殖和分裂, 但影响与细胞迁移相关基因 *mmp1* 和 *mmp2* 的表达。本研究进一步证明, RNAi-*mmp1* 和 RNAi-*mmp2* 影响涡虫头再生, 且已有研究证明 RNAi-*mmp1* 和 RNAi-*mmp2* 影响涡虫干细胞迁移<sup>[16]</sup>。诸多研究表明, MMP 通过调节细胞外基质的变化从而影响动物中枢神经发育<sup>[22,23]</sup>。值得关注的是, 细胞自噬相关蛋白 NBR1 通过调节粘着斑的装配影响细胞迁移<sup>[24]</sup>。其他研究发现, 过表达 Beclin 1 能够激活自噬, 恢复敲降 *let-7* 引起的神经元细胞迁移障碍<sup>[25]</sup>。综合上述研究结果, 本研究推测干扰 *DjAtg6* 引起涡虫 CNS 再生迟缓可能影响了细胞迁移, 但具体的分子机制有待深入研究。总之, 以涡虫为模型研究细胞自噬调控 CNS 再生的分子机制对理解高等动物神经发生和神经创伤修复具有重要的意义。

## 附录:

附加材料详见文章电子版 [www.chinagene.cn](http://www.chinagene.cn)。

## 致谢:

感谢中国科学院上海营养与健康研究所荆清教授和清华大学吴畏教授在涡虫研究技术方面给予的帮助。

## 参考文献(References):

- [1] Kenific CM, Wittmann T, Debnath J. Autophagy in adhesion and migration. *J Cell Sci*, 2016, 129(20): 3685–3693. [DOI]
- [2] Phadwal K, Watson AS, Simon AK. Tightrope act: autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(1): 89–103. [DOI]
- [3] Fleming A, Rubinsztein DC. Autophagy in neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci*, 2020, 43(10): 767–779. [DOI]
- [4] He M, Ding YT, Chu C, Tang J, Xiao Q, Luo ZG. Autophagy induction stabilizes microtubules and promotes axon regeneration after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(40): 11324–11329. [DOI]
- [5] Yazdankhah M, Farioli-Vecchioli S, Tonchev AB, Stoykova A, Cecconi F. The autophagy regulators Ambra1 and Beclin 1 are required for adult neurogenesis in the brain subventricular zone. *Cell Death Dis*, 2014, 5(9): e1403. [DOI]
- [6] Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest*, 2008, 118(6): 2190–2199. [DOI]
- [7] Cebrià F, Nakazawa M, Mineta K, Ikeo K, Gojobori T, Agata K. Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev Growth Differ*, 2002, 44(2): 135–146. [DOI]
- [8] Petersen CP, Reddien PW. Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration. *Science*, 2011, 332(6031): 852–855. [DOI]
- [9] Cowles MW, Brown DDR, Nisperos SV, Stanley BN, Pearson BJ, Zayas RM. Genome-wide analysis of the bHLH gene family in planarians identifies factors required for adult neurogenesis and neuronal regeneration. *Development*, 2013, 140(23): 4691–4702. [DOI]
- [10] Roberts-Galbraith RH, Brubacher JL, Newmark PA. A functional genomics screen in planarians reveals regulators of whole-brain regeneration. *eLife*, 2016, 5: e17002. [DOI]
- [11] González-Estévez C. Autophagy meets planarians. *Autophagy*, 2009, 5(3): 290–297. [DOI]
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. [DOI]
- [13] Ma KX, Zhang YM, Song GG, Wu M, Chen GW. Identification of autophagy-related gene 7 and autophagic cell death in the planarian *Dugesia japonica*. *Front Physiol*, 2018, 9: 1223. [DOI]
- [14] Sánchez Alvarado A, Newmark PA. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(9): 5049–5054. [DOI]
- [15] Vásquez-Doorman C, Petersen CP. Zic-1 expression in planarian neoblasts after injury controls anterior pole regeneration. *PLoS Genet*, 2014, 10(7): e1004452. [DOI]
- [16] Isolani ME, Abril JF, Saló E, Deri P, Bianucci AM, Batistoni R. Planarians as a model to assess *in vivo* the role of matrix metalloproteinase genes during homeostasis and regeneration. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55649. [DOI]
- [17] Rouhana L, Weiss JA, Forsthoefel DJ, Lee H, King RS, Inoue T, Shibata N, Agata K, Newmark PA. RNA interference by feeding *in vitro*-synthesized double-stranded RNA to planarians: methodology and dynamics. *Dev Dyn*, 2013, 242(6): 718–730. [DOI]

- [18] Cebrià F, Newmark PA. Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development*, 2005, 132(16): 3691–3703. [DOI]
- [19] Cowles MW, Omuro KC, Stanley BN, Quintanilla CG, Zayas RM. COE loss-of-function analysis reveals a genetic program underlying maintenance and regeneration of the nervous system in planarians. *PLoS Genet*, 2014, 10(10): e1004746. [DOI]
- [20] Li YQ, Zeng A, Han XS, Wang C, Li G, Zhang ZC, Wang JY, Qin YW, Jing Q. Argonaute-2 regulates the proliferation of adult stem cells in planarian. *Cell Res*, 2011, 21(12): 1750–1754. [DOI]
- [21] Mei Y, Glover K, Su MF, Sinha SC. Conformational flexibility of BECN1: Essential to its key role in autophagy and beyond. *Protein Sci*, 2016, 25(10): 1767–1785. [DOI]
- [22] Chan ZCK, Oentaryo MJ, Lee CW. MMP-mediated modulation of ECM environment during axonal growth and NMJ development. *Neurosci Lett*, 2020, 724: 134822. [DOI]
- [23] Sirbulescu RF, Ilieș I, Zupanc GKH. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in the cerebellum of teleost fish: Functional implications for adult neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 68: 9–23. [DOI]
- [24] Kenific CM, Debnath J. NBR1-dependent selective autophagy is required for efficient cell-matrix adhesion site disassembly. *Autophagy*, 2016, 12(10): 1958–1959. [DOI]
- [25] Petri R, Pircs K, Jönsson ME, Åkerblom M, Brattås PL, Klussendorf T, Jakobsson J. let-7 regulates radial migration of new-born neurons through positive regulation of autophagy. *EMBO J*, 2017, 36(10): 1379–1391. [DOI]

(责任编辑: 林古法)

附表 1 本研究所用引物信息

Supplementary Table 1 Primers used in this study

引物名称	用途	序列	长度(bp)
5GSP1	5'-RACE	5'-GCTATTTCTCTATCTAACTGATC-3'	565
5GSP2	5'-RACE	5'-CAGTAAACTCTGTTCTTCTTCTCC-3'	512
3GSP1	3'-RACE	5'-TACCTGAAACTCCAGTCGAATGGC-3'	562
3GSP2	3'-RACE	5'-TTGCAGAAATATTCTCAGGAAGATGG-3'	500
qAtg6F	qPCR	5'-GGAACAATTATGGGAGATGC-3'	281
qAtg6R	qPCR	5'-AATTCGCCAGTAAACTCTG-3'	
Atg6F1	WISH	5'-GTTAATTGTAAAAAGTGTTCTCTACCGTT-3'	1212
Atg6R1	WISH	5'-ATACTGTTTGAATGATGCTTTGACC-3'	
Atg6F2	dsRNA	5'-ATCAACTTCAGATCATCCCATGTG-3'	946
Atg6R2	dsRNA	5'-ATACTGTTTGAATGATGCTTTGACC-3'	
$\beta$ -cateninF	dsRNA	5'-ACAACCATCGAATCTTATCCGCCAG-3'	1325
$\beta$ -cateninR	dsRNA	5'-CATGTGTGAACCGAATTATGTCTGT-3'	
GFPP	dsRNA	5'-CGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCC-3'	507
GFPR	dsRNA	5'-AGCTCGTCCATGCCGTGAGTGATCC-3'	
coeF	qPCR	5'-GCACCAGGAAGATTCGCATACAT-3'	284
coeR	qPCR	5'-GTTAGGATTATTGGAGGCAGTAGAT-3'	
soxB2F	qPCR	5'-AGTAAGTCCTCATTAGCCAGT-3'	218
soxB2R	qPCR	5'-CACCTGTTAGCATTCCACTCAT-3'	
pax6F	qPCR	5'-ACGAGGTCACTTGGGAATCAATC-3'	246
pax6R	qPCR	5'-ACAACCTGAACTGGTAGCAACTC-3'	
runtF	qPCR	5'-CCAATGCGAGGTGACTGACTTGAA-3'	291
runtR	qPCR	5'-TGATTCTCCAATGTGAAGGTAAGT-3'	
hes1-3F	qPCR	5'-CATCGTGAAGGAATTACCAGTC-3'	283
hes1-3R	qPCR	5'-TACTCGTCTGTGCAGGATAATG-3'	
pcnaF	qPCR	5'-AGCTACCGGAGATATTGGTAATGG-3'	168
pcnaR	qPCR	5'-GAGACACGATAGGTGAAAGAGGC-3'	
piwiAF	qPCR	5'-GGTTATTCCACAACCTATTACAAGAG-3'	220
piwiAR	qPCR	5'-AATCTACTTCGTCATTGATATCC-3'	
mcm2F	qPCR	5'-GAGGAGGAGAAGAAGGATGT-3'	161
mcm2R	qPCR	5'-GCTGTGCTCAAACCTGGGACT-3'	
mmp1F1	qPCR	5'-ATGGCTGGAATAGAACAAGATGG-3'	202
mmp1R1	qPCR	5'-GACGAACCTCTCCTTCAGACATAG-3'	
mmp2F1	qPCR	5'-GAGCCTTAATAGTCGGTCTTCAAT-3'	259
mmp2R2	qPCR	5'-TCCTTCGGTCCATTCTTCAGCTG-3'	
mmp1F2	dsRNA	5'-TATGTCTGAAGGAGAAGTTCGTCTG-3'	850
mmp1R2	dsRNA	5'-ATCGTGATACGAACCTTTGTCTTGC-3'	
mmp2F2	dsRNA	5'-TGAGTTTGTCCGATGCTGAACACG-3'	746
mmp2R2	dsRNA	5'-GTCTTATCTCTCACGATTGCTGCG-3'	
DjEF2F	qPCR	5'-TTAATGATGGGAAGATATGTTG-3'	250
DjEF2R	qPCR	5'-GTACCATAGGATCTGACTTTGC-3'	