

领域前沿·中国



张令强, 军事科学院军事医学研究院研究员、医学蛋白质组全国重点实验室常务副主任。主要研究方向为蛋白质泛素化修饰与疾病的发生机理及其治疗, 围绕泛素连接酶 Smurf1 家族、去泛素化酶 OTU 家族、泛素应激小体的生理功能、作用机制与靶向干预开展了系列研究; 近期在水熊虫模式化及耐受超强辐射的研究中取得新发现。作为通信和共同通信作者在 *Science*、*Nat Cell Biol*、*Nat Med*、*Nat Chem Biol*、*Mol Cell*、*Cell Res*、*Nat Commun* 等期刊发表论文 100 余篇。获得国家杰出青年基金、国务院特殊津贴、中国青年科技奖、谈家桢生命科学奖创新奖、树兰医学奖青年奖等, 入选国家万人计划领军人才、国家百千万人才工程。作为第一完成人获得 2 项北京市科学技术奖一等奖, 授权中国专利 30 余项。兼任中国生物化学与分子生物学会副秘书长、理事。

水熊虫超强辐射耐受机制研究进展

韦懿芮 李磊* 张令强*

(军事科学院军事医学研究院, 北京 102206)

摘要 空间辐射损伤是制约人类深空探测及长期在轨驻留的关键医学问题。在多种涉核作业中, 超强辐射对人体构成严重危害, 对人员健康与安全形成了巨大威胁。水熊虫作为一种独特的多细胞生物, 其超强的抗逆能力在生物学研究中备受瞩目。该综述聚焦于水熊虫耐受超强辐射的特性, 详细阐述了水熊虫超强辐射耐受机制研究的最新进展, 及其在生物医学、辐射防护等领域的意义和潜在应用价值。

关键词 水熊虫; 超强辐射; 多组学; 耐受机制; 水平基因转移; 液-液相分离

Research Progress on the Mechanism of Radiation Tolerance of a Tardigrade

WEI Yirui, LI Lei*, ZHANG Lingqiang*

(Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 102206, China)

Abstract Space radiation damage is a critical medical issue that constrains human deep-space exploration and long-term on-orbit residence. In various nuclear-related work environments, ultra-high radiation poses a severe hazard to human, and a substantial threat to personnel health and safety. Tardigrades, as unique multicellular organisms, have attracted considerable attention in biological research for their exceptional stress resistance. This review focuses on the radiation tolerance characteristics of tardigrades, detailing the latest progress in the research on the ultra-high radiation tolerance mechanism of tardigrades, as well as its significance and potential application value in fields such as biomedicine and radiation protection.

Keywords tardigrade; ultra-high radiation; multi-omics; tolerance mechanism; horizontal gene transfer; liquid-liquid phase separation

国家自然科学基金(批准号: 82192881)资助的课题

*通信作者。Tel: 010-66931216, E-mail: lilei_tardigrade@163.com; zhanglq@nic.bmi.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82192881)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-66931216, E-mail: lilei_tardigrade@163.com; zhanglq@nic.bmi.ac.cn

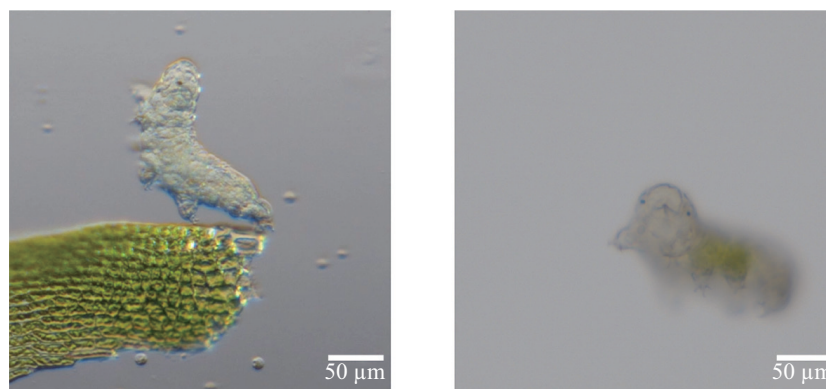


图1 显微镜下的河南高生熊虫

Fig.1 Micrograph of *Hypsibius henanensis*

1 水熊虫的基本介绍

水熊虫是缓步动物(tardigrades)的俗称,是一类微小的无脊椎动物。它们通常生活在苔藓、地衣等环境。它们广泛分布在世界各地,甚至在深海中也能发现它们的踪迹。水熊虫体长一般不超过1 mm,身体呈桶状,由头部、3个体节、尾节组成,身体表面覆盖一层几丁质和蛋白质构成的角质层或角质化的背甲;有4对短而粗的肢,肢的末端着生锐爪;口器由口管、口针、针托、吸咽和吸咽内的大板组成。水熊虫利用其特有的口针结构穿刺植物细胞壁,随后借助吸咽所产生的负压吸力,经由口管来摄取植物汁液^[1]。水熊虫可以在高温、低温、高压、超强辐射、极度干燥等多种极端环境下生存,甚至在外太空真空环境下也能存活下来。

2 水熊虫辐射耐受机制研究现状

自1773年首次发现水熊虫以来,其相关研究已历经二百多年,目前世界上有1 500余种水熊虫被描述^[2-3]。国内对水熊虫的研究主要集中在形态学、生态学、分类学等领域。在国外,近十几年内已有多种水熊虫被报道可耐受超强辐射。文献报道拉氏变形熊虫(*Ramazzottius varieornatus*)表达一种特有的蛋白质——损伤抑制因子(damage suppressor, Dsup), Dsup可结合DNA或核小体,从而保护DNA免受辐射损害^[4-5]。水熊虫可耐受高达3 000 Gy到5 000 Gy的伽马射线辐射,是人类辐射致死剂量的近1 000倍^[6-8],这使得水熊虫成为一种独特的超强辐射研究模型。尽管如此,水熊虫耐受超强辐射背后的机制,目前仍知之甚少。

近期,军事科学院军事医学研究院作者所在

科研团队在 *Science* 杂志发表研究论文,报道了一种新的水熊虫物种——河南高生熊虫(*Hypsibius henanensis*)(图1),按分类学划分其属于缓步动物门真缓步纲并爪目高生熊虫科高生熊虫属。河南高生熊虫具有高生属水熊虫的典型特征,与其他水熊虫不同的是,它们的小格(septulum)较短,在腿I~III基部没有角质条(longitudinal bar)和与后爪基部连接的角质条。本研究团队经过长期探索,成功建立了河南高生熊虫实验室培养体系。河南高生熊虫寿命为2~3个月,体长200~500 μm,以孤雌生殖方式繁衍后代。河南高生熊虫会经历周期性蜕皮,并将卵产在脱的皮中。研究团队发现,河南高生熊虫在伽马射线辐照后第15天的半数致死剂量为2 000 Gy,在4 000~5 000 Gy伽马射线辐照后,仍有相当一部分水熊虫可存活一段时间,表明其可耐受超强辐射。为了研究河南高生熊虫耐受超强辐射的机制,本研究团队在国际上首次组装了具有完善注释的染色体水平的水熊虫基因组图谱。随后,本团队整合转录组、蛋白质组响应超强辐射的动态变化及分子进化 and 功能特征分析,揭示了河南高生熊虫耐受超强辐射的三类机制,并分别对代表性关键分子进行了深入的功能和机制研究^[9]。

3 多组学分析筛选抗辐射相关基因

本研究团队首先对河南高生熊虫进行了基因组测序,获得了长读长测序数据,结合Hi-C(high-throughput chromosome conformation capture)技术,组装了河南高生熊虫高质量的染色体水平基因组,其大小为112.6 Mb。利用核型分析,进一步证实河南高生熊虫有6对染色体。基于以上数据,研究团队

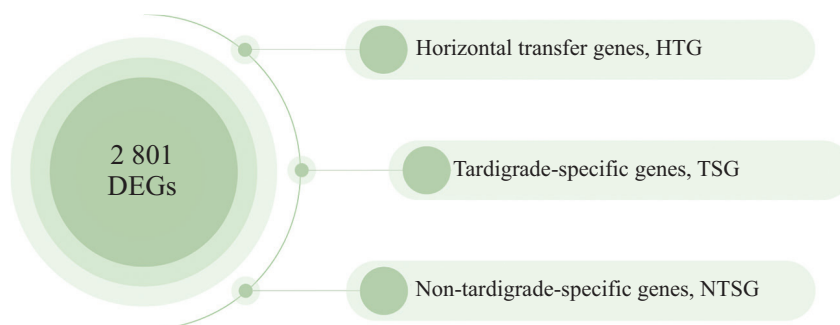


图2 河南高生熊虫辐照后差异表达基因(DEGs)分类

Fig.2 The classification of differentially expressed genes in *Hypsibius henanensis* after radiation

在河南高生熊虫中鉴定出 14 701 个编码蛋白质的基因。利用重离子辐照装置分别以 200 Gy、2 000 Gy 的剂量照射河南高生熊虫, 进行转录组和蛋白质组学分析, 获得了 2 801 个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 并从分子进化角度将其分为三类: 水平转移基因(horizontal transfer genes, HTG)、水熊虫特异基因(tardigrade-specific genes, TSG)、非水熊虫特异基因(non-tardigrade-specific genes, NTSG)(图2)。本团队分别从这三类基因入手, 筛选出了辐射耐受关键基因, 并对其开展了功能和机制研究, 揭示了河南高生熊虫耐受超强辐射的关键机制。

4 水平转移基因DODA1通过合成甜菜色素赋予水熊虫超强辐射耐受性

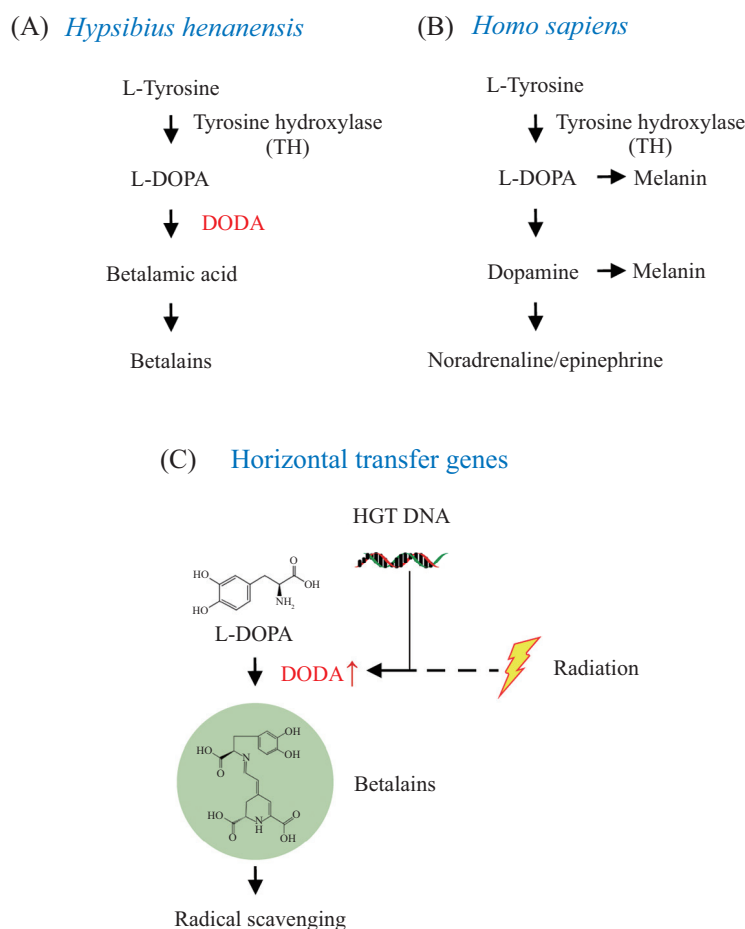
水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)事件作为生物进化的关键驱动力之一, 能够促使受体物种获得新的遗传物质, 进而产生适应性变化, 为生物适应极端环境提供一种独特的途径^[10-12]。本团队鉴定出河南高生熊虫通过 HGT 事件获得的基因有 459 个, 其中高可信度基因有 75 个, HTG 占比为 0.5% 到 3.1%。

通过分析辐照后 RNA 和蛋白表达水平变化, 研究团队发现在 HTG 中辐照上调最明显的是多巴 4,5-双加氧酶(DOPA 4,5-dioxygenase)基因(*DODA1*), 并且发现河南高生熊虫存在 5 个 *DODA*。经过系统发育分析, 发现 *DODA1~DODA4* 来源于蛭弧菌门细菌。*DODA* 是甜菜色素合成过程中的关键酶, 酪氨酸经过酪氨酸羟化酶催化生成 L-多巴, 而 L-多巴在 *DODA* 的催化下经过一系列反应最终生成甜菜色素(图 3A)。甜菜色素是一类植物色素, 此前被认为只存在于石竹目植物、少数细菌和真菌中, 广泛参与

植物抗逆过程^[13-14], 动物中未见报道。本研究团队通过质谱、光谱检测等系列分析, 证明了河南高生熊虫 *DODA1* 在体外以 L-多巴为底物, 催化产生甜菜黄素。进一步, 对 *DODA1* 的酶学特征进行了表征, 对其关键酶活性位点进行了预测和验证, 在体外证实了 *DODA1* 是多巴 4,5-双加氧酶, 可催化合成甜菜色素。进一步, 研究团队在人 HeLa 细胞中表达了河南高生熊虫 *DODA1*, 成功在哺乳动物细胞中建立了甜菜色素合成通路(HeLa 细胞中存在酪氨酸羟化酶), 在体内证实了 *DODA1* 是多巴 4,5-双加氧酶, 可催化合成甜菜色素, 且在人 HeLa 细胞中表达 *DODA1* 能有效提升 HeLa 细胞的抗辐射能力。

电离辐射通过直接和间接方式产生生物学效应, 直接方式即电离辐射直接作用于生物大分子(如 DNA、RNA、蛋白质等), 造成生物大分子结构和功能的破坏, 间接方式主要是电离辐射与细胞内含有的大量水分子相互作用, 产生氧自由基(活性氧), 活性氧对细胞造成结构和功能的损伤。有研究表明, 辐射引起的细胞损伤, 有 60%~70% 是由活性氧造成的^[15-16]。此前的研究表明, 甜菜色素是一类很强的抗氧化剂, 可以有效清除活性氧^[17-20]。细胞学实验结果表明, HeLa 细胞中异源重构甜菜色素合成通路, 可通过清除活性氧来减轻辐射损伤。

随后, 通过非靶向和靶向多反应监测质谱(MRM-MS)检测及拉曼光谱分析, 证实河南高生熊虫体内存在甜菜色素, 在受到辐照后, 河南高生熊虫体内的甜菜色素含量增加, 且分布发生改变。为了进一步确定 *DODA1* 在河南高生熊虫中是否发挥辐射保护作用, 研究团队成功建立了基于浸泡法的 RNA 干扰(siRNA)策略。敲低 *DODA1* 后, 河南高生熊虫体内甜菜色素含量下降, 并且辐照后河南高生



A: 河南高生熊虫L-多巴代谢路径。B: 人L-多巴代谢路径。C: 河南高生熊虫通过从蛭弧菌门水平转移基因*DODA1*合成甜菜色素清除自由基发挥辐射保护效应。

A: the L-DOPA metabolic pathway in *Hypsibius henanensis*. B: the L-DOPA metabolic pathway in *Homo sapiens*. C: *Hypsibius henanensis* synthesizes betalains to scavenge ROS in response to radiation protection effects through the horizontal transfer gene *DODA1* from *Bdellovibrionota*.

图3 河南高生熊虫与人L-多巴代谢通路比较(根据参考文献[9]修改)

Fig.3 Comparison of L-DOPA metabolic pathways between *Hypsibius henanensis* and *Homo sapiens* (modified from reference [9])

熊虫存活率下降。这表明水平转移基因*DODA1*介导的甜菜色素合成在河南高生熊虫耐受超强辐射中发挥重要作用。

与河南高生熊虫相比,人和其他动物以L-多巴为底物最终代谢为多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素,以及黑色素,由于不存在*DODA*,无法合成甜菜色素(图3B)。而在河南高生熊虫(也包括典型高生熊虫)中,由于*DODA1*的存在,L-多巴可以被代谢为甜菜色素,并且*DODA1*在辐照后表达水平升高,甜菜色素大量积累,从而起到辐射保护作用。这就是为什么河南高生熊虫可耐受超强辐射而人却不能的原因之一。

这部分研究揭示了河南高生熊虫通过*DODA1*合成甜菜色素来发挥抗氧化作用,从而赋予水熊虫超强辐射耐受特性(图3C)。

5 水熊虫特异性无序蛋白TRID1介导的相分离提高DNA双链损伤修复效率进而赋予水熊虫超强辐射耐受性

研究团队发现水熊虫特异性基因有4 436个,在编码蛋白质基因总数14 701个中,所占比值约为30%,比例远高于常见模式生物。在这些水熊虫特异性基因中,编码高度无序蛋白的基因有1 223个,占比约27.6%,在辐射后上调的417个特异性基因中,编码高度无序蛋白的基因有163个,占比约39.1%。根据上述数据,结合无序蛋白容易发生液-液相分离的特性,我们推测无序蛋白可能在辐射耐受中发挥了重要作用。在163个辐射后上调的特异性基因编码的高度无序蛋白中,再进一步筛选出19个含有长无序区域及在2 000 Gy特异性上调且高丰度的水熊虫较保守蛋白,进一步,通过无序性分析和核定位信

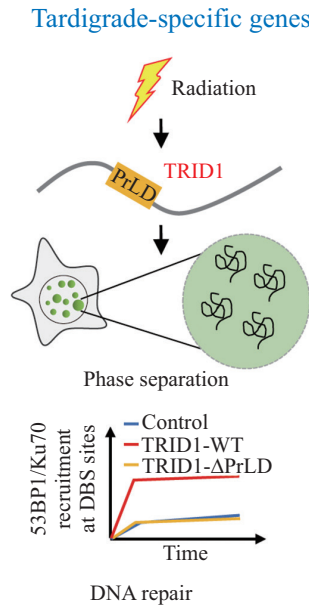


图4 水熊虫特异性蛋白TRID1介导液-液相分离提高DNA双链损伤修复效率响应辐射(根据参考文献[9]修改)

Fig.4 Tardigrade-specific protein TRID1 mediates liquid-liquid phase separation to improve the efficiency of DNA double-strand breaks damage repair in response to radiation (modified from reference [9])

号预测,筛选出可能在核中定位且响应辐射的水熊虫特异无序蛋白TRID1(tardigrade-specific radiation-induced disordered protein 1)。TRID1蛋白长268个氨基酸,具有一个类朊病毒结构域(PrLD)。研究团队表达纯化了GFP-TRID1蛋白,证明了TRID1能够在体外发生液-液相分离,形成液滴。进一步的突变体实验证明TRID1发生相分离依赖于PrLD结构域。

在人HeLa细胞中表达TRID1也可以发生液-液相分离,使用U2OS细胞进行克隆形成和免疫荧光分析,结果表明TRID1介导的相分离能促进DNA双链损伤修复来减少人细胞辐射损伤。进一步实验结果表明TRID1通过相分离与53BP1特异性共定位,提高Ku70蛋白的表达水平,并促进53BP1和Ku70在DNA损伤位点的募集。

在河南高生熊虫中敲低TRID1后,辐照后其存活率下降。基于以上数据,团队揭示了河南高生熊虫通过TRID1介导的相分离提高DNA双链损伤修复效率,赋予了河南高生熊虫超强辐射耐受性(图4)。

6 非水熊虫特异性基因BCS1和NDUFB8增强NAD⁺再生促进DNA损伤修复赋予水熊虫超强辐射耐受性

通过GO(Gene Ontology)功能分析,发现线粒体相关基因显著富集。线粒体呼吸链复合体I、

III、IV组装蛋白,如BCS1[ubiquinol-cytochrome c reductase (bc1) synthesis]、NDUFB8[NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex subunit 8]在辐射后显著上调,BCS1是线粒体伴侣蛋白,对于呼吸链复合体III组装至关重要^[21],NDUFB8是线粒体呼吸链复合体I组分,介导了线粒体呼吸链复合体I、III、IV间的相互作用,影响了线粒体呼吸链超级复合体的形成。结合基因家族扩张收缩分析,发现河南高生熊虫有477个扩张基因家族、2 609个收缩基因家族,而BCS1基因在河南高生熊虫中出现扩张,共有7个编码BCS1的基因。我们推断BCS1可能有助于水熊虫适应超强辐射环境。我们在人HeLa细胞中表达BCS1a和NDUFB8,进行克隆形成实验、彗星实验和免疫荧光分析,结果表明BCS1a、NDUFB8和人BCS1L都能减轻辐射诱导的DNA损伤,提高HeLa细胞的存活率。进一步的研究揭示了河南高生熊虫BCS1a和NDUFB8不影响ATP和ROS水平,可能调节电子传递。同时发现,BCS1a形成了与BCS1L一样的七聚体^[22-23],NDUFB8可被组装到线粒体呼吸链复合物I中,BCS1a和NDUFB8促进了线粒体呼吸超复合物I₁III₂IV₁(SC I₁III₂IV₁)的形成。实验证实BCS1a和NDUFB8促进了线粒体NAD⁺的产生,进而增加了细胞质NAD⁺水平。NAD⁺是PA-Rylation修饰的前体,DNA损伤感应蛋白PARP1利

Non-tardigrade-specific genes

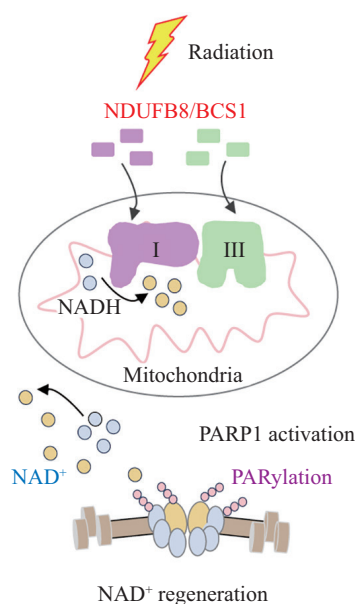


图5 非水熊虫特异性蛋白BCS1和NDUF8增强NAD⁺再生响应辐射(根据参考文献[9]修改)

Fig.5 The non-tardigrade-specific proteins BCS1 and NDUF8 enhance the regeneration of NAD⁺ in response to radiation (modified from reference [9])

用NAD⁺形成PARylation修饰,进而招募DNA损伤修复蛋白到DNA损伤位点,启动损伤修复^[24]。研究团队观察到在人细胞中表达水熊虫BCS1a和NDUF8后,PARP1、DNA修复蛋白均在DNA损伤位点显著富集。以上数据揭示了河南高生熊虫通过BCS1a和NDUF8增强NAD⁺再生,促进DNA损伤修复,赋予水熊虫超强辐射耐受性(图5)。

7 展望与应用

本研究团队成功建立了水熊虫的实验室培养体系,首次整合基因组、转录组、蛋白质组图谱,并通过分子机制和功能研究,从HTG、TSG、NTSG中发现了水熊虫三类超强辐射耐受关键机制,增加了我们对生命极限的认识,为水熊虫超强抗逆机制提供了新的认识,为超强辐射防护提供了重要理论依据和潜在防护靶点。

水熊虫耐受多种极端环境的特性,具有极高的科学研究价值和生物医学应用价值。然而对这些特性背后机制的认识却很有限。由于相关技术方法尚未建立,水熊虫目前还不是模式生物。目前的研究只是揭示了水熊虫耐受极端环境机制的冰山一角,未来还有很长的路要走,也会面临诸多挑战,如培养体系的建立、基因编辑技术的建立、超微量检测技

术方法的建立等。同时,针对水熊虫超强抗辐射机制的研究不仅具有重要的科学意义,而且其广泛的现实应用场景为多个学科领域提供了创新的应用视角。在医学领域,其机制有助于引导开发保护正常细胞免受放疗伤害的新型药物,同时为辐射环境下工作人员提供更优的防护策略。太空探索中,水熊虫的抗辐射机制为开发新型太空辐射防护材料提供了灵感,这对于保护宇航员免受宇宙射线的伤害至关重要。此外,水熊虫的生命力极强的特性为太空生物实验提供了重要参考,有助于了解生命在太空环境中的生存和适应机制。在生物技术领域,水熊虫的抗辐射基因通过基因工程技术被导入其他生物体中,可能赋予这些生物体抗辐射的能力,有助于开发新型抗辐射作物、抗辐射动物等,提高生物在极端环境下的生存能力。这些应用有望在未来实现,为人类应对辐射相关挑战和探索生命奥秘持续贡献独特的价值。

参考文献 (References)

- [1] 王立志, 李晓晨. 缓步动物门(Tardigrada)研究进展[J]. 四川动物(WANG L Z, LI X C. Research advances on Tardigrada [J]. Sichuan Journal of Zoology), 2005, 24(4): 641-5.
- [2] ARAKAWA K. Examples of extreme survival: tardigrade genomics and molecular anhydrobiology [J]. Annu Rev Anim Biosci,

- 2022, 10: 17-37.
- [3] MCINNES S J, JØRGENSEN A, MICHALCZYK Ł. 20 years of Zootaxa: tardigrada (Ecdysozoa: Panarthropoda) [J]. Zootaxa, 2021, 4979(1): 23-4.
- [4] CHAVEZ C, CRUZ-BECERRA G, FEI J, et al. The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosomes and protects DNA from hydroxyl radicals [J]. eLife, 2019, 8: e47682.
- [5] HASHIMOTO T, HORIKAWA D D, SAITO Y, et al. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade: unique protein [J]. Nat Commun, 2016, 7: 12808.
- [6] O.SCHILL R. Water bears: the biology of tardigrades [M]. Springer, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-95702-9.
- [7] JÖNSSON K I. Radiation tolerance in tardigrades: current knowledge and potential applications in medicine [J]. Cancers, 2019, 11(9): 1333.
- [8] HASHIMOTO T, KUNIEDA T. DNA protection protein, a novel mechanism of radiation tolerance: lessons from tardigrades [J]. Life, 2017, 7(2): 26.
- [9] LI L, GE Z, LIU S, et al. Multi-omics landscape and molecular basis of radiation tolerance in a tardigrade [J]. Science, 2024, 386(6720): eadl0799.
- [10] SOUCY S M, HUANG J, GOGARTEN J P. Horizontal gene transfer: building the web of life [J]. Nat Rev Genet, 2015, 16(8): 472-82.
- [11] WAGNER A, WHITAKER R J, KRAUSE D J, et al. Mechanisms of gene flow in archaea [J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(8): 492-501.
- [12] ARNOLD B J, HUANG I T, HANAGE W P. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria [J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(4): 206-18.
- [13] MIGUEL M G. Betalains in some species of the amaranthaceae family: a review [J]. Antioxidants, 2018, 7(4): 53.
- [14] STINTZING F C, CARLE R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition [J]. Trends Food Sci Technol, 2004, 15(1): 19-38.
- [15] BARCELLOS-HOFF M H, PARK C, WRIGHT E G. Radiation and the microenvironment: tumorigenesis and therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(11): 867-75.
- [16] MATSUMOTO K I, UENO M, SHOJI Y, et al. Heavy-ion beam-induced reactive oxygen species and redox reactions [J]. Free Radic Res, 2021, 55(4): 450-60.
- [17] CARREÓN-HIDALGO J P, FRANCO-VÁSQUEZ D C, GÓMEZ-LINTON D R, et al. Betalain plant sources, biosynthesis, extraction, stability enhancement methods, bioactivity, and applications [J]. Food Res Int, 2022, 151: 110821.
- [18] SADOWSKA-BARTOSZ I, BARTOSZ G. Biological properties and applications of betalains [J]. Molecules, 2021, 26(9): 2520.
- [19] GANDÍA-HERRERO F, ESCRIBANO J, GARCÍA-CARMONA F. The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains [J]. J Nat Prod, 2009, 72(6): 1142-6.
- [20] ESCRIBANO J, PEDREÑO M A, GARCÍA-CARMONA F, et al. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots [J]. Phytochem Anal, 1998, 9(3): 124-7.
- [21] WAGENER N, ACKERMANN M, FUNES S, et al. A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1 [J]. Mol Cell, 2011, 44(2): 191-202.
- [22] KATER L, WAGENER N, BERNINGHAUSEN O, et al. Structure of the Bcs1 AAA-ATPase suggests an airlock-like translocation mechanism for folded proteins [J]. Nat Struct Mol Biol, 2020, 27(2): 142-9.
- [23] TANG W K, BORGNIA M J, HSU A L, et al. Structures of AAA protein translocase Bcs1 suggest translocation mechanism of a folded protein [J]. Nat Struct Mol Biol, 2020, 27(2): 202-9.
- [24] KANG M, PARK S, PARK S H, et al. A double-edged sword: the two faces of PARylation [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9826.