

泥蚶基质金属蛋白酶组织抑制因子 3 基因的 克隆及镉免疫表达研究

李佩芬^{1,2}, 林志华^{2*}, 包永波^{2*}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 浙江万里学院浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100)

摘要: 通过已构建的泥蚶转录组文库 EST, 利用 SMART RACE 技术扩增得到泥蚶 Tg-TIMP-3 基因全长 cDNA 序列, 并对其进行生物信息学和组织表达相关分析。结果显示, 泥蚶 Tg-TIMP-3 cDNA 全长为 804 bp, 其中开放阅读框为 570 bp, 编码 189 个氨基酸; 氨基酸序列比对发现其氨基酸序列与其他动物的相似性并不高, 与长牡蛎的相似性仅为 35.8%, 但 TIMP 基因的两个功能域(N 端和 C 端)相对保守。qRT-PCR 检测结果显示: Tg-TIMP-3 mRNA 在鳃中表达最高, 外套膜和肝胰腺次之, 表达量最低的是血液。在不同浓度重金属镉(Cd)攻毒后, 泥蚶鳃中的 Tg-TIMP-3 mRNA 表达量先略微下调后显著上调达到最高, 其中 25 $\mu\text{g/L}$ 和 250 $\mu\text{g/L}$ 镉攻毒后在 6 h 时表达量达到最高($P < 0.01$), 500 $\mu\text{g/L}$ 镉攻毒后在 9 h 时表达量达到最高, 48 h 后各浓度组 Tg-TIMP-3 基因表达受到不同程度抑制。研究表明, Tg-TIMP-3 对重金属 Cd 免疫防御或解毒中可能起重要作用, 而泥蚶鳃组织中的 Tg-TIMP-3 mRNA 表达对不同浓度 Cd 的抗逆免疫反应的灵敏度和时序上存在一定差异。

关键词: 泥蚶; 基质金属蛋白酶组织抑制因子 3; 镉; mRNA 表达; 免疫反应

中图分类号: Q 785; S 968.3

文献标志码: A

基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMP)是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)的特异性抑制剂, TIMP 与 MMP 之间相互调节, 使 MMP 和 TIMP 在一定程度上保持协调平衡的关系, 对细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的代谢调控共有重要作用^[1]。目前在人类相关研究中发现该基因家族共有 4 个成员(TIMP-1, -2, -3 和 -4), 其结构高度同源, 但其组织表达、调控及抑制特征不同^[2-3]。在人类的研究中发现 TIMP 基因除了能抑制基质金属蛋白酶活性, 还具有突触可塑性^[4-5]、促进或反抗凋亡信号转导^[6]、抗血管生成^[7]以及促进细胞增殖^[8]的功能。不同于其他成员, TIMP-3 不仅阻抑范围最广, 而且还能与不溶性的细胞外基质紧紧相

连^[9-10]。在贝类相关研究中已经获得长牡蛎(*Crassostrea gigas*)TIMP-1, -2, -3 和 -4 的全长序列^[11-12]。发现这些基因与贝类的生长繁殖息息相关, 可能在伤口愈合、细菌刺激免疫及形态发育等方面起重要作用^[11,13]。

泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国东南沿海传统滩涂养殖贝类之一, 具有良好的养殖产业基础和前景。随着沿海经济的高速发展, 大量的工农业废水和生活污水被排入海, 导致贝类的养殖环境日趋恶化。重金属是养殖环境中主要污染元素之一, 具有来源广、残留时间长、亲脂性、难降解性、高富集性及不易被检测等特点, 同时其能够沿食物链转移富集^[14-15]。海洋生态系统的重金属污染是一个全球性的环境问题, 镉(Cd)是毒性最强的重金属污染物之一^[16], 能在海洋无脊椎动

收稿日期:2014-10-10 修回日期:2014-11-23

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A410);浙江省自然科学基金(LZ12C190001);浙江省重中之重学科开放基金(ZS2013008)

通信作者:林志华, E-mail: zhihua9988@126.com; 包永波, E-mail: bobbao2001@gmail.com

物,尤其是双壳类和腹足类软体动物中大量富集。检测发现泥蚶等贝类重金属 Cd 超标现象严重,但这些体内富集高浓度 Cd 的泥蚶仍能继续存活,并没有出现死亡现象,从组织外观上也大多没有出现畸变,因此,有必要寻求一种高效、灵敏的间接监测方法,在污染物产生不可修复的危害之前快速有效采取措施来预防或补救。以泥蚶为代表的近岸营埋栖生活的贝类,长期栖息在一定水域,对于监测重金属污染具有一定的优势。联合国环境规划署已将金属硫蛋白(MT)、溶酶体膜稳定性(LMS)、中性红保持力(NRR)和微核生成率(MN)等作为海洋环境污染的贝类生物标志物^[17]。这些生物标志物的有效性和灵敏性仍存在一定的争议,所以探讨滩涂贝类在重金属胁迫下的调控机制,从中筛选得到指示重金属污染的生物指标,可作为补充监测重金属污染的重要手段。本实验首次克隆获得泥蚶 Tg-*TIMP-3* 基因全长序列,并对其进行生物信息学、组织表达及镉免疫相关分析,初步探索泥蚶 *TIMP* 基因和重金属 Cd 富集、解毒的相关机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料、试剂和仪器

实验材料 实验用泥蚶材料取自浙江省象山县的宁波甬盛水产种业有限公司。挑选健壮且大小规格一致(平均壳长约 30 mm)的泥蚶作为实验对象,经活体解剖,迅速取闭壳肌、鳃、肝胰腺、外套膜、斧足和血液 6 种组织,用液氮速冻,保存于 -80 °C 冰箱中。攻毒的泥蚶先在海水中暂养 7 天,实验用海水水温(25.0 ± 1.0)°C。实验所需亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)由宁波甬盛水产种业有限公司提供。将 Cd(NO₃)₂ · 4H₂O 试剂配制成 Cd²⁺ 浓度为 1.000 g/L 母液备用;根据《海水水质标准》(GB 3097 - 1997)Cd 浓度为 5 μg/L 的限量,参照霍礼辉^[18]的研究成果,在保证各浓度各时间点泥蚶不死亡的前提下设置各实验组水体 Cd²⁺ 终浓度依次为 0、25、250 和 500 μg/L,其中 0 μg/L 作为对照组,25 μg/L 代表较低浓度,250 μg/L 代表中等浓度,500 μg/L 代表高浓度。开始实验前用等浓度 Cd²⁺ 的实验水体浸泡塑料箱 24 h 以上,消除容器对重金属的吸附作用。采用静态养殖方法,实验水体 20 L,每箱放置 70 个泥蚶,实验期间连续充气。分别在

实验开始的 0、3、6、9、24、48 和 72 h 进行取样,每箱取 5 个泥蚶,解剖后取其鳃,用液氮速冻,保存于 -80 °C 冰箱中。

试剂 Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen);SMARTTM RACE cDNA Amplification kit 和 Advantage 2 Polymerase kit (Clontech);pMD18-T 载体、大肠杆菌 DH5α、rTaq 聚合酶 (TaKaRa);胶回收试剂盒 (OMEGA);反转录试剂盒 (Promega);SYBR Green Real-time Master Mix (ABI)。PCR 所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

仪器 Mastercycler ProS 梯度 PCR 仪 (Eppendorf, 德国);NanoVue plus 超微量紫外分光光度计 (GE, 德国);Centrifuge 5417R 台式冷冻离心机 (Eppendorf, 德国);AB 7500 Fast Real-Time PCR system (ABI, 美国);DHP-9162 恒温培养箱 (上海慧泰仪器制造有限公司, 上海);HZ-9211KB 摇床 (太仓市华利达实验设备有限公司, 太仓)。

1.2 Tg-*TIMP-3* 基因 cDNA 全长克隆

参照 Trizol 总 RNA 提取试剂盒说明书的方法提取泥蚶上述组织总 RNA,用 1% 琼脂糖电泳检测 RNA 完整性,NanoVue 超微量紫外分光光度计检测浓度和纯度, -80 °C 冰箱中保存备用。通过 EST 序列检索,获得 Tg-*TIMP-3* 基因的 EST 片段,以此 EST 序列作为中间片段设计 3'-RACE 和 5'-RACE 特异性引物 Tg-*TIMP-3*-F 和 Tg-*TIMP-3*-R(表 1),克隆 Tg-*TIMP-3* 基因。具体步骤如下:利用 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒和 Advantage 2 Polymerase 扩增其全长 cDNA。3' 端和 5' 端扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测,割胶回收片段,胶回收试剂盒纯化。将纯化产物与 pMD18-T 载体连接,转化入感受态细胞 DH5α 中,挑取阳性克隆,利用 M13-47 和 RV-M 引物双向测序并验证测序结果。

1.3 Tg-*TIMP-3* 基因序列的生物信息学分析

测序结果去除载体序列,对比拼接,得到 Tg-*TIMP-3* 基因的 cDNA 全长序列。用 NCBI 中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 Blast 工具验证 cDNA 全长的正确性,并查找数据库中相似或同源基因序列;开放阅读编码框的预测在 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 中进行;利用 DNAMAN 6.0 对氨基酸序列和蛋白

质理化性质进行分析;用 ClustalW 程序进行多序列,用 MEGA 5.05 软件的 Neighbor-Joining 构建不同物种 *TIMP-3* 蛋白的系统进化树。

表 1 实验所用到的引物序列
Tab.1 Primer sequences for experiment

引物 primers	序列(5'→3') sequences from 5' to 3'	引物信息 information of primers
Tg- <i>TIMP-3</i> -F1	GCCTTCCTATCAAGCCAGGGTCT	3'-RACE 扩增
Tg- <i>TIMP-3</i> -R1	CCTGGTGCTTACACAGCCACATT	5'-RACE 扩增
Tg- <i>TIMP-3</i> -F2	GTCCAAGACCAAAATGTGGCTGTG	3'-RACE 扩增
Tg- <i>TIMP-3</i> -R2	CAGCCACATTTTGGTCTTGGACAG	5'-RACE 扩增
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	巢式 PCR 引物
Real- <i>TIMP-3</i> -F	TAGGCATCAGATACCATGACAACA	荧光定量引物
Real- <i>TIMP-3</i> -R	AACGAAATCAGCGTCACAGATAAG	
Tg-18SrRNA-F	CTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACT	
Tg-18SrRNA-R	TCCCGTATTGTTATTTTCGTCACT	内参基因荧光定量引物

1.4 Tg-*TIMP-3* 基因表达实时定量分析

使用 AB 7500 Fast Real-Time PCR system 和 SYBR Green Realtime Master Mix 对泥蚶闭壳肌、鳃、肝胰腺、外套膜、斧足和血液 6 种组织表达量以及水体终浓度为 0、25、250 和 500 $\mu\text{g/L}$ Cd 攻毒后泥蚶鳃中 Tg-*TIMP-3* 短期表达情况进行定量分析。根据 Tg-*TIMP-3* 序列设计荧光定量引物 Real-*TIMP-3*-F 和 Real-*TIMP-3*-R, 以 18S rRNA 作为内参基因, 用引物 Tg-18SrRNA-F 和 Tg-18SrRNA-R 进行特异性扩增(表 1)。

所有数据用 SPSS 20.0 (One-Way ANOVA) 进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示存在显著差异, $P < 0.01$ 为存在极显著差异。

2 结果

2.1 Tg-*TIMP-3* 基因 cDNA 全长与序列分析

SMART RACE 获得 Tg-*TIMP-3* 序列全长 cDNA 为 804 bp (GenBank 登录号: KP162340)。其中开放阅读框为 570 bp, 编码 189 个氨基酸, 5' 非编码区 (5'-UTR) 83 bp, 3' 非编码区 (3'-UTR) 151 bp, 包括终止密码子 TGA、加尾信号 AATATA 及多聚 poly A 尾巴, 推导 Tg-*TIMP-3* 蛋白质分子质量为 20.73 ku, 理论等电点 8.67, SignalP 3.0 检测发现有一个 22 个氨基酸组成的信号肽(图 1)。

2.2 Tg-*TIMP-3* 同源比对与系统发生分析

Tg-*TIMP-3* 的氨基酸序列用 ClustalW 与 NCBI 上选取其他物种的 *TIMP-3* 序列进行了比对, 从图中发现, Tg-*TIMP-3* 与其他物种 *TIMP-3* 相

似性比较低。与大西洋鲑 (*Salmo salar*) 相似度为 29.4%, 与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 相似度为 30.2%, 与埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 相似度为 30.6%, 与同是贝类的长牡蛎相似度也仅为 35.8% (图 2)。目前发现的 *TIMP* 基因家族均具有高度保守的 Cys-X-Cys 结构, 本研究中的 Tg-*TIMP-3* 也同样具有。对泥蚶两种 *TIMP* 基因的 cDNA 序列进行了比较分析, 发现 Tg-*TIMP-3* 和 Tg-*TIMP-4* 的氨基酸序列相似性仅为 31.8% (图 3)。

利用 MEGA 5.05 软件, 对泥蚶和其他 17 个物种的 *TIMP-3* 氨基酸序列进行对比并构建系统进化树, 所选物种的名称和 GenBank 号为人类 (*Homo sapiens*, AAB34532)、小家鼠 (*Mus musculus*, AAA40447)、黄牛 (*Bos taurus*, NP_776898)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*, AAA75002)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*, EKC31955)、埃及斑蚊 (*A. aegypti*, XP_001663710)、大西洋鲑 (*S. salar*, ACM09704)、牙鲆 (*P. olivaceus*, BAC87797)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*, NP_001033042)、青鳉 (*Oryzias latipes*, NP_001188423)、虎纹猫鲨 (*Scyliorhinus torazame*, AAD26150)、食蟹猴 (*Macaca fascicularis*, P61269)、家犬 (*Canis lupus familiaris*, AFQ35311)、猕猴 (*Macaca mulatta*, NP_001028128)、家马 (*Equus caballus*, CAB51854)、野猪 (*Sus scrofa*, XP_003126121) 及原鸡 (*Gallus gallus*, NP_990818)。发现脊椎动物 *TIMP-3* 先聚为一支, 然后与节肢动物门的埃及斑蚊聚为一支, 之后再与软体动物门的长牡蛎聚为一支, 最后与泥蚶聚为一支(图 4)。

```

1 ATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGACATTGTACCTGTCGTTTATAATTGG
61 AAGGTGGTTAGGCATCAGATACCATGACAACACTAAGTCTATCAGCTATATTTATCATT
1 M T T L S L S A I F I I
121 TTGCTGTATGTATTGGAACATCATTGGATGTACGTGTAGGCCAGCCATGCACAAGAAC
13 F A V C I G T S F G C T C R P S H A Q E
181 TTATCTGTGACGCTGATTTTCGTTATACAAGGTACGGTACTTAGATCGTCCATACAAGGAC
33 L I C D A D F V I Q G Q V L R S S I Q G
241 ATCAACGTATATACAAGTTTATAGTAATTGCTAAATATAAGTGTAAAGTTCGGCCTTCCTA
53 H Q R I Y K V L V I A K Y K C K F G L P
301 TCAAGCCAGGCTCTATCATAGTCYGTGCGACTCCAATTTACGTGAAGCTTGTGGAGTAC
73 I K P G S I I V X S T P I S R E A C G V
361 ATCTACTAGAAGGACTAAAATATATCTATCAGGTAAGTCAATCTCTGGTGGTTTACATA
93 H L L E G L K Y I L S G T A I P G G L H
421 TARATGCATGTGGATATAACAGACTCCTCTTTTCTATATCACGATGTGATTTTGACAATA
113 I X A C G Y N R L L F S I S R C D F D N
481 TAAGATATGGAAGGTACCAAGCCAATTGCGGATGTCAGGTAGTAAATGTTTTCCTCCAC
133 I R Y G R Y Q A N C G C Q V V N C F P P
541 AACCTTTCGTCCAAGACCAAAATGTGGCTGTGTAAGCACCAGGATAGAACCACCAAGACT
153 Q P F C P R P K C G C V S T R I E H Q D
601 CTGTTTGTGTAAGCATCATGGGCAGAGATGTTATTGGAACAGATTCTGCTGATTAAAGAC
173 S V C V K H H G Q R C Y W N R F C *
661 ATCTATTAATCTATCTACTTATTGATATATTATTACAGAGCAAACGGCTTTGTTTAA
721 ATTCTTTGTTCTTTCTTTGTATAACTTAAAAAATATAAAACACAGAGATTTTCCACCA
781 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图1 Tg-TIMP-3基因的cDNA全长序列及推导的氨基酸序列

“方框”表示 Tg-TIMP-3 基因的启动子、终止子和加尾信号,*代表蛋白翻译结束;阴影部分为 Tg-TIMP-3 的信号肽,下划线斜体加粗部分为信号肽切除位点

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of Tg-TIMP-3 gene

“Boxes” represent the start codon, the stop codon and the polyadenylation signal sequence, * represents the end of the protein translation. The signal peptide of Tg-TIMP-3 is shaded, the italic and bold underlined part was signal peptide cleavage site

```

Tegr - - - - -MTT L S L S A I F I I F A V C I G T S F G C T C R P S H A Q E L I C D A D F V I Q G Q V L R - S S I 50
Crgi - - - - -MK S A V L I V C V L I S V S I I S E A K C F V R H P Q N D F C Q A D Y V I K A E I L G E K N V 49
Aeae M L Q T R M N P Y H V M T A A L L V A L G V I L Q L S S T E A C S C L P E H A Q T A Y C D A E Y V I V A Q V L R K S N R 60
Paol - - - - -M L T F P V N G V L C T L A L L V L W R A E E L A G A C S C A P V H P Q Q A F C N A D V V I R A K V V G E K E V 56
Sasa - - - - -M P L S I N G V L C T L T V L I L W Q A E K L V E A C S C A P V H P Q Q A F C N A D V V I R A T V V G E K A V 55

Tegr Q G H Q R I Y K V L V I A K - Y K C K F G L P I K - - P G S I I V X S T P I S R E A C G V H L L E G - - L K Y I L S G T 105
Crgi T S F E K R Y K V K V L E N - Y K S G Y T S P F K - - - Y S Q V W I Y T T T S S A A C G V Q L D I G - - K T Y V I T G P 103
Aeae K H N D N N V Y K I A I K K E Y K M S P R A Q K M - - - L K Q G K L I T P S T D S M C G I Q L E V N - - Q L Y A I A A - 114
Paol D S G N D I Y G N P I K R I Q Y E V K Q I K M F K G P N Q D I E A V F T A P V S A V C G V T L D A T G K K G Y L I S G K 116
Sasa D T E N - I Y G N P I T M I Q Y D V K Q I K M Y K G P D Q D I E E I F T A P V S S V C G V T F D T S G K K D Y L I S G K 114

Tegr A I P - G G L H I X A C G Y N R L L F S I S R C D F D N I R Y G R Y Q A N C G C Q V V N C F P P Q P F C P R P - - - - 159
Crgi K R D - T K L T A N T C S W N V E V S A L T S F Q R N A L R K G Y Y R K N C E C K V C N C - - - - - 147
Aeae - - - - -R D I H V G L C N F V R K Y S D L T I V E K R G L A G - I Y R K G C S C Q I K P C F S G E C N M T I G A C N W T 169
Paol A E A G G Q M H V T L C D Y I M L W D S L S T T Q K S L S Q - R Y Q M G C E C K I V R C P S L P C E I S A P E E C L W 175
Sasa V E A G G K M H V T L C D Y I T P W E S M S P T Q K T S L T Q - R Y Q M G C D C K I V R C P S L P C A I S A P E E C L W 173

Tegr - - - K C G C V S T R I E H Q D S V C V K H H G Q R C Y W N R F C - - - - - 189
Crgi - - - I V Q Q L A R A T Y F N V L S Y - - - - - 163
Aeae P W A S C E T D Y G S C I P T R G Y L I D G S P A K C H W R R S P L Y Q K C K V D T R E - - 213
Paol T D L M I E K Q V H G R Q A N H Y A C V K R A D G S C S W Y R G V A L P K K E F L D A E D P 221
Sasa T D L M M E K Q V H G R Q A N D Y A C V K R A D S S C S W Y R G N A P P K K E F L D I E D P 219

```

图2 Tg-TIMP-3与其他物种TIMP-3氨基酸序列比对

Tegr:泥蚶,Crgi:长牡蛎,Aeae:埃及斑蚊,Paol:牙鲆,Sasa:大西洋鲑。黑色阴影表示一致序列,灰色阴影表示相似序列

Fig.2 Amino acid sequence alignment of TIMP-3 between *T. granosa* and other species

Tegr represents *Tegillarca granosa*, Crgi represents *Crassostrea gigas*, Aeae represents *Aedes aegypti*, Paol represents *Paralichthys olivaceus*, Sasa represents *Salmo salar*. Identities are shaded dark and similarities are shaded gray

```

Tegr3 - MTTLSLSAIFIIFAVCI GTSFGCTCRP SHAQELICDADFVIQGVLRSS-IQGHQRIYK 58
Tegr4 MLRFLSLVIIVAVLMMQRIPNAYGCYCDPAHPQQEFCTVDYVIKAKVREKIFIYDADNTTE 60

Tegr3 VLVIAKYKCKFGLPIKP-----GSIIVXSTPI SREACGVHLLLEGLKYILSGTAIPGGL 111
Tegr4 MPVEVKYVLKIKKI FKQTPAFEELNDTTVAFTS SKDSL CGVDLNVNEDYLISGNVNGGRM 120

Tegr3 HIXACGYNRLLFSISRCDFDNIRYGRYQANCGCQV VNCFP-----PQPF CPRPKCGCVST 166
Tegr4 DLHYCSWIEKYNNPTSIQKRGVRF-LYKNGCKCQVFRFCFNGGCNPPAAFVGVDEDHNC AWE 179

Tegr3 R-----IEHQDSVCVKHHGQR CYWNR-----FC 189
Tegr4 RGLPGDCYARKGICKKLGDGRCCWKRTHALKNCAPKEHSAHWC 222

```

图3 Tg-TIMP-3与Tg-TIMP-4氨基酸序列比对

Tegr3:Tg-TIMP-3, Tegr4:Tg-TIMP-4。黑色阴影表示一致序列,灰色阴影表示相似序列

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of Tg-TIMP-3 and Tg-TIMP-4

Tegr3 represents Tg-TIMP-3, Tegr4 represents Tg-TIMP-4. Identities are shaded dark and similarities are shaded gray

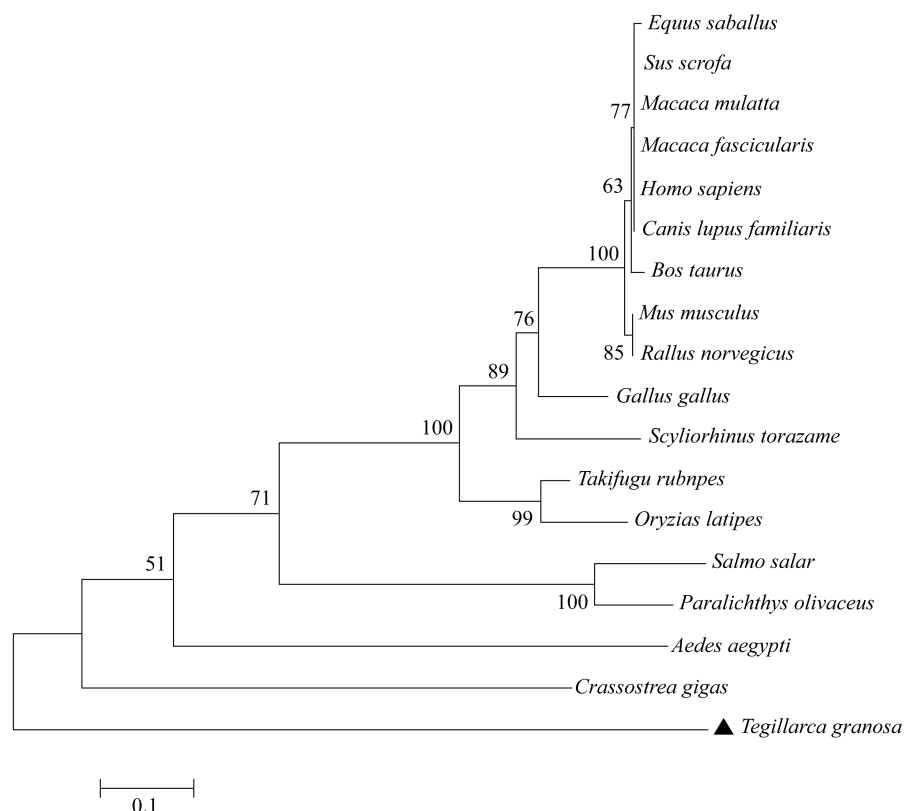


图4 邻接法构建泥蚶与其他物种TIMP-3的系统进化树

Fig. 4 Neighbor-Joining phylogenetic tree of TIMP-3 between *T. granosa* and other species

2.3 Tg-TIMP-3 mRNA在泥蚶不同组织中的表达差异

qRT-PCR检测发现,Tg-TIMP-3 mRNA在泥蚶闭壳肌、鳃、肝胰腺、外套膜、斧足和血液中共有表达,表达量由高到低依次为鳃>外套膜>肝胰腺>闭壳肌>斧足>血液。其中鳃中表达量最高,外套膜和肝胰腺次之,均极显著高于其在血液中的表

达量($P < 0.01$) (图5)。

2.4 不同浓度Cd攻毒后泥蚶鳃中Tg-TIMP-3 mRNA表达的短期变化

利用实时定量PCR方法分析了Cd攻毒后的表达情况(图6)。分析结果显示Cd攻毒后泥蚶鳃中的Tg-TIMP-3 mRNA表达量随着水体中Cd浓度的变化而变化,其中25 $\mu\text{g/L}$ Cd攻

毒后, Tg-*TIMP-3* 表达量在 6 h 时达到最高, 是 0 h 时的 14.1 倍, 极显著地高于同浓度的其他实验组 ($P < 0.01$), 之后回落, 48 h 后表达受到抑制 ($P < 0.01$); 250 $\mu\text{g/L}$ Cd 攻毒后 Tg-*TIMP-3* 表达量在 3 h 时受到抑制, 是 0 h 时的 0.17 倍, 在 6 h 升高并达到最高, 是 0 h 时的 15.3 倍, 极显著地高于同浓度的其他实验组 ($P < 0.01$), 9 h 时再次受到抑制, 是 0 h 时的 0.07 倍 ($P < 0.01$), 24 h 时再次上调, 是 0 h 时的 2.3 倍, 之后下调 ($P < 0.01$); 500 $\mu\text{g/L}$ Cd 攻毒后鳃中 Tg-*TIMP-3* 在 3~6 h 表达被抑制, 其中 6 h 是 0 h 的 0.16 倍 ($P < 0.05$), 9 h 时表达量达到最高, 是 0 h 的 2.2

倍, 之后表达量不断下降 ($P < 0.05$), 72 h 时表达量是 0 h 时的 0.05 倍, 极显著地低于同浓度的其他实验组 ($P < 0.01$)。在对照组, 各个时间点表达量没有显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本实验通过构建 EST 文库克隆获得 Tg-*TIMP-3* 基因, 其 cDNA 全长为 804 bp, 其中开放阅读框为 570 bp, 编码 189 个氨基酸, 5' 非编码区 (5'-UTR) 83 bp, 3' 非编码区 (3'-UTR) 151 bp, 终止密码子 TGA 和加尾信号 AATATA 以及 poly A 尾巴, 推导 Tg-*TIMP-3* 蛋白质分子质量为 20.73 ku, 理论等电点 8.67。在无脊椎动物果蝇中的研究发现, 至少有一种 *TIMP* 在 ECM 重塑中具有重要作用^[19-20], 之前实验发现 Tg-*TIMP-4* 具有信号肽^[13], 本实验发现 Tg-*TIMP-3* 也有一个 22 个氨基酸组成的信号肽, 推测其可能具有高度保守的参与组织重建的蛋白水解系统^[21]。这个信号肽在高度保守的 Cys-X-Cys (Tg-*TIMP-3* 的 X 为 Thr) 基序上游切除。同源序列比对发现 Tg-*TIMP-3* 与其他物种的 *TIMP-3* 相似性并不高, 与 Tg-*TIMP-4* 比对发现其拥有 12 个高度保守的 Cys, 这 12 个 Cys 形成 6 个二硫键, 将蛋白折叠成 2 个功能域, 即 N 端与 C 端^[21]。在对人类的研究中发现, *TIMP* 的 N 端具有结合基质金属蛋白酶的功能, 此功能在无脊椎动物果蝇和线虫中也得到证实^[19]; 而 C 端具有连接金属酶类及其前体的作用。在脊椎动物研究中发现成熟 *TIMP* 中第一个半胱氨酸即 Cys¹ 可以螯合基质金属蛋白酶中的金属离子, 从而抑制基质金属蛋白酶活性; 本实验发现 Tg-*TIMP-3* 的成熟蛋白中同样具有 Cys¹, 推测其在泥蚶中发挥着类似高等生物的功能。*TIMP-3* 在 *TIMP* 家族中是唯一一个不仅具有广泛抑制基质金属蛋白酶的作用, 还能抑制 ADAM (a disintegrin and metalloproteinase like, or adamalysin) 和 ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) 家族活性^[22-25] 的基因。*TIMP-3* 对其的抑制作用在抗炎过程具有重要作用, 对癌症, 风湿性关节炎和骨关节炎等发展过程都能产生影响^[9,26]。*TIMP* 在无脊椎动物的研究中, 首先在果蝇中克隆得到全长 cDNA, 随后在线虫及太平洋牡蛎等物种中得到全长 cDNA^[11-12,27], 课题组之前成功获得的 Tg-*TIMP-4*, 与 Tg-*TIMP-3* 类似, Tg-*TIMP-4* 具有含 23

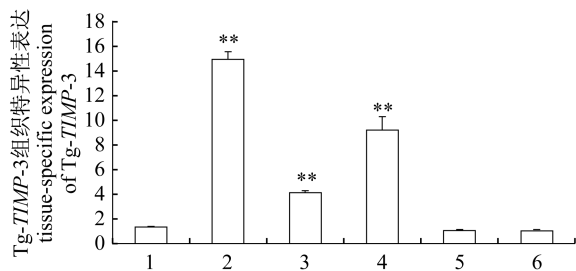


图5 Tg-*TIMP-3* 基因在泥蚶 6 种组织中的表达差异分析 ($n = 4$)

1. 闭壳肌; 2. 鳃; 3. 肝胰腺; 4. 外套膜; 5. 斧足; 6. 血液。* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 5 Analysis of expression of Tg-*TIMP-3* gene in six tissues of *T. granosa* ($n = 4$)

1. adductor muscle; 2. gill; 3. hepatopancreas; 4. mantle; 5. foot; 6. blood; * indicate significant difference ($P < 0.05$), ** indicate extremely significant difference ($P < 0.01$)

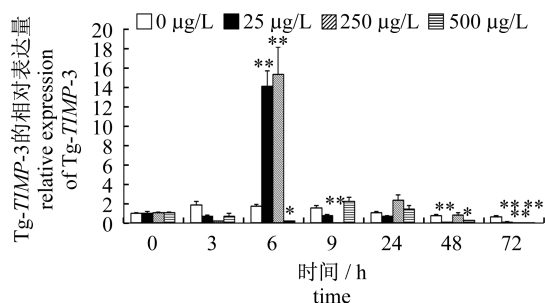


图6 不同浓度 Cd 攻毒后泥蚶鳃中 Tg-*TIMP-3* 表达水平分析

* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 6 Real-time analysis of the relative of Tg-*TIMP-3* gene in gill of *T. granosa* challenged by different concentration of Cd

* indicate significant difference ($P < 0.05$), ** indicate extremely significant difference ($P < 0.01$)

个氨基酸组成的信号肽,在高度保守的 Cys-X-Cys 基序(Tg-*TIMP*-4 中 X 为 Tyr)上游切除,12 个高度保守的 Cys,同样也具有 Cys¹,参与了贝类抗菌免疫防御^[13]。从构建的 *TIMP*-3 氨基酸系统进化树来分析,脊椎动物中的哺乳纲、鸟纲和鱼纲聚成一大支,然后与节肢动物门的埃及斑蚊聚为一支,之后再与软体动物门的长牡蛎聚为一支,最后与泥蚶聚为一支。这一结果与传统分类结果和系统发育演化规律基本吻合。

本实验用 qRT-PCR 检测发现,Tg-*TIMP*-3 基因在泥蚶闭壳肌、鳃、肝胰腺、外套膜、斧足和血液组织中均表达,其中在鳃中表达量最高($P < 0.01$),外套膜和肝胰腺($P < 0.01$)次之,表达量最低的是血液,由于鳃是贝类的呼吸器官,对水中的细菌和有毒物质起到过滤作用,是免疫防御的第一道屏障。外套膜是与外界接触最直接的,也是作为抵御外界细菌和有毒物质的第一道防线。根据 Tg-*TIMP*-3 基因在组织中的表达量,推测其可能在免疫防御中起重要的作用。

Montagnani 等^[11]研究发现,*TIMP* mRNA 在贝壳损坏和菌刺激下表达量均在 3~6 h 时上调,在 9 h 时表达量达到最高,然后回落,表明 *TIMP* 可能在太平洋牡蛎伤口愈合,细菌刺激免疫中起重要作用。中国东部沿海的生态系统中重金属的污染严重,其中 Cd 是毒性最强的重金属污染物之一^[16]。双壳贝类通过鳃不断吸收溶解在水中的重金属,然后通过血液输送到体内各个部位,对重金属具有高度的富集作用^[28-29]。虽然部分贝类体内重金属含量很高,但仍未表现出明显的畸变,可能贝类体内某些组织或蛋白对重金属有清除作用。本实验研究发现,在 25 $\mu\text{g/L}$ 和 250 $\mu\text{g/L}$ Cd 攻毒后鳃中 Tg-*TIMP*-3 表达量均在 6 h 达到最高,500 $\mu\text{g/L}$ Cd 攻毒后鳃中 Tg-*TIMP*-3 在 9 h 达到最高,其中 250 $\mu\text{g/L}$ Cd 攻毒后在 24 h 表达再次上调,之后表达量都受到抑制。随着重金属 Cd 浓度升高,Tg-*TIMP*-3 的诱导表达量增加,说明 Tg-*TIMP*-3 是可诱导蛋白,500 $\mu\text{g/L}$ Cd 攻毒后,鳃中 Cd 含量可能超过泥蚶承受重金属极限,导致泥蚶体内机制紊乱,Tg-*TIMP*-3 的表达量受到抑制。由于 Cd²⁺ 能结合蛋白质中的羟基、氨基和巯基,使蛋白质变性失活,导致 Tg-*TIMP*-3 在攻毒初期表达量下调。25 $\mu\text{g/L}$ 和 250 $\mu\text{g/L}$ Cd 攻毒后,Tg-*TIMP*-3 在 6 h 表达量上升并达到最高,推测可能由于基质金属蛋

白酶是依赖 Zn²⁺ 的内肽酶(endopeptidases)家族,在 *MMP* 的活性位点,催化锌的络合范围由三个组氨酸残基和一个外加配体构成。*TIMP* 与活化的 *MMP* 形成不可逆的 1:1 非共价键结合的复合物,从而抑制其活性,抑制 *MMP* 对基质蛋白的降解^[30]。泥蚶通过鳃吸收了大量的 Cd²⁺,Cd²⁺ 可能与组氨酸残基的氨基结合,与 Zn²⁺ 竞争蛋白结合位点,导致大量 *TIMP*-*MMP* 复合物失活,促使 *MMP* 和 *TIMP*-3 的表达量上调。250 $\mu\text{g/L}$ Cd 攻毒后,Tg-*TIMP*-3 的表达量在 9 h 回落后,24 h 再度上调,可能是 Cd 攻毒下泥蚶体内启动了更为有效的防御机制,如抗氧化酶系统中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)以及金属硫蛋白(metallothionein, MT)。也可能 ECM 自身修复过程需要 *MMP*、*TIMP*、ADAM 和 ADAMTS 保持平衡^[2],最终导致高浓度 Cd 攻毒后 Tg-*TIMP*-3 的表达量回落后再次上调。

本研究通过 RACE 技术克隆获得 Tg-*TIMP*-3 全长序列,对其进行生物信息学、组织表达和镉刺激情况下 mRNA 表达分析,探讨了 Tg-*TIMP*-3 在重金属 Cd 攻毒下的免疫防御或解毒方面的相关机制,但 *TIMP*-3 与 Cd 代谢或免疫确切的相关机理还需进一步深入研究。另外,本研究为筛选重金属 Cd 污染下滩涂贝类生物标志物的筛选提供了理论依据,但具体的时间效应及剂量效应还需进一步验证。

参考文献:

- [1] Okamoto T, Akaike T, Suga M, et al. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(9):6059-6066.
- [2] Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of Metalloproteinases: Evolution, structure and function [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1477(1-2):267-283.
- [3] Melendez-Zajgla J, Del P L, Ceballos G, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled [J]. *Molecular Cancer*, 2008, 7:85.
- [4] Jourquin J, Tremblay E, Bernard A, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (*TIMP*-1) modulates, neuronal death, axonal plasticity, and learning and memory [J]. *European Journal of*

- Neuroscience, 2005, 22(10): 2569 – 2578.
- [5] Jaworski D M, Perez-Martinez L. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression is regulated by multiple neural differentiation signals [J]. Journal of Neurochemistry, 2006, 98(1): 234 – 247.
- [6] Jung K K, Liu X W, Chirco R, et al. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein [J]. European Molecular Biology Organization Journal, 2006, 25(17): 3934 – 3942.
- [7] Seo D W, Li H, Guedez L, et al. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: An MMP-independent mechanism [J]. Cell, 2003, 114(2): 171 – 180.
- [8] D' Alessio S, Ferrari G, Cinnante K, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(1): 87 – 99.
- [9] Murphy G, Nagase H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis; Destruction or repair [J]. Nature Clinical Practice Rheumatology, 2008, 4(3): 128 – 135.
- [10] Pavloff N, Staskus P W, Kishnani N S, et al. A new inhibitor of metalloproteinases from Chicken; ChIMP-3. A third member of the TIMP family [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(24): 17321 – 17326.
- [11] Montagnani C, Le Roux F, Berthe F, et al. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms [J]. FEBS Letters, 2001, 500(1–2): 64 – 70.
- [12] Montagnani C, Ana Tirape, Viviane Boulo, et al. The two Cg-timp mRNAs expressed in oyster hemocytes are generated by two gene families and differentially expressed during ontogenesis [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2005, 29(10): 831 – 839.
- [13] Wang Q, Bao Y B, Huo L H, et al. A novel tissue inhibitor of metalloproteinase in blood clam *Tegillarca granosa*: Molecular cloning, tissue distribution and expression analysis [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(3): 645 – 651.
- [14] Bi C J, Chen Z L, Xu S Y, et al. The Yangtze River Estuary macrobenthos accumulation of heavy metals [J]. Journal of Applied Ecology, 2006, 17(2): 309 – 314. [毕春娟, 陈振楼, 许世远, 等. 长江口潮滩大型底栖动物对重金属的累积特征. 应用生态学报, 2006, 17(2): 309 – 314.]
- [15] Wang W X, Ke C H. Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods [J]. Aquatic Toxicology, 2002, 56(3): 153 – 165.
- [16] Han F X, Banin A, Su Y, et al. Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere [J]. Naturwissenschaften, 2002, 89(11): 497 – 504.
- [17] Wang X Y, Yang H S, Wang Q. Reviews of ecological toxicology effects on heavy metal pollution stress on bivalves [J]. Marine Science, 2009, 30(10): 112 – 118. [王晓宇, 杨红生, 王清. 重金属污染胁迫对双壳贝类生态毒理效应研究进展. 海洋科学, 2009, 30(10): 112 – 118.]
- [18] Huo L H. Preliminary studies on accumulation and response of heavy metal (copper, lead and cadmium) in *Tegillarca granosa* [D]. Ningbo: Ningbo University, 2012. [霍礼辉. 泥蚶对重金属 (铜、铅、镉) 的富集和响应初步研究. 宁波: 宁波大学, 2012]
- [19] Pohar N, Godenschwege T A, Buchner E. Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: Structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human [J]. Genomics, 1999, 57(2): 293 – 296.
- [20] Godenschwege T A, Pohar N, Buchner S, et al. Inflated wings, tissue autolysis and early death in tissue inhibitor of metalloproteinases mutants of *Drosophila* [J]. European Journal of Cell Biology, 2000, 79(7): 495 – 501.
- [21] Fernandez-Catalan C, Bode W, Huber R, et al. Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor [J]. European Molecular Biology Organization Journal, 1998, 17(17): 5238 – 5248.
- [22] Amour A, Slocombe P M, Webster A, et al. TNF Alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3 [J]. FEBS Letters, 1998, 435(1): 39 – 44.
- [23] Amour A, Knight C G, Webster A, et al. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3 [J]. FEBS Letters, 2000, 473(3): 275 – 279.
- [24] Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, et al. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5) [J]. Journal of

- Biological Chemistry, 2001, 276 (16): 12501 – 12504.
- [25] Jacobsen J, Visse R, Sorensen H P, *et al.* Catalytic properties of ADAM12 and its domain deletion mutants [J]. Biochemistry, 2008, 47 (2): 537 – 547.
- [26] Rocks N, Paulissen G, El Hour M, *et al.* Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer [J]. Biochimie, 2008, 90 (2): 369 – 379.
- [27] Montagnani C, Avarre J C, de Lorgeril J, *et al.* First evidence of the activation of Cg-*timp*, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2007, 31 (1): 1 – 11.
- [28] Li J R, Li X P, Wang L, *et al.* Research progress of absorption, transport and accumulation of heavy metals of shellfish [J]. Aquatic Sciences, 2007, 26 (1): 51 – 55. [励建荣, 李学鹏, 王丽, 等. 贝类对重金属的吸收转运与累积规律研究进展. 水产科学, 2007, 26 (1): 51 – 55.]
- [29] Zhao H X, Zhan Y, Xu Z R. Progress on heavy metals toxicity to aquatic organisms [J]. Jiangxi Feed, 2003, 2: 13 – 18. [赵红霞, 詹勇, 许梓荣. 重金属对水生生物毒性的研究进展. 江西饲料, 2003, 2: 13 – 18.]
- [30] Kikuchi H, Shinmoda W, Nonsda T, *et al.* Significance of serine proteinase and matrix metalloproteinase system in the destruction of human articular cartilage [J]. Clinical Experimental Pharmacology and Physiology, 1996, 23 (10 – 11): 885 – 889.

A novel tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in blood clam *Tegillarca granosa*: molecular cloning and immune-related research of Cd

LI Peifen^{1,2}, LIN Zhihua^{2*}, BAO Yongbo^{2*}

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: On the basis of cDNA library of *Tegillarca granosa*, Tg-*TIMP-3* cDNA was cloned by SMART RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) techniques and then the bioinformatics, expression and immune defense analysis of Tg-*TIMP-3* were carried out. The full length cDNA of Tg-*TIMP-3* gene was 804 bp, containing a complete ORF (Open Reading Frame) of 570 bp encoding 189 amino acids. The deduced amino acid sequence of Tg-*TIMP-3* did not share high similarity with others, only shared 35.8% similarity with *TIMP-3* from *Crassostrea gigas*, but the two functional domains of *TIMPs* were relatively conservative. The results of tissue-specific expression by real time PCR showed that the mRNA transcript level of Tg-*TIMP-3* in gill was higher than those in other tissues including haemocytes, adductor muscle, foot, hepatopancreas and mantle. After being challenged by different concentration of Cd, the level of relative expression in gill of Tg-*TIMP-3* mRNA was first slightly reduced and then significantly increased the highest. Those challenged by the concentrations of 25 $\mu\text{g/L}$ and 250 $\mu\text{g/L}$ of Cd reached the highest at 6 h ($P < 0.01$), 500 $\mu\text{g/L}$ reached the highest at 9 h, but finally inhibited to different degrees after 48 h. The results indicated that Tg-*TIMP-3* played a vital role in the immune defense responses to Cd. However, the temporal sequence and sensitivity of mRNA expression were different in different challenge groups.

Key words: *Tegillarca granosa*; *TIMP-3*; Cd; mRNA expression; immune response

Corresponding author: LIN Zhihua. E-mail: zhihua9988@126.com;

BAO Yongbo. E-mail: bobbao2001@gmail.com