



赤眼鳟与草鱼 TLR19 结构及功能差异初探

袁文玲, 吕 钊, 刘 益, 刘小燕*, 肖调义*

(湖南农业大学, 湖南省特色水产资源利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘要: 为探索赤眼鳟 TLR19(*ScTLR19*) 与已报道草鱼 TLR19(*CiTLR19*) 的结构及功能差异, 实验克隆了 *ScTLR19* 基因全长并分析其结构特点, 利用实时荧光定量 PCR(qPCR) 分析其组织表达及草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 感染后的表达特征, 同时采取过表达实验揭示其对 TLR19 信号通路下游功能基因的激活特性。结果显示, *ScTLR19* 基因编码 957 个氨基酸, 与 *CiTLR19* 氨基酸序列具有高度相似性 (94.04%); 但 *ScTLR19* 胞外区由 9 个亮氨酸重复序列 (LRR) 组成, 比 *CiTLR19* 在 654~677 氨基酸位点之间明显多 1 个 LRR, 且在三级结构上相应多 2 个 α -螺旋和 6 个 β -折叠。*ScTLR19* 广泛表达于赤眼鳟各组织, GCRV 攻毒后, 其表达水平在免疫组织肾脏中显著上调。赤眼鳟鳍条细胞系过表达 *ScTLR19* 并接受 GCRV 攻毒后, 干扰素调节因子 IRF7 在攻毒期间的表达水平与对照组无显著差异, 而干扰素调节因子 IRF3 在攻毒 12 和 24 h 的表达水平显著上调, 且衔接蛋白 MyD88 和 TRIF 的表达水平均显著上调。研究表明, 与 *CiTLR19* 相比, *ScTLR19* 同样只对 IRF3 而不对 IRF7 进行调控, 但不同于 *CiTLR19* 单一调控 TRIF 的模式, 其同时对 MyD88 和 TRIF 二者进行调控, 可能介导更多样的抗病毒免疫反应。

关键词: 赤眼鳟; 草鱼; GCRV; TLR19; 结构与功能

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

先天免疫是鱼类在进化过程中抵御病原入侵的第一道防线^[1-2], 它依赖机体模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 继而激活下游信号通路、诱导机体免疫应答, 以杀灭或清除入侵病原^[3-5]。Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 家族是当今研究最热门的模式识别受体之一, 根据哺乳动物 TLR 家族分子配体及结构特征^[6-7], 研究人员将鱼类中鉴定的 20 种 TLR 家族分子划分为 6 大亚家族^[8-11], 即 TLR1、3-5、7 和 11 亚家族。TLR 的基本结构包括跨膜区、胞外区和胞内区^[12]: 所有 TLR 都有 1 段跨膜域, 属于 I 型跨膜蛋白; 胞外区由多

个丰富的亮氨酸重复序列 (LRR) 组成, 不同 TLR 之间胞外区 LRR 数目不一, 导致它们的结构和配体特异; 胞内区通常由 1 个 Toll/白细胞介素 1 受体 (Toll/interleukin 1 receptor, TIR) 结构域构成, 为 TLR 进行信号传导的关键结构域, 它能结合、激活接头蛋白分子 (adapter protein) 并级联激活下游免疫信号^[13]。不同 TLR 介导的信号级联反应主要分为 MyD88 依赖和 MyD88 非依赖的两种途径^[14], 最终通过激活 NF- κ B 或 IRF 等入核转录因子^[15-16], 诱导白介素、趋化因子和 I 型干扰素 (interferon, IFN) 等表达, 从而激起机体不同的免疫应答。

TLR19 是鱼类特异性受体^[17], 与 TLR11-13、

收稿日期: 2020-01-14 修回日期: 2020-05-04

资助项目: 国家自然科学基金面上项目 (31972787); 国家自然科学基金青年项目 (31802288)

通信作者: 刘小燕, E-mail: 1176450971@qq.com; 肖调义, E-mail: tyxiao1128@163.com

TLR21-23 和 TLR20/26 同属于 TLR11 亚家族^[18]。目前, 有关 TLR11 亚家族的功能研究主要集中在 TLR22 基因, 它在大部分鱼类免疫组织中有较高表达, 暗示着 TLR22 可能是抵抗病原菌侵袭的重要免疫相关基因。现有多种硬骨鱼类的 TLR19 基因均被克隆鉴定, 如斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)^[19]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[20]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[21]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[22]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[23]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)等。在草鱼中, 双链 RNA(dsRNA) 病毒类似物 poly(I:C) 能诱导草鱼肾脏细胞(CIK)中 TLR19 基因表达量显著上调^[17]; 而在大西洋鲑中, 传染性鲑鱼贫血症病毒(ISAV)感染却引起肾脏组织 TLR19 基因表达量下降^[21]。此外, 灭活嗜水气单胞菌刺激使团头鲂肝脏、脾脏和头肾组织中 TLR19 基因表达量显著下调^[23]; 而引起黄颡鱼肝脏、脾脏和血液 TLR19 基因表达量显著上调^[22]。因此, 不同鱼类的 TLR19 基因在响应不同或相同病原时呈现出不同的表达模式, 暗示它们的功能模式和机制可能具有特性。

赤眼鲟(*Squaliobarbus curriculus*)属鲤科(Cyprinidae), 赤眼鲟属(*Squaliobarbus*)^[24]。它不仅具有适应能力强、生长速度快、食性杂等特点, 而且在感染 GCRV 时, 与同属雅罗鱼亚科的草鱼相比具有更高的抗性^[25], 但该抗性差异的分子机制尚未明确。鉴于 TLR 家族分子在抗病毒免疫中发挥关键作用, 已有研究提示部分赤眼鲟 TLR 与草鱼相应 TLR 在结构上存在明显差异, 这可能造成了它们抗病毒免疫功能的差异, 从而导致 2 种鱼抗 GCRV 能力的差异^[26]。草鱼 TLR19(CiTLR19)的功能已有深入研究, 其作为胞内 PRR 识别 GCRV, 通过 MyD88 非依赖途径 TRIF 信号通路激活 IRF3 以诱导 I 型干扰素的表达, 从而发挥抗病毒免疫功能^[17]。本实验克隆获得赤眼鲟 TLR19 基因(*ScTLR19*)的全长, 发现其胞外区与草鱼 TLR19 相比多 1 个 LRR, 而后基于功能比较进一步观察了 GCRV 刺激后 *ScTLR19* 在不同免疫组织的表达水平变化, 并通过过表达实验初步解析其相对于 *CiTLR19* 独特的抗 GCRV 免疫功能, 旨在初步探明赤眼鲟草鱼 TLR19 结构和功能的差异, 并为赤眼鲟与草鱼 GCRV 抗性差异的分子机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及 GCRV 攻毒实验

实验 6 月龄赤眼鲟来自湖南农业大学—东方星座基地, 为 2019 年繁育个体, 体质量(10.5±0.3)g, 体长(9.1±0.1)cm。拉回后置于 28℃、80L/箱的循环养殖系统暂养一个月, 每天定点投喂饲料。活鱼经丁香酚麻醉后, 取鳃、皮肤、肌肉、肠、肝脏、脾脏、肾脏和头肾组织, 置于液氮中保存, 为组织表达量检测备用。对于 GCRV 攻毒实验, GCRV 病毒(JX0901 毒株, 由中国水产科学院长江水产研究所曾令兵研究员惠赠)经腹腔注射注入鱼体(0.2 mL/尾), 在攻毒 6、12、24、72 和 168 h 后取样, 对照组注射同等量的磷酸缓冲盐溶液(PBS), 每个时间点取 3 尾鱼作为重复。攻毒后取免疫组织肝脏、脾脏、肾脏, 保存方法同上。

1.2 RNA 提取及 cDNA 的合成

参照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction(TaKaRa)试剂盒说明书提取总 RNA, 并用 BioSpectrometer Basic 核酸蛋白仪(Eppendorf)检测其 RNA 浓度和质量; 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性; 按照 cDNA 反转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA。

1.3 ScTLR19 基因全长的克隆

ScTLR19 基因中间片段的克隆 以 NCBI 中草鱼 TLR19 基因(GenBank: KY798320.1)的序列信息为参考, 运用 Oligo 7.0 软件设计引物 *ScTLR19*-cF/R(表 1), 以赤眼鲟肝脏 cDNA 为模板 PCR 扩增获得 *ScTLR19* 基因的中间片段, 体系为: 10 μL Taq Master Mix (TaKaRa), 7 μL ddH₂O, 1 μL cDNA, 1 μL *ScTLR19*-cF 和 1 μL *ScTLR19*-cR。程序为: 94℃, 预变性 5 min; 94℃, 变性 30 s, 退火温度 56℃, 30 s, 72℃, 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72℃, 修复延伸 7 min; 4℃ 保存。回收 PCR 产物并连接至 pMD19-T 载体(TaKaRa), 送武汉奥科鼎盛生物科技有限公司测序。

ScTLR19 基因的 5' RACE 和 3' RACE 3' RACE 第一轮以 *ScTLR19* 3'W 和通用引物 UPM(表 1)为扩增引物, 扩增条件为 94℃, 预变性 5 min; 94℃, 变性 30 s, 退火温度 55℃, 30 s, 72℃, 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72℃, 修复

表 1 本研究所用引物的序列信息

Tab. 1 Primers and their sequences used in this study

引物 primer	序列 sequence (5' -3')	用途 application	登录号 GenBank NO.
ScTLR19-cF	CTGCCAATGCCTTTTCACAC	中间片段扩增	
ScTLR19-cR	GCAAACAGAGCCTCAATCTCG		
ScTLR19-5'	TCCAGGTGGTCTACTTCCGAAGTCTC	5' RACE	
ScTLR19 3' W	ACTAATGTTTTCAAGGCAGTTCGAGAGC	3' RACE	
ScTLR19 3' N	CACTGCACCGTCTCAAGCGTCT		
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC		
ScTLR19-qF	TTCACACTTGCCTTCTTTGGA	荧光定量PCR	
ScTLR19-qR	TAATCACCGAAAAGCAGCCAGA		
MyD88-qF	GAAGCCCGTCCAGGTCCA		KR604719.1
MyD88-qR	TGAAGGCATCAAAGGTCTCCG		
TRIF-qF	TCGAGGAGGAAGGCTGGCACTT		KU870671
TRIF-qR	TGAGCGTGAAGCAGACAGCAGC		
IRF7-qF	CGCCTGTGTTCGTCACCTCGT		ACS34986.1
IRF7-qR	GGTGGTTGAAAAGCGTATTGG		
IRF3-qF	AAACGTGTCTGTACAAAACCC		KY362546
IRF3-qR	CTCAAGCCCCAAATAGAGCTG		
EF 1 α -qF	CGCCATTGTTGAGATGATCCCT		
EF 1 α -qR	GACACCAACAGCAACGGTCT		
β -actin-qF	GCTATGTGGCTCTTGACTTCG		
β -actin-qR	GGGCACCTGAACCTCTCATT		
ScTLR19-tF	tcgagctcaagcttcaattcATGGGTGTGACTGACTCAAATTGC	过表达载体构建	
ScTLR19-tR	ggatccgggcccgcggtaccAGAAGCTTCTCAGTGTCATTTCATG		

延伸 7 min。接着以第一轮 PCR 产物稀释 50 倍作为模板，利用 ScTLR19 3' N 和通用引物 UPM (表 1) 进行巢式扩增。5' RACE 首轮以 ScTLR19-5' 和通用引物 UPM (表 1) 为扩增引物，扩增条件为 94 °C，预变性 5 min；94 °C，变性 30 s，退火温度 60 °C，30 s，72 °C，延伸 2 min，共 35 个循环；72 °C，修复延伸 7 min。接着以首轮 PCR 产物稀释 50 倍作为模板进行二次扩增。综合分析 3'，5' RACE 和中间片段序列，获得 ScTLR19 基因全长信息。

1.4 ScTLR19 结构特征分析

DNAMAN 软件拼接得到 ScTLR19 基因全长后，ExPasy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线 <https://www.china-fishery.cn>

预测其蛋白质理化性质。借助 Blast 软件对不同鱼类 TLR19 氨基酸序列相似性进行分析，MAGA 7.0 软件 (Neighbor-Joining, 邻接法, 1000 次自展检测) 构建系统进化树。ScTLR19 结构域和三级结构预测分别在 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 平台上完成。

1.5 荧光定量 PCR(qPCR) 检测

根据 ScTLR19 基因全长设计 qPCR 引物 ScTLR19-qF/R (表 1)，借助 CFX96-Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-rad) 对赤眼鳟各健康组织以及感染 GCRV 后免疫组织肝脏、脾脏、肾脏中 ScTLR19 基因的相对表达量进行检测，以 β -

actin 和 EF-1 α 作为内参 (表 1)。qPCR 反应体系: 5 μ L SYBR Green I 荧光染料 (Vazyme), 0.4 μ L ScTLR19-qF/R, 1 μ L cDNA 模板, 3.2 μ L ddH₂O。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 40 个循环, 溶解曲线: 65 $^{\circ}$ C 至 95 $^{\circ}$ C, 每 5 s 增加 0.5 $^{\circ}$ C, 所有样品设置 3 个重复。

1.6 ScTLR19 的过表达实验

过表达质粒 pEGFP-N1-Flag-ScTLR19 的制备 以 ScTLR19 ORF 序列为模板, 设计特异性引物 ScTLR19-tF/R (表 1), 获得带酶切位点 (5' *Kpn* I 和 3' *Eco*R I) 的 PCR 产物。经双酶切后, 用 T4 连接酶将其连接至 pEGFP-N1-Flag 载体构建 pEGFP-N1-Flag-ScTLR19 重组质粒。按照 Endo-Free Plasmid Mini Kit I (TaKaRa) 说明书提取 pEGFP-N1-Flag-ScTLR19 重组质粒, 并用核酸蛋白仪检测浓度, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

转染 利用阳离子脂质体法进行转染实验, 转染前保证赤眼鳟鳍条细胞 (SCF) 培养密度达到 60%~70%。根据 Lipofectamine[®]3000 (ThermoFisher) 转染试剂盒说明书提示将 pEGFP-N1-Flag-ScTLR19 重组质粒转染至细胞 (5 μ g/T25 瓶)。每个实验组 3 个重复, CO₂ 培养箱 (ThermoFisher) 28 $^{\circ}$ C 环境转染 6 h。

ScTLR19 同源过表达 瞬时转染 24 h 后, 首先用荧光倒置显微镜 (Olympus, BX51) 进行荧光观察并拍照。接着, 收取 ScTLR19 样品并用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 对照组为健康赤眼鳟细胞和过表达 pEGFP-N1-Flag 细胞, 利用 qPCR 方法验证 ScTLR19 基因 mRNA 水平的过表达。

利用 Western Blot 方法验证 ScTLR19 蛋白水平的过表达。首先, 提取 ScTLR19 过表达的 (转染 24 h 后) SCF 细胞总蛋白, 并用 BCA 法检测总

蛋白浓度。接着, 蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离后, 250 mA 下湿转膜 2 h。用 0.5% PBST 洗膜 30 min (10 min/次) 后, 将膜置于封闭液 (Beyotime) 室温封闭 15 min。加入 Flag 鼠源抗体 (ABclonal, 1:1000 稀释) 和内参蛋白 β -actin 兔源抗体 (ABclonal, 1:4000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后, PBST 漂洗 5 次, 每次 5 min。二抗避光孵育 1 h (β -actin 羊抗兔二抗和 Flag 羊抗鼠二抗, 均按 1:2000 稀释), 洗膜 5 次。最后, 加入 ECL 底物显色液 (Beyotime) 显色, 通过 Gene Genome (Alcatel) 成像系统拍照。

IRF3、IRF7、TRIF 和 MyD88 基因表达水平检测 瞬时转染 24 h 后进行 GCRV 攻毒 (MOI:0.5), 收取攻毒 0、12、24 和 48 h 后的细胞, 用 Trizol 法提取 RNA 并合成第一链 cDNA, 借助 qPCR 方法检测 IRF3、IRF7、TRIF 和 MyD88 基因的 mRNA 水平变化。

1.7 数据处理

用 Bio-Rad CFX Manager 软件和 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法计算 ScTLR19、IRF3、IRF7、TRIF 和 MyD88 基因的相对表达量, 数据分析用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析及多重比较。

2 结果

2.1 ScTLR19 与 CtTLR19 的结构比较

ScTLR19 基因全长 3230bp (GenBank: MN432880), 编码 957 个氨基酸, 其预测蛋白分子量为 109.528 ku, 理论等电点为 5.99。系统进化树结果显示 ScTLR19 与 CtTLR19 同源性最高 (图 1)。Blast 结果也表明两者相似性最高 (94.04%); 团头鲂次之 (90.60%); 大西洋鲑最低 (50.57%, 表 2)。

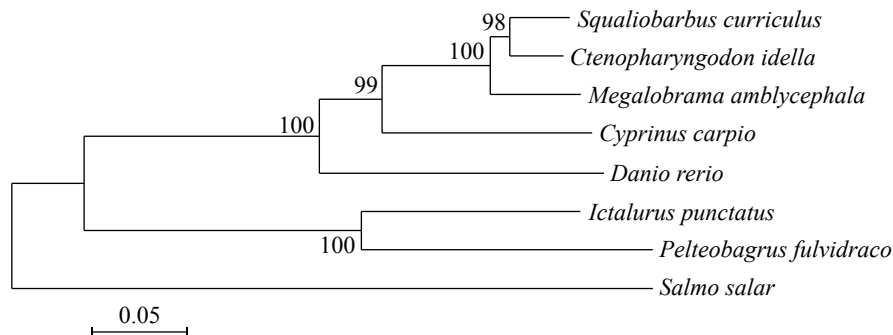


图 1 ScTLR19 系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of ScTLR19

表 2 与其他鱼类 TLR19 蛋白氨基酸序列相似性比较

Tab. 2 Comparison of amino acid similarity among fish TLR19s

物种 species	登录号 GenBank No.	相似性/% similarity
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	AUF71965.1	94.04
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	APT35508.1	90.60
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	LC150772.1	80.90
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_001352353.1	73.89
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	AQY78352.1	56.88
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	AEI59675.1	56.84
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	CDH93609.2	50.57

而 SMART 结构域预测显示 *ScTLR19* 胞内段由 1 个保守 TIR 结构域 (803~948 氨基酸位点之间) 构成, 跨膜域在 11~30 氨基酸位点之间, 胞外段由 9 个亮氨酸重复序列 (LRR) 组成, 分别位于 98~121、150~173、234~257、385~408、409~432、433~456、457~480、630~653 和 654~677 氨基酸

位点之间 (图 2-a), 相比 *CiTLR19* 在 654~677 氨基酸位点之间多 1 个 LRR (图 2-a,b)。 *ScTLR19* 三级结构由 15 个 α -螺旋和 17 个 β -折叠构成 (图 2-c), 而 *CiTLR19* 三级结构由 13 个 α -螺旋和 11 个 β -折叠构成 (图 2-d), 因此 *ScTLR19* 三级结构比 *CiTLR19* 多 2 个 α -螺旋和 6 个 β -折叠。

2.2 *ScTLR19* 基因的组织表达分析

借助 qPCR 方法对 *ScTLR19* 基因的组织表达模式进行了分析。结果显示, *ScTLR19* 基因在肠、肝脏、肌肉、皮肤、脾脏、鳃、肾脏、头肾等 8 个组织中都有表达, 且在皮肤和肌肉的表达量最高, 头肾和肾脏次之, 而在肠、肝脏、鳃和脾脏组织中表达水平较低 (图 3)。

2.3 GCRV 攻毒后 *ScTLR19* 基因在免疫组织的表达模式

GCRV 攻毒后, 赤眼鲟肾脏、脾脏和肝脏组织中 *ScTLR19* 基因的表达水平总体呈现先上升后下降的趋势, 且均出现一个表达峰: 脾脏

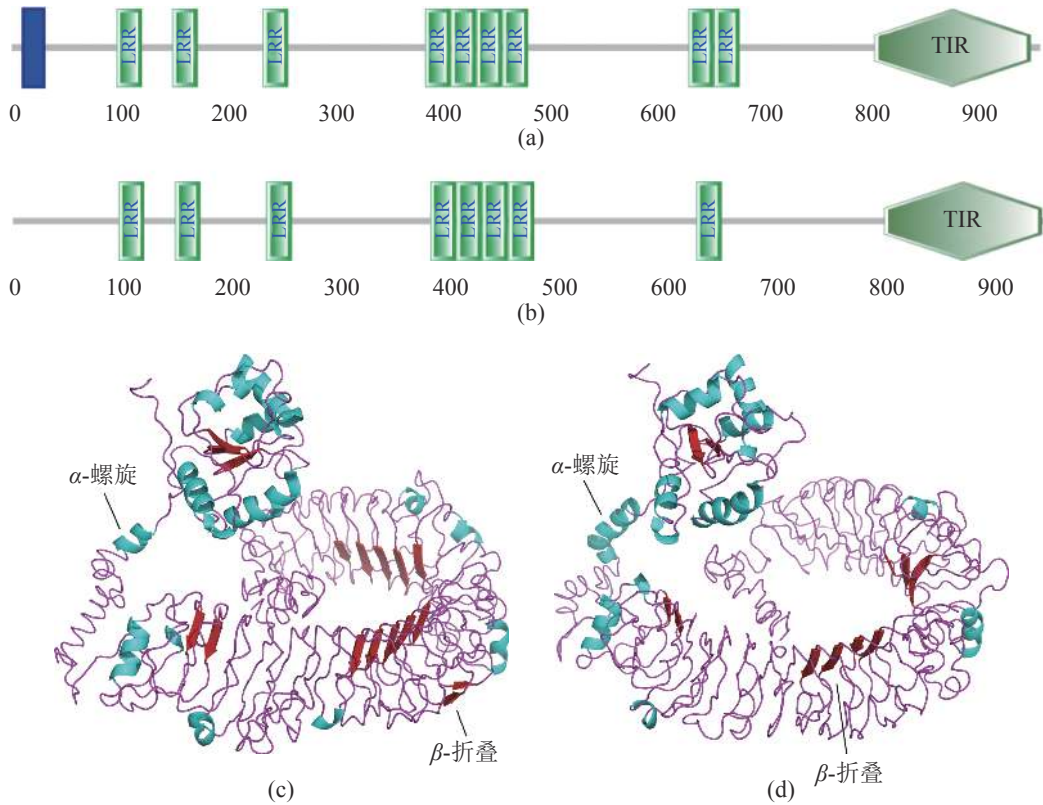


图 2 *ScTLR19* 和 *CiTLR19* 结构域与三级结构比较

(a) 和 (c) 分别为 *ScTLR19* 预测结构域和三级结构; (b) 和 (d) 为 *CiTLR19* 预测结构域和三级结构

Fig. 2 Comparison of domains and 3D structures between *ScTLR19* and *CiTLR19*

(a) The domains and (c) 3D structure of *ScTLR19*; (b) The domains and (d) 3D structure of *CiTLR19*

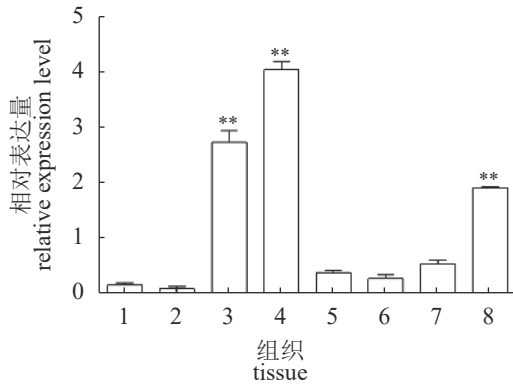


图 3 ScTLR19 基因在健康组织中的相对表达量

1. 肠, 2. 肝脏, 3. 肌肉, 4. 皮肤, 5. 脾脏, 6. 鳃, 7. 肾脏, 8. 头肾。“**”表示极显著差异 ($P<0.01$), 误差线表示标准误差 ($n=3$)

Fig. 3 The relative expressions of ScTLR19 in normal tissues of *S. curriculus*

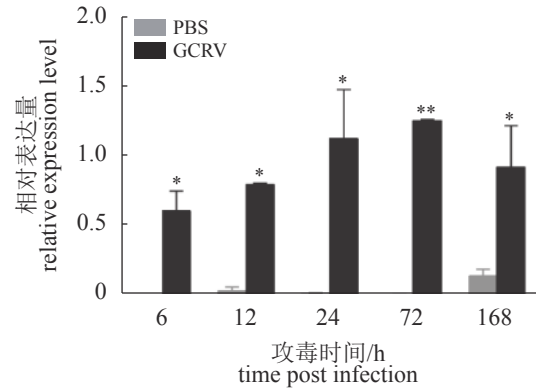
1. intestine, 2. liver, 3. muscle, 4. skin, 5. spleen, 6. gill, 7. kidney, 8. head kidney. Extremely significant differences ($P<0.01$) were marked with “**”, and error bar was shown as the standard error ($n=3$)

和肝脏表达峰出现在 GCRV 攻毒后 24 h, 而肾脏的表达峰出现在 GCRV 攻毒后 72 h。此外, 肾脏组织中 ScTLR19 基因在攻毒各时间点的表达水平显著高于对照组 ($P<0.05$) (图 4-a); 脾脏组织中 ScTLR19 基因在攻毒各时间点的表达水平与对照组无显著差异 (图 4-b); 而肝脏组织中 ScTLR19 基因在攻毒组 12、72 和 168 h 的表达水平出现显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 4-c)。

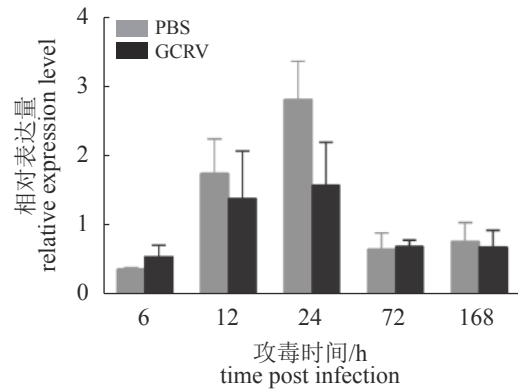
2.4 ScTLR19 抗 GCRV 免疫功能的特性分析

ScTLR19 同源过表达 为揭示 ScTLR19 相对于 CiTLR19 独特的抗 GCRV 免疫功能, 本研究在赤眼鲟鳍条细胞系 (SCF) 中成功实现了 ScTLR19 的过表达 (图 5-a)。瞬时转染 pEGFP-N1-Flag-ScTLR19 质粒后, 发现 ScTLR19 在 SCF 中的相对表达量显著增加 ($P<0.05$) (图 5-c), 继而借助 Flag 抗体检测到过表达的 ScTLR19 蛋白, 蛋白条带大小约 136 ku (图 5-d)。

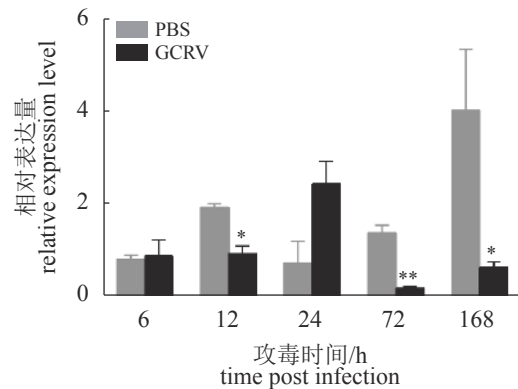
ScTLR19 对干扰素调节因子 IRF7 和 IRF3 的调控 实验借助 qPCR 方法定量分析了 ScTLR19 过表达后 IRF3 和 IRF7 基因在 GCRV 攻毒期间的表达量变化。结果显示, ScTLR19 在 SCF 过表达后, IRF7 基因于 GCRV 攻毒各时间点的表达水平与对照组无显著差异 ($P>0.05$) (图 6-a), 而 IRF3 基因在 GCRV 攻毒 12 和 24 h 时的表达水平显著高于对照组, 分别为对照组的 13.1 倍



(a)



(b)



(c)

图 4 GCRV 攻毒后 ScTLR19 基因在肾脏 (a)、脾脏 (b) 和肝脏 (c) 组织中的相对表达量变化

显著性差异 ($P<0.05$) 和极显著性差异 ($P<0.01$), 分别用 * 或 ** 标出。误差线表示标准误差 ($n=3$)

Fig. 4 The fold changes of ScTLR19 in kidney(a), spleen(b) and liver(c) tissues after GCRV stimulation

The significant differences ($P<0.05$) and extremely significant differences ($P<0.01$) were marked with “*” and “**”. Error bar was shown as the standard error ($n=3$)

($P<0.05$) 和 6.2 倍 ($P<0.01$) (图 6-b)。

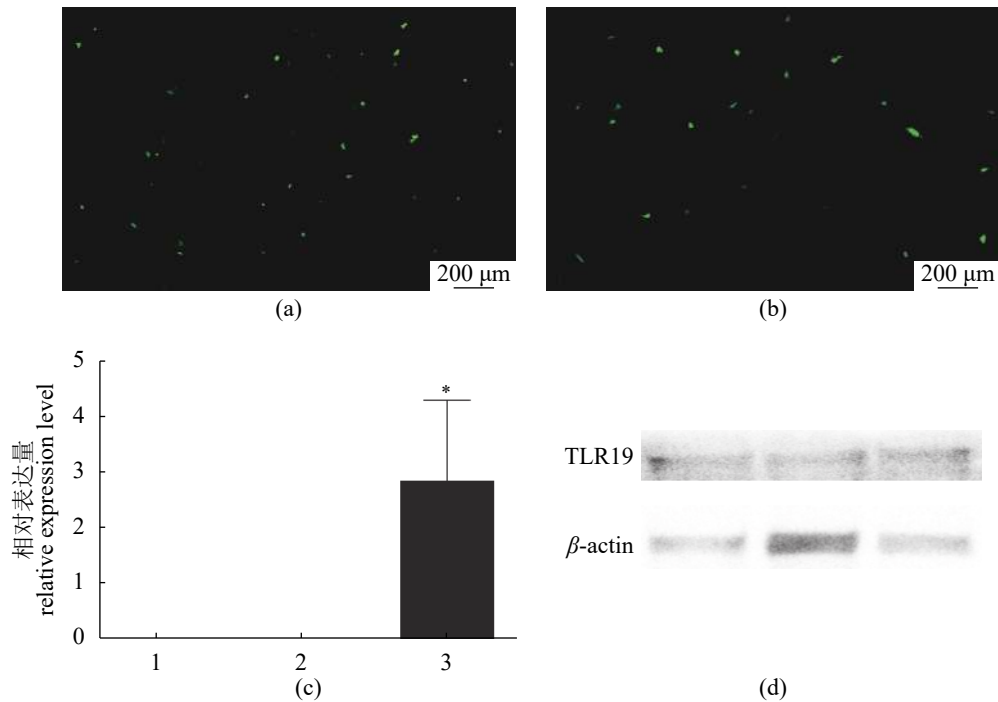


图 5 ScTLR19 细胞过表达及其验证

(a)、(b) 分别表示荧光显微镜下观察 pEGFP-N1-Flag-ScTLR19 和 pEGFP-N1-Flag(对照) 转染结果, (c) 表示 SCF、pEGFP-N1-Flag 和 pEGFP-N1-Flag-ScTLR19 中 TLR19 的 mRNA 表达水平, (d) 表示瞬时转染 pEGFP-N1-Flag-ScTLR19 后的蛋白表达水平 (3 个生物学重复)。“*”表示显著差异 ($P<0.05$), 误差线表示标准误差 ($n=3$)

Fig. 5 Confirmation of homologous overexpression of ScTLR19 in SCF cells

(a) The overexpressions of ScTLR19 and (b) EGFP (control) in SCF cells under microscope. (c)The mRNA expression level of TLR19 in SCF, pEGFP-N1-Flag and pEGFP-N1-Flag-ScTLR19. (d) The protein expression level of pEGFP-N1-Flag-ScTLR19(three biological repeats). The significant differences ($P<0.05$) were marked with “*”. Error bar was shown as the standard error ($n=3$) 1. SCF, 2. pEGEP-N1-Flag, 3. pEGEP-N1-Flag-ScTLR19

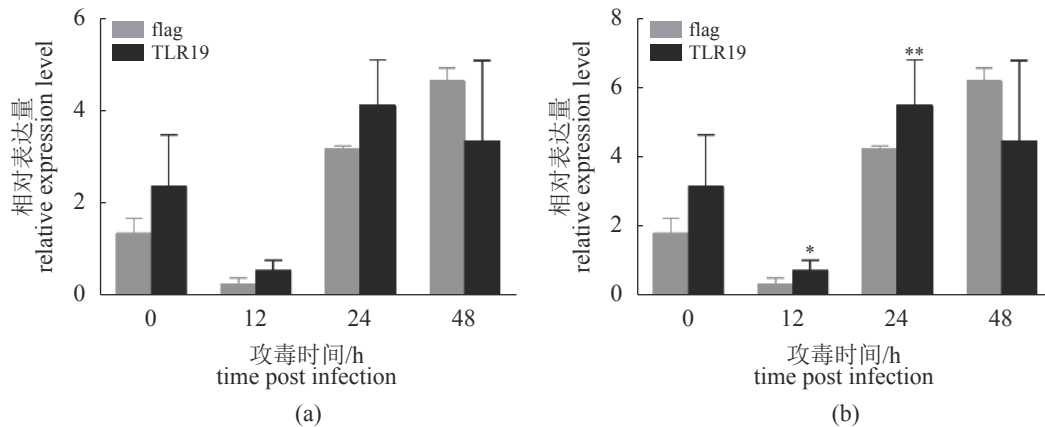


图 6 ScTLR19 过表达后 IRF7(a) 和 IRF3(b) 基因在 GCRV 攻毒期间的表达量变化

显著性差异 ($P<0.05$) 和极显著性差异 ($P<0.01$), 分别用*或**标出。误差线表示标准误差 ($n=3$)

Fig. 6 Fold changes of IRF7(a) and IRF3(b) after the overexpression of ScTLR19 in SCF cells during GCRV infection

The significant differences ($P<0.05$) and extremely significant differences ($P<0.01$) were marked with “*” and “**”, and error bar was shown as the standard error ($n=3$)

ScTLR19 对信号通路衔接蛋白 TRIF 和 MyD88 的调控 ScTLR19 在 SCF 过表达后,

TRIF 基因表达水平在 GCRV 攻毒 12 和 24 h 时显著高于对照组, 表达量分别为对照组的 5.3 倍

($P < 0.01$) 和 3.6 倍 ($P < 0.05$) (图 7-a)。此外, MyD88

毒 12 和 24 h 时也显著高于对照组, 表达量分别为对照组的 3.6 倍 ($P < 0.01$) 和 4.3 倍 ($P < 0.01$) (图 7-b)。

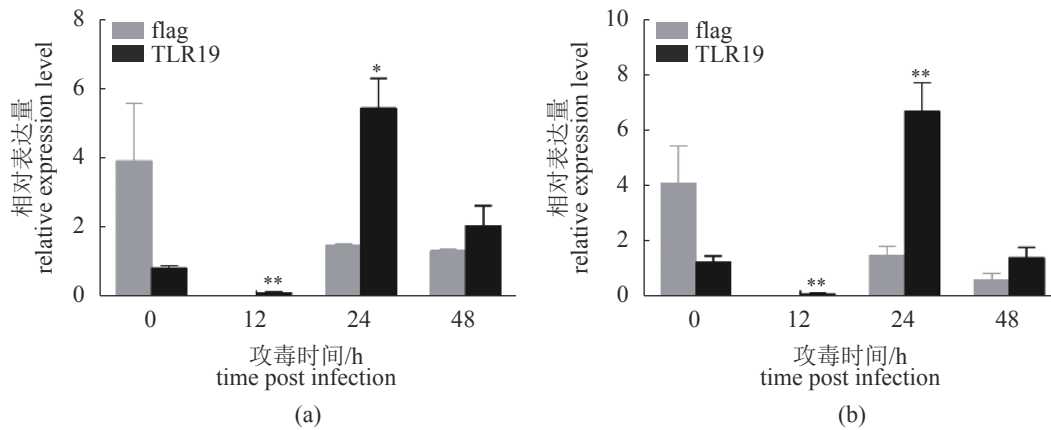


图 7 ScTLR19 过表达后 TRIF(a) 和 MyD88(b) 基因在 GCRV 攻毒期间的表达量变化

显著性差异 ($P < 0.05$) 和极显著性差异 ($P < 0.01$), 分别用 * 或 ** 标出。误差线表示标准误差 ($n=3$)

Fig. 7 Fold changes of TRIF(a) and MyD88(b) after the overexpression of ScTLR19 in SCF cells during GCRV infection

The significant differences ($P < 0.05$) and extremely significant differences ($P < 0.01$) were marked with "*" and "**", and error bar was shown as the standard error ($n=3$)

3 讨论

作为最原始的脊椎动物, 在长期的进化过程中, 不同鱼类同种先天免疫 PRR 基因出现了结构和功能分化的现象, 导致它们在响应同种病毒时所激发的免疫应答不同, 这可能是不同鱼类抗病毒能力具有差异的原因之一^[27]。因此, 比较同种先天免疫 PRR 基因在不同鱼类中的结构和功能差异对揭示不同鱼类抗病机制的差异具有重要意义。本实验发现赤眼鲟 (GCRV 抗性) 先天免疫 PRR 基因 TLR19 的结构和免疫功能与草鱼 (易感 GCRV) TLR19 基因相比存在明显差异, 可能为这两种经济鱼类 GCRV 抗性差异的分子机制提供线索。

本实验证实了 ScTLR19 和 CiTLR19 结构的不同。虽然 Blast 比对和系统进化树结果表明两者序列具有高度的相似性和同源性, 但是从结构域预测的结果发现, ScTLR19 与 CiTLR19 相比, 在胞外区 654~677 氨基酸位点之间多 1 个 LRR。相应地, 在三级结构上, ScTLR19 与 CiTLR19 相比多了 2 个 α -螺旋和 6 个 β -折叠。LRR 作为识别基序存在于所有 TLR, 其结构包括 α -螺旋和 β -折叠, 两者形成环并连接^[28]。在 TLR 作为模式识别受体发挥作用的过程中, LRR 会形成一个马

蹄状的非球状结构, 一系列 LRR 形成的非球状结构构成了一个 β -链凹面, 这个凹面为蛋白互作提供场所, 与 TLR 受体-配体的结合息息相关^[29]。而且在一定程度上, TLR 胞外 LRR 结构特征决定了其配体结合的活性, 即免疫识别功能^[30]。本研究表明 ScTLR19 和 CiTLR19 胞外 LRR 结构的不同, 极有可能导致两者免疫识别功能具有差异。

对 ScTLR19 基因组织表达量检测发现其在皮肤和肌肉中最高, 与其他健康鱼类组织相比, 黄颡鱼 TLR19 基因在脾脏和头肾中表达量较高^[22], 大西洋鲑 TLR19 基因表达主要集中在脾脏、头肾、鳃、肌肉和肝脏中^[21], 草鱼 TLR19 基因在肝脏中表达量最高, 说明鱼类 TLR19 不具有组织特异性表达。鱼类不同免疫组织发挥不同功能, 脾脏为鱼类中性粒细胞和红细胞的生长、成熟提供场所^[31]; 肾脏作为重要的淋巴组织, 当受到抗原刺激时, 中肾组织中存在抗体产生细胞^[31]。已有研究资料显示, GCRV 攻毒后草鱼 TLR19 基因主要在脾脏组织中发挥抗病毒免疫功能^[32], 而在本研究中发现 GCRV 攻毒后 ScTLR19 表达量在肾脏组织中显著上调, 表明赤眼鲟接受 GCRV 刺激时 ScTLR19 作为 PRR 可能主要在肾脏中发挥免疫功能。

IRF3 和 IRF7 作为 IRF 的家族成员, 都是 I 型 IFN 诱导因子, 在 TLR 信号通路介导的抗病毒免疫中发挥关键作用^[33-35]。作为转录因子, 当宿主细胞未受到病毒刺激时, IRF3 和 IRF7 在细胞质中处于失活状态。一旦病毒入侵, 两者被 TLR 信号通路上游分子激活并磷酸化, 而后转移至细胞核, 调控干扰素表达抵抗病毒^[36-38]。已有研究表明, GCRV 感染后, 草鱼 TLR19 只能调控 IRF3 而不调控 IRF7 的转录水平^[17]。而在本研究中, 赤眼鳟 TLR19 在 SCF 同源过表达并用 GCRV 感染后, IRF3 基因表达量相比对照组显著上调, 但 IRF7 基因表达量相比对照组无显著变化, 表明在赤眼鳟抗 GCRV 的免疫反应中 ScTLR19 也只调控 IRF3 而不调控 IRF7 的转录水平。因此, 赤眼鳟 TLR19 和草鱼 TLR19 在抗 GCRV 的免疫反应中对 IRF3、IRF7 的调控和激活模式可能一致。

TLR 介导的信号级联反应主要分为 MyD88 依赖和 MyD88 非依赖的两种途径。MyD88 作为最早被鉴定介导 TLR 信号通路的蛋白分子, 其 C 端的 TIR 结构域与 TLR 中的 TIR 形成融合物后, MyD88-D 端死亡域结构发生改变, 从而募集白细胞介素相关受体激酶分子, 最终激活 TLR 信号通路中的下游因子^[39-41]。有研究表明, 在青鱼肾细胞过表达 MyD88 并用嗜水气单胞菌刺激后, NF- κ B 信号通路被激活且肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 α (IFN- α) 和白细胞介素 6 (IL-6) 表达显著上调; 敲降 MyD88 后, 这些因子的表达水平显著下降^[42]。另外, 在 HEK293T 细胞过表达东北七鳃鳗 MyD88 后, 能够增强 NF- κ B 的活性从而启动 TLR 信号通路^[13]。因此, MyD88 在鱼类 TLR 信号通路中具有保守功能。在 TLR 介导的 MyD88 非依赖的信号级联反应中, 衔接蛋白 TRIF 可替代 MyD88 发挥关键作用。TRIF 也称 TICAM-1, 其 N 端首先与肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAF) 结合, 接着与激活酶 TBK1 (TANK-binding kinase-1) 发生互作, 最终诱导 IFN 表达^[43-44]。TLR3 和 TLR4 介导的免疫信号通路由衔接 TRIF 介导, 其通过激活 IRF 途径、诱导 IFN 表达以转导上游免疫信号^[45-46]。在本研究中, ScTLR19 同源过表达后, 发现 GCRV 攻毒诱导 MyD88 和 TRIF 基因表达水平均显著上调, 说明在赤眼鳟 TLR19 信号通路中, ScTLR19 可能调

控 MyD88 和 TRIF 两者协同发挥免疫功能。而在草鱼中, 草鱼 TLR19 只激活 TRIF 诱导下游免疫信号^[17]。鉴于赤眼鳟与草鱼 TLR19 胞外结构存在差异, 我们推测该结构差异可能导致二者介导抗 GCRV 免疫信号通路的差异, 但仍需后续的实验验证。

本研究发现, 赤眼鳟 TLR19 基因的结构与草鱼 TLR19 明显不同。GCRV 刺激后, ScTLR19 基因主要在免疫组织肾脏中进行显著响应。此外, 赤眼鳟 TLR19 介导的抗 GCRV 免疫功能相比草鱼 TLR19 具有特性, 主要体现在其能同时调控 TRIF 和 MyD88, 这可能使得赤眼鳟 TLR19 介导的抗 GCRV 免疫信号和功能模式更加丰富、广泛, 从而增强赤眼鳟的 GCRV 抗性。研究结果为深入探究赤眼鳟与草鱼应对 GCRV 时采取不同策略机制提供了分子依据。

参考文献 (References):

- [1] Magor B G, Magor K E. Evolution of effectors and receptors of innate immunity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(8-9): 651-682.
- [2] Wang M Q, Wang L L, Jia Z H, *et al.* The various components implied the diversified Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in mollusk *Chlamys farreri*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 205-212.
- [3] Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 137-151.
- [4] Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system[J]. *Science*, 2010, 327(5963): 291-295.
- [5] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2001, 1(2): 135-145.
- [6] Roach J C, Glusman G, Rowen L, *et al.* The evolution of vertebrate Toll-like receptors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(27): 9577-9582.
- [7] 范泽军, 邹鹏飞, 姚翠鸾. 鱼类 Toll 样受体及其信号传导的研究进展[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(1): 173-184. Fan Z J, Zou P F, Yao C L. Toll-like receptors (TLR) and its signaling pathway in teleost[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 173-184(in Chinese).
- [8] Rebl A, Goldammer T, Seyfert H M. Toll-like receptor signaling in bony fish[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 134(3-4): 139-150.

- [9] Palti Y. Toll-like receptors in bony fish: From genomics to function[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1263-1272.
- [10] Pietretti D, Wiegertjes G F. Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 43(2): 205-222.
- [11] Wang J L, Zhang Z, Liu J, *et al.* Structural characterization and evolutionary analysis of fish-specific TLR27[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 940-945.
- [12] Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition[J]. *International Immunology*, 2009, 21(4): 317-337.
- [13] Zhou Z B, Ding S Q, He Y Y, *et al.* Northeast Chinese lamprey (*Lethenteron morii*) MyD88: identification, expression, and functional characterization[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 539-547.
- [14] 吴羽媛, 郭志颖, 梁海鹰, 等. 马氏珠母贝 TLR6 基因的克隆、序列分析与表达[J]. *水产学报*, 2017, 41(11): 1687-1698.
- Wu Y Y, Guo Z Y, Liang H Y, *et al.* Cloning, sequence analysis and expression studies on *PmTLR6* gene from *Pinctada fucata martensii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(11): 1687-1698(in Chinese).
- [15] Thompson A J V, Locarnini S A. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response[J]. *Immunology & Cell Biology*, 2007, 85(6): 435-445.
- [16] Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, *et al.* TRAF6 Establishes innate immune responses by activating NF- κ B and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(5): e5674.
- [17] Ji J F, Rao Y L, Wan Q Y, *et al.* Teleost-specific TLR19 localizes to endosome, recognizes dsRNA, recruits TRIF, triggers both IFN and NF- κ B pathways, and protects cells from grass carp reovirus infection[J]. *The Journal of Immunology*, 2018, 200(2): 573-585.
- [18] Wang J L, Zhang Z, Fu H, *et al.* Structural and evolutionary characteristics of fish-specific TLR19[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(1): 271-279.
- [19] Zhao F, Li Y W, Pan H J, *et al.* Expression profiles of toll-like receptors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 993-997.
- [20] Meijer A H, Krens S F G, Rodriguez I A M, *et al.* Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish[J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(11): 773-783.
- [21] Lee P T, Zou J, Holland J W, *et al.* Identification and characterisation of *TLR18-21*, genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 549-559.
- [22] Wang K L, Ji W, Zhang G R, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of three TLR genes in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): responses to stimulation of *Aeromonas hydrophila* and TLR ligands [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 466-479.
- [23] 赖瑞芳. 团头鲂 Toll 样受体基因序列分析及其表达研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- Lai R F. Studies of Toll-like receptors and their expressions in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* [D]. Wuhan: Huangzhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [24] 刘巧林, 肖调义, 刘敏, 等. 赤眼鲟生物学研究进展[J]. *水产科学*, 2012, 31(11): 687-691.
- Liu Q L, Xiao T Y, Liu M, *et al.* Research progress of biology in *Squaliobarbus curriculus*[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(11): 687-691(in Chinese).
- [25] 刘巧林. 草鱼与赤眼鲟杂交 F₁ 遗传特征及对其草鱼呼肠孤病毒抗性的研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- Liu Q L. Studies on genetic characteristics and grass carp reovirus resistance of F₁ hybrids between grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*)[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [26] Wang R H, Li W, Fan Y D, *et al.* Tlr22 structure and expression characteristic of barbel chub, *Squaliobarbus curriculus* provides insights into antiviral immunity against infection with grass carp reovirus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 120-128.
- [27] 张蛰春, 刘阳. 高等脊椎动物 Toll 样受体基因分子进化模式研究进展[J]. *生物学通报*, 2018, 53(4): 1-6.
- Zhang Z C, Liu Y. Advances in the molecular evolution of toll-like receptor genes in higher vertebrates[J]. *Bulletin of Biology*, 2018, 53(4): 1-6(in Chinese).
- [28] Hillig R C, Renault L, Vetter I R, *et al.* The crystal structure of malp: a new fold for a GTPase-activating protein[J]. *Molecular Cell*, 1999, 3(6): 781-791.
- [29] Kobe B, Deisenhofer J. Proteins with leucine-rich repeats[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1995,

- 5(3): 409-416.
- [30] 武明花, 李桂源. 蛋白质识别基序——富亮氨酸重复序列的结构与功能[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(1): 35-38.
- Wu M H, Li G Y. Structure and function of the leucine-rich repeat as a protein recognition motif[J]. Journal of International Pathology and Clinical Medicine, 2006, 26(1): 35-38(in Chinese).
- [31] 唐玫, 马广智, 徐军. 鱼类免疫学研究进展[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(3): 112-116, 127.
- Tang G, Ma G Z, Xu J. Advances in research of fish immunology[J]. Immunological Journal, 2002, 18(3): 112-116, 127(in Chinese).
- [32] Liao Z W, Wan Q Y, Su H, *et al.* Pattern recognition receptors in grass carp *Ctenopharyngodon idella*: I. Organization and expression analysis of TLRs and RLRs[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 76: 93-104.
- [33] Huang Y H, Huang X H, Cai J, *et al.* Identification of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) interferon regulatory factor 3 involved in antiviral immune response against fish RNA virus[J]. Fish & Shellfish Immunol, 2015, 42(2): 345-352.
- [34] Barnes B, Lubyova B, Pitha P M. Review: On the role of IRF in host defense[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2002, 22(1): 59-71.
- [35] Krishnan R, Kurcheti P P, Mushtaq Z, *et al.* Interferon-regulatory factors, IRF3 and IRF7 in Asian seabass, *Lates calcarifer*: Characterization, ontogeny and transcriptional modulation upon challenge with nervous necrosis virus[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 468-476.
- [36] Grant C E, Vasa M Z, Deeley R G. cIRF-3, a new member of the interferon regulatory factor (IRF) family that is rapidly and transiently induced by dsRNA[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(12): 2137-2146.
- [37] Lazear H M, Lancaster A, Wilkins C, *et al.* IRF-3, IRF-5, and IRF-7 coordinately regulate the type I IFN response in myeloid dendritic cells downstream of MAVS signaling[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(1): e1003118.
- [38] Hahn A M, Huye L E, Ning S B, *et al.* Interferon regulatory factor 7 is negatively regulated by the Epstein-Barr Virus immediate-early gene, *BZLF-1*[J]. Journal of Virology, 2005, 79(15): 10040-10052.
- [39] O'Neill L A J, Bowie A G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling[J]. Nature Reviews Immunology, 2007, 7(5): 353-364.
- [40] Ahmed-Hassan H, Abdul-Cader M S, Sabry M A, *et al.* Toll-like receptor (TLR)4 signalling induces myeloid differentiation primary response gene (MYD) 88 independent pathway in avian species leading to type I interferon production and antiviral response[J]. Virus Research, 2018, 256: 107-116.
- [41] 梁箫, 刘钰珠, 陈珂, 等. 厚壳贻贝MyD88-4基因的生物特性及其对沙氏弧菌的免疫应答[J]. 水产学报, 2019, 43(11): 2347-2358.
- Liang X, Liu Y Z, Chen K, *et al.* Identification of MyD88-4 in *Mytilus coruscus* and expression changes in response to *Vibrio chagasii* challenge[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(11): 2347-2358(in Chinese).
- [42] Zhang X S, Xu X Y, Shen Y B, *et al.* Myeloid differentiation factor 88 (Myd88) is involved in the innate immunity of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) defense against pathogen infection[J]. Fish & Shellfish immunology, 2019, 94: 220-229.
- [43] Huang B Y, Zhang L L, Du Y S, *et al.* Alternative splicing and immune response of *Crassostrea gigas* tumor necrosis factor receptor-associated factor 3[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(10): 6481-6491.
- [44] Bakshi S, Taylor J, Strickson S, *et al.* Identification of TBK1 complexes required for the phosphorylation of IRF3 and the production of interferon β [J]. Biochemical Journal, 2017, 474(7): 1163-1174.
- [45] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors[J]. Nature Immunology, 2010, 11(5): 373-384.
- [46] Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, *et al.* Toll-like receptor signal transduction[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2007, 39(4): 421-438.

Preliminary analysis of the structural and functional differences between *Squaliobarbus curriculus* and *Ctenopharyngodon idella* TLR19s

YUAN Wenling, LV Zhao, LIU Yi, LIU Xiaoyan*, XIAO Tiaoyi*

(Hunan Agricultural University, Hunan Engineering Technology Research Center of
Featured Aquatic Resources Utilization, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to explore the structural and functional differences between a TLR19 homolog (designated as *ScTLR19*) from *S. curriculus* and the reported TLR19 (designated as *CiTLR19*) from *C. idellus*, we cloned the full-length cDNA sequence of *ScTLR19* gene and analyzed its sequence and structural characteristics, investigated its expression patterns of various tissues and the responses to grass carp reovirus (GCRV) infection with real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) technique, and revealed its distinct regulation on the downstream functional genes of TLR19 signaling pathway by overexpression experiments in this study. The results showed that the *ScTLR19* gene encoded 957 amino acids, whose sequence shared high similarity (94.04%) with that of *CiTLR19*. The extracellular region of *ScTLR19* protein consisted of nine leucine-rich repeats (LRRs), and harbored one more LRR than that for *CiTLR19* at the amino acid sites of 654~677. The *ScTLR19* also owned two more α -helixes and six more β -folds than that of *CiTLR19* for the three dimensional structure. The transcriptional expressions of *ScTLR19* were widely detected in various tissues of *S. curriculus*, and significantly up-regulated in kidney after GCRV infection. When the *S. curriculus* fin cells overexpressed *ScTLR19* and were then challenged with GCRV, the transcriptional expressions of interferon regulatory factor 7 (IRF7) did not significantly change ($P>0.05$), while the transcriptional expressions of interferon regulatory factor 3 (IRF3) and both MyD88 and TRIF that were reported as two important adaptor proteins in TLR signal pathways, were significantly up-regulated at 12 h and 24 h post GCRV infection, compared to the control group ($P<0.05$). According to the previous study on *CiTLR19*, *ScTLR19*, just like *CiTLR19*, only regulated IRF3, but not IRF7 signal pathway during GCRV infection, but unlike *CiTLR19* only regulating TRIF signal pathway, *ScTLR19* could regulate both MyD88 and TRIF signal pathways, which might enable *ScTLR19* with more antiviral immune functions to enhance the resistance against GCRV for *S. curriculus*. These results shed light on the differences in the structure and function between two TLR19 genes from *S. curriculus* and *C. idellus*.

Key words: *Squaliobarbus curriculus*; *Ctenopharyngodon idella*; GCRV; TLR19; structure and function

Corresponding authors: LIU Xiaoyan. E-mail: 1176450971@qq.com;

XIAO Tiaoyi. E-mail: tyxiao1128@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (General Program, 31972787); Science Fund for Creative Research Groups of the National Natural Science Foundation of China (31802288)