



金属蛋白酶组织抑制剂在皱纹盘鲍抗弧菌免疫中的作用

张明辉¹, 章 骞^{1,2}, 林锦锦¹, 张凌晶¹,
刘光明^{1,2}, 陈玉磊^{1*}, 曹敏杰^{1,2*}

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

摘要: 由弧菌感染引起的疾病是影响鲍存活率的主要因素, 实验以皱纹盘鲍为研究对象, 探讨金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 在皱纹盘鲍抗弧菌免疫中的功能及其与基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1, MMP-1) 的相互作用关系。实验通过 PCR 技术克隆得到了 TIMP cDNA 序列, 全长为 2291 bp。利用 NetNGlyc 1.0 Server 和 NetOGlyc 4.0 Server 软件对 TIMP 的氨基酸序列进行分析, 结果显示, TIMP 有 3 个潜在的 N-糖基化位点, 分别位于第 47、77 和 152 位的 Asn, 以及一个潜在的 O-糖基化位点, 即位于第 108 位的 Thr。多序列比对结果显示, 皱纹盘鲍 TIMP 氨基酸序列与杂色鲍、太平洋牡蛎、泥蚶中 TIMP 的序列相似性分别为 76.0%、18.9% 和 19.3%。利用荧光定量 PCR 技术分析了副溶血性弧菌感染过程中皱纹盘鲍不同组织中 TIMP 的表达情况, 发现在弧菌感染早期, TIMP 在血淋巴细胞和鳃组织中的表达量均显著上调。利用 RNA 干扰技术分别敲低皱纹盘鲍 TIMP 和 MMP-1 的表达水平, 研究 TIMP 与 MMP-1 在皱纹盘鲍抗弧菌免疫中的相互作用关系。结果显示, 鲍体内 MMP-1 表达沉默后, TIMP 表达量显著上调; 而 TIMP 表达受到抑制时, MMP-1 表达量显著下降, 说明 TIMP 表达受 MMP-1 负调控, 而 MMP-1 表达受 TIMP 正调控。本研究将有助于揭示 TIMP 及其与 MMP-1 相互作用在皱纹盘鲍先天免疫反应中的功能, 也可为鲍养殖的病菌防治策略提供新的思路。

关键词: 皱纹盘鲍; 副溶血性弧菌; 金属蛋白酶组织抑制剂; 基质金属蛋白酶 1; 相互作用; 先天性免疫

中图分类号: Q 785; S 944.4*5

文献标志码: A

鲍隶属于软体动物门 (Mollusca) 腹足纲 (Gastropoda) 原始腹足目 (Archaeogastropoda) 鲍科 (Haliotidae) 鲍属 (*Haliotis*), 具有较高的营养和药学价值, 位列“海产八珍”之一, 是非常重要的渔业资源和水产养殖品种^[1]。2019 年我国鲍产量近 18 万 t, 较 2018 年同比增长 10.48%, 福建省鲍的

产量占全国 80%, 位居首位^[2]。皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 原为我国北部沿海重要的渔获种类, 也是该地区最优良的浅海养殖贝类之一^[3]。由于福建等南方海域冬季水温较高、皱纹盘鲍生长速率快, “北鲍南养”养殖方式得到很好地实施^[4]。这不仅提高了鲍鱼的成活率, 而且降低了养殖成本,

收稿日期: 2020-10-04 修回日期: 2021-01-27

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901004); 国家自然科学基金 (31702372, 31772049); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-49)

第一作者: 张明辉 (照片), 从事水生生物先天免疫反应研究, E-mail: bright1995zmh@163.com

通信作者: 陈玉磊, 从事水生生物先天性免疫反应研究, E-mail: ylchen@jmu.edu.cn;

曹敏杰, 从事海洋生物资源高效利用研究, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn



鲍鱼的价格也逐渐被普通消费者所接受。

由弧菌感染引起的疾病是影响鲍鱼产量和质量的主要因素之一^[5]。其中, 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的致死率最高^[6]。该菌是一种嗜盐性的革兰氏阴性菌, 可以附着在海洋生物体内, 对海洋生物和人类都具有很强的致病性^[7]。与其他无脊椎动物类似, 皱纹盘鲍利用先天性免疫反应来抵御病原菌对宿主的侵染。皱纹盘鲍的先天性免疫系统包含多种受体、调控因子和效应蛋白, 例如纤维蛋白原相关蛋白、Toll 样受体、清道夫受体和抗菌肽等^[8]。除此之外, 参与血淋巴凝集、血淋巴细胞吞噬和凋亡等主要过程的大分子也在皱纹盘鲍的先天性免疫过程中发挥重要作用^[9]。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一类高度保守的依赖于锌离子和钙离子的蛋白水解酶^[10]。MMPs 的表达由糖皮质激素、类维生素 A、病菌感染和外界压力等因素调控^[11], 其活性受转录水平、酶原激活和金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitors of MMPs, TIMPs) 的严格控制^[12]。TIMPs 是一组低分子量的糖蛋白, 广泛分布于组织和体液中, 可由成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞等产生^[13]。作为组织中 MMPs 主要的内源性抑制因子, TIMPs 能特异性抑制 MMPs 家族的基质降解酶。TIMPs 与不同的 MMPs 表现出不同的亲和力, 其以可逆的共价键方式与 MMPs 相结合形成 1:1 复合体, 二者的平衡关系在调节胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的稳定中有重要作用^[14]。作为多功能分子, TIMPs 不仅可抑制 MMPs 活性, 且具有细胞生长因子样作用, 可促进成纤维细胞增生及胶原合成, 使 ECM 沉积。此外, TIMPs 还可调控 ECM 代谢和抑制血管的生成, 抑制肿瘤发生和发展^[15]。

Chen 等^[16]研究表明, 副溶血性弧菌感染导致皱纹盘鲍 MMP-1 表达量显著上调, 且 MMP-1 可调节免疫相关基因的表达及细胞的活性, 但其内源性抑制剂 TIMP 的具体功能尚不清楚。因此, 本实验以皱纹盘鲍为研究对象, 克隆得到 TIMP 序列, 分析了 TIMP 在皱纹盘鲍不同组织及副溶血性弧菌感染前后的表达情况, 并初步探索了 TIMP 与 MMP-1 的相互作用关系。本研究有助于了解皱纹盘鲍抗弧菌感染的分子机理, 对了解 TIMPs 与 MMPs 在软体动物免疫中的相互作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大小均一的健康皱纹盘鲍购于福建省厦门市夏商国际水产交易中心, 平均体质量约 40 g, 于 20 °C 暂养 3~4 d 后根据相关实验分组进行处理。养殖用海水取自集美大学水产试验场, 每 12 h 更换 1 次。

1.2 实验动物分组及致病菌处理

实验用皱纹盘鲍暂养后, 随机挑取 3 只, 收集血淋巴细胞、肝胰腺、鳃、肌肉、褶边、外套膜和性腺, 不同个体相同组织混合后置于液氮备用。将剩余皱纹盘鲍随机分为 2 组, 每组 20 只, 试验组注射副溶血弧菌 (2×10^7 CFU), 对照组注射同等体积 PBS。注射 12、24、48 和 72 h 后, 分别随机挑取 3 只, 收集皱纹盘鲍主要免疫器官 (血淋巴细胞、鳃、肝胰腺), 不同个体相同组织混合后置于液氮备用。以上实验均重复 3 次。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

按总 RNA 提取试剂盒 (Tiagen) 提供的方法提取皱纹盘鲍各组织 (血淋巴细胞、肝胰腺、鳃、肌肉、褶边、外套膜和性腺) 的总 RNA。通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物的完整性, 使用 Nanodrop ND1000 检测 RNA 浓度及纯度。按 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TAKARA) 操作说明合成普通克隆用 cDNA。利用 SMARTer RACE 5'/3' Kit (TAKARA) 合成 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 用 cDNA。将不同组织 mRNA 浓度调为一致, 利用 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) 合成用于荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 的 cDNA。

1.4 TIMP 基因克隆

根据杂色鲍 (*H. diversicolor*) TIMP 序列设计正反向引物 (表 1), 以皱纹盘鲍 cDNA 为模板扩增 TIMP 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列。根据克隆得到的 ORF 序列设计 RACE 扩增用正反向引物 (表 1), 以 5', 3'-RACE cDNA 为模板, 扩增 5' 和 3' 非编码区 (untranslated region, UTR), 最终得到皱纹盘鲍 TIMP 序列全长。

1.5 糖基化位点分析、多序列比对和系统进化树分析

利用 NetNGlyc 1.0 Server 和 NetOGlyc 4.0

表1 *TIMP* 全长扩增用引物Tab. 1 Primers used for *TIMP* cloning

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence
TIMP (ORF)-F	ATGGAGTTTCACCAGCTGTTTG
TIMP (ORF)-R	TCAACATGTCAGGTTGGAAAGTT
TIMP-5' RACE	GGCGCAAAGTCGGCTTGACAGAAGTA
TIMP-3' RACE	TCACATTGCCCTGTCATGGAGATGGA

Server 软件分别对 *TIMP* 蛋白序列中潜在的 N-糖基化位点和 O-糖基化位点进行预测。在 NCBI 中用 BLAST 工具(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索得到皱纹盘鲍 *TIMP* 同源蛋白序列, 利用 DNAMAN 软件进行多序列比对, 通过 Mega 7.0 软件构建不同物种 *TIMP* 氨基酸序列的系统进化树。

1.6 荧光定量 PCR 检测基因表达

根据皱纹盘鲍 *TIMP*、*MMP-1* 基因序列设计 qPCR 用引物(表 2), 以 β -actin 作为内参基因, 利用 TransStart® Top Green qPCR SuperMix (TransGen Biotech) 分析 *TIMP* 和 *MMP-1* 在皱纹盘鲍各组织及副溶血性弧菌感染前后的表达差异性。qPCR 反应体系 (10 μ L): 2 \times qPCR SuperMix 5 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 0.2 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 0.2 μ L, 50 \times Passive Reference Dye 0.2 μ L, cDNA 1.0 μ L, ddH₂O 3.4 μ L。于 ABI 7300 仪器中进行两步法 PCR 扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s,

60 $^{\circ}$ C 延伸 31 s (荧光采集), 循环 40 次; 扩增结束后, 从 55 $^{\circ}$ C 升温至 94 $^{\circ}$ C 制备熔解曲线。每个样品设置 3 个重复, 每组反应均设置无模板对照。

1.7 RNA 干扰皱纹盘鲍 *TIMP* 和 *MMP-1* 表达

利用 siRNA 在线设计网站 (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnai-express>) 分别设计 3 条皱纹盘鲍 *TIMP* 和 *MMP-1* 特异性 siRNA, 选择打乱序列的 siRNA 作为对照, siRNA 序列见表 3。利用 *In vitro* transcription T7 kit (TaKaRa) 体外合成成熟序列 siRNA, 将其溶解于 siRNA 溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5) 中, 并用 Nanodrop ND-1000 测定浓度。将副溶血性弧菌悬液和 30 μ g 特异性的 siRNA 或打乱序列的 siRNA 共同注射至皱纹盘鲍肌肉内。此外, 将只注射 PBS 的溶液设置为空白对照组, 只注射副溶血性弧菌溶液设置为阴性对照组。每组注射 12、24、48 和 72 h 后, 收集 3 只皱纹盘鲍的血淋巴液, 于 4 $^{\circ}$ C 500 \times g 离心 10 min, 离心收集的血淋巴细胞用于后续检测。以上实验重复 3 次。

1.8 数据分析

运用 GraphPad Prism 5 软件处理数据及图表绘制, 采用单因素方差分析法 (One-Way ANOVA) 进行统计分析, 显著性水平为 $P < 0.05$, 极显著性水平为 $P < 0.01$ 。

表 2 荧光定量 PCR 用引物

Tab. 2 Primers used in the qPCR assay

基因名称 gene name	正向引物(5'-3') forward primer	反向引物(5'-3') reverse primer
<i>TIMP</i>	TTCGTCTTTGAGGCTTTGGTA	ATCACAGGAGAAGTCAGGGAA
<i>MMP-1</i>	GGAACACGGAGATGGACAATAC	GTTGGGGGGTGAGGATTAGAC
β -actin	AGATGTTGCTGCGTTGGTTAT	GATGGGGTACTTGAGGGTGAG

表 3 RNA 干扰实验中所用 siRNA 序列

Tab. 3 siRNAs used in the RNA interference assay

siRNA 序列名称 sequence name	正义链 (5'-3') sense strand	反义链 (5'-3') anti-sense strand
TIMP-siRNA1	CCAACCTGGACCACTGACAA	TGTTCAGTGGTCCAGTTGG
TIMP-siRNA2	CCCTGTCATGGAGATGGAT	ATCCATCTCCATGACAGGG
TIMP-siRNA3	GGACATACTTGCTTACCAT	ATGGTAAGCAAGTATGTCC
MMP1-siRNA1	GCTACCTCAACACCGACTA	TAGTCGGTGTGAGGTAGC
MMP1-siRNA2	GGTTGCTGCTCATGAATTT	AAATTCATGAGCAGCAACC
MMP1-siRNA3	GCAAGAGCCGCATCTTCAT	ATGAAGATGCGGCTCTTGC
scrambled siRNA	TTCTCCGAACGTGTACCGT	ACGTGACACGTTCCGGAGAA

2 结果

皱纹盘鲍肌肉组织中胶原蛋白含量高^[3], 富含多种与肌肉蛋白新陈代谢密切相关的金属蛋白酶。转录组测序结果显示, 当弧菌感染杂色鲍后, 其血淋巴细胞中的 *TIMP* 和 *MMP-1* 表达量均发生显著上调^[17]。作为 MMPs 的天然抑制剂, TIMPs 极有可能通过调控 MMPs 的表达与活性来参与皱纹盘鲍的抗弧菌免疫过程。但目前关于 TIMPs 在鲍鱼抗菌免疫中的作用及其与 MMPs 的相互作用关系却知之甚少。

2.1 皱纹盘鲍 *TIMP* 的克隆

以皱纹盘鲍血淋巴细胞 cDNA 为模板, 克隆得到 *TIMP* cDNA 全长序列 (图 1)。该 cDNA 全长为 2291 bp, 其中 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 133 bp, 3'-UTR 1690 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 468 bp, 共编码 155 个氨基酸残基。推导的氨基酸序列包含一个 N 端信号肽 (1~22 aa) 和纺锤蛋白 (nutrin, NTR) 结构域, NTR 结构域中有 6 个保守的半胱氨酸残基。利用 NetNGlyc 1.0 Server 对 *TIMP* 的氨基酸序列进行分

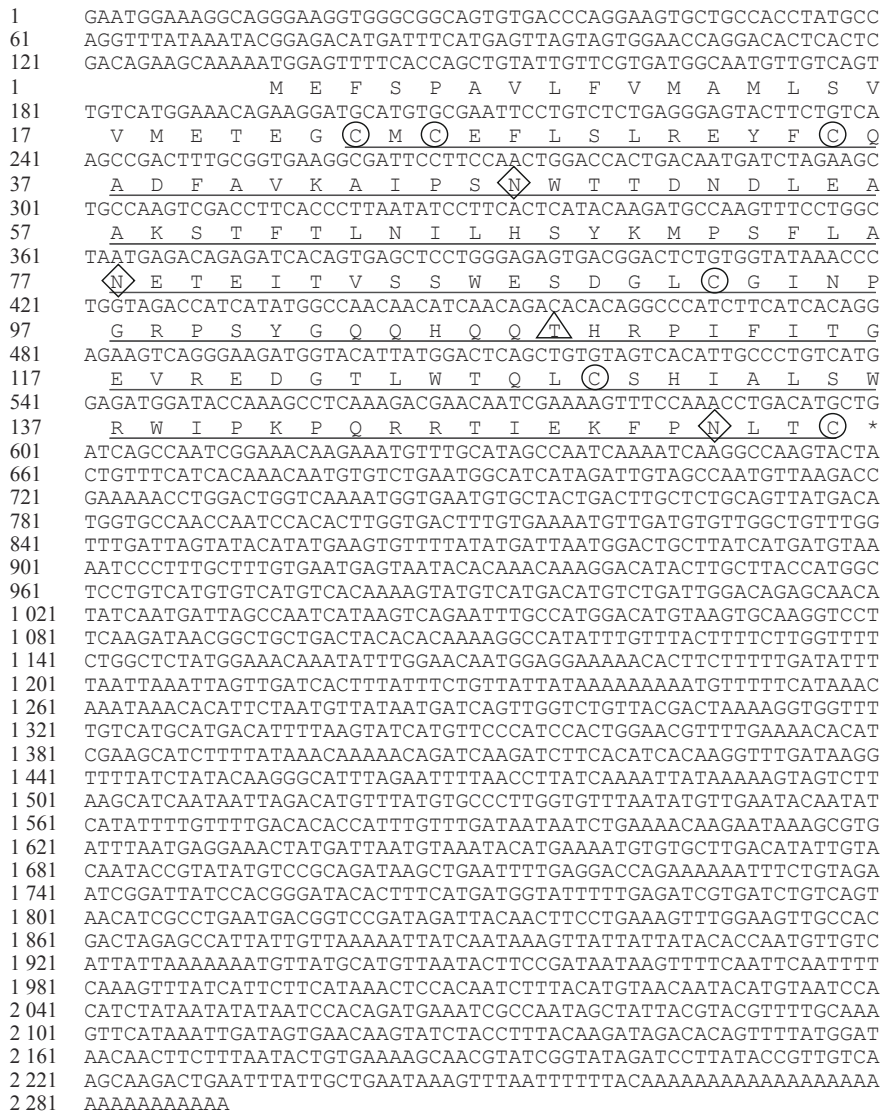


图 1 *TIMP* 核苷酸序列和推导的氨基酸序列

下划线为 NTR 结构域, 半胱氨酸残基已用圆圈标示出, N-糖基化和 O-糖基化位点分别用菱形和三角形标示出

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *TIMP*

The NTR domain was underlined. The cysteine residues were marked with circle. The N-glycosylation and O-glycosylation sites were marked with diamonds and triangles, respectively

析,结果显示其含有3个潜在的N-糖基化位点,分别是位于第47、77和152位的Asn;使用NetOGlyc 4.0 Server软件对TIMP的氨基酸序列进行分析,得到其含有一个潜在的O-糖基化位点,是位于第108位的Thr。

使用DNAMAN软件对不同物种TIMP氨基酸序列进行多序列比对,结果显示,皱纹盘鲍TIMP氨基酸序列与杂色鲍、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、泥蚶(*Tegillarca granosa*)中TIMP的序列相似性分别为76.0%、18.9%和19.3%(图2),表明TIMP在软体动物中的保守性较低。

通过Mega 7.0软件构建不同物种TIMP氨基酸序列的系统进化树。该系统进化树采用邻接法构建得到,Bootstrap值为1000,酿酒酵母属真菌界,因此选取酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)

作为有根树的外群。同为鲍属的皱纹盘鲍和杂色鲍形成姐妹群,支持率较高(自展值为100),在该分支之后又形成2个分支,分别是与同属软体动物门的长牡蛎和泥蚶,表明皱纹盘鲍的TIMP在进化分支上更接近软体动物,表现出与软体动物TIMP的共同祖先具有更高的同源性,而与其他远缘关系的物种表现出较大的差异(图3)。综上所述,不同物种的TIMP在进化树上表现出较大的差异,关于脊索动物门(Chordata)中TIMP的研究已有较多报道,而软体动物中TIMP的研究目前报道较少,有待进一步研究。

2.2 TIMP在皱纹盘鲍各组织中的表达量

利用荧光定量PCR技术检测皱纹盘鲍各组织中TIMP的表达情况。结果显示,TIMP在皱纹盘鲍各组织中均有表达(图4)。在转录水平上,

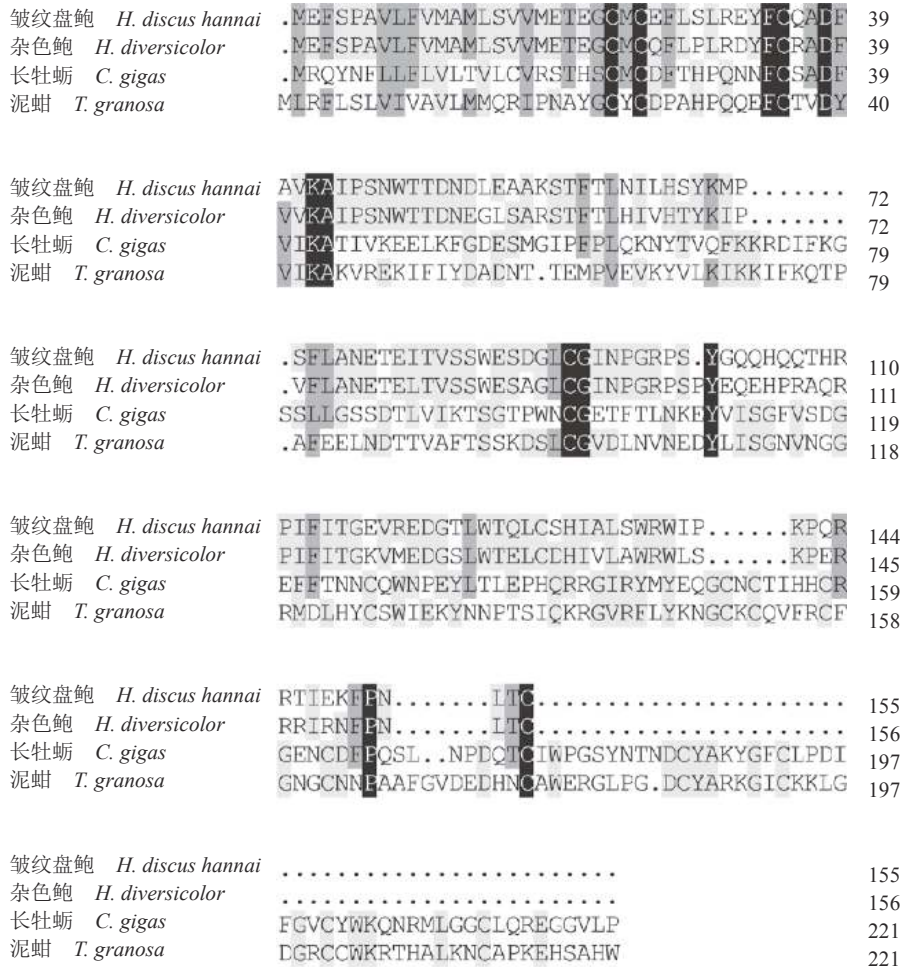


图2 不同软体动物中TIMP氨基酸序列的多序列比对

杂色鲍, ABY87360.1; 长牡蛎, AAW52530.1; 泥蚶, AFB81539.1

Fig. 2 Multiple alignment of TIMP amino acid sequences from different molluscs

H. diversicolor, ABY87360.1; *C. gigas*, AAW52530.1; *T. granosa*, AFB81539.1

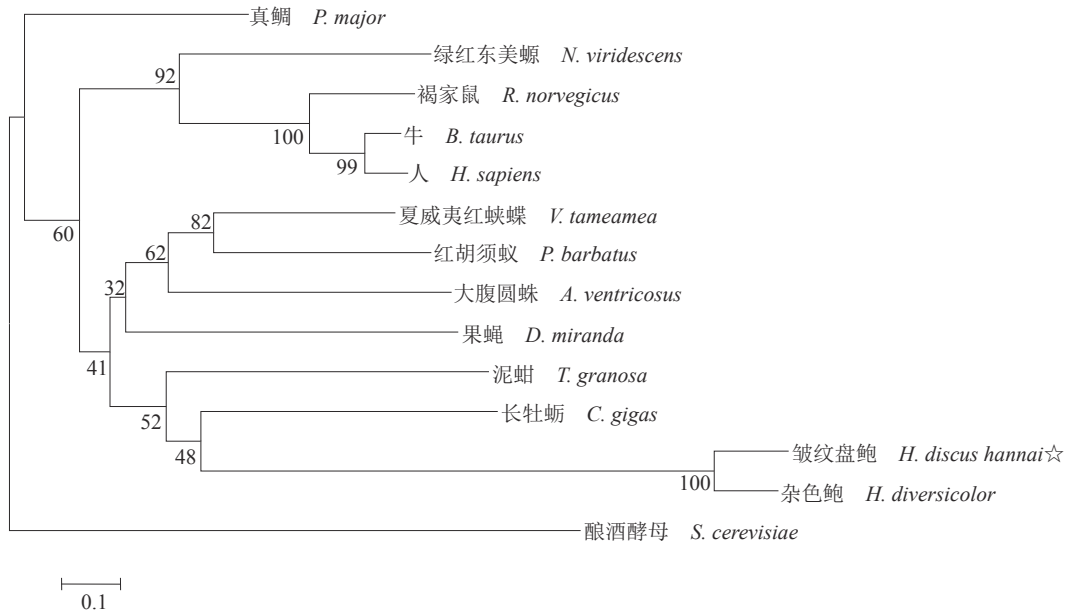


图 3 采用邻接法构建不同物种的 TIMP 系统发育树

真鲷, XP_017144835.1; 绿红东美鲷, ABB88702.1; 褐家鼠, EDL97726.1; 牛, APG21189.1; 人, AAX47478.1; 夏威夷红蜈蚣, XP_026486368.1; 红胡须蚁, XP_011631309.1; 大腹圆蛛, GBL73882.1; 果蝇, XP_017144835.1; 泥蚶, AFB81539.1; 长牡蛎, AAW52530.1; 杂色鲍, ABY87360.1; 酿酒酵母, EXG83307.1

Fig. 3 Phylogenetic tree of TIMP from different species based on Neighbor-joining method

Pagrus major, XP_017144835.1; Notophthalmus viridescens, ABB88702.1; Rattus norvegicus, EDL97726.1; Bos taurus, APG21189.1; Homo sapiens, AAX47478.1; Vanessa tameamea, XP_026486368.1; Pogonomyrmex barbatus, XP_011631309.1; Araneus ventricosus, GBL73882.1; Drosophila miranda, XP_017144835.1; T. granosa, AFB81539.1; C. gigas, AAW52530.1; H. diversicolor, ABY87360.1; S. cerevisiae, EXG83307.1

TIMP 在血淋巴细胞中表达量最高, 其次为褶边和外套膜, 而性腺、鳃、肌肉和肝胰腺中 TIMP 相对表达量较低 (图 4)。

2.3 副溶血性弧菌感染前后 TIMP 在皱纹盘鲍各组织中的表达量

为了进一步探究 TIMP 与皱纹盘鲍抗菌免疫的关系, 首先利用副溶血性弧菌感染鲍, 并收集不同感染时期的皱纹盘鲍免疫器官和组织, 以检测 TIMP 表达与副溶血性弧菌感染的关系。结果显示, 与 PBS 组相比较, 副溶血性弧菌感染 12 h 时血淋巴细胞和鳃组织中 TIMP 转录水平升高了 4 倍, 且均达到最高值。而后, TIMP 转录水平显著下降至与对照组相近水平。弧菌感染并未引起肝胰腺中 TIMP 转录水平显著变化 (图 5)。

2.4 皱纹盘鲍体内 TIMP 与 MMP-1 的相互调控关系

TIMPs 是组织中 MMPs 主要的内源性抑制因子, 能特异性抑制 MMPs 家族的基质降解酶。为了检测 TIMP 与 MMP-1 在皱纹盘鲍体内的相互作用关系, 利用 RNA 干扰技术分别敲低皱纹盘鲍

TIMP 与 MMP-1 表达量。当 TIMP 敲低 24~72 h 时, MMP-1 表达量受到显著抑制 (图 6)。而当 MMP-1 敲低 24 h 后, TIMP 表达量显著上调 (图 7)。结果表明, MMP-1 表达受 TIMP 正调控, 而 TIMP 表达受 MMP-1 负调控。

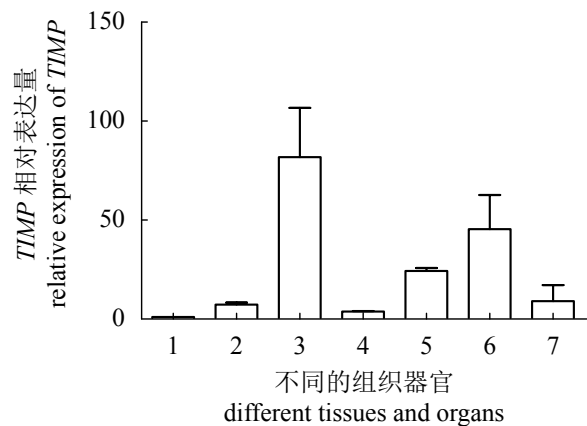


图 4 TIMP 在皱纹盘鲍各组织器官中的表达情况

1. 肝胰腺, 2. 鳃, 3. 血淋巴细胞, 4. 肌肉, 5. 外套膜, 6. 褶边, 7. 性腺

Fig. 4 Expression of TIMP in abalone tissues and organs

1. hepatopancreas, 2. gill, 3. hemocytes, 4. muscle, 5. mantle, 6. frill, 7. gonad

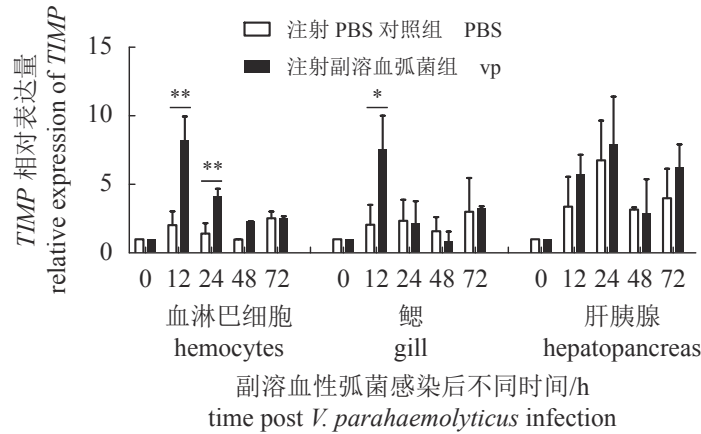


图 5 *TIMP* 在副溶血性弧菌感染前后的表达情况

“*”表示具有显著差异 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 5 Expression of *TIMP* before and post *V. parahaemolyticus* infection

“*” indicates significant difference ($P < 0.05$); vp. *V. parahaemolyticus*, the same below

3 讨论

MMPs 是参与降解 ECM 过程中至关重要的蛋白酶^[18], *TIMPs* 是该蛋白酶的内源性抑制剂^[19],

它同时也参与了细胞增殖、迁移、侵袭、血管生成抑制及细胞凋亡等进程^[20]。在机体中, 大部分情况下 *TIMPs* 都是通过抑制 MMPs 的活性来发挥作用^[21], 只有少部分情况 *TIMPs* 是通过与特殊的

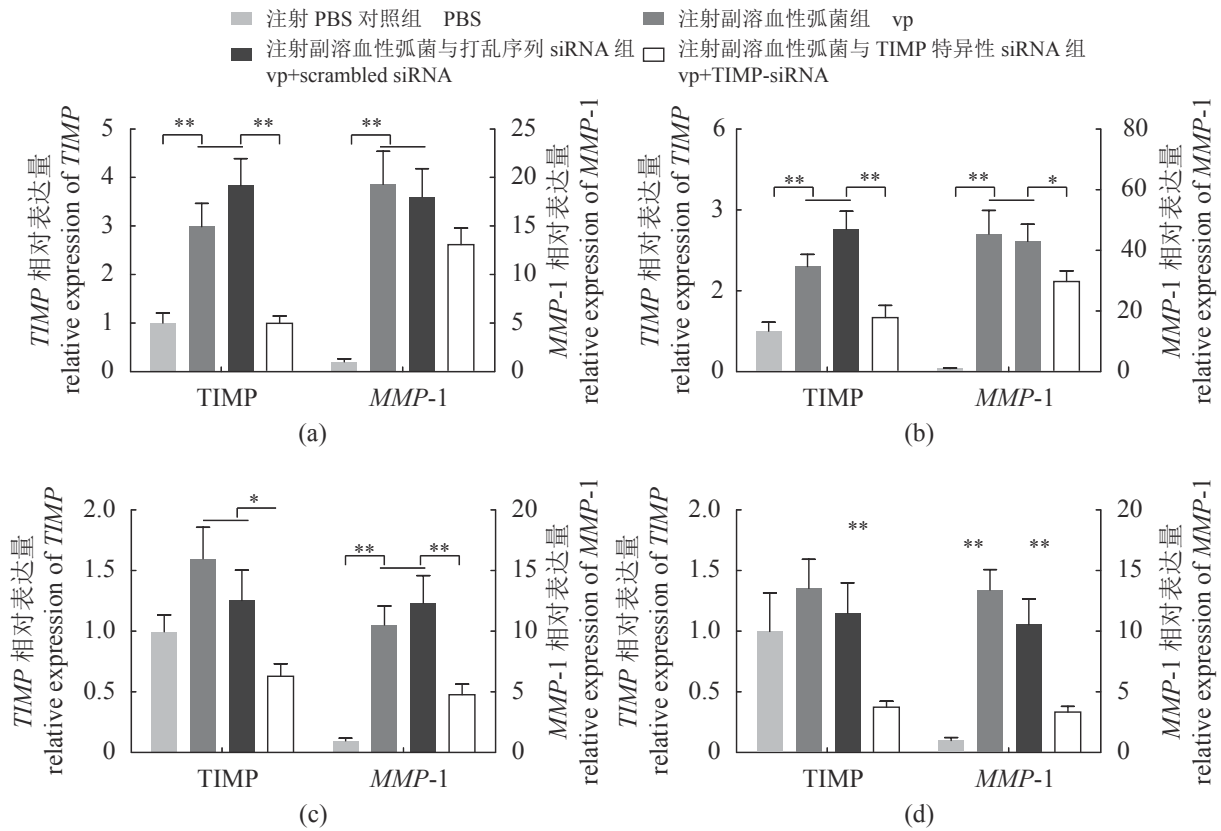


图 6 *TIMP* 敲低对 *MMP-1* 表达的影响

(a)-(d) *TIMP* 分别敲低 12、24、48 和 72 h

Fig. 6 Effects of *TIMP* knock-down on the expression of *MMP-1*

(a)-(d) knock-down of *TIMP* at 12, 24, 48 and 72 h, respectively

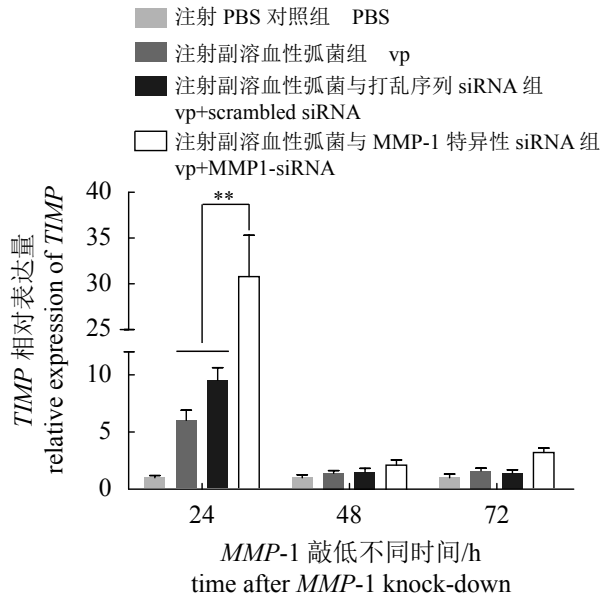


图 7 *MMP-1* 敲低对 *TIMP* 表达的影响

Fig. 7 Effects of *MMP-1* knock-down on the expression of *TIMP*

细胞受体相互结合发挥作用的。二者之间的动态平衡与体内细胞水平的信号传导、生长因子等息息相关。目前, 软体动物中已有杂色鲍、长牡蛎、泥蚶等的 *TIMP* 序列被克隆, 但对于 TIMPs 在软体动物先天性免疫中的研究及其与 MMPs 的相互作用关系鲜有报道。本研究根据杂色鲍 *TIMP* 序列设计引物, 利用 PCR 技术克隆得到了皱纹盘鲍 *TIMP* cDNA 全长序列。该 cDNA 全长为 2291 bp, 其中 ORF 为 468 bp, 共编码 155 个氨基酸残基。推导的氨基酸序列包含一个 N 端信号肽 (1~22 aa) 和纺锤蛋白 (nutrin, NTR) 结构域, NTR 结构域中有 6 个保守的半胱氨酸残基。

已有研究表明, ECM 成分是微生物病原体入侵的停靠点^[22]。TIMPs 对 ECM 的代谢至关重要, 最主要的功能是直接抑制 MMPs 依赖的 ECM 蛋白水解作用, 从而参与 ECM 的组织重排^[23]。此外, MMPs 和 TIMPs 参与多种生物活性蛋白的加工过程, 包括细胞因子、趋化因子和细胞表面蛋白等, 进而间接影响 ECM 的代谢^[24]。破坏 MMPs 与 TIMPs 之间的平衡可能会导致与失控的细胞外基质周转、炎症、细胞生长和迁移相关的疾病, 如关节炎、心血管疾病、癌症、肺病、肾炎、神经障碍和组织溃疡^[25]。Chen 等^[16] 研究表明, 副溶血性弧菌感染导致皱纹盘鲍 *MMP-1* 表达量显著上调, 且 *MMP-1* 可调节免疫相关基因的表达及细胞的活性。作为 MMPs 的内源性抑制剂, TIMPs 极

有可能通过调控 MMPs 的表达与活性来参与皱纹盘鲍的抗弧菌免疫过程。

在水生无脊椎动物中, 血淋巴细胞作为主要的免疫细胞, 在抵御细菌感染过程中发挥重要作用^[26]。转录组测序结果显示, 当弧菌感染杂色鲍后, 其血淋巴细胞中的 *TIMP* 和 *MMP-1* 表达量均发生显著上调^[17]。Wang 等^[27] 对泥蚶血中的 *TIMP* 进行克隆表达, 发现 *TIMP-4* 蛋白可能在软体动物防御机制中起着关键作用。Montagnani 等^[28] 发现, *TIMP* 与长牡蛎的个体发生、伤口愈合和防御机制密切相关。本研究结果表明, 在弧菌感染早期, *TIMP* 在血淋巴细胞和鳃组织中的表达量均显著上调, 说明 *TIMP* 可能参与皱纹盘鲍的早期免疫应答反应。此外, 皱纹盘鲍体内 *MMP-1* 表达受 *TIMP* 正调控, 而 *TIMP* 表达受 *MMP-1* 负调控。以此推测, 弧菌感染后皱纹盘鲍体内 *MMP-1* 表达量的升高可抑制 *TIMP* 的表达, 从而形成负反馈调节。但弧菌感染诱导 *MMP-1* 和 *TIMP* 表达的先后顺序、*MMP-1* 与 *TIMP* 蛋白水平的相互调控作用以及 *TIMP* 对 *MMP-1* 酶活性的抑制作用有待进一步探索。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Park S C, Kim J Y, Lee J K, et al. Antibacterial action of new antibacterial peptides, nod1 and nod2, isolated from *Nordotis discus discus*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(27): 6875-6881.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020. Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Center, China Fisheries Society. China fisheries yearbook 2019[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [3] 张亚琦. 鲍鱼的物性学研究及加工工艺探讨 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008. Zhang Y Q. Study on the processing methods of abalone and its rheological characteristic[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008 (in Chinese).
- [4] 陶志鹏. 皱纹盘鲍内脏纤维素酶的分离纯化与分子克隆 [D]. 厦门: 集美大学, 2014. Tao Z P. Purification, characterization and cloning of a cellulase from abalone (*Haliotis discus hannai*) viscera[D]. Xiamen: Jimei University, 2014 (in Chinese).
- [5] 段雪昆. 皱纹盘鲍基质金属蛋白酶基因的克隆及表达

- 分析[D]. 厦门: 集美大学, 2016.
- Duan X K. Cloning and expression of matrix metalloproteinases from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)[D]. Xiamen: Jimei University, 2016 (in Chinese).
- [6] Beaz-Hidalgo R, Balboa S, Romalde J L, *et al.* Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(1): 34-43.
- [7] Lopez-Joven C, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, *et al.* Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in two species of clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(1): 197-208.
- [8] Lovell C R. Ecological fitness and virulence features of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine environments[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(5): 1781-1794.
- [9] Sperstad S V, Haug T, Blencke H M, *et al.* Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(5): 519-530.
- [10] 闫训友, 薛冲, 刘志敏, 等. 基质金属蛋白酶及其组织抑制剂研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2004, 15(03): 302-305.
- Yan X Y, XUE C, LIU Z M, *et al.* Current advancement on matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metallo-proteinases[J]. *Letters in biotechnology*, 2004, 15(03): 302-305 (in Chinese).
- [11] Fanjul-Fernández M, Folgueras A R, Cabrera S, *et al.* Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2010, 1803(1): 3-19.
- [12] Müller-Quernheim J, Eickelberg O. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": matrix metalloproteinases in COPD[J]. *European Respiratory Journal*, 2012, 39(1): 197-209.
- [13] 刘爱蕙. 基质金属蛋白酶抑制剂-4(TIMP-4)基因的克隆与真核表达载体构建[D]. 长春: 吉林大学, 2006.
- Liu A H. Cloning and eukaryotic expression vector construction of tissue inhibitor of metalloproteinase 4 gene[D]. Changchun: Jilin University, 2006 (in Chinese).
- [14] Ishiguro N, Ito T, Oguchi T, *et al.* Relationships of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover and inflammation as revealed by analyses of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2001, 44(11): 2503-2511.
- [15] 左慧, 李丽. 在恶性肿瘤中检测MMPs、TIMPs的研究进展[J]. *中国临床医学*, 2003, 10(01): 95-97.
- Zuo H, Li L. Advance in the measure of MMPs and TIMPs in malignant tumors[J]. *Clinical medical journal of China*, 2003, 10(01): 95-97 (in Chinese).
- [16] Chen Y L, Li W Y, Hu J J, *et al.* Nucleus-translocated matrix metalloproteinase 1 regulates innate immune response in pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 290-298.
- [17] Wang K J, Ren H L, Xu D D, *et al.* Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(11): 1326-1347.
- [18] 赵秀斌. 不同强度跑台运动对大鼠骨组织I型胶原和MMP-1表达的影响[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- Zhao X B. Effect of different intensity treadmill exercise to expression of collagen I and MMP-1 of bone tissue in rats[D]. Suzhou: Soochow University, 2010 (in Chinese).
- [19] 牛海玲. 刺参MMP及TIMP基因的克隆及在自溶过程中的变化研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2014.
- Niu H L. Molecular cloning of MMP and TIMP from *Stichopus japonicus* and their expression profile during autolysis[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2014 (in Chinese).
- [20] Brew K. Reflections on the evolution of the vertebrate tissue inhibitors of metalloproteinases[J]. *The FASEB Journal*, 2019, 33(1): 71-87.
- [21] 商冠宁. 基质金属蛋白酶-2及其抑制因子在骨肉瘤侵袭转移中的作用[D]. 大连: 大连医科大学, 2005.
- Shang G N. The function of MMP-2 and TIMP-2 in the invasion and metastasis of osteosarcoma[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2005 (in Chinese).
- [22] Westerlund B, Korhonen T K. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix[J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 9(4): 687-694.
- [23] Parks W C, Wilson C L, López-Boado Y S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(8): 617-629.
- [24] Kübler A, Luna B, Larsson C, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* dysregulates MMP/TIMP balance to drive rapid cavitation and unrestrained bacterial proliferation[J]. *Journal of Pathology*, 2015, 235(3): 431-444.
- [25] Brew K, Nagase H. The Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2010, 1803(1): 55-71.
- [26] 费晨. 基质金属蛋白酶在痘病毒感染中的作用和表达变化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- Fei C. Roles of matrix metalloproteinases in poxvirus

- replication[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2010 (in Chinese).
- [27] 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.
- [28] 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.

Role of tissue inhibitor of metalloproteinase in the anti-*Vibrio* immunity of *Haliotis discus hannai*

ZHANG Minghui¹, ZHANG Qian^{1,2}, LIN Jinjin¹, ZHANG Lingjing¹,
LIU Guangming^{1,2}, CHEN Yulei^{1*}, CAO Minjie^{1,2*}

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. National & Local Joint Engineering Research Center of Deep Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

Abstract: As an important economic shellfish in coastal area of China, abalone is susceptible to bacterial infection, especially *Vibrio parahaemolyticus*. Similar to other invertebrates, *Haliotis discus hannai* resists pathogen infection by innate immune response. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are endogenous protein regulators of the matrix metalloproteinases (MMPs) family. As MMP-1 was engaged in the innate immunity of abalone, the involvement of TIMP in the regulation of MMP-1 expression and activity as well as the immune responses merits further investigation. In this study, the role of TIMP in the innate immune responses of *H. discus hannai* against *V. parahaemolyticus* infection and the interaction between TIMP and MMP-1 were investigated. The full length cDNA sequence of *TIMP* was obtained, and the expressions of *TIMP* in different tissues of *H. discus hannai* were analyzed post *Vibrio* infection. The cloned *TIMP* cDNA sequence was 2291 bp in length. NetNGlyc 1.0 Server and Netoglyc 4.0 Server were used to analyze the glycosylation sites of TIMP. The results showed that TIMP had three potential N-glycosylation sites, namely Asn at positions 47, 77 and 152, and a potential O-glycosylation site, namely Thr at position 108. Multiple alignment of TIMP amino acid sequences from different molluscs showed that the similarities of TIMP in *H. discus hannai* with those of *H. diversicolor*, *Crassostrea gigas* and *Tegillarca granosa* were 76%, 18.9% and 19.3%, respectively. In the early stage of *V. parahaemolyticus* infection, the expression of *TIMP* in hemocytes and gill tissues were significantly up-regulated. To study the interaction between TIMP and MMP-1 in the anti-*Vibrio* immunity of abalone, RNA interference technology was used to knock down the expression levels of *TIMP* and *MMP-1*. After the silencing of *MMP-1* gene in abalone, *TIMP* expression was significantly up-regulated. When *TIMP* expression was inhibited, *MMP-1* expression decreased significantly. These results indicated that *MMP-1* expression was positively regulated by TIMP, while TIMP expression was negatively regulated by *MMP-1* in abalone. In conclusion, the present study will help to reveal the interaction between TIMP and MMP-1 in abalone innate immunity against *V. parahaemolyticus* infection. It also provided new insights into the prevention and control of pathogens in abalone culture.

Key words: *Haliotis discus hannai*; *Vibrio parahaemolyticus*; tissue inhibitor of metalloproteinase; matrix metalloproteinase 1; interaction; innate immunity

Corresponding authors: CHEN Yulei. E-mail: ylchen@jmu.edu.cn;

CAO Minjie. E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0901004); National Natural Scientific Foundations of China (31702372, 31772049); China Agriculture Research System of MOF and MARA(CARS-49)