



草鱼 *mst2* 在免疫应答中的作用机制

李亚男, 唐美珍, 卢志杰, 林 鑫*, 秦真东*

(仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,
广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东广州 510225)

摘要: 为了初步阐明草鱼哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 2 基因 (mammalian sterile 20-like kinase 2, *mst2*) 在机体免疫中的作用机制, 实验采用 RNA-Seq 技术对干扰 *mst2* 后经脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 应激的草鱼肾细胞系 (*Ctenopharyngodon idella* kidney cell lines, CIK) 进行了转录组测序与验证分析。测序原始数据经 De novo 拼接与组装后共获得 22 374 个独立功能基因 (unigenes), 其中已知功能基因为 21 199 个, 预测的新基因为 1 175 个。干扰 *mst2* 后经 LPS 应激的 unigenes 表达差异分析表明, 对照组与实验组之间共存在 38 个差异基因 (differentially expressed genes, DEGs), 其中上调基因 16 个, 下调基因 22 个。利用实时荧光定量 PCR 技术 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 对 38 个 DEGs 的 RNA-Seq 结果进行验证, 结果显示, qRT-PCR 和 RNA-Seq 分析一致, 说明 RNA-Seq 分析结果可靠。采用 RNA 干扰技术干扰 *mst2* 后经 LPS 处理, CIK 细胞转录组中 DEGs 参与免疫代谢的途径主要有 MAPK 信号通路、内吞作用途径、自噬途径和细胞因子受体相互作用途径。凋亡相关基因检测结果显示, 干扰 *mst2* 并经 LPS 处理后, 促凋亡基因 (*fas*、*bad1*、*bad2*、*caspase-3*、*caspase-8* 和 *caspase-9*) 转录水平上调, 抗凋亡基因 (*bcl2*) 转录水平下调, 证明干扰 *mst2* 后经 LPS 处理会诱发细胞发生凋亡。综上所述, *mst2* 可通过调控凋亡相关过程参与机体免疫反应。本研究结果初步阐明了草鱼 *mst2* 参与机体免疫应答的分子机理, 可为草鱼细菌性疾病防控提供一定的基础理论参考。

关键词: 草鱼; *mst2*; CIK 细胞系; RNA-Seq; 细胞凋亡

中图分类号: S 942

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 属于脊索动物门 (Chordata) 鱼纲 (Pisces) 鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 草鱼属 (*Ctenopharyngodon*), 为草食性鱼类, 是世界各地都在养殖的一种重要的淡水鱼。2018 年全球草鱼产量约 570.4 万 t, 仅次于罗非鱼, 成为全球第二大养殖淡水鱼类^[1-2]。然而, 随着养殖密度不断增加、养殖水环境日益恶化, 导致草鱼发生一系列疾病; 其中, 最

为严重的是草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV)^[3] 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[4] 感染草鱼后, 导致草鱼严重的出血病, 造成了极高的死亡率; 这种情况在制约着草鱼大规模养殖发展的同时, 给养殖户带来了巨大的经济损失。综上所述, 开展草鱼抗病分子机制的研究是一项极其重要和有意义的工作。

Hippo 信号途径是一条在非哺乳与哺乳动物

收稿日期: 2021-03-14 修回日期: 2021-03-30

资助项目: 国家自然科学基金 (42006115); 广东省区域联合基金 (2020A1515110826)

第一作者: 李亚男 (照片), 从事水产动物抗氧化免疫研究, E-mail: liyanan@zhku.edu.cn

通信作者: 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn; 秦真东, E-mail: qinzhendongsc@163.com



之间进化上高度保守的激酶级联信号通路,主要通过调节细胞增殖控制器官大小、细胞凋亡、组织再生和组织稳态^[5]。哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 2 基因 (*mst2*) 是 Hippo 信号途径的重要组成成员之一,在生物体内各个组织中广泛表达。MST2 蛋白结构域显示,其 N 端和 C 端分别存在一个激酶结构域和调节结构域。调节结构域又可以分为两部分,即一个是自抑制结构域,另一个是被称为 SARAH 结构域的螺旋-螺旋二聚化结构域^[6]。MST2 主要的功能:(1)能诱导细胞凋亡,在细胞增殖、存活、形态建成和运动方面都具有重要作用;(2)在病原入侵机体时起着重要的免疫功能^[7-8]。近年来,大部分的 *mst2* 研究都主要集中在哺乳动物上开展,在鱼类却鲜有报道。目前,只有汪亚平团队对草鱼 *mst2* 的克隆和亚细胞定位进行了研究^[9],但并没有详细深入阐明其免疫分子机制。

为了促进功能基因组学研究,高通量测序技术 (Next-generation sequencing, NGS) 主要应用在新的基因发现、基因表达谱和单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP)^[10-11] 等方面。随着高通量测序技术的快速发展,它为研究宿主与病原体相互作用 (包括基因表达和免疫反应) 提供了非常有价值的信息^[12]。近年来,通过使用高通量测序技术已在鱼类中发现许多参与先天免疫和适应性免疫的保守基因和新基因,物种涉及虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[13]、红鲑 (*O. nerka*)^[14]、齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*)^[15]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[16]、金鱼 (*Carassius auratus*)^[17] 和草鱼^[2] 等。

本研究首先在草鱼肾细胞系 (*C. idella* kidney cell lines, CIK 细胞系) 中利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi 或 siRNA) 技术成功干扰 *mst2* 后再经脂多糖 (LPS) 应激处理,然后采用 RNA-Seq 技术进行了转录组测序、基因功能注释和表达谱分析。最后利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证了转录组的差异表达基因 (differently expressed genes, DEGs) 和凋亡相关基因,证明 *mst2* 能通过调节细胞凋亡来参与宿主的免疫应答,可为今后草鱼疾病防控提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

CIK 细胞系早期是由中国水产科学研究院

珠江水产研究所刘春老师赠送,后经本实验室传代扩大培养并保存。

1.2 CIK 细胞系培养、siRNA 转染和 LPS 应激

CIK 细胞系为贴壁细胞,其培养基为 M199 (Gibco, 美国),含有 10% 牛血清 (FBS, GemCell, 美国)、100 U/mL 的双抗 (青链霉素, Genom, 中国),放置在 CO₂ 浓度为 5% 的 28 °C 恒温生化培养箱进行培养。待细胞长满后,将其传代于 12 孔板 (1×10⁶ 个/孔),培养 12~16 h,待细胞密度达到 80%~90% 时,开始 siRNA 转染,siRNA 浓度为 10×10⁻⁶ mol/L,剂量为 2 μg/孔。草鱼 *mst2* 的 siRNA 引物于生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成,根据转染试剂 Lipofectamine™ 3000 说明书进行 siMst2 与 siNC (非特异性对照) 的转染:(1) *mst2* siRNA 的稀释。将 10×10⁻¹⁰ mol 的 siRNA 加入到 50 μL 无血清培养基 Opti-MEM 培养基中,轻柔地混匀;(2) siRNA 和 Lipofectamine™ 3000 复合物的制备。取 3 μL 的 Lipofectamine™ 3000 加入到稀释好的 siRNA 中,轻柔地混匀,然后室温静置 20 min。最后,将 siRNA 和 Lipofectamine™ 3000 复合物加到细胞中,于 28 °C、5% CO₂ 的培养箱继续培养。待 CIK 细胞系转染 6 h 后,更换含 10% 的 FBS 和 1% 双抗的 M199 培养基,并用 10 μg LPS 应激 CIK 细胞系,12 h 后收集 3 组 CIK 细胞系,每组 3 个重复样品,用 1 mL 的 RNAiso Plus (TaKaRa 公司,大连) 充分吹打细胞,之后保存于 -80 °C 用于 RNA 提取。

1.3 总 RNA 的提取、转录组文库的构建和测序

CIK 细胞系总 RNA 的提取按照 RNAiso Plus 试剂盒说明书进行,使用 Nano 2000 微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司) 和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和浓度。转录组文库构建流程:(1) 用 mRNA 富集法和 rRNA 去除法对 total RNA 进行处理,用带有 OligodT 的磁珠富集有 polyA 尾巴的 mRNA;用 DNA 探针杂交 rRNA, RNaseH 选择性消化 DNA/RNA 杂交链,再用 DNase I 消化掉 DNA 探针,纯化后即得到所需 RNA。(2) 用打断 buffer 把获得的 RNA 片段化,随机 N6 引物进行反转录,再合成 cDNA 二链形成双链 DNA。(3) 把合成的双链 DNA 末端补平并 5' 端磷酸化,3' 端形成突出一个“A”的黏末端,

再连接一个3'端有凸出“T”的鼓泡状的接头。(4)连接产物通过特异的引物进行PCR扩增。(5)PCR产物热变性成单链,再用一段桥式引物将单链DNA环化得到单链环状DNA文库。(6)由华大基因组研究所提供测序服务,测序平台为Illumina/Hiseq2000。

1.4 测序质量检测, De novo 组装和基因注释

本研究对转录组测序所得的原始数据进行统计和质量评价,使用FASTQC软件(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)对原始测序数据(raw reads)进行质量评估,去除reads中含有的测序接头序列,使用Trinity软件对序列进行拼接,将拼接得到的基因参考序列进行进一步比对分析:(1)将拼接得到的基因参考序列(所有的 unigene)与NCBI的Nr蛋白数据库比对获取基因注释信息(Blastx, $E\text{-value} \leq 10^{-5}$)。(2)把拼接得到的基因参照序列与Rfam数据库进行比对,应用RSEM软件v1.2.6进行基因表达定量分析,基因表达量用FPKM值(反应基因表达水平)表示。(3)根据参考基因序列与NCBI的Nr数据库Blast比对结果,用Blast2Go提取GO注释信息。(4)把拼接得到的参考基因序列与KEGG

数据库中的蛋白序列进行Blastx比对($E\text{-value} \leq 10^{-5}$),从中提取KEGG注释信息数据并分析与处理。

1.5 qRT-PCR 验证差异表达基因

根据HIScript[®] Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme)说明书合成cDNA,在-20℃保存备用。利用qRT-PCR方法检测差异表达基因,其反应体系和反应程序参照AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix试剂说明书(Vazyme),反应在qTOWER3 touch3 (JENA, 德国)荧光定量PCR仪中进行,目的基因和内参基因 $\beta\text{-actin}$ 分别独立做3次重复,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。qRT-PCR反应体系(20 μL):模板cDNA 4 μL (稀释10倍),上下游引物各0.5 μL (10×10^{-6} mol/L)(表1), $2 \times$ AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 10 μL , ddH₂O 5 μL 。反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,60℃退火30 s,45个循环;最后72℃延伸20 s,4℃保存5 min。数据显示方式为平均值 \pm 标准差,使用GraphPad Prism 8软件进行作图和双因素方差分析, $P < 0.05$ (*)表示差异显著, $P < 0.01$ (**)表示差异极显著。

表1 实验中所用的引物及其序列

Tab. 1 Primers used in the study

引物 primers	引物序列(5'-3') sequences (5'-3')	用途 usage	引物 primers	引物序列(5'-3') sequences (5'-3')	用途 usage
ATG2-F	TGGGTCATTAAGGTTCTCAGTGG	qRT-PCR	SLC25A33_36, RIM2-R	CAGCGAAATAGATTGCCCTTGAG	
ATG2-R	GGCAGATACCATACATGAGCGTA		CXXC5-F	TATGCAGATACATCGAAAGGGGG	qRT-PCR
BGI_novel_G000199-F	ACATCCTTCTGCCAGTAAAGAG	qRT-PCR	CXXC5-R	TACAATCATICTCCCGTCTCCC	
BGI_novel_G000199-R	TGGGAAGGACTACGAGAACTTTG		SIAT8B-F	ATGAGATCCACCTGTATGGCTTC	qRT-PCR
KRAB1-F	GTTGTGATTCCGGCTGAAGAAAGG	qRT-PCR	SIAT8B-R	GTGGACTGGCTCTAGATGTGTAG	
KRAB1-R	GTCCTTTTACTCGTGTGGATG		CD84-F	CCAGGTGTGTTTGGTGATTCAATG	qRT-PCR
KRAB2-F	GGTGACCCAATGAGCATTAACTC	qRT-PCR	CD84-R	CTGTCTCTGAATCTCCCATCAGTAC	
KRAB2-R	CAAGAGGGCTGAAAATGAAAACG		HSPA1S-F	AGGAGATTGAGAGAATGGTGCAG	qRT-PCR
KRAB3-F	CCATCAGAAGTCGTGGGTATTCA	qRT-PCR	HSPA1S-R	TCAGGTTCTCATCTCCCACTG	
KRAB3-R	GGAAGATCTCTGCTCTACGACTG		SH2B1_3-F	GTTACAGCTACACTACAGGCCCTT	qRT-PCR
KRAB4-F	CCTTCCAACCCGATCGAAATTTT	qRT-PCR	SH2B1_3-R	AGGATGATGAGTGAGGTAGGGAA	
KRAB4-R	CGTTGCTAGTTACGATTACGCTG		SMCH-F	GCCCAAGAGAGTTGTGCTTTAAG	qRT-PCR
KRAB5-F	ACTGGAGATAAAGATGGAGCAGC	qRT-PCR	SMCH-R	TGGCCATTCATGACTATCTCTGG	
KRAB5-R	GTCTTTTATCCGTCATCTCTTGC		USP36_42-F	GAGCCTGGGTTTGTATGATGTG	qRT-PCR
KRAB6-F	GGGAAACTAAGGCTATGTCCACA	qRT-PCR	USP36_42-R	TGTGTACCTCAAGAACTCATGGG	
KRAB6-R	CTGCTTTAAGTGCATCTCTGTGG		EXT2-F	GGCAGACGAGAAGATATCAGAGG	qRT-PCR
TOR1AIP-F	CCAATCTGAGTGTAGTGAGGAC	qRT-PCR	EXT2-R	CCATTCCCCAGGTAAGATCAACA	
TOR1AIP-R	CAGGATGACGTGAGAAATTCTGC		HSPA1s-F	GGAAGTTTGTATGACCCAGTTGTG	qRT-PCR
COL12A-F	GCATCTATAGGGGAAGTGACTGG	qRT-PCR	HSPA1s-R	ATCTTACCAGGACCATAGAGGA	
COL12A-R	AGTATCAGGGGACAAGTCTCTCA		ACRT1, ARP1-F	GTTTATTGGACCCAAAGCTGAGG	qRT-PCR
ELAVL2_3_4-F	CAGGAGCTTACATCCCTCAGTAC	qRT-PCR	ACRT1, ARP1-R	TGGGCCAATATCTAGAGTGCTTC	

· 续表 1 ·

引物 primers	引物序列(5'-3') sequences (5'- 3')	用途 usage	引物 primers	引物序列(5'-3') sequences (5'- 3')	用途 usage
ELAVL2_3_4-R	GTTGGGTTGGAAAGTGACGATG		MRPL45-F	CGACAGCAGTACATAGAGAGACC	qRT-PCR
CAPG-F	GCAAAGCCCAGATCACTAACATC	qRT-PCR	MRPL45-R	GCTGTTTCAGACCTTCTTTGGAC	
CAPG-R	TGGTCCCATTTGCCAGGATAAAG		HSPA1s-F	CAGTGTGGAAGATGAGAACCTGA	qRT-PCR
ASCC3-F	TTCTCAGTATTACATCCGAGCCG	qRT-PCR	HSPA1s-R	GCATCCCTCCCTGATAAAGCTTA	
ASCC3-R	CTGAAGATCCAAGAGCTCTGTGT		HSPA1s-F	CAGTGTGGAAGATGAGAACCTGA	qRT-PCR
EPB41, 4.1R-F	GAGGAAGTCGTCAAAACCAACCC	qRT-PCR	HSPA1s-R	GCATCCCTCCCTGATAAAGCTTA	
EPB41, 4.1R-R	CCTCTGGCTCTTCTTTGATCAGT		Bad1-F	GTCTCAGGTGTATACAGTCAGCC	qRT-PCR
NLR3, NOD3-F	GAGAATACGCAGCAGATGTTCC	qRT-PCR	Bad1-R	AGAACGACCTCTGAATGGAAGTC	
NLR3, NOD3-R	GCTTCCAGGTCTGTGTCATAGAA		Bad2-F	TCTCGATGAATGAGGATCTGCTG	qRT-PCR
NUMA1-F	TCTGACTTCTCTCAACCAAGCTC	qRT-PCR	Bad2-R	CTCATCGCTCATTCTCCTTAGCT	
NUMA1-R	CAAGAGTTCCTGATTCTGCTCCT		Caspase3-F	GCATCATCATCAACAACAAA	qRT-PCR
BGI_novel_G000058-F	AGAATCAGACGGTGGTGAAGTAC	qRT-PCR	Caspase3-R	GACTGAGCATCACACAAACA	
BGI_novel_G000058-R	GCTGTGTATATCTTGTGTCGGC		Caspase8-F	GTTTCTGTGCATGGACCTGATTC	qRT-PCR
IL17RE-F	TCTCCTAAAACTGCTTCTCCACC	qRT-PCR	Caspase8-R	CAGCTCTCTTCCACTTCTCTCT	
IL17RE-R	GGAAATCCACACAAAAACGAGAGG		Caspase9-F	GTGGGATAGATGACCAGATGGAC	qRT-PCR
PDE4-F	CCAGGTGGGCTTCATTGACTATA	qRT-PCR	Caspase9-R	AGACATAGCCTGGAAAGGTTGAG	
PDE4-R	CTCTGGTACCACTCTCTGTGTGTC		Fas-F	TCTGAATGTTCCCACTGAGAAG	qRT-PCR
RNF38_44-F	TTATCTGTCTTCCAGTCCAGCC	qRT-PCR	Fas-R	CATGTTCTCTTCATCCCAAGAA	
RNF38_44-R	TAGGAAGCGAGCTGTTTCGATATC		Bcl2-F	AGGAAAATGGAGGTTGGGAT	qRT-PCR
KEAB-F	CTAATGTCTAATGTGGGGGTGCT	qRT-PCR	Bcl-2-R	CTGAGCAAAAAAGGCGATG	
KEAB-R	TAGTGAATGAGAGAGGAGCCCAA		Mcl1-F	TGGAAAGTCTCGTGGTAAAGCA	qRT-PCR
WIPF-F	GCGCCGTTTATTTCTCTCTCTC	qRT-PCR	Mcl1-R	ATCGCTGAAGATTCTGTTGCC	
WIPF-R	CGGGAAAAGAGCGTCAACTTATC		miMST2-F	TTGCCACAGTCTCAAATCCA	qRT-PCR
BGI_novel_G000872-F	CTCCACAATATCAGGACCACAA	qRT-PCR	miMST2-R	CCAGAAGGGTGTCCCAATAAC	
BGI_novel_G000872-R	GAAGAATTGTCTGCTGGGATGATG		NC-F	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	siRNA
NRCAM-F	TACGAGTGAGCACAAGAGTCTTC	qRT-PCR	NC-R	ACGUGACACGUUCGGAGAATT	
NRCAM-R	GTATTGCCCTCGTTCATAAAGC		siMst2-F	GAAGGACAUGCCAAACUAGCUTT	siRNA
SLC25A33_36, RIM2-F	CGTCATTAGACCAGGAACAGTCA	qRT-PCR	siMst2-R	AGCUAGUUUGGAUGUCCUUCT	

2 结果

2.1 干扰效果检测

对 CIK 细胞系中 *mst2* 进行 siRNA 转染实验, 转染 CIK 细胞系 6 h 后, 通过 qRT-PCR 方法检测 CIK 细胞系中 *mst2* 的表达情况, 结果显示, 相对于 siNC 对照组, siRNA 组 *mst2* 表达显著下降至 59.46%(图 1, $P < 0.05$), 表明 CIK 中 *mst2* 干扰成功, 可进行后续 LPS 应激与转录组分析实验。

2.2 转录组 De novo 拼接组装

使用 DNBSEQ 平台检测每个样品平均产出 6.40 Gb 数据 (图 2-a)。样品比对基因组的平均比率为 78.95%, 比对基因集的平均比率为 59.78%; 共检测到表达的基因数为 22 374 个, 其中已知的基因为 21 199 个, 预测的新基因为 1 175 个; 共检测出 19 335 个新转录本, 其中 14 517 个属于已知蛋白编码基因的新的可变剪接亚型, 1 190 个属于新的蛋白编码基因的转录本,

剩下的 3 628 个属于长链非编码 RNA (图 2-b)。unigene 的大小分布结果显示, 最丰富的单基因

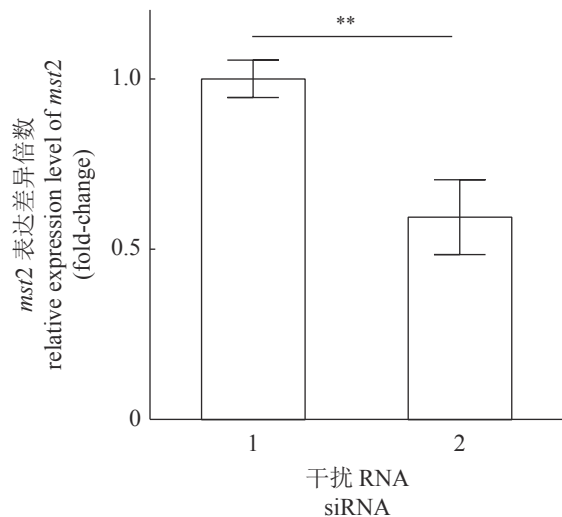


图 1 干扰效果检测图

Fig. 1 Interference effect detection of *mst2*

1. siNC, 2. siMst2

被聚在长度为 $\geq 3\ 000$ bp 的簇中 (图 2-a)。将基因表达水平标准化为 FPKM, 在对照组 siNC 和实验 siMst2 中分别检测到 20 649 个和 20 804 个重叠群, 2 组中都有 19 079 个共同的重叠群 (图 2-c)。转录因子 (transcription factors, TF) 家族的 unigene 数量分布结果显示, TF 主要聚集在 zf-C2H2 簇中 (图 3)。

2.3 差异基因注释与分析

为进一步了解干扰草鱼 *mst2* 经 LPS 处理后, CIK 细胞的差异基因的表达, 本实验建立了对照组和干扰 *mst2* 组的 DEG 文库。差异基因 GO 富集分析结果表明, 这些 DEGs 被划分为“生物学

过程”、“细胞成分”和“分子功能”三大 GO 分类的 13 个功能分类中 (图 4)。其中, “生物学过程”包括 4 个生物学功能, 分别是“发育过程”(developmental process)、定位 (localization)、代谢过程 (metabolic process) 和多细胞生物过程 (multicellular organismal process)。“细胞成分”包括 6 个功能成分, 如细胞 (cell)、膜 (membrane)、膜部分 (membrane part)、细胞器 (organelle)、细胞器部分 (organelle part) 和复杂蛋白 (protein-containing complex)。“分子功能”包括 3 个功能分类即结合 (binding)、催化活性 (catalytic activity) 和转运活性 (transporter activity)。干扰 *mst2* 后 unigenes 表

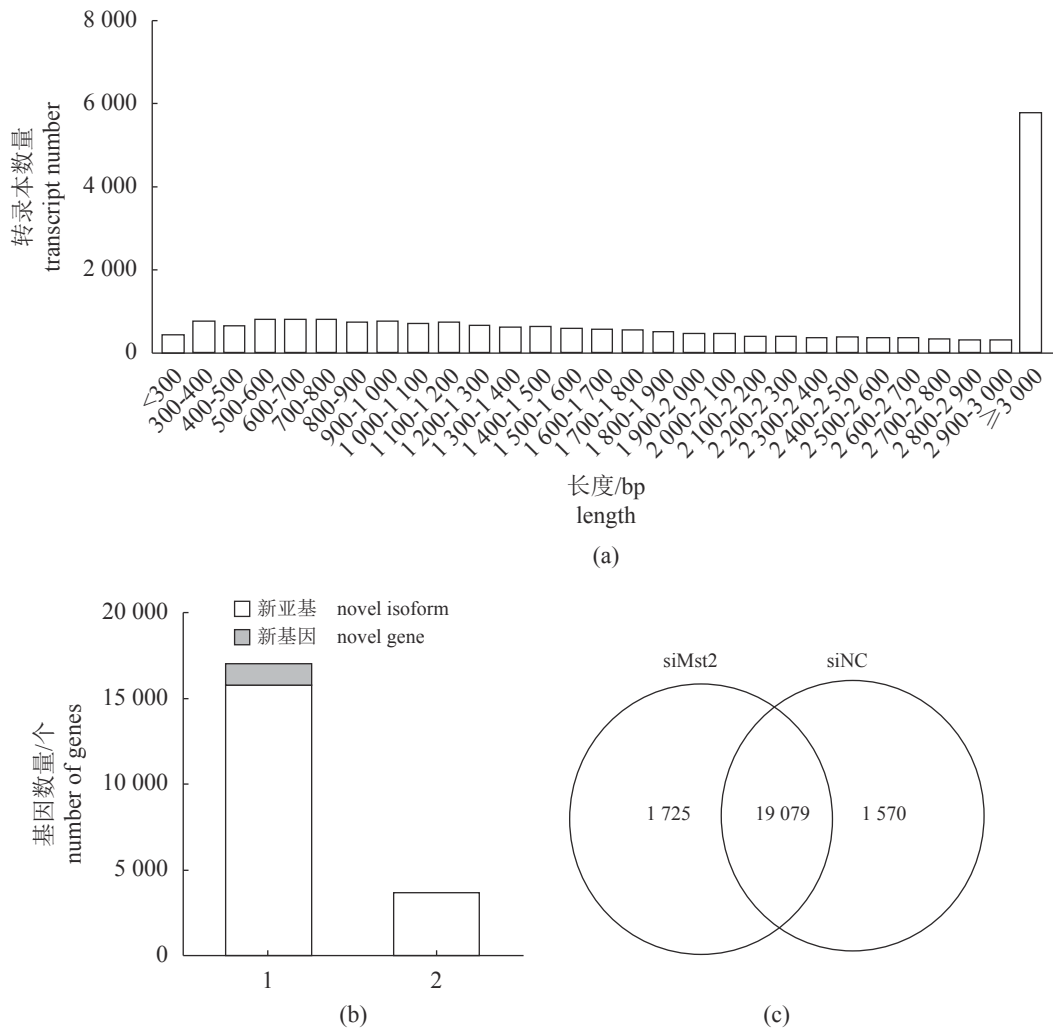


图 2 Unigene 序列长度统计

(a) 干扰 *mst2* 后经 LPS 应激的 CIK 细胞系 unigene 长度分布, (b) 已知基因和新基因的数目, (c) 对照 siNC 和实验组 siMst2 的 Venn 图分析; 1. 编码转录本, 2. 非编码转录本

Fig. 2 Unigene sequence length statistics

(a) Overview of LPS infected siMst2 CIK cells transcriptomic sequence length distributions for all unigenes, (b) the number of known genes and novel genes, (c) the Venn diagram of siNC control and siMst2 intergroup expression; 1. coding transcript, 2. noncoding transcript

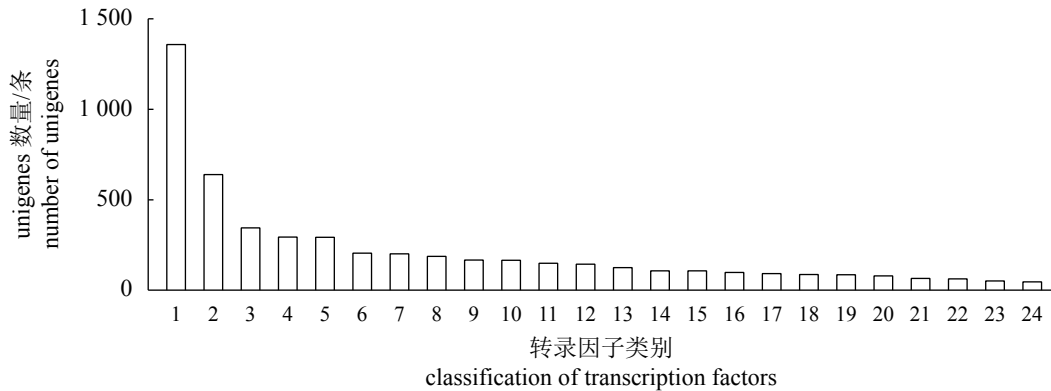


图3 转录因子 unigenes 数量分布

Fig. 3 The number of unigenes of the transcription factors

1. zf-C2H2, 2. homeobox, 3. TF_bZIP, 4. bHLH, 5. others, 6. HMG, 7. THAP, 8. ZBTB, 9. MYB, 10. CBF, 11. zf-BED, 12. zf_C2HC, 13. RHD, 14. ARID, 15. MBD, 16. zf-MIZ, 17. zf-LITAF-like, 18. fork, 19. CSD, 20. zf_GATA, 21. Tub, 22. PAX, 23. HSF, 24. CUT

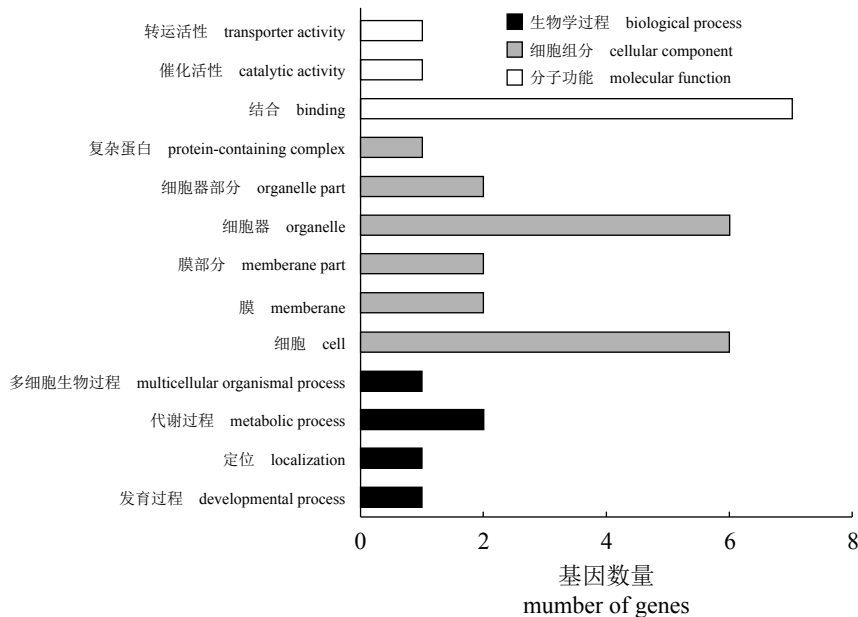


图4 干扰 *mst2* 后经 LPS 应激的 CIK 细胞 DEGs 基因 GO 富集分析

Fig. 4 Gene ontology enrichment analysis of DEGs in LPS infected siMst2 CIK cells

达差异分析表明, siNC 与 siMst2 组之间共存在 38 个 DEGs, 其中上调基因 16 个, 下调基因 22 个 (图 5)。

2.4 KEGG 信号途径分析

为进一步了解干扰 *mst2* 经 LPS 处理后, CIK 细胞差异基因涉及到 KEGG 信号代谢途径的分布, 本实验将所有的 DEGs 与 KEGG 数据库进行比对后, 发现共有 20 条信号代谢途径被注释到。干扰 *mst2* 经 LPS 处理后, CIK 细胞系转录组中差异表达基因参与免疫代谢途径主要有 MAPK

信号通路、内吞作用、自噬和细胞因子受体相互作用等 (图 6)。

2.5 qRT-PCR 验证

利用 qRT-PCR 对 38 个 DEGs (其中上调基因 16 个, 下调基因 22 个) 的 RNA-Seq 结果进行验证, 结果显示, qRT-PCR 和 RNA-Seq 分析一致 (图 7), 说明 RNA-Seq 分析结果可信。为了更进一步探究干扰 *mst2* 并经 LPS 应激后对细胞凋亡的影响, 本实验使用 qRT-PCR 法对凋亡相关基因 (*fas*、*bad1*、*bad2*、*mcl1*、*bcl2*、*caspase-3*、

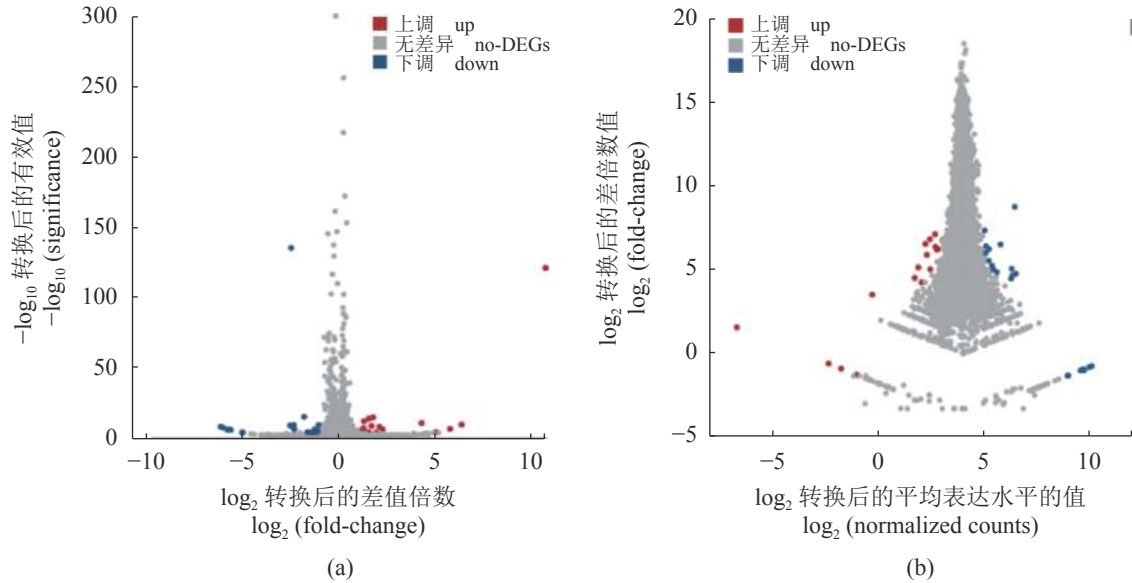


图 5 DEGs 的火山图

(a) X 轴表示 \log_2 转换后的差值倍数, Y 轴表示 $-\log_{10}$ 转换后的有效值, (b) X 轴表示 \log_2 转换后的平均表达水平的值, Y 轴表示 \log_2 转换后的差的倍数的值; 红色点表示显著上调的基因, 蓝色点表示显著下调的基因, 灰色点表示没有显著变化的基因

Fig. 5 A volcano plot of DEGs

(a) X-axis represents the difference multiple value after \log_2 conversion, Y-axis represents the significant value after $-\log_{10}$ conversion, (b) X-axis represents the value of average expression level after \log_2 conversion, Y-axis represents the value of multiple of difference after \log_2 conversion; the red pots indicate significantly up-regulated genes, while the blue pots indicate significantly down-regulated genes and the gray pots represent no significantly changed genes

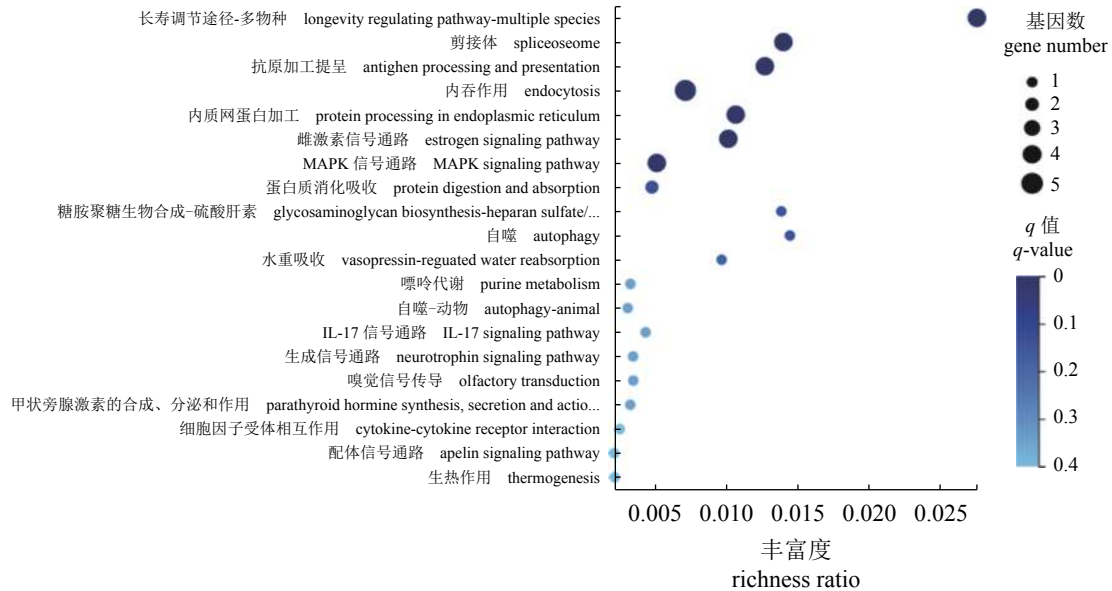


图 6 差异基因 KEGG 途径富集图

气泡表示注释到 KEGG 通路的基因数量; 颜色表示浓缩 q 值, 颜色越深表示 q 值越小

Fig. 6 Differential gene KEGG pathway enrichment bubble map

The bubble indicates the number of genes annotated to a KEGG pathway; the color represents the enrichment q value, the darker color indicates the smaller q value

caspase-8 和 *caspase-9*) 进行检测, 结果发现除了抗凋亡基因 *bcl2* 的转录水平下降, 其他促凋亡

基因的 mRNA 表达水平上升; 因此, 干扰 *mst2* 后用 LPS 应激会促进细胞凋亡的发生(图 8)。

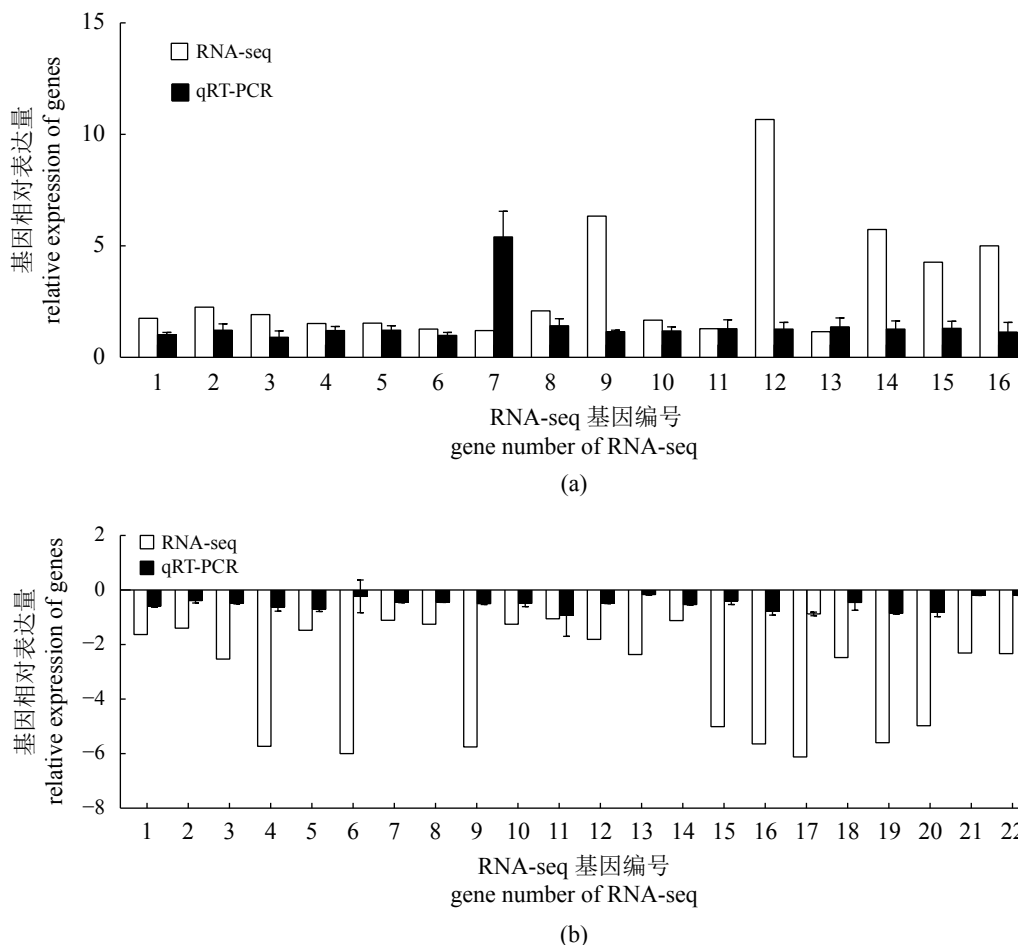


图 7 qRT-PCR 检测 RNA-Seq 上调基因 (a) 和下调基因 (b)

Fig. 7 Validation of the up-regulated genes (a) and down-regulated genes (b) in the RNA-seq data by qRT-PCR

(a) 1. ATG2, 2. BGI_novel_G000199, 3. KRAB1, 4. KRAB2, 5. KRAB3, 6. KRAB4, 7. KRAB5, 8. KRAB6, 9. TOR1AIP, 10. COL12A, 11. ELAVL2_3_4, 12. CAPG, 13. ASCC3, 14. EPB41.4.1R, 15. NLR3, NOD3, 16. NUMA1; (b) 1. BGI_novel_G000058, 2. IL17RE, 3. PDE4, 4. RNF38_44, 5. KEAB, 6. WIPF, 7. BGI_novel_G000872, 8. NRCAM, 9. SLC25A33_36, RIM2, 10. CXXC5, 11. SIAT8B, 12. CD84, 13. HSPA1S, 14. SH2B1_3, 15. SMCH, 16. USP36_42, 17. EXT2, 18. HSPA1s, 19. ACRT1, ARP1, 20. MRPL45, 21. HSPA1s, 22. HSPA1s

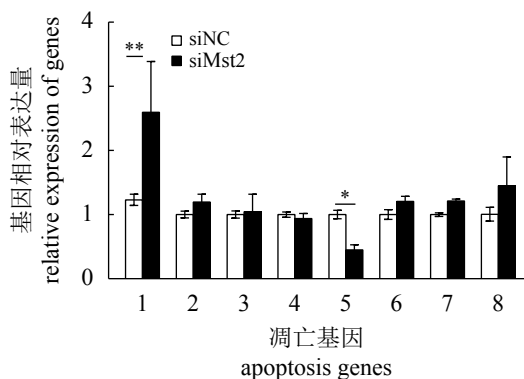


图 8 qRT-PCR 检测细胞凋亡相关基因的结果

Fig. 8 Validation of the induced apoptosis genes by qRT-PCR

1. *fas*, 2. *bad1*, 3. *bad2*, 4. *mcl1*, 5. *bcl2*, 6. *caspase-8*, 7. *caspase-9*, 8. *caspase-3*

3 讨论

RNA-seq 技术是利用高通量测序法对组织或细胞中所有的 RNA 反转录而成的 cDNA 文库进行测序。随着 RNA-seq 技术的不断发展与成熟, 该技术应用在多种鱼类中, 如牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[18]、多鳞鱈 (*Sillago sihama*)^[19]、金钱鱼 (*Scatophagus argus*)^[20] 及草鱼^[21] 等。然而, RNA-seq 技术被应用在草鱼 CIK 细胞的研究不多, 而且都集中在针对 GCRV 病毒的研究, 如 GCRV 感染 CIK 细胞后转录组的测定^[22-24]。用细菌或 LPS 应激 CIK 细胞分析转录组差异表达却鲜有报道。因此, 为了初步阐明 *mst2* 参与 CIK 细胞免疫应答的分子机理, 本研究通过在草鱼 CIK 细胞

转染 siRNA 干扰 *mst2*, 收集干扰后经 LPS 应激的样品, 采用 RNA-seq 技术进行转录组测序。转录组报告显示, 每个样品平均产出 6.40 Gb 数据, 样品比对基因组的平均比率为 78.95%, 比对基因集的平均比率为 59.78%; 共检测到表达的基因数为 22 374 个, 其中已知的基因为 21 199 个, 预测的新基因为 1 175 个; 共检测出 19 335 个新转录本。上述测序数据的各项指标表明测序质量较高, 达到后续组装分析的要求。

利用 qRT-PCR 对 38 个 DEGs 的 RNA-Seq 结果进行验证, 结果发现 qRT-PCR 和 RNA-Seq 分析一致, 说明 RNA-Seq 分析结果可靠。有研究利用 RNA-Seq 技术进行 GCRV 感染 CIK 细胞转录组测序, 部分序列注释到免疫代谢途径如内吞作用、细胞因子受体相互作用^[24]、MAPK 和自噬信号途径^[23]。本研究通过干扰 *mst2* 并经 LPS 处理后, CIK 细胞转录组中差异表达基因同样注释到 MAPK 信号通路、内吞作用、自噬和细胞因子受体相互作用代谢途径。说明在机体受到病原微生物入侵时, 上述代谢途径都会被激活并参与机体免疫应答的过程。因此, 研究表明 *mst2* 具有抗细菌免疫的功能。

Mst2 不但能诱导细胞凋亡, 在细胞增殖、存活、形态建成和运动方面都具有重要作用, 而且在病原入侵机体时起着重要的免疫功能^[7-8]。近年来, 很多研究已经报道过 Mst2 能通过直接磷酸化 FoxO 来调节下游相关基因的表达。Monsalve 等^[25]已经证明了 Mst2 可以使 FoxO1 的 S212 位点与 FoxO3 的 S207 位点磷酸化; 这 2 个位点被 Mst2 磷酸化后会抑制 FoxO 与胞浆蛋白 14-3-3 的结合, 从而促进 FoxO 进入细胞核进行转录的功能。FoxO 不仅具有启动 ROS 清除相关基因表达和调控 DNA 损伤修复的功能, 而且也具有调节细胞周期进程、细胞凋亡与糖代谢等相关基因表达的功能。FoxOs 对过量 ROS 的清除作用, 主要是 FoxOs 通过转录表达一系列抗氧化蛋白, 如过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)(包括依赖于 Mn^{2+} 的 SOD-2 和依赖于 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的 SOD-1) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (Gpx) 等^[26]。Choi 等^[27]研究发现, 敲除 *mst2* 的初始 T 细胞的 *FoxO1/3* 激活受损, 进一步导致下游 SOD-2 与 CAT 转录水平降低, 最终引起初始 T 细胞 ROS 水平上升与细胞凋亡; 但是回补持续活化的 FoxO (S207D)

或者过表达 *mst2* 却能降低 T 细胞内的 ROS 含量, 抑制 T 细胞的凋亡。综上所述, 干扰 *mst2* 会抑制 FoxOs 转录, 进而会使机体内 ROS 含量升高, 从而导致抗氧化系统损伤, 最终诱发细胞凋亡。本实验在 CIK 细胞干扰 *mst2* 后经 LPS 应激, 检测了凋亡相关基因, 结果发现, 促凋亡基因转录水平上升, 而抗凋亡基因与之相反, 此结果表明干扰 CIK 细胞 *mst2* 后经 LPS 应激, 可能会导致过量的 ROS 在 CIK 细胞中积累, 从而使细胞发生凋亡。

细胞凋亡是一个重要的生物学过程, 在胚胎发育、细胞和组织的动态平衡及免疫中起着关键作用。通过消除不必要的、不稳定的、受损的和受感染的细胞, 细胞凋亡介导了宿主对细菌、病毒、寄生虫等病原体的免疫防御^[28-32]。根据我们先前的研究, 细胞凋亡主要通过 3 条不同的途径被触发: 线粒体途径、死亡受体途径和内质网途径^[2]。在死亡受体途径中, 一些外部因子可以激活该家族在细胞膜上的成员, 如 *fas*、*fasL*, 从而激活 *caspase-8* 和 *caspase-3*, 最终导致细胞凋亡^[33]。线粒体凋亡途径会使线粒体膜上的电位发生变化, 然后导致细胞色素 C 的释放, 进而诱导 *caspase-9* 和 *caspase-3* 表达, 最终导致细胞程序性死亡^[34]。许多研究表明, 鱼体或甲壳动物受到细菌或 LPS 应激时会产生 ROS 并诱发细胞凋亡, 如草鱼^[2, 35]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[36]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[37]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[38] 及扁鲨 (*Lophius litulon*)^[39] 等。本研究通过 siRNA 干扰 CIK 细胞 *mst2* 后经 LPS 应激, 利用 qRT-PCR 检测了凋亡相关基因, 结果发现, 促凋亡基因 (*fas*、*bad1*、*bad2*、*caspase-8*、*caspase-9* 和 *caspase-3*) 转录水平上升, 而抗凋亡基因 (*bcl2*) 转录水平下降; 此结果表明, 干扰 CIK 细胞 *mst2* 后经 LPS 应激会诱发细胞发生凋亡。一方面, 可能是通过激活 Fas 死亡受体途径来招募启动型 Caspase-8; 随后 Caspase-8 直接剪切并激活 Caspase-3, 从而诱发细胞凋亡。另一方面, 可能是通过启动线粒体凋亡途径激活了促凋亡蛋白 Bad; Bad 抑制了抗凋亡蛋白 Bcl2 和 Mcl1, 从而诱导细胞色素 C 激活 Caspase-9 和 Caspase-3, 最后导致凋亡的产生, 但其中具体分子机制还有待更深入的探究。

综上所述, 本研究首次构建了通过 siRNA

干扰 CIK 细胞 *mst2* 后经 LPS 应激的 cDNA 文库, 并进行了转录组测序。通过 De novo 拼接组装获得 22 374 个 unigene, 其中 19 335 个 unigene 获得了成功注释。干扰 CIK 细胞 *mst2* 后经 LPS 应激会诱发细胞发生凋亡, 可能是 ROS 的过量积累激活了 *fas* 死亡受体途径和线粒体凋亡途径使细胞凋亡; 然而, 其具体分子机制还有待更进一步的探究。

李亚男和唐美珍为共同第一作者。

参考文献 (References):

- [1] Shen Y B, Wang L, Fu J J, *et al.* Population structure, demographic history and local adaptation of the grass carp[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 467.
- [2] Lu Z J, Yang M X, Zhang K, *et al.* *Aeromonas hydrophila* infection activates death receptor apoptosis pathway in the red blood cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 532: 735956.
- [3] Rao Y L, Wan Q Y, Su H, *et al.* ROS-induced HSP70 promotes cytoplasmic translocation of high-mobility group box 1b and stimulates antiviral autophagy in grass carp kidney cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(45): 17387-17401.
- [4] Lu Z J, Zhan F B, Yang M X, *et al.* The immune function of heme oxygenase-1 from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in response to bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 112: 168-178.
- [5] Justice R W, Zilian O, Woods D F, *et al.* The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation[J]. *Genes & Development*, 1996, 9(5): 534-546.
- [6] Scheel H, Hofmann K. A novel inter action motif, SARAH, connects three classes of tumor suppressor[J]. *Current Biology*, 2003, 13(23): R899-R900.
- [7] Dan I, Watanabe N M, Kusumi A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades[J]. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11(5): 220-230.
- [8] Graves J D, Draves K E, Gotoh Y, *et al.* Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(18): 14909-14915.
- [9] Chu P F, He L B, Xiong L, *et al.* Molecular cloning, expression analysis and localization pattern of the MST family in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 76: 316-323.
- [10] Huang Y H, Huang X H, Yan Y, *et al.* Transcriptome analysis of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) spleen in response to Singapore grouper iridovirus[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 556.
- [11] Blanca J M, Cañizares J, Ziaresolo P, *et al.* Melon transcriptome characterization: simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms discovery for high throughput genotyping across the species[J]. *The Plant Genome*, 2011, 4(2): 118-131.
- [12] Ozsolak F, Milos P M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(2): 87-98.
- [13] Long M, Zhao J, Li T T, *et al.* Transcriptomic and proteomic analyses of splenic immune mechanisms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 122: 41-54.
- [14] Polinski M P, Bradshaw J C, Inkpen S M, *et al.* De novo assembly of Sockeye salmon kidney transcriptomes reveal a limited early response to piscine reovirus with or without infectious hematopoietic necrosis virus superinfection[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 848.
- [15] Ye H, Xiao S J, Wang X Q, *et al.* Characterization of spleen transcriptome of *Schizothorax prenanti* during *Aeromonas hydrophila* Infection[J]. *Marine Biotechnology*, 2018, 20(2): 246-256.
- [16] Zhu J J, Li C, Ao Q W, *et al.* Transcriptomic profiling revealed the signatures of acute immune response in tilapia (*Oreochromis niloticus*) following *Streptococcus iniae* challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 346-353.
- [17] Wang R X, Hu X C, Lü A J, *et al.* Transcriptome analysis in the skin of *Carassius auratus* challenged with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 510-516.
- [18] Fan Z F, You F, Wang L J, *et al.* Gonadal transcriptome analysis of male and female olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *BioMed Research International*, 2014, 10(1): 1-10.

- 2014: 291067.
- [19] Tian C X, Li Z Y, Dong Z D, *et al.* Transcriptome analysis of male and female mature gonads of silver sillago (*Sillago sihama*)[J]. *Genes*, 2019, 10(2): 129.
- [20] He F X, Jiang D N, Huang Y Q, *et al.* Comparative transcriptome analysis of male and female gonads reveals sex-biased genes in spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(6): 1963-1980.
- [21] Yang M X, Lu Z J, Li F L, *et al.* Escherichia coli induced ferroptosis in red blood cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 112: 159-167.
- [22] Shang X Y, Yang C R, Wan Q Y, *et al.* The destiny of the resistance/susceptibility against GCRV is controlled by epigenetic mechanisms in CIK cells[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4551.
- [23] Chu P F, He L B, Huang R, *et al.* Autophagy inhibits grass carp reovirus (GCRV) replication and protects *Ctenopharyngodon idella* kidney (CIK) cells from excessive inflammatory responses after GCRV infection[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(9): 1296.
- [24] Chen G, He L B, Luo L F, *et al.* Transcriptomics sequencing provides insights into understanding the mechanism of grass carp reovirus infection[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 488.
- [25] Monsalve M, Olmos Y. The complex biology of FOXO[J]. *Current Drug Targets*, 2011, 12(9): 1322-1350.
- [26] Klotz L O, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, *et al.* Redox regulation of FoxO transcription factors[J]. *Redox Biology*, 2015, 6: 51-72.
- [27] Choi J, Oh S, Lee D, *et al.* Mst1-FoxO signaling protects Naïve T lymphocytes from cellular oxidative stress in mice[J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e8011.
- [28] Cohen J J, Duke R C, Fadok V A, *et al.* Apoptosis and programmed cell death in immunity[J]. *Annual Review of Immunology*, 1992, 10: 267-293.
- [29] Danial N N, Korsmeyer S J. Cell death: critical control points[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205-219.
- [30] DeLeo F R. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(4): 399-413.
- [31] Koyama A H, Adachi A, Irie H. Physiological significance of apoptosis during animal virus infection[J]. *International Reviews of Immunology*, 2003, 22(5-6): 341-359.
- [32] Sokolova I M. Apoptosis in molluscan immune defense[J]. *Invertebrate Survival Journal*, 2009, 6(1): 49-58.
- [33] Locksley R M, Killeen N, Lenardo M J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 487-501.
- [34] Brenner D, Mak T W. Mitochondrial cell death effectors[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2009, 21(6): 871-877.
- [35] Jiang J, Yin L, Li J Y, *et al.* Glutamate attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative damage and mRNA expression changes of tight junction and defensin proteins, inflammatory and apoptosis response signaling molecules in the intestine of fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 70: 473-484.
- [36] Uraga-Tovar D I, Domínguez-López M L, Madera-Sandoval R L, *et al.* Generation of oxyradicals (and H₂O₂), mitochondrial activity and induction of apoptosis of PBMC of *Cyprinus carpio* treated *in vivo* with halomethanes and with recombinant HSP60 kDa and with LPS of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2014, 36(5): 329-340.
- [37] Ko E Y, Cho S H, Kwon S H, *et al.* The roles of NF-κB and ROS in regulation of pro-inflammatory mediators of inflammation induction in LPS-stimulated zebrafish embryos[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 68: 525-529.
- [38] Nie J J, Yu Z X, Yao D F, *et al.* *Litopenaeus vannamei* sirtuin 6 homolog (*LvSIRT6*) is involved in immune response by modulating hemocytes ROS production and apoptosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 271-284.
- [39] Tian X X, Zheng J W, Xu B G, *et al.* Optimization of extraction of bioactive peptides from monkfish (*Lophius litulon*) and characterization of their role in H₂O₂-induced lesion[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(9): 468.

Mechanism of *mst2* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during the immune response

LI Yanan, TANG Meizhen, LU Zhijie, LIN Li*, QIN Zhendong*

(Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: In recent years, RNA-seq technology has been used in fish researches. The transcriptome analysis in *Ctenopharyngodon idella* kidney cell lines (CIK) is focused on virus, and that based on bacteria or lipopolysaccharide (LPS) is rarely reported. In order to elucidate the mechanism of mammalian sterile20-like kinase 2 (*mst2*) in *C. idella* during immune response, we analyzed and verified the transcriptome sequence of CIK incubated with LPS after being interfered with *mst2* by small interfering RNA technology (siRNA). Firstly, a total of 22 374 unigenes were obtained from the original sequence data by De novo assembly, of which 21 199 genes were known and 1 175 new genes were predicted. Secondly, the analysis of unigenes expression showed that there were 38 differential genes (differentially expressed genes, DEGs) including 16 up-regulated genes and 22 down-regulated genes. Thirdly, 38 DEGs were verified by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results showed that the qRT-PCR analysis was consistent with transcriptome sequencing, indicating that the transcriptome sequencing was reliable. 38 DEGs in CIK cells were mainly involved in immune metabolism pathway, containing MAPK signal pathway, endocytosis pathway, autophagy pathway and cytokine receptor interaction pathway. Moreover, after being interfered with *mst2* and treated with LPS, the detection of apoptosis-related genes showed that the transcriptional levels of pro-apoptotic genes (*fas*, *bad1*, *bad2*, *caspase-3*, *caspase-8* and *caspase-9*) were up-regulated, while the anti-apoptotic genes (*bcl2*) were down-regulated. Therefore, it was proved that interfering *mst2* could induce cell apoptosis after LPS treatment. To sum up, *mst2* can participate in the body's immune response by regulating apoptosis-related processes. The present results preliminarily clarified the molecular mechanism of *mst2* in grass carp during immune response, and may provide some basic theoretical reference for the prevention and control of grass carp bacterial diseases.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *mst2*; CIK cell lines; RNA-Seq; cell apoptosis

Corresponding authors: LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn;

QIN Zhendong. E-mail: qinzhendongsc@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (42006115); Guangdong Province and Applied Basic Research Fund Project (2020A1515110826)