

文章编号: 1000-0615(2019)02-0389-11

DOI: 10.11964/jfc.20171211104

仿刺参基质金属蛋白酶基因MMP-16的克隆及表达

李石磊¹, 杨爱馥^{1,2}, 董颖¹, 高杉¹,
陈仲¹, 孙红娟¹, 周遵春^{1*}

(1. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁大连 116023;

2. 大连出入境检验检疫局, 国家水产品检测重点实验室, 辽宁大连 116600)

摘要: 基质金属蛋白酶(MMPs)是一种能够降解细胞外基质的蛋白水解酶类。为研究MMPs在仿刺参免疫防御中的作用, 本实验采用RACE技术克隆了仿刺参基质金属蛋白酶16基因(*Aj-MMP-16*)的cDNA全长序列, 并对其序列特征和功能进行了初步分析; 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法, 分别分析了*Aj-MMP-16*基因在仿刺参不同组织、不同“化皮”体壁组织以及病原菌刺激后体腔细胞中的表达情况。结果显示, *Aj-MMP-16*基因的cDNA全长为2 976 bp, 包括一个342 bp的5'非编码区, 一个963 bp的3'非编码区; 开放阅读框(ORF)为1 671 bp, 编码557个氨基酸, 预测蛋白分子量为63.11 ku, 等电点为4.79。*Aj-MMP-16*具有典型的MMPs家族蛋白结构: N-端前肽区、铰链区、催化区、C-端类血红素结合区和跨膜区。*Aj-MMP-16*与其他物种的MMPs具有一定的相似性, 与紫色球海胆的MMP-16相似性最高。*Aj-MMP-16*基因mRNA在仿刺参各组织中均有表达, 表达量由高到低为呼吸树、肠、体腔细胞、管足、肌肉、体壁; 在“化皮病”不同阶段, *Aj-MMP-16*基因mRNA在“化皮”体壁组织中的表达量显著高于正常体壁组织; 灿烂弧菌和蜡样芽孢杆菌刺激后, 体腔细胞中*Aj-MMP-16*基因mRNA表达量显著升高。*Aj-MMP-16*基因可能在仿刺参内脏再生、炎症发生以及免疫应答中起着重要的作用。

关键词: 仿刺参; 基质金属蛋白酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q 785; S 968.9

文献标志码: A

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是指由细胞分泌并分布在细胞表面或细胞间隙的大分子物质, 由胶原蛋白、蛋白聚糖和纤维蛋白等组成, 参与细胞生长、分化和信号传导等^[1-4]。ECM在大多数蛋白酶作用下均稳定存在, 但在基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的作用下可发生裂解。MMPs是一类依赖Zn²⁺等金属离子的蛋白水解酶类, 是降解ECM最重要的酶系。MMPs对胚胎发育、炎症反应、组织再生和修复等有着重要的作用, 广泛存在于动、植物和微生物体内^[5-7]。

MMPs是一个蛋白酶家族, 根据其成员的底

物专一性、序列相似性和结构域组成不同可分为(1)胶原酶: 将三螺旋的胶原蛋白特异性切割成小的片段, 主要包括MMP-1、MMP-8、MMP-13^[8]; (2)明胶酶: 能够降解变性胶原和明胶, 包括MMP-2和MMP-9^[9]; (3)基质溶解酶: 包括MMP-3、MMP-10和MMP-11, 可降解ECM中的蛋白多糖、纤维蛋白和层粘连蛋白, 并参与MMPs酶原的激活作用^[10]; (4)基质分解素: 均缺少C末端类血红素结构域, 包括MMP-7和MMP-26^[11]; (5)膜结合型MMPs: 在哺乳动物体内存在2种糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白(MMP-17和MMP-25)和4种I型穿膜蛋白(MMP-14、MMP-15、

收稿日期: 2017-12-25 修回日期: 2018-04-16

资助项目: 国家自然科学基金(31672688); 辽宁省自然科学基金(2015020786); 辽宁省科技计划项目(2017203005); 辽宁省海洋渔业厅科研项目(201608)

通信作者: 周遵春, E-mail: zunchunz@hotmail.com

MMP-16和MMP-24),膜结合型MMPs能激活MMP-2酶原^[12]; (6)其他MMPs: MMP-12、MMP-19、MMP-20、MMP-22、MMP-23等,这些MMPs缺少明显的分类特征。

水产动物MMPs的相关研究较多,如鱼类中的斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、小青鳉(*Oryzias minutillus*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)等^[13-16],贝类中的马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)、杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)等^[17-19],棘皮动物中的紫色球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)、仿刺参(*Apostichopus japonicus*)等^[20-23]。仿刺参是棘皮动物门的典型代表生物,具有排脏、再生、自溶等生物学特性,因此非常适合作为研究MMPs的模式生物。同时,仿刺参具有较高的营养价值和经济价值,是我国海水增养殖的重要品种之一。随着养殖规模的不断扩大,病害问题也愈发严重。开展仿刺参免疫相关基因的功能和作用机制研究,对病害防控具有重要意义。本研究采用cDNA末端快速克隆技术(RACE),克隆仿刺参基质金属蛋白酶16基因(*Aj-MMP-16*)的cDNA全长序列,对其结构域和氨基酸序列的特征进行了初步分析,并研究了该基因mRNA在仿刺参不同组织、“化皮病”发生不同阶段以及病原菌刺激条件下的表达变化情况,为进一步探索仿刺参*Aj-MMP-16*基因的免疫防御机理提供理论基础,也为深入研究仿刺参MMPs蛋白的结构和功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物 实验用健康仿刺参[体质量(10.0±1.2)g]取自辽宁省海洋水产科学研究院引育种中心,采用沙滤海水暂养,期间水温18℃,盐度32, pH7.8,保持充气。

实验菌株 实验用菌为灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),细菌浓度以单位体积液体中含有的菌落形成单位(colony-forming units, CFU)表示。将上述2种细菌在28℃、150 r/min的条件下培养至对数生长期后期,各取细菌培养悬液在4 000 r/min条件下4℃离心15 min,弃上清液,用生理盐水分别重悬各细菌沉淀至终浓度为10¹¹ CFU/mL,用于仿刺参体腔注射。

1.2 实验方法

全长cDNA扩增 通过仿刺参转录组测序获得*Aj-MMP-16*基因的部分cDNA序列^[24]。利用Primer Premier 5.0设计特异性引物(表1)。全长扩增采用SMART RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa)试剂盒,通过巢式PCR进行5'和3'末端序列的扩增,第1轮PCR反应条件为94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5个循环; 94℃ 30 s,

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
MMP-16-3'-RACE-1P	GGCTGCCACGAGATTGGACAC	3'-RACE
MMP-16-3'-RACE-2P	TAGGATGGGCGGTGTATTCGTGA	3'-RACE
MMP-16-5'-RACE-1P	AGGTCCAAAGCGTGAGCGAGG	5'-RACE
MMP-16-5'-RACE-2P	ATCGGGTTCAGAGCGGCGTAGG	5'-RACE
UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGC -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3'和5'-RACE
UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	3'和5'-RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3'和5'-RACE
MMP-16-Qpcr-F	GTGGCAAACATTTATCCCGAGG	荧光定量 qRT-PCR
MMP-16-Qpcr-R	TGGGCAGCCACTAAAAACAGGT	荧光定量 qRT-PCR
Cytb-Qpcr-F	TGAGCCGCAACAGTAATC	内参基因 reference gene
Cytb-Qpcr-R	AAGGGAAAAGGAAGTGAAAG	内参基因 reference gene

68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 30个循环; 72 °C 10 min, 4 °C保温。以第1轮PCR产物为模板,进行第2轮PCR反应,反应条件为94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 30个循环; 72 °C 10 min, 4 °C保温。

扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离检测,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

序列分析 开放阅读框(ORF)和氨基酸序列预测采用ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)。通过SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行信号肽预测和基因结构分析。多重序列比对和系统发育分析使用软件MEGA 6.0, Neighbor-Joining法构建系统发育树。

RNA提取 采用动物组织总RNA提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司)提取仿刺参不同组织及细菌刺激后体腔细胞的总RNA,电泳检测RNA的完整性。用核酸蛋白分析仪(型号NanoPhotometer,德国Implen公司)检测RNA的纯度和浓度。

仿刺参“化皮病”实验群体的构建 参照Yang等^[24]的方法构建仿刺参“化皮病”实验群体。100头仿刺参暂养在2个水槽中(80 cm×45 cm×45 cm),用手术刀在每个个体背部切十字形小口(0.5 cm×0.5 cm),将水槽中灿烂弧菌浓度调至 5×10^9 CFU/mL,实验期间每天换水1/4并补充灿烂弧菌。将仿刺参“化皮病”分成I期(早期)、II期(中期)和III期(后期)3个病变阶段,“化皮”I期:仿刺参体壁出现1个白色溃疡斑点(直径<0.2 cm),未吐脏,具有附着能力;“化皮”II期:仿刺参体壁出现2~3个溃疡斑点(0.2 cm<直径<0.5 cm),未吐脏,具有附着能力;“化皮”III期:仿刺参体壁出现深度大面积溃疡,吐脏,失去附着能力。每个发病阶段各取15只仿刺参,每5只仿刺参取病变体壁组织(溃疡处)和正常体壁组织分别混合,迅速投入液氮中冷冻,于-80 °C冰箱保存备用。

病原菌刺激 选用两种“仿刺参腐皮综合症”病原菌作为刺激实验菌株,分别为灿烂弧菌(革兰氏阴性菌)和蜡样芽孢杆菌(革兰氏阳性菌)^[25-26]。实验共分为9组:对照组、灿烂弧菌组、蜡样芽孢杆菌组各3个平行实验组,每组仿

刺参40只,实验期间不投饵,无个体死亡。对照组中,用1 mL灭菌注射器向每只仿刺参的体腔注射50 μL生理盐水;实验组中,用同样的方法向每只仿刺参注射50 μL对应的细菌生理盐水悬液。注射后4、12、24、48、72和96 h分别从各实验组中取5只仿刺参,解剖获得体腔液。将同组内5只仿刺参的体腔液混匀后,分装于EP管中,4000 r/min条件下4 °C离心10 min,弃上清液,将体腔细胞迅速投入液氮中冷冻,于-80 °C冰箱保存备用。

实时荧光定量PCR (qRT-PCR)分析 每个样品的总RNA用PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa)进行反转录,反应体积及反应条件按照说明书进行。根据转录组获得的基因序列信息,设计qRT-PCR实验所需引物, *Cytb*作为内参基因^[27]。qRT-PCR采用SYBR Green I染料法(SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit II, TaKaRa),在Mx3005p™ 荧光定量PCR仪(Stratagene, La Jolla, CA, USA)上进行。反应终体积20 μL,包括10 μL 2×SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RnaseH Plus), 0.4 μL ROX Reference Dye II, 2 μL cDNA样品,引物各0.4 μmol/L, 6.8 μL去离子水。反应条件:95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 56 °C 25 s, 72 °C 25 s, 40个循环。每个样品进行3次重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算mRNA相对表达量^[28]。

数据分析 所得数据用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)及Duncan氏多重比较,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 Aj-MMP-16基因的cDNA序列分析

Aj-MMP-16基因的cDNA序列全长为2 976 bp, GenBank登录号MF 538722,包括一个342 bp的5'端非编码区,一个963 bp的3'端非编码区;开放阅读框(ORF)为1 671 bp,编码557个氨基酸,预测蛋白分子量为63.11 ku,等电点为4.79。氨基酸序列分析表明,Aj-MMP-16包含N-端前肽区(prodomain)、铰链区(hinge region)、催化区(catalytic domain)和C-端类血红素结合区(hemopexin domain)4个结构域,为典型的MMPs家族蛋白结构(图1)。除此以外,Aj-MMP-16作为膜结合型MMPs,还具有一个跨膜螺旋区。前肽区有一个半胱氨酸开关;催化区具有高度保守的HEXGH-XXGXXH序列,为催化活性中心,并含有一个

金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)的结合位点; 铰链区是催化区与类血红素结合蛋白相间的区域; 类血红素结合区包含4个类似的β折叠, 形成一种四叶片螺旋桨式

结构(four-bladed β-propeller structure)。

2.2 Aj-MMP-16的同源分析

在NCBI蛋白质数据库中采用BLASTp对Aj-

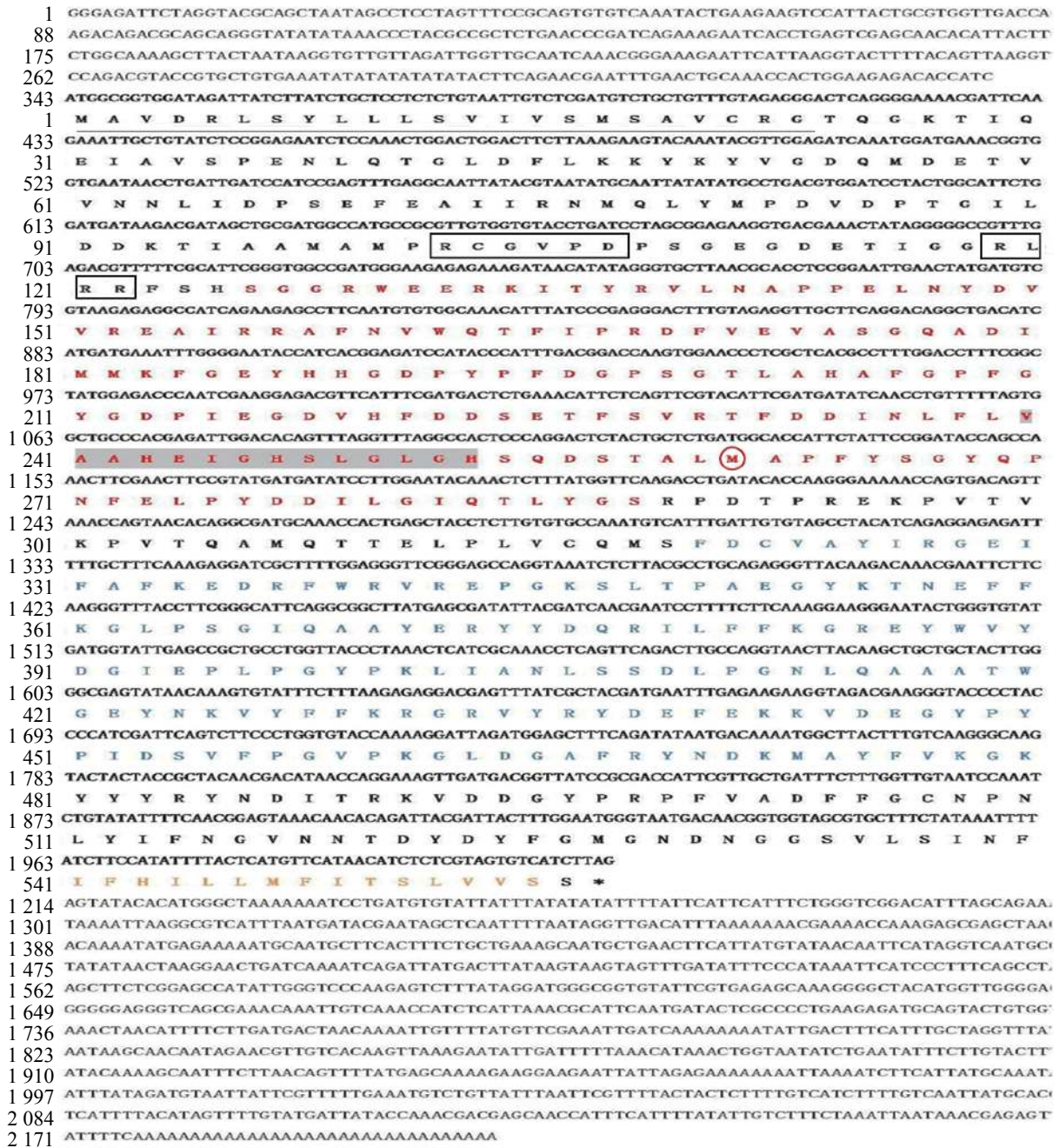


图1 Aj-MMP-16基因的cDNA序列及氨基酸序列

下划线表示信号肽; 两个加框的序列分别表示半胱氨酸开关和激活序列; 红色表示催化区; 阴影序列表示催化活性中心序列; 画圈的氨基酸表示甲硫氨酸残基; 蓝色表示4个重复序列类血红素蛋白结构域; 黄色表示跨膜螺旋区; *表示终止密码子

Fig. 1 The full-length cDNA and amino acid sequence of Aj-MMP-16

Underline was signal peptide; two boxed sequences indicate cysteine switch and activation sequence respectively; red was catalytic zone; shadow sequence was catalytic center sequence; circle was amino acid methionine residues; blue were four repeat sequences of hemopexin domain; yellow was transmembrane region; * was the termination codon

MMP-16氨基酸序列进行同源性检索发现, 其与紫色球海胆MMP-16相似度最高, 为45%; 与虹鲚(*Poecilia reticulata*)的相似度为40%; 与美洲野牛(*Bison bison*)的相似度为39%; 与长棘海星(*Acanthaster planci*)、北非果蝠(*Rousettus aegyptiacus*)、绒鼠(*Chinchilla lanigera*)和白喉鸚(*Tinamus guttatus*)的相似度为38%(图2)。

2.3 Aj-MMP-16进化分析

利用MEGA 6.0软件邻接法构建相关氨基酸的系统进化树。结果显示, 哺乳动物MMP-16为一亚支, 鸟类MMP-16为一亚支, 爬行动物为一亚支, Aj-MMP-16和海胆MMP-16为一亚支, 与传统分类相吻合。不同基因间聚类结果显示, MMP-16聚为一亚支, MMP-24聚为一亚支, MMP-14聚为一亚支, Aj-MMP-16和海胆的MMP-16聚为一亚支(图3)。

2.4 Aj-MMP-16基因在仿刺参不同组织中的表达分析

qRT-PCR检测结果显示, *Aj-MMP-16*基因mRNA在仿刺参体壁、肌肉、管足、呼吸树、肠和体腔细胞中均有表达, 并且在呼吸树中的表达量最高, 显著高于在其他组织中的表达量($P < 0.05$), 在肠中的表达量次之, 在体壁中的表达量最低, 肌肉和管足之间的差异不显著($P > 0.05$), 但与其他各组织表达量差异显著($P < 0.05$)(图4)。

2.5 Aj-MMP-16基因在“化皮”仿刺参体壁中的表达分析

qRT-PCR检测结果显示, 在“化皮”I、II、III阶段, *Aj-MMP-16*基因mRNA在“化皮”体壁组织中的表达量分别是在正常体壁中表达量的16倍、6倍和44倍(图5)。随着“化皮”程度的加深, *Aj-MMP-16*基因mRNA在“化皮”体壁组织中

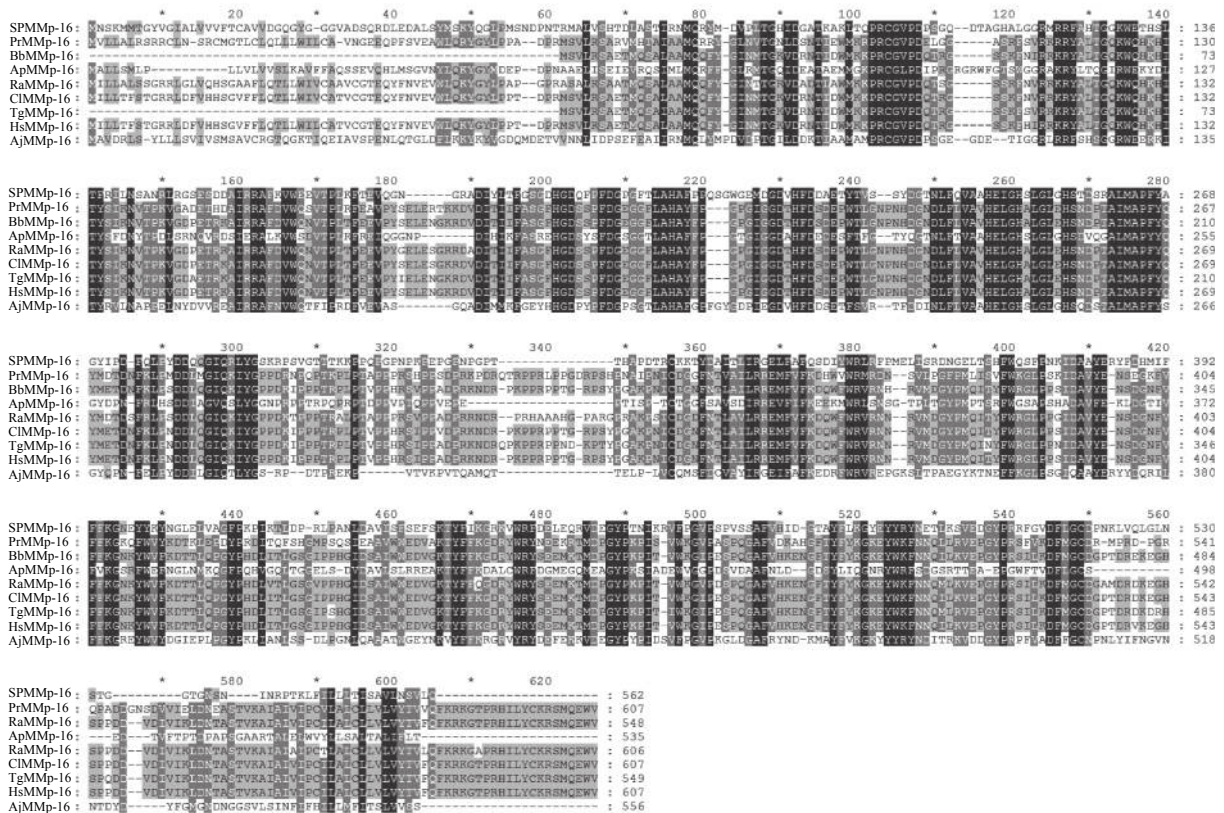


图2 Aj-MMP-16氨基酸序列与其他物种的同源性比较

SpMMP-16 (紫色球海胆, *S. purpuratus*, AY878927); PrMMP-16 (虹鲚, *P. reticulata*, XM_008438393); BbMMP-16 (美洲野牛, *B. bison*, XP_010860429); ApMMP-16 (长棘海星, *A. planci*, XP_022103714); RaMMP-16 (北非果蝠, *R. aegyptiacus*, XP_016008643); CIMMP-16 (绒鼠, *C. lanigera*, XP_005381812); TgMMP-16 (白喉鸚, *T. guttatus*, XP_010220738); HsMMP-16 (人, *Homo sapiens*, NM_005941); AjMMP-16 (仿刺参, *A. japonicus*, MF 538722)

Fig. 2 The multiple sequence alignment of Aj-MMP-16 amino acid sequences

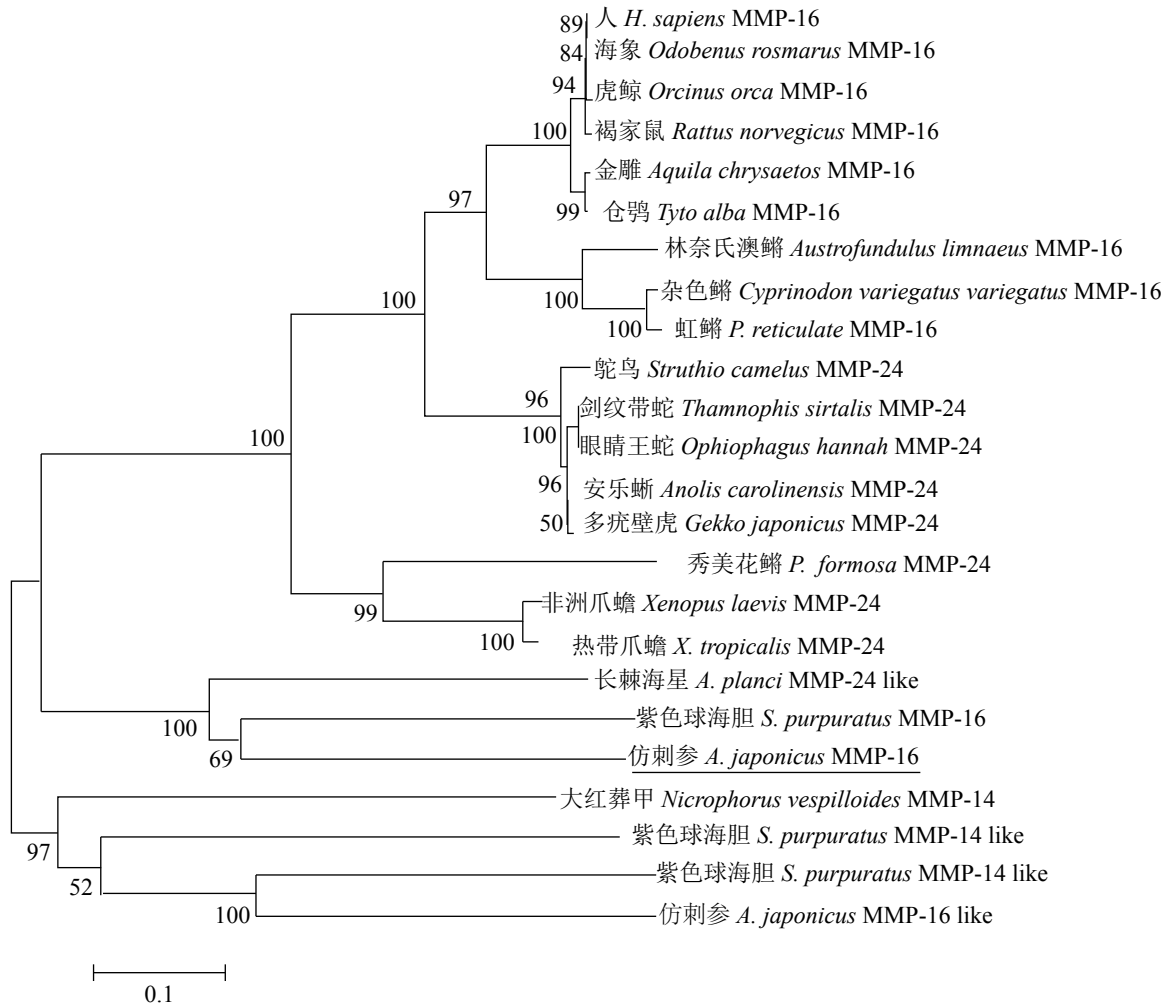


图 3 基于MMPs家族氨基酸序列的系统进化树

H. sapiens MMP-16 (人:NM_005941); *O. rosmarus* MMP-16 (海象:XM_004413624); *O. orca* MMP-16 (虎鲸:XM_004276143); *R. norvegicus* MMP-16 (褐家鼠:NM_080776); *A. chrysaetos* MMP-16 (金雕:XM_011595588); *T. alba* MMP-16(仓鸮:XM_009967635); *A. limnaeus* MMP-16 (林奈氏澳鲂:XM_014032474); *C. variegatus* MMP-16 (杂色鲮:XM_015391257); *P. reticulata* MMP-16 (虹鲮:XM_008438393); *S. camelus* MMP-24 (鸵鸟:XM_009679289); *T. sirtalis* MMP-24 (剑纹带蛇: XM_014059304); *O. hannah* MMP-24 (眼镜王蛇: ETE69143); *A. carolinensis* MMP-24 (安乐蜥:XM_008109937); *G. japonicus* MMP-24(多疣壁虎:XM_015408213); *P. formosa* MMP-14 (秀美花鲮:XM_007563680); *X. laevis* MMP-14 (非洲爪蟾:NM_001091009); *X. tropicalis* MMP-14 (热带爪蟾:NM_001030388); *A. planci* MMP-24 like (长棘海星: XP_022103712); *S. purpuratus* MMP-16 (紫色球海胆:AY878927); *A. japonicus* MMP-16 (仿刺参: MF538722); *N. vespilloides* MMP-14 (大红葬甲:XP_017781285); *S. purpuratus* MMP-24 like (紫色球海胆:XM_011685933); *S. purpuratus* MMP-14 like (紫色球海胆:XM_011669009); *A. japonicus* MMP-16 like (仿刺参: KX372220)

Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of MMPs

的表达量呈现出先升高后降低, 然后再升高的趋势。

2.6 病原菌刺激后Aj-MMP-16基因表达变化

*Aj-MMP-16*基因mRNA在灿烂弧菌刺激后表达量相比对照组有显著提高($P<0.05$), 刺激后4 h的表达量最高, 显著高于其他时间($P<0.05$); 刺激后12 h表达量有所下降, 但仍然显著高于对照组($P<0.05$); 24~96 h, *Aj-MMP-16*基因mRNA表

达量呈现出逐渐下降的趋势, 但相比于对照组显著上调($P<0.05$)(图6)。

受蜡样芽孢杆菌刺激后, *Aj-MMP-16*基因mRNA的时序表达规律显示, 刺激后4 h表达量就有显著上调, 12 h时有所下降, 在24 h达到顶峰, 刺激后48~96 h表达量都在较高水平。刺激后12 h, 刺参体腔细胞中*Aj-MMP-16*基因mRNA的表达量最低, 与对照组差异不显著。刺激后其他时间点*Aj-MMP-16*基因mRNA的表达量较对

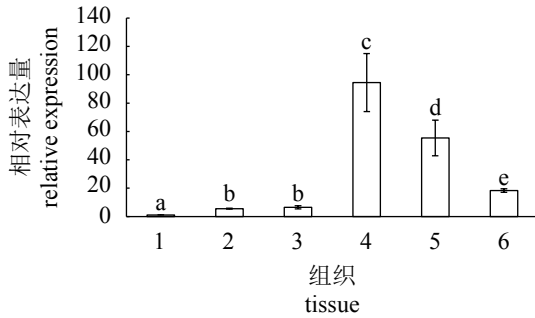


图4 Aj-MMP-16基因在不同组织中表达情况

1.体壁, 2.肌肉, 3.管足, 4.呼吸树, 5.肠, 6.体腔细胞; 不同字母表示差异显著($P<0.05$); 下同

Fig. 4 Expression analysis of Aj-MMP-16 mRNA in different tissues

1. body wall, 2. muscle, 3. tube feet, 4. respiratory tree, 5. intestine, 6. coelomocytes; different letters mean significant differences at the $P<0.05$ level; the same below

对照组均有显著提高($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 Aj-MMP-16氨基酸序列及比对分析

Aj-MMP-16包含N-端前肽区、催化区、铰链区、C-端类血红素结合区和跨膜螺旋区等典型的MMPs蛋白结构。前肽区半胱氨酸开关(PRCGVDP)中的半胱氨酸残基(C)能与 Zn^{2+} 形成分子内复合物, 阻碍活性位点与 Zn^{2+} 的结合, 从而使蛋白酶丧失生物学活性, 因此半胱氨酸残基在酶原被

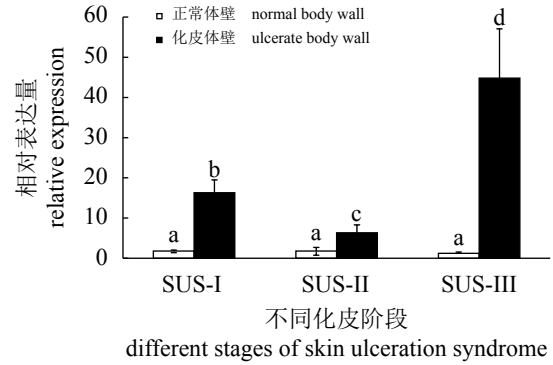


图5 Aj-MMP-16基因在不同“化皮”阶段表达情况

SUS-I. “化皮”I期; SUS-II. “化皮”II期; SUS-III. “化皮”III期

Fig. 5 Expression Analysis of Aj-MMP-16 mRNA at different stages of skin ulceration syndrome

SUS-I. skin ulceration syndrome I; SUS-II. skin ulceration syndrome II; SUS-III. skin ulceration syndrome III

激活过程中被水解, 使得酶原被激活^[29]。催化中心HEXGHXXGXXH中的3个组氨酸残基(H)可与 Zn^{2+} 配体形成配位键, 甲硫氨酸残基会形成拐角, 保护 Zn^{2+} ^[30]。铰链区具柔韧性, 可由催化区和类血红素结合区做不同朝向运动。类血红素结合区与底物特异性识别有关, 由其引导的蛋白间相互作用对于MMPs自身的激活、定位和降解过程具有重要意义^[31-32]。跨膜螺旋区存在于膜结合型MMPs中, 有将该类MMPs固定于细胞膜上的作用。膜结合型MMPs定位在肿瘤细胞及其基质成纤维细胞的细胞膜上, 是MMPs的受体,

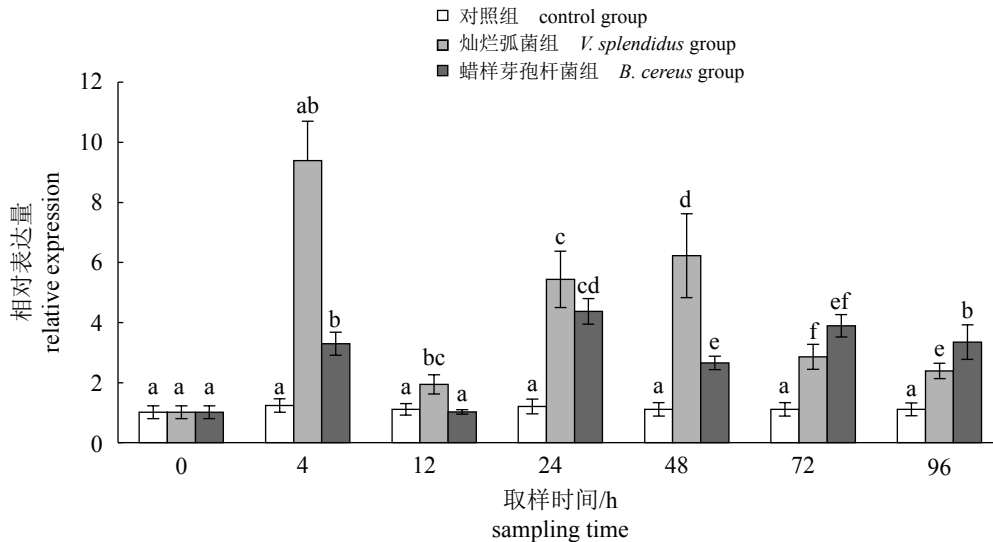


图6 病原菌刺激后Aj-MMP-16基因表达情况

Fig. 6 Expression analysis of Aj-MMP-16 mRNA after the pathogenic bacteria challenge

也是MMPs的激活剂,而且还可降解不同型胶原。多序列比对结果显示,Aj-MMP-16与其他类型MMPs具有序列保守性,系统发育分析显示Aj-MMP-16和紫色球海胆MMP-16聚为一亚支。

3.2 Aj-MMP-16基因表达分析

细胞外基质积极参加多种生物过程,包括胚胎发育、形态发生、器官形成和组织再生。而金属基质蛋白酶家族基因可以通过有选择的降解ECM成分释放隐性生长激素,进而对细胞外基质调节发挥重要作用^[33-34]。有研究表明,紫色球海胆MMP-14和MMP-16基因在受精卵孵化过程中起着重要作用^[21];格氏海参(*Holothuria glaberrima*)肠道再生过程中检测到有4种金属蛋白酶的存在^[22],推测可能在ECM重组和内脏再生过程中发挥重要作用;在仿刺参排脏和肠再生的过程中,MMP-2 like和MMP-16 like这2个基因可能参与调节ECM成分与生长因子之间的相互作用和促进细胞迁移^[35]。仿刺参的排脏与再生是其生物学特征之一,在受到刺激或处于不良环境时,刺参通过身体剧烈收缩,将呼吸树、消化道等内脏器官由肛门排出体外,当环境条件适合时,能再生出新的内脏器官^[36]。在本研究中,Aj-MMP-16基因在仿刺参呼吸树、肠和体腔细胞中高表达,推测该基因可能会在仿刺参内脏再生过程中发挥重要作用。

MMPs参与调控机体的免疫防御和炎症发生^[37-38]。有研究表明,MMPs在人类慢性静脉溃疡和感染性疾病中发挥核心作用,在持久的慢性静脉溃疡过程中MMP-1和MMP-8基因过表达;MMP-9基因不但参与静脉溃疡的愈合阶段,其SNP位点多态性还与压力溃疡发生相关^[39-41]。从病原菌感染开始产生溃疡至大面积溃疡,Aj-MMP-16基因mRNA在仿刺参“化皮”不同阶段病变体壁组织中高水平表达,说明该基因可能在仿刺参体壁溃疡发生和愈合过程中起着重要作用。Aj-MMP-16基因mRNA在“化皮”阶段表现出升高-降低-再升高的表达变化趋势,这与MMP-24、MMP-24 preproprotein-like、Mucin-2和Zonadhesin-like等基因在仿刺参“化皮”不同阶段的表达趋势一致^[24]。仿刺参“化皮病”的发生发展是一个多基因调控、多因素参与的动态复杂过程,其发病机制尚未阐明,Aj-MMP-16基因在仿刺参化皮过程中所参与的信号通路及调控机制值得

进一步研究。

在病原菌刺激后,仿刺参体腔细胞中Aj-MMP-16基因mRNA表达量较刺激前显著上调。此类情况在其他水产动物的MMPs研究中也较多报道。外源细菌感染后,黄颡鱼(*Pelteobagrus fluvidraco*)4种组织器官中MMP-9基因表达量大幅上升^[42];马氏珠母贝血液中MMP-17基因表达量在脂多糖刺激后12 h达到最大值^[17]。仿刺参免疫系统属于非特异性免疫,细胞免疫是其主要的防御机制之一。在受到外界抗原物质刺激时,体腔细胞首先向外源物质迁移,膜结合型MMPs可以锚定在细胞膜上,并在细胞表面活动,参与调节细胞的迁移、生长、分化和存活,促进伤口的愈合^[43-44]。因此推测Aj-MMP-16基因mRNA的高表达可能有利于体腔细胞在仿刺参体内的迁移,在机体抵抗细菌入侵的免疫防御中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Michel G, Tonon T, Scornet D, *et al.* The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in eukaryotes[J]. *New Phytologist*, 2010, 188(1): 82-97.
- [2] Paye A, Truong A, Yip C, *et al.* EGFR activation and signaling in cancer cells are enhanced by the membrane-bound metalloprotease MT4-MMP[J]. *Cancer Research*, 2014, 74(23): 6758-6770.
- [3] Olczyk P, Mencner Ł, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 747584.
- [4] Abedin M, King N. Diverse evolutionary paths to cell adhesion[J]. *Trends in Cell Biology*, 2010, 20(12): 734-742.
- [5] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry[J]. *Circulation Research*, 2003, 92(8): 827-839.
- [6] VanSaun M N, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease[J]. *Birth Defects Research-Part C: Embryo Today: Reviews*, 2006, 78(1): 69-79.
- [7] Massova I, Kotra L P, Fridman R, *et al.* Matrix

- metalloproteinases: structures, evolution, and diversification[J]. *The FASEB Journal*, 1998, 12(12): 1075-1095.
- [8] Rojkind M. Role of metalloproteinases in liver fibrosis[J]. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 1999, 23(5): 934-939.
- [9] Belotti D, Paganoni P, Manenti L, *et al.* Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells[J]. *Cancer Research*, 2003, 63(17): 5224-5229.
- [10] Pei D, Majmudar G, Weiss S J. Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(41): 25849-25855.
- [11] Freitas V S, de Araújo C R F, Alves P M, *et al.* Immunohistochemical expression of matrilysins (MMP-7 and MMP-26) in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors[J]. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2009, 108(3): 417-424.
- [12] Puttabatappa M, Jacot T A, Al-Alem L F, *et al.* Ovarian membrane-type matrix metalloproteinases: induction of MMP14 and MMP16 during the periovulatory period in the rat, macaque, and human[J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 91(2): 34.
- [13] Bugel S M, Wehmas L C, La Du J K, *et al.* Phenotype anchoring in zebrafish reveals a potential role for matrix metalloproteinases (MMPs) in tamoxifen's effects on skin epithelium[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2016, 296: 31-41.
- [14] Wang C, Zhan C L, Cai Q F, *et al.* Expression and characterization of common carp (*Cyprinus carpio*) matrix metalloproteinase-2 and its activity against type I collagen[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 177: 45-52.
- [15] Ogiwara K, Takano N, Shinohara M, *et al.* Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the medaka[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(24): 8442-8447.
- [16] Tsukamoto H, Yokoyama Y, Suzuki T, *et al.* Molecular cloning and expression of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the pufferfish *Takifugu rubripes*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 148(3): 295-302.
- [17] 罗少杰, 闫芳, 郑哲, 等. 马氏珠母贝基质金属蛋白酶基因MMP-17的克隆及表达分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(7): 978-988.
- Luo S J, Yan F, Zheng Z, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of matrix metalloproteinase 17 gene from *Pinctada martensii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(7): 978-988(in Chinese).
- [18] 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.
- [19] Chovar-Vera O, Valenzuela-Muñoz V, Gallardo-Escárate C. Molecular characterization of collagen IV evidences early transcription expression related to the immune response against bacterial infection in the red abalone (*Haliotis rufescens*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 241-248.
- [20] Lepage T, Gache C. Purification and characterization of the sea urchin embryo hatching enzyme[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(9): 4787-4793.
- [21] Ingersoll E P, Pendharkar N C. Characterization and expression of two matrix metalloproteinase genes during sea urchin development[J]. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5(6): 727-732.
- [22] Quiñones J L, Rosa R, Ruiz D L, *et al.* Extracellular matrix remodeling and metalloproteinase involvement during intestine regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*[J]. *Developmental Biology*, 2002, 250(1): 181-197.
- [23] Wu H L, Hu Y Q, Shen J D, *et al.* Identification of a novel gelatinolytic metalloproteinase (GMP) in the body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its involvement in collagen degradation[J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(5-6): 871-877.
- [24] Yang A F, Zhou Z C, Pan Y J, *et al.* RNA sequencing analysis to capture the transcriptome landscape during skin ulceration syndrome progression in sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 459.
- [25] 汪笑宇, 周遵春, 关晓燕, 等. 仿刺参及养殖环境中溶

- 藻弧菌和灿烂弧菌的PCR快速检测[J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(3): 125-130.
- Wang X Y, Zhou Z C, Guan X Y, *et al.* Rapid PCR detection for *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* in sea cucumber *Apostichopus japonicus* and its culturing environment[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(3): 125-130(in Chinese).
- [26] 艾海新, 于晶晶, 郑方亮, 等. 刺参“腐皮综合症”致病菌 LNUB415 的分离及防治的初步研究[J]. *微生物学杂志*, 2012, 32(2): 68-72.
- Ai H X, Yu J J, Zheng F L, *et al.* Isolation and control of pathogen bacteria LNUB415 that caused “Skin Ulcer Syndrome” on spinous sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 32(2): 68-72(in Chinese).
- [27] 杨爱馥, 周遵春, 董颖, 等. 仿刺参 *cytb* 和 β -*actin* 基因表达稳定性比较[J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(1): 79-84.
- Yang A F, Zhou Z C, Dong Y, *et al.* Stability comparison of *cytb* and β -*actin* genes expression in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(1): 79-84(in Chinese).
- [28] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [29] Van Wart H E, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(14): 5578-5582.
- [30] Jiang W P, Bond J S. Families of metalloendopeptidases and their relationships[J]. *FEBS Letters*, 1992, 312(2-3): 110-114.
- [31] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs[J]. *Cardiovascular Research*, 2006, 69(3): 562-573.
- [32] Overall C M. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites[J]. *Molecular Biotechnology*, 2002, 22(1): 51-86.
- [33] Roy R, Yang J, Moses M A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(31): 5287-5297.
- [34] Hatfield K J, Reikvam H, Bruserud Ø. The crosstalk between the matrix metalloprotease system and the chemokine network in acute myeloid leukemia[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(36): 4448-4461.
- [35] Miao T, Wan Z X, Sun L N, *et al.* Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases (ajMMP-2 like and ajMMP-16 like) characterization during intestine regeneration of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 212: 12-23.
- [36] 杨红生, 周毅, 张涛. 刺参生物学——理论与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2014.
- Yang H S, Zhou Y, Zhang T. The Biology of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*: theory and Practice[M]. Beijing: Science Press, 2014(in Chinese).
- [37] Mott J D, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, 16(5): 558-564.
- [38] Majkowska I, Shitomi Y, Ito N, *et al.* Discoidin domain receptor 2 mediates collagen-induced activation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human fibroblasts[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(16): 6633-6643.
- [39] Serra R, Grande R, Buffone G, *et al.* Extracellular matrix assessment of infected chronic venous leg ulcers: role of metalloproteinases and inflammatory cytokines[J]. *International Wound Journal*, 2016, 13(1): 53-58.
- [40] Amato B, Coretti G, Compagna R, *et al.* Role of matrix metalloproteinases in non-healing venous ulcers[J]. *International Wound Journal*, 2015, 12(6): 641-645.
- [41] Latifa K, Sondess S, Hajer G, *et al.* Evaluation of physiological risk factors, oxidant-antioxidant imbalance, proteolytic and genetic variations of matrix metalloproteinase-9 in patients with pressure ulcer[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29371.
- [42] Ke F, Wang Y, Hong J, *et al.* Characterization of MMP-9 gene from a normalized cDNA library of kidney tissue of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Fish &*

- [Shellfish Immunology](#), 2015, 45(2): 260-267. 6(5): e1750.
- [43] Oh S Y, Lee S J, Jung Y H, *et al.* Arachidonic acid promotes skin wound healing through induction of human MSC migration by MT3-MMP-mediated fibronectin degradation[J]. [Cell Death & Disease](#), 2015, [44] Tracy L E, Minasian R A, Caterson E J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound[J]. [Advances in Wound Care](#), 2016, 5(3): 119-136.

Cloning and expression analysis of *MMP-16* gene from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

LI Shilei¹, YANG Aifu^{1,2}, DONG Ying¹, GAO Shan¹,
CHEN Zhong¹, SUN Hongjuan¹, ZHOU Zunchun^{1*}

(1. Liaoning Key Lab of Marine Fishery Molecular Biology,
Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China;

2. National Aquatic Product Safety Testing Key Laboratory,
Dalian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116600, China)

Abstract: Matrix metalloproteinases (MMPs) are proteolytic enzymes that degrade extracellular matrix. In order to study the function of MMPs in the immune defense of *Apostichopus japonicus*, the full-length cDNA sequence of the matrix metalloproteinase 16 gene, named Aj-MMP-16, was cloned using RACE method. The sequence characteristics and function of Aj-MMP-16 were preliminarily analyzed. The results showed that the full-length cDNA of this gene was 2 976 bp, including a 5' non-coding region of 342 bp, a 3' non-coding region of 963 bp, and an open reading frame (ORF) of 1 671 bp encoding 557 amino acids. The predicted molecular weight of Aj-MMP-16 protein was 63.11 ku and isoelectric point was 4.79. Functional domain analysis revealed the typical MMPs family protein structure of Aj-MMP-16 including N-terminal propeptide region, hinge region, catalytic region, hemopexin-like domain and transmembrane region. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that Aj-MMP-16 shared a certain degree of conservatism with MMPs of other species and had the highest identity with MMP-16 of *Strongylocentrotus purpuratus*. Quantitative real time PCR showed that the *Aj-MMP-16* mRNA was expressed in all tissues of *A. japonicus*, and the expression levels were from high to low in the order of respiratory tree, intestine, coelomocytes, tube feet, muscle and body wall. At different stages of skin ulceration syndrome progression, the expression of *Aj-MMP-16* mRNA in ulcerate body wall was significantly higher than that of the normal body wall. After the pathogenic bacteria challenge, *Aj-MMP-16* mRNA expression increased significantly in coelomocytes. The results suggested that *Aj-MMP-16* may play important roles in visceral regeneration, inflammation and immune response in sea cucumber.

Key words: *Apostichopus japonicus*; matrix metalloproteinases; cDNA cloning; expression analysis

Corresponding author: ZHOU Zunchun. E-mail: zunchunz@hotmail.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31672688); Natural Science Foundation of Liaoning Province (2015020786); Science & Technology Project of Liaoning Province, China (2017203005); Research Project of Liaoning Marine Fisheries Department (201608)