



低氧胁迫对瘤背石磺 Toll 样受体 4、血细胞和免疫酶活性的影响

肖海明^{1,2,3}, 土志涵^{1,2,3}, 饶榕城^{1,2,3}, 陈锡林^{1,2,3},
钱畅^{1,2,3}, 张小明^{1,2,3}, 沈和定^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为探究瘤背石磺面临低氧环境时固有免疫的应激机制, 实验以 RACE 法对瘤背石磺 *TLR4* 基因进行全长克隆, 并进行生物信息学分析, 测定了低氧胁迫下瘤背石磺 *TLR4* 基因的表达变化, 以及分析了血细胞活力和溶菌酶 (LSZ) 活性、肝脏中超氧化物歧化酶 (SOD) 和碱性磷酸酶 (ALP) 活性。结果显示, 瘤背石磺 *TLR4* 基因 cDNA 全长共 3 605 bp, 包括编码 956 aa 氨基酸的 2 817 bp 开放阅读框。系统进化树表明, 瘤背石磺 *TLR4* 基因与光滑双脐螺 *TLR4* 基因的进化地位较为接近。qRT-PCR 结果显示, *TLR4* 基因在瘤背石磺 7 个组织中均有表达, 其中表达量最高的是肝脏。低氧胁迫下, 各组织中 *TLR4* 基因的表达量皆显著上升, 其中神经节在 4 h 时率先达到峰值。此外, 血细胞活力、LSZ 活性、ALP 活性都是呈先下降后上升的趋势, 而 SOD 活性呈先上升再下降再上升的趋势, 波动幅度最为明显。研究结果初步说明了 *TLR4* 的生理功能, 为探究潮间带生物免疫系统的低氧应激机制提供理论参考。

关键词: 瘤背石磺; *TLR4*; 基因克隆; 低氧胁迫; 固有免疫

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

瘤背石磺 (*Onchidium reevesii*) 是一种以肺呼吸为主, 营养丰富, 含有多种天然活性肽, 具有较高药用价值的经济贝类, 大体分布在我国东部沿海区域^[1-3]。然而, 这种潮间带底栖无脊椎动物的获取主要来自于野外采集。近年来, 由于人为因素的影响, 水体的溶解氧含量 (DO) 发生了显著的改变, 产生了大量的缺氧区域乃至最小含氧带 (oxygen minimum zones, OMZs)^[4-5]。在全球变暖的影响下, 根据气候模型预测, 全球水体 DO 将普遍下降, OMZs 也将进一步扩散^[6-8]。近几十年来,

在水温上升和人为因素的影响下, 沿海和河口水域环境中的 DO 水平急剧下降, 缺氧区域的不断扩大^[9-10], 对沿海区域的生物多样性、周围生态环境的维持以及可持续发展产生了严重的负面影响^[11]。无脊椎动物仅有固有免疫, 其免疫机制相对简单, 对水环境的变化极为敏感, 如瘤背石磺等, 被认为是优良的生物研究材料^[12]。

Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 广泛存在于陆地、两栖和海洋动物中, 是固有免疫中能够特定鉴别病原相关分子模式 (PAMP) 的受体代

收稿日期: 2021-11-17 修回日期: 2022-01-04

资助项目: 上海市协同创新中心任务 (A1-3605-21-000202)

第一作者: 肖海明 (照片), 从事贝类生理生态学研究, E-mail: 462653102@qq.com

通信作者: 沈和定, 从事海洋贝类系统进化研究, E-mail: hdshen@shou.edu.cn



表, 对调节生物体内的免疫功能、保持内环境稳定具有重要作用^[13]。其中 Toll 样受体 4 (TLR4) 能够诱导炎症的级联反应, 并且在神经递质的影响下调节生物体内的先天性免疫与适应性免疫能力^[14]。此外, 在各种外源胁迫刺激下均能够使其激活或表达变化, 进而调控生物体内的损伤与适应性反应。在对光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) 的研究中发现, TLR 能够增强生物的免疫能力, 影响其在遭受血吸虫病时的存活能力, 证明了无脊椎动物中 TLR 能够对寄生虫进行识别反应^[15]。皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 的 TLR 基因在细菌和病毒诱导下表达量发生明显上升, 实验结果表明 TLR 参与贝类的抗病毒免疫反应^[16]。在长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 中, TLR 参与了灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 预感染所产生的免疫保护作用^[17], 并且在面对重金属镉^[18] 以及高温^[19] 等胁迫下, TLR 都能够激活或者促进生物的免疫能力, 起到保持生物体内环境相对稳定的作用。而在关于哺乳动物的一系列研究中发现, 缺氧会促进内皮细胞产生活性氧 (ROS)、抑制 TLR4 基因的表达^[20], 但是也会上调神经细胞中 TLR4 的表达^[21]。通过外源注射 TLR4 配体能够减少低氧胁迫下神经细胞的凋亡, 抑制炎症反应^[22-23], 而敲除了 TLR4 基因的小鼠不再具有低氧预适应后的自我保护作用^[24]。

与其他无脊椎动物一样, 瘤背石磺主要依靠体液免疫和细胞免疫来防御外界侵害^[25]。腹足动物血淋巴中的血细胞是免疫系统的主要组成部分^[26], 能够执行多种免疫功能, 对各种环境胁迫十分敏感, 是反映其免疫能力的重要指标。同时, 低氧胁迫可通过诱导 ROS 的产生引起氧化应激^[27]。超氧化物歧化酶 (SOD) 能催化超氧阴离子自由基转化为氧气和过氧化氢, 清除活性氧, 在抗氧化防御中发挥必要作用^[28]。Chen 等^[29] 发现, 随着 DO 的下降, 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的血细胞数量与 SOD 活性也同样降低。此外, 碱性磷酸酶 (ALP) 与溶菌酶 (LSZ) 广泛存在于各种动物中, 是动物体内免疫系统的重要组成部分, 在免疫防御中起着重要作用^[30]。有研究表明, 低氧胁迫会导致生物体内 ALP^[29] 和 LSZ^[31] 的活性产生变化, 进而影响生物的生长与存活。

本研究克隆了瘤背石磺 TLR4 基因全长序列, 对其理化特性及其在各个部位中的差异表达进行了分析, 研究瘤背石磺在低氧胁迫后 TLR4

mRNA 的表达变化, 分析了血淋巴的细胞增殖与 LSZ 活性和肝脏 SOD 与 ALP 活性的变化, 为研究潮间带动物面对外界生存压力的适应变化提供了理论参照。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从江苏盐城滩涂地区采集瘤背石磺, 暂养于上海海洋大学培育箱中。期间每日按时以体重的 2.5% 投喂 60 目过筛玉米粉作为食物, 不定时地喷洒海水以维持环境湿润并及时处理粪便与死亡个体。暂养 1 周后使用健康、体重约为 (10.0±0.2) g 的瘤背石磺进行后续实验。本实验中, 操作人员严格按照动物实验伦理规范进行操作。

1.2 TLR4 cDNA 全长克隆

实验前, 所有器材均经高压灭菌。选择健康成年的瘤背石磺, 取出各个组织, 加入 Trizol (TaKaRa, 大连) 溶液, 按照制造商的方案提取各个组织的 RNA。通过 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国) 检测 RNA 的浓度与 OD_{260/280} 值。用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (诺唯赞生物科技股份有限公司, 南京) 进行反转录, 并储存在 -20 °C。

基于本实验室已有转录组中挑选得到的部分 TLR4 相关片段, 通过 Primer Premier 6.0 软件设计相关引物 (表 1)。扩增体系 (20 μL): 10 μL 2×Taq Master Mix, 8 μL ddH₂O, 0.6 μL 引物, 0.8 μL cDNA。经电泳检测后, 将 PCR 产物纯化并通过 pGEM-easy (Promega, 中国) 导入 DH-5α (Promega, 中国) 中, 培养、筛选和测序。然后根据 SMARTer RACE5'/3'Kit 试剂盒进行 cDNA 末端快速扩增, 产物如上述方法处理后送测。产物通过生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 得到 *OrTLR4* 全长序列。

1.3 序列分析

通过线上软件对 TLR4 开放阅读框、同源性、结构域、二级和三级结构和修饰位点等进行分析 (表 2), 以 MEGA X 采用 NJ 法构建系统进化树。

1.4 组织差异表达

随机选取 3 只瘤背石磺, 采集各个组织, 根据 TLR4 基因全长序列, 通过 Primer 6 设计相应的 TLR4-RT-F 与 TLR4-RT-R 引物, 使用 ChamQ™

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物 primer	序列 Sequence 5'-3'	用途 usage
TLR4-F1	CACGGATGTGCCTAAGTCG	片段验证
TLR4-R1	TTAATCCTATCGTCGTTCC	片段验证
TLR4-F2	CCCCGTGTATTTTAGCG	片段验证
TLR4-R2	CATCCAGGGTTTTAGTGTC	片段验证
TLR4-F3	CCGACACTAAAAACCTG	片段验证
TLR4-R3	TTCTCTCCCAACCTG	片段验证
TLR4-F4	AACTGTGTGGTGACTTCTT	片段验证
TLR4-R4	CTCCCGTCTGTCTTCTGT	片段验证
TLR4-5' RACE outer	GAGATATTGACTGCCCGTGTCTAGGG	5' RACE
TLR4-5' RACE inner	AATTTGGAGATTCCTCGCGGCTTG	5' RACE
TLR4-3' RACE outer	GATGAGACAGAAAGACAGACGGGAGAC	3' RACE
TLR4-3' RACE inner	TGTCAGGTCTCTGGTTGCTGGGGATAA	3' RACE
TLR4-RT-F	GCATCCATAGCCGGGATTTC	荧光定量RT-qPCR
TLR4-RT-R	AGCAGGAAGATCAACACCGA	荧光定量RT-qPCR
β -actin-F	GTCCACCACAAGTGCTTCT	荧光定量RT-qPCR
β -actin-R	CGGTCGTGGTTGTTTCATT	荧光定量RT-qPCR

表 2 本研究用到的线上软件

Tab. 2 Software used in this study

软件 software	网址 URL	用途 usage
NCBI ORF Finder	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/	开放阅读框
NCBI Blast	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	同源性
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/	理化性质
Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index	二级结构
Swiss Model	https://swissmodel.expasy.org/interactive	三级结构
NetNGlyc 1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/	糖基化位点
NetPhos 3.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/	磷酸化位点
Signal 5.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	信号肽
SMART: Main page	http://smart.embl-heidelberg.de/	结构域

Universal SYBR[®] qPCR Master Mix 试剂盒 (诺唯赞生物科技股份有限公司, 南京) 通过 CFX-96 (Bio-Rad, 美国) 进行 qPCR 实验。20 μ L 反应体系: 10 μ L 2 \times Taq Master Mix (novoprotein, 上海), 0.4 μ L 正反引物, 7.2 μ L ddH₂O, 2 μ L 模板。

1.5 低氧胁迫下 TLR4 基因表达定量分析

在 2 L 集气瓶中 加入 2/3 的海水, 通过在水体中持续通入氮气使 DO 水平控制 2 mg/L 左右。从养殖箱中随机选取健康的瘤背石磺, 用干净纱布包裹后放入水中, 从而避免瘤背石磺逃离。分

别在低氧处理 0、1、2、4、8、12 和 24 h 后取样, 每次取样随机选取 9 只瘤背石磺, 分别采集瘤背石磺的肝脏、神经节、皮肤和腹足置于液氮中以备后续实验。

1.6 免疫指标测定

取出保存的肝脏组织, 冰浴研磨后离心 (2 500 r/min, 10 mins), 取上清液。使用改良型 Bradford 蛋白测试盒 (生工生物工程上海股份有限公司) 测定样品中蛋白含量。肝脏的 ALP 和 SOD 活性分别使用 ALP 活性检测试剂盒 (南京建城生

```

1 TCATTCCGATGTACGGATGTGCTAAGTCGCAATATCGGATGTAATCCAACCACAACAGACATGGTCAGCTGTTCCGAGGAACCC
91 GATCAACAATATCTCAAAAACCAACATGCTCGGACGGTTCGGATGTAACAACAACCTAGATAGTTCTCATACAGTTTGAAGAA
1 M L G R C S D C N N N L D S S H N S F E E
181 GGCATTAAGCAGACCGGATGTAACCTGAAACAAGCCGCGAGGAATCCAAAATCAATAACAAGGAGGAGAATAACAAGTCAGCTACAC
22 G I K Q T R D V P E T S R E E S P N S I T K E E N T S Q L H
271 GAAAGAGATCTTTTCAATCATAAGGACAAGGAGACCAAGAAAGAATTTCTACGGTTAAACACGATGACAGCTATATGACAAAA
52 E R D L F I H T G Q G R P R K N F L T V K N D A D L Y D K K
361 GAGCTTGTCTCTCTCAAGAACAGCTTACAACCATCACAACAGCAATCAGTCCGGCTCTATCAAGAGAGTCCGGCAGTTTTGTC
82 D V V P L L Q E Q S Y N H H N Q N Q S R L Y Q R E S G S F C
451 TCAGCTOCATGTACGACAAGGGTCCATTCCAAAACGAGTCTCTGCAAAAGTGATAAGCAGTAATGGCCCTAGACACGGGC
112 S A P C T T R G P F P K L T S S L P K W I S S K C A L D T G
541 AGTCAATATCTCACTGCTCTACAGAGGTTTGTCAATGTCAGGATAATCCCTGCTGTTAAGTGCACATTTGGCAACAATAGTACG
142 S Q Y L N C S Y R G L L N V P D N P C P V N C T F G T I R T
631 TACAATCTCAAAAATAACGTCACAACAATACATAATGTACTTTTCTAGATTGAGCAGCTAGAAGTTTGGATCTTCGTCTAAC
172 Y N L Q N N N V T T I H N C T F S R F E Q L E V L D L S S N
721 AACTTAACTCAGTGAACACGAGCAATTTACGGGCTCAAAATTTAAAGACCTCAATCTATGGGCAATAGTCTCAAAAATGAGCCT
202 N L N S L E P R A F Y G L K Y L K D L N L W G N S L K M S A
811 GAAAATTTCCCGCGTATTTTAGCGATCTCAGTCTCAAAAAGTTGAGATCAATCGGAACGACGATAGGATTAAGACGGGGGA
232 E N F P P C I F S D L Q S L K K L Q I N R N D D R I K S G
902 CTGGACTACCGTATGAGGCTGTCTACCTCTCCCGCTGACCAATCTCTATGGAAGGACAGTATGTAAGAGTTTGGCCCTGGC
262 L D Y P D E A L S Y L S R L T N L S M D G Q Y A K E F G P G
991 TTCAAAAGCTGACCTCGTAAACCATGTAATCCTGAGGCTACTTAAGGCTACTGTAATCAGCATTAAACCGAAACACACATTC
292 F K S L T S L T H V I L E G Y L T G Y C N I S I L T E T T F
1 081 CAAAATGTGCGTATATAAGGCATTTAAGCATTTGTTTACATTTAAGGATCCACCAAAATGCTTCTCATTCTACACAACCT
322 Q N V P Y I R H L S I G S C Y I V R I H P N A F S F L Q Q L
1 171 GAATCTAGATGGAACCAATGAGATATGACATAATACATTTGCCCATGTTTTTCATAGCTACGGAACATCACAACCTGAAAA
352 E S L D L N H N E D I D I I H L P H V F H S L R N I T T L K
1 261 CACCTTAAATGAAATTTGGTCTTAAACGTTATCTATGGGATGCTGCTGGACCAAGATTTAGAAGATTTCCCAACATCGAAA
382 H L N M K L V V N R Y S I G I C L D H Q Y L E D F P Q H L E
1 351 TCGTGAAGTGAAGAAAATAACATGAAGGATGACAGATCCGATGATCCCGTTTGTACCGACATAAAAACCTGGATCGAGC
592 S L N V Q E N N I E G I D R S V I S R L S P T L K T L D V S
1 441 GGAACAGATTTGTGTTGGAAGTATTGAAGGATGCAATCTCAATGGAATCTAATCATCTACGAATCAATGGCGGAGTTTCA
441 G N R F V F G T Y L K D L H L M E N L I H L R I N G G S F T
1 531 TACTATCTGCCAGCATTATCCCTATCAGTTACTGAGGAGCAGAATGATCAAGCAATGACCCCTATGTTGGCGGGCTGTGAT
472 Y Y L P G I Y P Y Q L L R E Q N D Q S N C T L Y G G G A L Y
1 621 TATAACAATTTAAGCTTTCCTCGGCTGCCGCCGACATAGACAAATGAAATGAACAAGCCCGCTAGATATCTTATCTGCT
502 Y N N L T F V L R L R P P R L E T I E M N N A G L R Y L L S A
1 711 CTGAAAATCGATAGCAGGAACAATGACCAAGTTAAGCATGGCTGGAACAAAATTCGGAACATATCGGCCATTTATGGGTTTGG
532 L K I D S R N N L T K L S M A G N K F P K L I G P F I G F A
1 801 AAC2AAAGCATTGGATTGTGACCTTGTACGTAGAGAAGATAAAAATCCACATCTCTCACATCAACAATCGCTGACGCTTTGAAC
562 N L K H L D L S T C Y V E K I K S T F F S H L Q S L E L L N
1 891 TTGGCCGCAACTTGTGGTACTTCTGGACAGAAATGCGGAGCAAACTTTCTCAAGCTCATAAACTAAAACATGAAATTTG
622 L G A N L L G D F L A Q N A E P K L F S S L I N L K T L N
1 981 ACTTCAATGACATCTCGGCTCTCCAGAGGACATCTTTCTGGACTGGACAAAATGGAATATTTACTACTGTATGGAAATCCCTTCAA
622 T F N D I S A L P E D I F S G L D K M E Y L L L Y R N P L Q
2 071 CGGTTGATGTTCCATCATATGCAATACTTCAAGCAATGATGACAAATCCAGAAATTCAGCTGCGGACAAAGCGACGAG
652 R F D V S I I H M H N L Q E L D L D N T R I Q L L D K A T R
2 161 GATCAGATCGATGCTCGAGAAAGGTCAAAACGTCACCGTCGAGCGGAAAGATGCGGATATGTTGACTGGCAACATCGAC
662 D H I D M L S G K G Q N V T V D V E R C P I M C D C D N L D
2 251 TTTTGAATGGATGCAAAAATCCAAATCTGATAGATTTAACAATTTCTTTTTCATATGTTTGCACCTATCTCGATACATCGTTGAAAGCT
692 F L K W M Q K S K S V D L T N S F S Y V C T Y P D T S L K A
2 341 ATTAAGGATGGCTATGTCACAAATACAGGTTTGGGAAGAGAAATGCACATCTCAGAGATGTTACTTTTCTTGTGGTGGCAGCTACT
722 I M D G Y A D T I Q V L G R E C T S Q E M L L F F V G A A T
2 431 AGTATTAGTATCACCATTATCTGTCGCAATCTGATCGTTTTCGTTGGAACATTCGCTATCTGACTAGCCGCTCACTCAATCTAC
752 S I M I I T I I C A I L Y R F R W N I R Y L Y Y A A H S I Y
2 521 CAAGGTAAGATTCGAAGACAGAAAGACAGACTTCGATACGATGCTTTTATTTGTTACGATGCCAGGACGATTTTGTGTGGGA
782 H G K I S K T E E T D F R Y D A F I C Y D A Q D D D F V L G
2 611 AAATATCGCCGGAATGAGCGGGGACTGAAGATGTCATCCATAGCCGGATTTTCATCGCTGGGACTACATCGCTCCAACTC
812 K L S P E L E R R G L K M C I H S R D F I A G D Y I A S N I
2 701 GTCAAAGCTGTTTGTAGCAGAAAACAGTGGTGTCTGACTCGGAATTTGATCGACAGCTATTTGGTGGCTCGAGATGCGAGATG
842 V K A V C S S R K T V V V L T R N L I D S Y W C G F E M Q M
2 791 GCCAAATGGAATCGGTGTACAGTGGCCGCTCGGTTGATCTTCTGCTGATGGAAGGATTCGGAAAAGGCTCTAGGGCTGGACATT
872 A K L E S V Y S G R S V L I F L L M E T I P E S V L G V D I
2 881 CTGTACAACATCGGAAACAATACCTACATCCCTACCCGACCCCTACTGATGCCACAGTATGGGAGCTGTGGGACAACTGGCA
902 L Y N I R N N T Y I P Y P D P L P D A T S M G R L W D K L A
2 971 TCCGATACAGATCTTAACTCTTAAAGCCGGAGTTTATTTGACGTATTGACGAGCTGACGAATGATGAGACAGAAAGACAGACGGG
932 S D I T S *
3 061 AGACAGAAACAGACAGAATGGTGAAGCAGAATGGATGAAGAGATGGATGAATGGTGGATGGTGGATAGATGGATAGGTGGATAAATGGA
3 151 TAGTGAAATGGGTGATGAAATAGATAGATAGAAAACGCTGTGAGCGTCTCCGACCTTTAAGGATTTAAGCAAACTGTCAGTGAAGT
3 241 TGTCAGTCTCTGTTGCTGGGATAAAAATCAGTCTCACAGACAAAATAAGACATCTCTGCAATGAAAGGGTATAGGCTAACGACT
3 331 TGATCAAAAGCAAGCTCTGTAACACTTTCACTCATGACAAGGAGATAACCTAATAACAACTTTTCTCAGATTTGCTCAAGTTTGA
3 421 ACCGTCAGCTCTTCACTGAAAAGACACATGCCTCTTCTTTCGACATCTTTTTCGACTGTTACGGATCAGGATTTATCGAGCTACTAAG
3 511 TCCCGTATGGTTAAGAAAGCAGATCTGGTCCGCTGACATAAATCTCGATGCGAGCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
3 601 AAAAA

```

图 1 瘤背石磺 *TLR4* 序列及氨基酸序列

细线框.起始密码子、终止密码子;波浪线.跨膜区;下划线.亮氨酸重复序列;双下划线.加尾信号;阴影部分.TIR 结构域。

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of *TLR4* in *O. reevesii*

Thin line box. start codon and the stop codon; wavy line. transmembrane region; single underline. LRR regions; double underline. polyadenylation signal; shades boxes. TIR domain.

物工程研究所) 和 SOD 活性检测试剂盒 (生工生物工程上海股份有限公司) 检测。使用新鲜的血淋巴组织通过 LSZ 活性检测试剂盒 (南京建城生物工程研究所) 和 CCK-8 试剂盒 (生工生物工程上海股份有限公司) 检测 LSZ 活性和血淋巴增殖活性。

1.7 数据分析

以 β -actin 为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析比较各个 TLR4 基因的相对表达量, 以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。通过 SPSS 25.0 软件进行统计分析。所有数据均通过正态性检验后, 使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有显著相关性。

2 结果

2.1 TLR4 基因序列

瘤背石磺 TLR4 基因 cDNA 全长为 3 605 bp, 包括 2 817 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 其中 5'非编码区 117 bp, 3'非编码区 617 bp, 并含有加尾信号 AATAAA 和 Poly(A) 尾巴 (图 1), GenBank 注册号: OK335747。

2.2 TLR4 特征分析

该蛋白共编码 956 aa 氨基酸, 理论等电点为 6.03, 平均疏水指数为 -0.250, 分子式为 $C_{4865}H_{7601}N_{1305}O_{1456}S_{45}$, 共有原子 15 272 个, 分子质量 109 ku, 无信号肽。Leu、Ser 的含量最高, 分别占氨基酸总量的 13.5%、8.6%; Met、Trp 含量最低, 分别占氨基酸总量的 2.1%、0.6%。其中负电残基 (Asp+Glu) 共 106 个, 正电残基 (Arg+Lys) 共 92 个 (表 3)。OrTLR4 蛋白包含 39 个磷酸化位点, 分别为 Ser 22 个、Thr 8 个以及 Tyr 9 个。糖基化位点为 14 个。该蛋白是跨膜蛋白, 具有 1 个跨膜区域, 由 762~784 位氨基酸组成; 有 8 个亮氨酸重复序列 (leucine rich repeat, LRR) 结构域, 其中包括 6 个 LRR 和 2 个 LRR_TYP, 以及 1 个非亮氨酸重复序列结构域 (TIR 结构域, 814~956 aa)。

2.3 同源性分析

通过瘤背石磺 TLR4 的氨基酸序列与其他软体动物的氨基酸序列多重比对, 虽然完整的 OrTLR4 氨基酸序列与其他物种的 TLR4 氨基酸序列相比同源性相对较低, 但是在氨基酸序列的 TIR 结构域区域具有相对较高的一致性, 并且 OrTLR4 的 LRR 基序中的大多数亮氨酸残基与其

表 3 TLR4 氨基酸组成

Tab. 3 TLR4 Amino acid composition			
氨基酸 amino acids		含量/(g/N) content	百分比/% percentage
丙氨酸(A) Ala		33	3.5
精氨酸(R) Arg		47	4.9
亮氨酸(N) Asn		71	7.4
天冬氨酸(D) Asp		61	6.4
半胱氨酸(C) Cys		25	2.6
谷氨酰胺(Q) Gln		34	3.6
谷氨酸(E) Glu		45	4.7
甘氨酸(G) Gly		49	5.1
组氨酸(H) His		26	2.7
异亮氨酸(I) Ile		64	6.7
亮氨酸(L) Leu		129	13.5
赖氨酸(K) Lys		45	4.7
甲硫氨酸(M) Met		20	2.1
苯丙氨酸(F) Phe		43	4.5
脯氨酸(P) Pro		38	4.0
丝氨酸(S) Ser		82	8.6
苏氨酸(T) Thr		55	5.8
色氨酸(W) Trp		6	0.6
酪氨酸(Y) Tyr		45	4.7
缬氨酸(V) Val		38	4.0

他无脊椎动物 TLR4 相比具有较高的保守性 (图 2)。根据瘤背石磺 TLR4 的氨基酸序列, 通过 MEGA X 以 NJ 法构建系统进化树。结果显示, 瘤背石磺与光滑双脐螺的亲缘关系相对接近, 其次是加州海兔 (*Aplysia californica*), 接着与三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*)、厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 以及虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) 等聚为一大支; 另一大分支由鱼类、鸟类以及节肢动物 3 个小支组成, 结果与形态学分类一致 (图 3)。

2.4 各个组织间 TLR4 基因差异表达分析

以 β -actin 为内参, 通过 qRT-PCR 对 TLR4 在瘤背石磺不同部位中的相对表达进行分析。结果表明, TLR4 在瘤背石磺 7 种组织中都有表达, 其中肝脏表达量高于其他各个组织, 接着分别为背部皮肤、肌肉、性腺和腹足, 均有较高的表达量且相互之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 但是在口器与神经节中的表达量很低 (图 4)。

2.5 低氧胁迫后 TLR4 基因表达变化分析

以 β -actin rRNA 作为内参, 通过 qRT-PCR 分

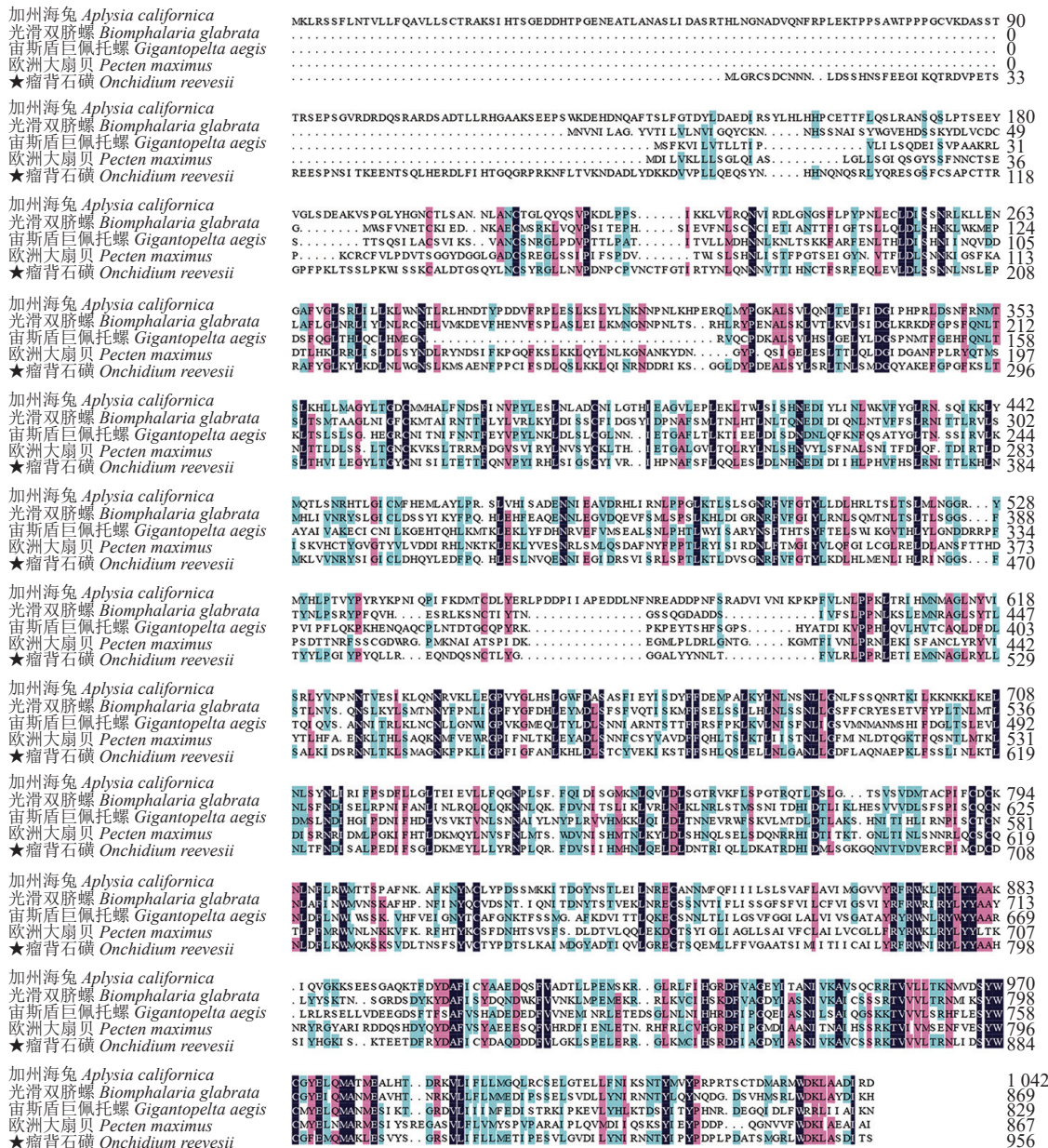


图 2 瘤背石磺 TLR4 的多重比对

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequence of *O. reevesii* TLR4

析 *TLR4* 基因在瘤背石磺不同组织在低氧胁迫 1、2、4、8、12 和 24 h 后的相对表达变化 (图 5)。在肝脏和神经节组织中都是先上升再逐渐减少但是仍高于 0 h，肝脏在第 8 小时达到峰值，而神经节在第 4 小时达到峰值。然而，在背部皮肤和腹足中趋势相对复杂，呈先上升再下降再上升的趋势，背部皮肤在第 8 小时达到峰值，而腹足在 4 h 达到峰值。

2.6 低氧胁迫对细胞活性的影响

低氧胁迫下，0~4 h，血淋巴细胞活力逐渐

下降，在 4 h 处降至最低；8~24 h 逐渐上升，但仍低于对照组 (0 h)。结果表明，各实验组血淋巴细胞活力均低于对照组，且差异显著 (图 6) ($P < 0.05$)。

2.7 低氧胁迫对酶活性的影响

与对照组相比，低氧胁迫 1 h 和 2 h，SOD 活性有所增加。在 2~12 h，SOD 活性逐渐下降，又于 24 h 有所上升，但都低于对照组，且具有显著差异 ($P < 0.05$) (图 7)。此外，在低氧胁迫下，ALP 与 LSZ 活性变化相仿，都是先下降，在 8 h 达到

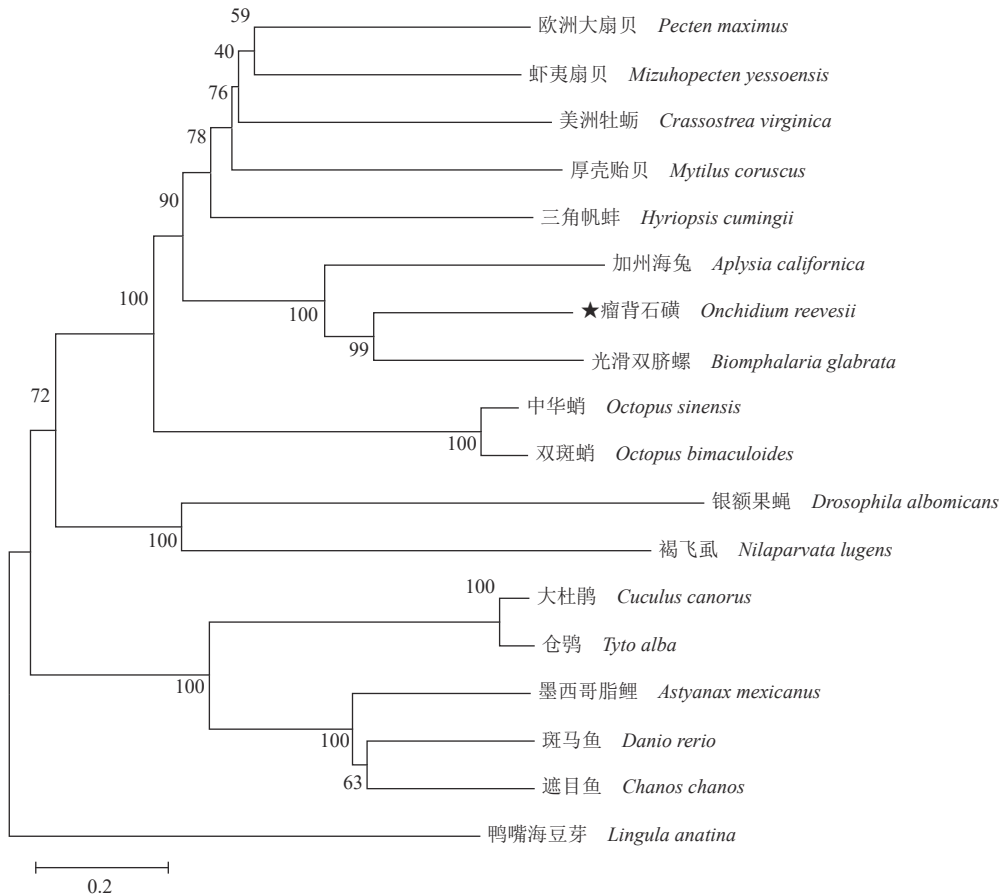


图3 TLR4 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of TLR4

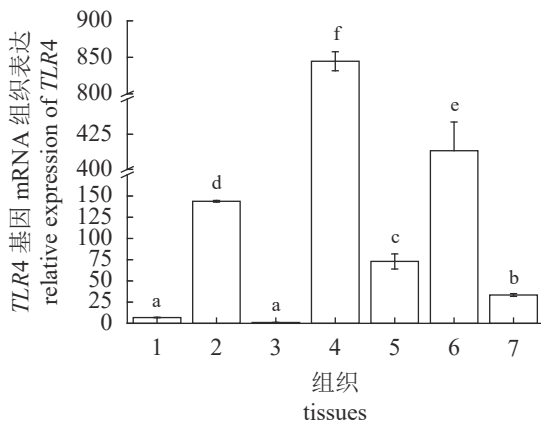


图4 TLR4 基因在瘤背石磺不同组织中的表达情况

1.口器, 2.肌肉, 3.神经节, 4.肝胰腺, 5.性腺, 6.背部皮肤, 7.腹足。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Expression of TLR4 gene in different tissues of *O. reevesii*

1. mouthpart, 2. muscle, 3. ganglion, 4. hepatopancreas, 5. gonad, 6. backside skin, 7. gastropod. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

最低值, 然后于 12 h 上升, 再于 24 h 下降, 且都显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 8, 图 9)。不同的是, ALP 活性从 2 h 才开始下降, 而 LSZ 于 1 h 就开始下降。

3 讨论

结构域分析显示, 瘤背石磺 TLR4 含有跨膜区, 具备经典的 TLRs 家族蛋白结构域结构, 其中包括大量 LRRs 序列与唯一的 TIR 结构域。事实上, 大量的 LRR 基序增加了外结构域的表面面积及其对更广泛 PAMP 进行识别的能力^[32]。一些研究表明, TLRs 的跨膜区域可以积极地参与与其他 TLRs 的寡聚, 进而产生相互作用^[33], 而 TLR 结构域能够结合相应的对接蛋白从而激发 TLR 级联反应。此外, 在 TIR 结构域中, 发现在各种 TLR4 中普遍一致氨基酸序列, 它们在其他软体动物的氨基酸序列中同样是相对保守的, 该基序可能在 TLR4 的细胞定位中有着关键作用^[34]。据进化树表明, 瘤背石磺与光滑双脐螺、加州海兔聚

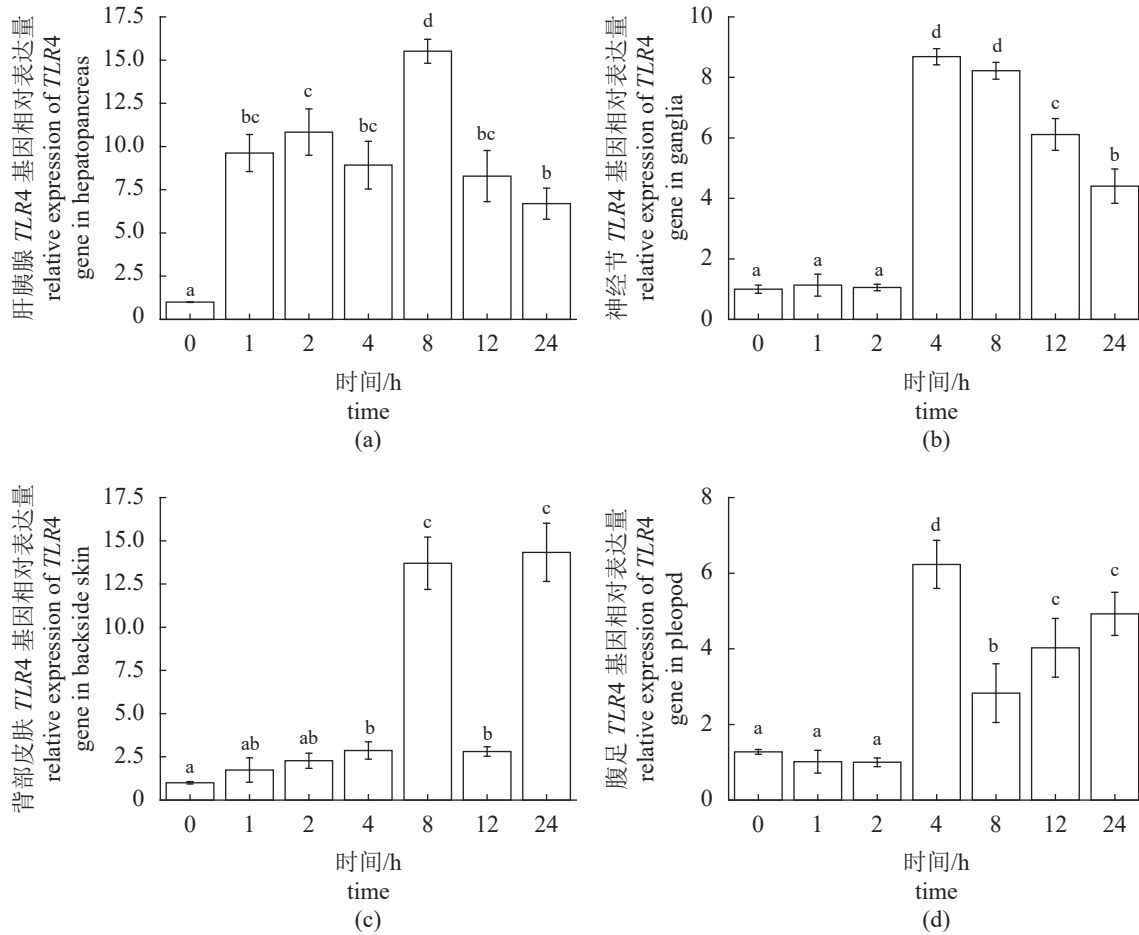


图5 低氧胁迫下 TLR4 基因在不同组织中各个时间点的相对表达量

(a) 肝脏, (b) 神经节, (c) 背部皮肤, (d) 腹足。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 5 Relative expression of TLR4 gene in different tissues under hypoxia stress at different timepoints

(a) hepatopancreas, (b) ganglia, (c) backside skin, (d) gastropod. Different lowercase letters on the histogram mean significant differences ($P < 0.05$), the same below.

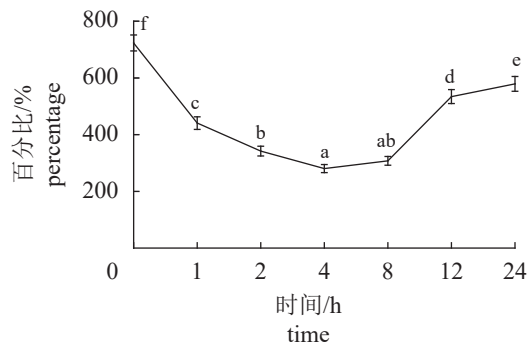


图6 低氧胁迫对瘤背石磺血淋巴细胞活力在各个时间点的的影响

Fig. 6 Effects of hypoxia stress on hemocyte viability at different timepoints

为一支, 说明其与软体动物腹足类之间的亲缘关系相对接近, 而与软体动物双壳类具有明显的区分, 同时无脊椎动物聚为一大支, 这种进化关系

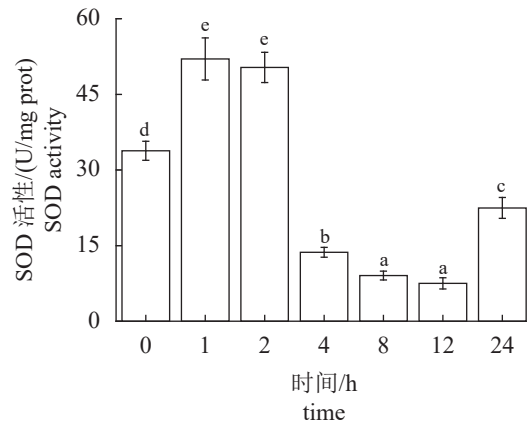


图7 低氧胁迫对瘤背石磺肝脏 SOD 活性在各个时间点的的影响

Fig. 7 Effects of hypoxia stress on superoxide dismutase activity in hepatopancreas at different timepoints

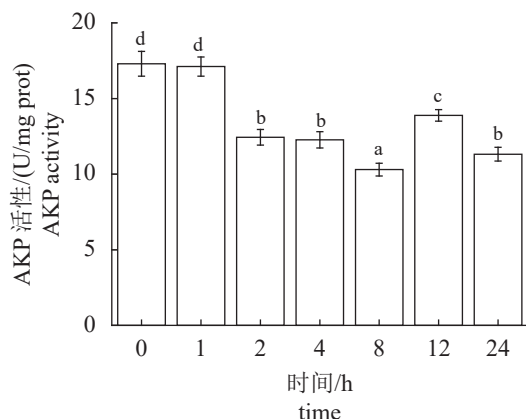


图8 低氧胁迫对瘤背石磺肝脏 ALP 活性在各个时间点的影响

Fig. 8 Effects of hypoxia stress on alkaline phosphatase activity in hepatopancreas at different timepoints

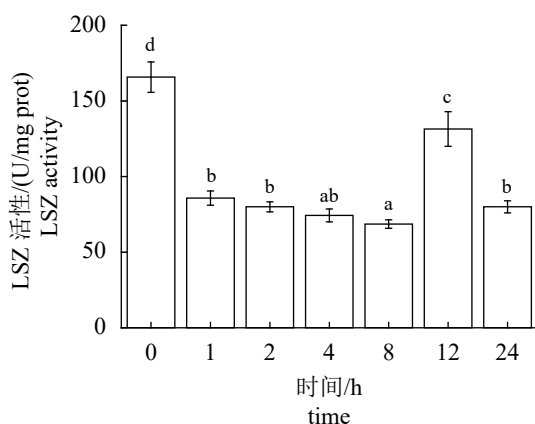


图9 低氧胁迫对瘤背石磺血淋巴 LSZ 活性在各个时间点的影响

Fig. 9 Effects of hypoxia stress on lysozyme activity in hemolymph at different timepoints

说明了无脊椎动物的 TLR4 可能具备一个相同的起源, 并进一步说明了与软体动物的 TLR4 具有潜在共同点。

OrTLR4 广泛分布于瘤背石磺各个组织中, 在肝脏与背部皮肤中具有相对较高的表达水平。相关研究表明, 肝脏是无脊椎动物的主要免疫组织, 能够产生大量免疫应答因子^[35]。在两栖动物中, 皮肤被认为具有先天免疫的作用, 能够产生大量的抗菌分泌物^[36], 并且在花背蟾蜍 (*Bufo raddei*) 的皮肤中也发现具有较高含量的 *TLR4*^[37]。推测 *TLR4* 在瘤背石磺肝脏和背部皮肤中的高表达水平可能与肝脏和背部皮肤在瘤背石磺的免疫功能中扮演着重要角色密切相关。大量研究表明, 炎症与中枢神经系统某些神经退行性疾病的发病

机制密切相关^[38], *TLR4* 除了具有鉴别多种病原的能力之外, 还参与调节先天免疫反应。然而到目前为止, 关于 *TLR4* 与无脊椎动物神经系统之间作用的报道很少。

低氧胁迫实验中, 肝脏 *TLR4* 的表达量率先增加, 这进一步说明了肝脏在瘤背石磺固有免疫中具有重要作用。神经节 *TLR4* 的表达量第一个达到峰值, 紧接着其他各组织的表达量也随之到达了峰值, 推测瘤背石磺 *TLR4* 的表达可能与其神经内分泌调节有关。相关研究发现, TLRs 能够激活级联反应, 调节生物的固有免疫, 缓解机体损伤, 稳定生物内环境, 适应环境胁迫。Zhao 等^[39] 研究发现, 血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 的感染能够引起湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 体内 *TLR* 表达的变化。在被副溶血性弧菌 (*Vibrio Parahemolyticus*) 反复感染的拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 中, 通过比较肝脏、血细胞中相关基因的表达情况发现, TLR 参与了早期的免疫启动, 进而避免病原体的反复感染^[40]。此外在对长牡蛎的研究发现, 在面临镉以及海水酸化^[18] 等威胁时, *TLR* 基因表达量显著上升, 进而缓解了生物体内的损伤。低氧胁迫下, 瘤背石磺各个组织 *TLR4* 基因的表达量皆表现出明显上升。可见 *TLR4* 基因参与瘤背石磺的低氧应激反应机制, 并具有举足轻重的特殊意义。*TLR4* 的表达总体上趋向于先升高再下降, 推测可能是由于低氧刺激造成了生物体内产生损伤, 引起 *TLR4* 表达量的上升, 启动了免疫反应机制, 而在持续的低氧胁迫下, 损伤积累可能会干扰生物体内 *TLR4* mRNA 的合成, 导致 *TLR4* 表达量逐步减少。

在贝类中, 血淋巴起着多种重要的生理作用, 包括离子的运输、氧化还原和营养物质的运输等^[41]。在血淋巴中循环的血细胞是免疫系统的主要组成部分, 代表内部防御的第一道防线^[26]。它们可以执行多种免疫功能, 对外部干扰非常敏感^[42]。在本实验中, 低氧胁迫对瘤背石磺血淋巴免疫能力的影响与应激时间具有明显的关联性。与 Matozzo 等^[43] 研究结果相似, 在低氧胁迫的影响下, 血淋巴中的细胞活力与 LSZ 活性都明显降低, 各时间点均显著低于对照组, 这说明在低氧胁迫下, 瘤背石磺血淋巴的免疫能力受到明显抑制。此外, 随着低氧胁迫时间的变化, 血淋巴的细胞活力在各时间间隔中发生显著变化, 进一步说明了贝类的血淋巴细胞对于环境变化的高度敏

感性。因此, 血淋巴细胞的细胞活力或许是瘤背石磺低氧应激免疫系统中一个良好的指标。

肝脏在贝类的免疫防御和解毒中也很重要。低氧胁迫会诱导机体产生 ROS, 导致氧化损伤, SOD 是最重要的抗氧化酶之一, 在抗氧化防御中起着不可或缺的作用。检测肝脏中 SOD 活性随时间的变化可能有助于确定组织的氧化损伤程度和机体的健康状况。本研究发现, 在低氧胁迫下, SOD 活性呈现先上升再下降的趋势。Chen 等^[29]发现栉孔扇贝 SOD 活性在低氧胁迫下也呈现相似的变化趋势。该趋势的产生可能是由于低氧胁迫下生物体产生的大量 ROS, 诱导 SOD 活性上升, 以保护机体免受抗氧化损伤。而随着时间变化, ROS 对于 SOD 的消耗超过了瘤背石磺的生产能力, 大量累积的 ROS 又会抑制瘤背石磺体内 SOD 的活性, 使生物体抗氧化防御能力下降。

ALP 在生物的消化和防御中对代谢过程的调节非常重要。目前为止, 许多关于 ALP 的研究主要集中在高等动物, 特别是哺乳动物^[44]和家禽^[45], 而对软体动物的研究很少, 因此实验结论将为其物种的未来研究提供参考数据。随着低氧胁迫的时间延长, 瘤背石磺 ALP 活性呈先下降后上升再下降的趋势。与之前研究相似^[46], 低氧胁迫后 ALP 活性逐渐下降, 且均显著低于对照组, 这可能是肝脏免疫能力在低氧胁迫的影响下受到抑制的结果。相关研究表明, 贝类中酶活性增加, 除了可能是机体防御机制外, 还有可能是一种病理特征^[47], 这可能是 ALP 活性于 12 h 上升的原因。

本研究克隆获得瘤背石磺 *TLR4* cDNA 序列, 对 *TLR4* 的理化特性、系统发育、组织表达差异进行了分析, 测定了低氧胁迫下瘤背石磺 *TLR4* 基因的表达变化, 并分析了血细胞活力和 LSZ 活性、SOD 和 ALP 活性。进一步揭示了低氧胁迫下瘤背石磺免疫系统的作用机制中 *TLR4* 基因的功能, 为研究瘤背石磺的低氧应激机制提供了初步的分子依据, 也为进一步探究海洋贝类的免疫机制和进化提供了理论参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Xu G Y, Yang T Z, Shen H D. Effect of circadian clock and light-dark cycles in *Onchidium reevesii*: possible implications for long-term memory[J]. *Genes*, 2019,

<https://www.china-fishery.cn>

10(7): 488.

- [2] Shen H D, Li K, Chen H C, *et al.* Experimental ecology and hibernation of *Onchidium struma* (Gastropoda: Pulmonata: Systellommatophora)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, 396(2): 71-76.
- [3] Liang W, Wu R Y, Yang T Z, *et al.* Effect of pathogenic bacteria on a novel C-type lectin, hemocyte and superoxide dismutase/alkaline phosphatase activity in *Onchidium reevesii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 102: 185-194.
- [4] Middelburg J J, Levin L A. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry[J]. *Biogeosciences*, 2009, 6(7): 1273-1293.
- [5] Gewin V. Oceanography: Dead in the water[J]. *Nature*, 2010, 466(7308): 812-814.
- [6] Beszczynska-Möller A, Fahrbach E, Schauer U, *et al.* Variability in Atlantic water temperature and transport at the entrance to the Arctic Ocean, 1997-2010[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2012, 69(5): 852-863.
- [7] Deutsch C, Brix H, Ito T, *et al.* Climate-forced variability of ocean hypoxia[J]. *Science*, 2011, 333(6040): 336-339.
- [8] Zhao Y Y, Liu J, Uthaiyan K, *et al.* Dynamics of inorganic carbon and pH in a large subtropical continental shelf system: interaction between eutrophication, hypoxia, and ocean acidification[J]. *Limnology and Oceanography*, 2020, 65(6): 1359-1379.
- [9] Avendaño-Alvarez O, Salas-Monreal D, Marin-Hernandez M, *et al.* Annual hydrological variation and hypoxic zone in a tropical coral reef system[J]. *Regional Studies in Marine Science*, 2017, 9: 145-155.
- [10] Khan F U, Hu M H, Kong H, *et al.* Ocean acidification, hypoxia and warming impair digestive parameters of marine mussels[J]. *Chemosphere*, 2020, 256: 127096.
- [11] Spijkers J, Morrison T H, Blasiak R, *et al.* Marine fisheries and future ocean conflict[J]. *Fish and Fisheries*, 2018, 19(5): 798-806.
- [12] Gu B N, Liang W, Yang T Z, *et al.* Metallothionein, hemocyte status and superoxide dismutase/aspartate aminotransferase activity are sensitive biomarkers of cadmium stress in *Onchidium reevesii*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 215: 105284.
- [13] Hemmrich G, Miller D J, Bosch T C G. The evolution of

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- immunity: a low-life perspective[J]. *Trends in Immunology*, 2007, 28(10): 449-454.
- [14] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. *Nature Immunology*, 2001, 2(8): 675-680.
- [15] Pila E A, Tarrabain M, Kabore A L, *et al.* A novel toll-like receptor (TLR) influences compatibility between the gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the digenean trematode *Schistosoma mansoni*[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(3): e1005513.
- [16] Elvitigala D A S, Premachandra H K A, Whang I, *et al.* Molecular insights of the first gastropod TLR counterpart from disk abalone (*Haliotis discus discus*), revealing its transcriptional modulation under pathogenic stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(2): 334-342.
- [17] Wang W L, Wang L L, Liu Z Q, *et al.* The involvement of TLR signaling and anti-bacterial effectors in enhanced immune protection of oysters after *Vibrio splendidus* pre-exposure[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 103: 103498.
- [18] Cao R W, Liu Y L, Wang Q, *et al.* The impact of ocean acidification and cadmium on the immune responses of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 81: 456-462.
- [19] Green T J, Montagnani C, Benkendorf K, *et al.* Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 151-157.
- [20] Ishida I, Kubo H, Suzuki S, *et al.* Hypoxia diminishes toll-like receptor 4 expression through reactive oxygen species generated by mitochondria in endothelial cells[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(4): 2069-2075.
- [21] Zhang P, Cheng G Q, Chen L X, *et al.* Cerebral hypoxia-ischemia increases toll-like receptor 2 and 4 expression in the hippocampus of neonatal rats[J]. *Brain & Development*, 2015, 37(8): 747-752.
- [22] Marsh B J, Williams-Karnesky R L, Stenzel-Poore M P. Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke[J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3): 1007-1020.
- [23] Marsh B, Stevens S L, Packard A E B, *et al.* Systemic lipopolysaccharide protects the brain from ischemic injury by reprogramming the response of the brain to stroke: a critical role for IRF3[J]. *Journal of Neuroscience*, 2009, 29(31): 9839-9849.
- [24] Pradillo J M, Fernández-López D, García-Yébenes I, *et al.* Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2009, 109(1): 287-294.
- [25] Zhang M M, Qiao G, Li Q, *et al.* Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways from coelomocytes of *Onchidium struma* after bacterial challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 528-543.
- [26] Cheng T C. Biochemical and ultrastructural evidence for the double role of phagocytosis in molluscs: defense and nutrition[M]//Bulla L A, Cheng T C. *Comparative pathobiology*. Boston: Springer, 1977: 21-30.
- [27] Andreyeva A Y, Gostyukhina O L, Kladchenko E S, *et al.* Acute hypoxic exposure: effect on hemocyte functional parameters and antioxidant potential in gills of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Marine Environmental Research*, 2021, 169: 105389.
- [28] Roche H, Bogé G. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication[J]. *Marine Environmental Research*, 1996, 41(1): 27-43.
- [29] Chen J H, Mai K S, Ma H M, *et al.* Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(3): 272-281.
- [30] 刘志鸿, 牟海津, 王清印. 软体动物免疫相关酶研究进展[J]. *海洋水产研究*, 2003, 24(3): 86-90.
- Liu Z H, Mou H J, Wang Q Y. Research progress of immune related enzymes in mollusca[J]. *Marine Fisheries Research*, 2003, 24(3): 86-90 (in Chinese).
- [31] Wang Y J, Hu M H, Cheung S G, *et al.* Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity[J]. *Aquaculture*, 2012, 356-357: 22-29.
- [32] Bell J K, Mullen G E D, Leifer C A, *et al.* Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors[J]. *Trends in Immunology*, 2003, 24(10): 528-533.
- [33] Godfroy III J I, Roostan M, Moroz Y S, *et al.* Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48875.

- [34] Couture L A, Piao W J, Ru L W, *et al.* Targeting toll-like receptor (TLR) signaling by toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein/MyD88 adapter-like (TIRAP/Mal)-derived decoy peptides[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(29): 24641-24648.
- [35] Wang L L, Li L, Wang L L, *et al.* Two Rab GTPases, EsRab-1 and EsRab-3, involved in anti-bacterial response of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 1007-1015.
- [36] Carrillo-baltodano A M, Boyle M J, Rice M E, *et al.* Developmental architecture of the nervous system in *Themiste lageniformis* (Sipuncula): new evidence from confocal laser scanning microscopy and gene expression[J]. *Journal of Morphology*, 2019, 280(11): 1628-1650.
- [37] 高凤娟, 李丕鹏, 陆宇燕. 花背蟾蜍皮肤结构及其抗氧化和免疫功能的研究[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2015, 33(3): 324-328.
- Gao F J, Li P P, Lu Y Y. Microstructure of toad (*Bufo raddei*) and its antioxidant and immune function[J]. *Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2015, 33(3): 324-328 (in Chinese).
- [38] Rosi S, Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, *et al.* Neuroinflammation alters the hippocampal pattern of behaviorally induced *Arc* expression[J]. *Journal of Neuroscience*, 2005, 25(3): 723-731.
- [39] Zhao Q P, Gao Q, Zhang Y, *et al.* Identification of Toll-like receptor family members in *Oncomelania hupensis* and their role in defense against *Schistosoma japonicum*[J]. *Acta Tropica*, 2018, 181: 69-78.
- [40] Zhang X, Zeng X Y, Sun Y L, *et al.* Enhanced immune protection of mud crab *Scylla paramamosain* in response to the secondary challenge by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 565958.
- [41] Canesi L, Gallo G, Gavioli M, *et al.* Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves[J]. *Microscopy Research & Technique*, 2002, 57(6): 469-476.
- [42] Fournier M, Pellerin J, Lebeuf M, *et al.* Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes[J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 59(1-2): 83-92.
- [43] Matozzo V, Monari M, Foschi J, *et al.* Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*: I. Effects on immune responses[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 325(2): 163-174.
- [44] Chaudhuri G, Chatterjee S, Venu-Babu P, *et al.* Kinetic behaviour of calf intestinal alkaline phosphatase with pNPP[J]. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 2013, 50(1): 64-71.
- [45] Dong J X, Li Z F, Lei H T, *et al.* Development of a single-chain variable fragment-alkaline phosphatase fusion protein and a sensitive direct competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of ractopamine in pork[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 736: 85-91.
- [46] Sun S M, Yang M, Fu H T, *et al.* Altered intestinal microbiota induced by chronic hypoxia drives the effects on lipid metabolism and the immune response of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. *Aquaculture*, 2020, 526: 735431.
- [47] Feng S Y. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels[M]//Fisher W S. Disease processes in marine bivalve molluscs. Bethesda: Fisheries Society Special Publication, 1988: 153-168.

Effects of hypoxia stress on Toll-like receptor 4, blood cells and immune enzyme activities in *Onchidium reevesii*

XIAO Haiming^{1,2,3}, TU Zhihan^{1,2,3}, RAO Rongcheng^{1,2,3}, CHEN Xilin^{1,2,3},
QIAN Chang^{1,2,3}, ZHANG Xiaoming^{1,2,3}, SHEN Heding^{1,2,3*}

- (1. Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and Green-culture of Aquaculture Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to explore the mechanism of innate immunity in *Onchidium reevesii* under hypoxia stress, the cDNA sequence of Toll-like receptor 4 (TLR4) gene was cloned by RACE-PCR, and bioinformatics analysis was conducted. In addition, the expression changes of *TLR4*, the activity changes of hemocyte, lysozyme (LSZ), superoxide dismutase (SOD) and alkaline phosphatase (AKP) under hypoxia stress were determined. The results showed that the full length of *TLR4* cDNA was 3,605 bp, the length of open reading frame was 2,817 bp, and it encoded a total of 956 amino acids. The phylogenetic tree results suggest that the *TLR4* gene was the closest to the *TLR4* gene of *Biomphalaria glabrata*. The results of qRT-PCR indicated that the *TLR4* gene was expressed in all tissues, and the relative expression in the hepatopancreas was the highest. The expression of each tissue increased significantly under hypoxia stress and the expression of ganglion reached its peak earlier than the other tissues at 4 h. In addition, hemocyte viability, LSZ activity and AKP activity decreased at first and then increased, while SOD activity increased at first, then decreased and finally increased, which was more sensitive to hypoxia stress than the others. The results provide a data base for illustrating TLR4 biological functions and a theoretical foundation for investigating the mechanism of the immune system in intertidal macrobenthos under hypoxia stress.

Key words: *Onchidium reevesii*; *TLR4*; gene clone; hypoxia stress; innate immunity

Corresponding author: SHEN Heding. E-mail: hdshen@shou.edu.cn

Funding projects: Collaborative Innovation Center Task Team Funding (A1-3605-21-300202)