



马氏珠母贝 *TNFR27* 基因克隆与功能初探

梁碧丹¹, 卢金昭¹, 梁海鹰^{1,2*}, 张美珍¹, 申铖皓¹, 张彬¹

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 为了探究肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 基因在马氏珠母贝中的免疫应答机制, 本实验采用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆了马氏珠母贝 *TNFR27* (*PmTNFR27*) 基因 cDNA 全长并进行生物信息学分析, 运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测了马氏珠母贝在脂多糖 (LPS)、聚肌胞苷酸 [Poly (I:C)] 及镉胁迫后, *PmTNFR27* mRNA 在其不同组织中的表达模式。结果显示, *PmTNFR27* cDNA 全长为 1 524 bp, 5'UTR 长为 186 bp, 3'UTR 长为 248 bp, 包含 28 bp 的 poly(A) 尾巴, 开放阅读框 (ORF) 为 1 062 bp, 编码 353 个氨基酸; 结构域预测表明 *PmTNFR27* 具有一个典型的 CRD 结构域和一个跨膜蛋白结构域, 符合肿瘤坏死因子受体超家族特征; 多序列比对结果显示, 贝类种间的相似性不高, 但功能结构域位置较保守。系统进化树结果显示, 马氏珠母贝与其他贝类聚为一支。qRT-PCR 结果显示, *PmTNFR27* mRNA 在马氏珠母贝各组织中均有表达, 在鳃中相对表达量最高。LPS 刺激后, *PmTNFR27* 基因在鳃中的相对表达量于 3 h 显著上升并达到最高值, 于 72 h 降到最低值, 最高值约为最低值的 9.67 倍; Poly (I:C) 刺激后, *PmTNFR27* 基因在鳃中的相对表达量在 6、12 h 显著上升并达到最高值, 至 96 h 时降到最低值, 最高值约为最低值的 13.16 倍。镉胁迫后, 3 h 相对表达量达到最高, 24、48 h 相对表达量显著下降。研究表明, *PmTNFR27* 可能参与了马氏珠母贝的免疫应答反应。本研究可为进一步探究 TNFR 在贝类中的生物学功能提供重要的理论基础和参考价值。

关键词: 马氏珠母贝; *PmTNFR27*; 基因克隆; 免疫刺激

中图分类号: Q 785; S 968.3

文献标志码: A

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 通常是由巨噬细胞、单核细胞和 NK 细胞等免疫细胞分泌的细胞因子, 与 TNF 相对应的蛋白受体是肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR)。TNF 与 1 个或 3 个膜上的 TNFR 结合后形成三聚体结构并导致受体构象发生改变, 继而激活各种免疫效应分子, 介导相应的信号通路,

在器官形成、炎症、细胞凋亡等生理与病理学过程中发挥了重要作用^[1-3]。截至目前, 在人 (*Homo sapiens*) 中有 29 种 TNFR 家族成员得到鉴定^[2], 如 TNFR1、TNFR2、FAS 及 DR4 等^[4]。大多数 TNFR 家族成员为 I 型跨膜蛋白, N 端位于胞外且富含连续半胱氨酸的 CRD 结构域 (也称为 TNFR 结构域), C 端位于胞内, 通常含有传导细胞信号的死

收稿日期: 2022-04-17 修回日期: 2022-10-11

资助项目: 国家自然科学基金 (31472306); 广东省自然科学基金 (2023A1515012924, 2021A1515010962); 广东省科技专项 (2021A05250); 广东省海港建设与渔业产业发展专项 (A201608B15); 南海经济动物物种创新与利用创新团队 (2021KCXTD026)

第一作者: 梁碧丹 (照片), 从事无脊椎动物增殖与珍珠培育研究, E-mail: 928870470@qq.com

通信作者: 梁海鹰, 从事无脊椎动物增殖与珍珠培育研究, E-mail: zjlianghy@126.com



亡结构域 (death domain, DD)^[5]。有少部分 TNFR 家族成员属于Ⅲ型跨膜蛋白, 如 XEDAR、TNFRSF13C、TNFRSF17等^[6]。肿瘤坏死因子受体 I 型跨膜蛋白与Ⅲ型跨膜蛋白都是一次跨膜蛋白, 并且 N 端位于胞外, 二者之间的区别为信号锚定序列不同, 且Ⅲ型跨膜蛋白不具有死亡结构域。TNFR 共同特征是含一个或多个 CRD 结构域, 每个 CRD 包含 6 个保守的半胱氨酸残基, 形成 3 对链内二硫键来维持其结构域的稳定^[7]。TNFR 的功能结构不同, 因此在机体免疫调控中所介导的信号通路也存在差异, 如 TNFR1 具有死亡结构域, 与相应配体结合, 激活信号通路相关调控分子如接头蛋白肿瘤坏死因子受体相关死亡域蛋白 (tumor necrosis factor receptor associated death domain protein, TRADD)^[8], 进而激活 caspase 级联反应, 从而诱导细胞凋亡。TNFR2 胞内缺乏死亡结构域, 但具有一个或多个肿瘤坏死因子受体相关因子 (tumor necrosis factor receptor-associated factors, TRAF) 连接位点, 当 TNFR 活性位点受到激活, 招募下游的 TRAF 衔接蛋白成员, 从而激活下游如 NF- κ B、JNK 等信号通路^[9-10]。

在无脊椎动物中, 最早得到鉴定的是黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 Wengen^[11], 与大多数哺乳动物 TNFR 家族蛋白不同, Wengen 有一独特的胞内结构域且仅含 1 个膜外 CRD 结构域^[12]。在玉足海参 (*Holothuria leucospilota*) 中过表达肿瘤坏死因子受体 16 同源基因 (*HLTNFR-16*) 可诱导凋亡, 双荧光素酶报告分析显示, 其可激活经典的 NF- κ B 信号通路^[5]。部分 TNFR 超家族成员在软体动物中得到鉴定, 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 中 *CfTNFR1* 和 *CfTNFR2* 在受到鳃利斯顿氏菌 (*Listonella anguillarum*) 刺激后表达上调^[13-14]。虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) 中 *PyTNFR1* 和 *PyTNFR2* 在细菌感染后 3 h 表达量上调至最高值^[15], 对外来刺激产生免疫应答。香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 中的 *ChEDAR*、*ChTNFR27*、*ChTNFR5* 和 *ChTNFR16* 均定位在细胞膜上, 能够激活 NF- κ B 通路^[4]。此外, 马氏珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*) 中两个肿瘤坏死因子受体 *PmTNFR1* 和 *PmTNFR5* 得到鉴定, 在 LPS 刺激后 48 h 表达量显著升高; RNA 干扰 *PmTNFR1* 和 *PmTNFR5* 的表达后, 信号通路下游基因 NF- κ B 表达下调^[16]。以上研究说明肿瘤坏死因子受体参与机体的免疫应答及 NF- κ B 信号通路的调控。但目前

在软体动物中只有少部分 TNFR 超家族成员得到鉴定, 其他 TNFR 超家族受体基因有待进一步探索。

马氏珠母贝是我国重要的海水珍珠贝, 所产珍珠广泛应用于医药、美容、养生等行业。近年来, 我国沿海水域因环境污染及野蛮养殖致使水质恶化, 马氏珠母贝各种病害频繁发生^[17]。同时, 工业废水的排放以及农药滥用导致养殖水体重金属超标, 特别是沿海区域及河口镉金属积蓄严重, 容易在贝体免疫器官富集^[18-19], 病害及重金属污染双重作用严重阻碍了马氏珠母贝养殖业的发展。鉴于 TNFR 超家族基因在免疫调控中的重要作用, 研究 TNFR 免疫基因的免疫调控机制非常必要, 可为提高马氏珠母贝的存活率与珍珠产量以及珍珠产业的良好发展提供科学依据。本研究克隆获得马氏珠母贝 *PmTNFR27* 的 cDNA 全长, 分析其生物信息学特征; 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测该基因在不同组织、LPS、Poly (I:C) 刺激及镉胁迫下的表达水平, 以期为马氏珠母贝 TNFR 家族的深入研究提供更多基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取养殖于广东省湛江市徐闻县大井村海域的 2 龄马氏珠母贝为实验贝, 规格大小一致, 清除贝体表面附着物, 于实验室暂养 5 d。实验过程中操作人员严格遵守实验动物福利审查指南的各项伦理规范, 并按照实验动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 实验试剂

TRIzol 购自 Invitrogen 公司; pMD-19T 载体、RACE 试剂盒等购自 TaKaRa 公司; 反转录试剂盒、Trans1-T1 Phage Resistant Chemically 感受态细胞、SYBR[®]Select Master Mix 购自北京全式金生物技术有限公司; 琼脂糖和 DNA Marker 分别购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司与宝生物工程 (大连) 有限公司; 氯化镉由实验室提供。

1.3 *PmTNFR27* cDNA 全长克隆

从本实验室构建的马氏珠母贝血细胞转录组文库^[20]中获得注释为 TNFR27 的 unigene 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件根据基因 CDS 序列设计特异性引物 (表 1)。利用 TRIzol 法提取马氏珠母贝鳃组织的总 RNA, 通过 0.1% 琼脂糖凝胶电

泳以及 Nano Drop 2000 核酸定量分析仪 (Thermo, 美国) 测定鳃组织总 RNA 浓度并分析纯度。参照 SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司) 的说明书, 制备 5'RACE 和 3'RACE 模板, 对 3'和 5'末端进行扩增。获得 PCR 产物后, 观察

电泳条带, 纯化目的片段及检测浓度, 将目的片段与 pMD-19T 克隆载体连接过夜, 然后将产物转入到 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞中, 在培养基中过夜培养, 最后挑选阳性克隆进行测序。

表 1 *PmTNFR27* 克隆及荧光定量检测所用的引物序列

Tab. 1 Primer sequence used in the cloning and qRT-PCR of *PmTNFR27*

引物 primers	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 function
<i>PmTNFR27</i> -5'-outer	ATGGTTGATATGGCAGTGGTA	5'-RACE
<i>PmTNFR27</i> -5'-inner	CCCAATCCAGCACAACTCTC	5'-RACE
<i>PmTNFR27</i> -3'-outer	CAAGTTTGTCGGATTCTGTTCTCAC	3'-RACE
<i>PmTNFR27</i> -3'-inner	GCAAGAGCATAGACTACAGGGAT	3'-RACE
<i>PmTNFR27</i> -F	GAGATTGTGCTGGATTGGGGAAAAC	中间片段验证 middle segment verification
<i>PmTNFR27</i> -R	CGAACAAAATCCCTGTAGTCTATGCTC	中间片段验证 middle segment verification
<i>PmTNFR27</i> -RT-F	GACACCCATTCTTGCGAG	荧光定量PCR Real-time PCR
<i>PmTNFR27</i> -RT-R	GGTGTCATAAAGTTTCCCCA	荧光定量PCR Real-time PCR
<i>GAPDH</i> -S	CACTCGCCAAGATAATCAACG	内参基因 reference gene
<i>GAPDH</i> -A	CCATTCTGTCAACTTCCCAT	内参基因 reference gene

1.4 *PmTNFR27* 生物信息学分析

利用 DNAMAN 8.0 软件将测序正确的结果与数据文库中 unigene 序列进行比对, 拼接得到 *PmTNFR27* cDNA 全长。ORF Finder 软件预测开放阅读框 (ORF) 后得到其氨基酸序列; ExPASy-ProtParam 与 Signal P 6.0 网站分析氨基酸理化性质及预测是否具有信号肽; TMHMM Server v.2.0 在线网站预测其跨膜结构域; SOPMA 在线网站预测其蛋白质二级结构; SMART 在线网站预测其结构域; DNAMAN 8.0 软件进行多序列比对及 Mega X 软件构建系统进化树。

1.5 组织表达分析

分别取 10 只规格一致, 健康马氏珠母贝的血细胞、闭壳肌、外套膜、性腺、鳃和肝胰腺组织, 置于干冰中保存。其中血细胞处理参考吴羽媛等^[21]的方法。使用 TRIzol 法提取各组织的总 RNA, 验证 RNA 浓度及纯度。参照 Reverse Transcriptase M-MLV (Rnase H) 反转录试剂盒说明书操作, 反转录合成 cDNA 第一链。反转录产物作为定量 PCR 模板。实时荧光定量扩增条件: 95 °C 5 min、95 °C 10 s、60 °C 15 s、72 °C 15 s、40 个循环; 95 °C 10 s、65 °C 60 s、97 °C 1 s、37 °C 30 s。

1.6 LPS 与 Poly (I:C) 刺激表达分析

把 180 只贝随机分成 3 组: LPS 组 (实验组) (10 mg, Sigma)、Poly (I:C) 组 (实验组) (25 mg, Sigma), PBS(磷酸盐缓冲液) 组 (对照组), 每组 60 只, 分别向闭壳肌注射 100 μ L LPS (100 μ g/mL)、Poly (I:C) (100 μ g/mL) 和 PBS, 于 3、6、12、24、48、72、96 h 取 8 只贝的鳃组织, 迅速置于液氮中保存。使用 TRIzol 法提取鳃组织的总 RNA, 然后检测 RNA 浓度及纯度。参照 Reverse Transcriptase M-MLV (Rnase H) 反转录试剂盒说明书操作, 反转录合成 cDNA 第一链作为模板。

1.7 镉胁迫表达分析

预实验得出马氏珠母贝 24 h 镉胁迫半致死浓度 (LC₅₀) 为 8.0 mg/L。随机取 60 只健康的马氏珠母贝, 使用 4.0 mg/L (1/2 LC₅₀) 镉胁迫 48 h。按 0、3、6、12、24、48 h 分别取 10 只贝的鳃组织, 于液氮中保存。使用 TRIzol 法提取鳃组织的总 RNA, 后续实验方法同“LPS 与 Poly (I:C) 刺激表达分析”。

1.8 数据分析

内参基因选择 *GAPDH*, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[22] 计算基因相对表达量。使用 SPSS 26.0 软件对不同组织、

两种免疫刺激后以及胁迫条件下的实验数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和LSD、Duncan氏多重比较, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 *PmTNFR27* 克隆及序列分析

验证正确的中间片段与5'和3'末端序列通过重叠拼接得到全长为1 524 bp的*PmTNFR27* cDNA序列, 其中, 5'非编码区(5'UTR)为186 bp, 3'非编码区(3'UTR)为248 bp, 包含28 bp的poly(A)尾, ORF长度为1 062 bp, 编码一条353个氨基酸残基组成的前体蛋白(图1)。

2.2 马氏珠母贝 *PmTNFR27* 的理化性质分析

PmTNFR27 相对分子质量为40.16 ku, 理论等电点为9.18。*PmTNFR27* 蛋白由20种氨基酸组成, 其中Lys占比最高, 为9.6%; Trp占比最低, 为0.6%。ProParam预测*PmTNFR27*不稳定系数为45.59, 被划分为不稳定蛋白; ProtScale疏水性预测分析得知, *PmTNFR27*总平均亲水性系数为-0.726, 属于亲水蛋白。另外, 预测结果表明*PmTNFR27*蛋白并不具有信号肽。SOPMA二级结构预测的结果显示, *PmTNFR27*蛋白中 α 螺旋占22.10%, β 转角占7.37%, 延伸链占16.45%, 无规则卷曲占54.11%(图2)。SMART结构域预测在第70~108位氨基酸存在CRD结构域, 在第132~154位氨基酸存在跨膜结构域(图3)。

2.3 马氏珠母贝 *PmTNFR27* 同源性分析和系统进化树构建

运用DNAMAN 8.0软件将*PmTNFR27*氨基酸序列与美洲牡蛎(*C. virginica*)、紫贻贝(*Mytilus edulis*)、长牡蛎(*C. gigas*)、巨海扇蛤(*Pecten maximus*)、香港牡蛎、虾夷扇贝进行多序列比对, 发现其种间的序列相似性不高, 为30.76%, 但功能结构域位置相对保守(图4)。运用Mega X软件构建系统进化树(表2, 图5), 显示智人和小鼠(*Mus musculus*)等哺乳动物聚为一支, 马氏珠母贝与其他贝类聚为一支, 符合传统分类, 其中与美洲牡蛎、长牡蛎两种牡蛎亲缘关系最接近。

2.4 马氏珠母贝 *PmTNFR27* 的组织差异表达

qRT-PCR检测*PmTNFR27*在马氏珠母贝血细胞、外套膜、性腺、闭壳肌、鳃和肝胰腺这6种

```
1 aagcagtggtatcaacgcagagtagatggggagtgtaggatattgttaattcatttgg
61 ggaccaccgagccggggggaucuaaactaccacagggggaaalaactcagggaagg
121 agctgctcagctgtgaaggtccattcaaccgggtttgttttcagtagcagaaataccaac
181 tgagaatgagcagatggccagccgtagcccccagagagaagaagaagagtcgtgtgat
M Q T M A K R R P R E K K V W C D
241 TTGCAAAGAAAAGTATTATTTCCGCACTAGCTAAATGTATGAATGGCAAAATGC
19 F A K K K Y Y F P Q L A K C M K C D K C
301 CTGAAAGGAGGGACACCCCATCTTGGCAGTGAAGAAATGTCAAATGGACCCCTGTC
39 L K G E G H P I L A S E K D V K M D P V
361 CACGGAGCTTGAATTGCCTCCCTGTGCGACATGCCAAGGGGTATTATTAATCAGGA
59 H G A I N C I P C R T C P K G Y F N S G
421 AGGAAATCCGTTGTAACAATGTAGAGATTGTCTGGATTGGGAAAACCTTATGTACA
79 R K F R C K Q C R D C A G L G K T L Y T
481 CCCTGTAATCTACGTCCAATGCTGTTTGGTGCACATATACATAAAGGAAATCAAGCA
99 P C N S T S N A V C G D T I H K G N Q A
541 GAGGAAGATCAGCCATTTGAAATCCACAGCATGTTATTTTATTTATGTTCTTCT
119 E E D L A I L N P Q T V T F T C L I
601 TTAATACCACCTGCCATATCAACCATCGTGTATTCTACAGGAGGAGGAGGCGAAAC
139 T T T A T S T T V F T R R K R K R N
661 GCGGATACATGTCCTGACGGTTTGTGAAGACGTTAACACAAGCTGATTAACACCA
159 A D T C P V R F V K N V N N K I I K P P
721 GGGAAAGCGAAGACGGGATTAAGTACAATGTGCGAGCTTCAAATCTCCAGCCGTG
179 G K A E E R G L I L T N V R R S N S P A V
781 ATGTTAATCAAGAAAATCATTGACAGCATACTCCAATTAACAACGAGGAGATGGCGCA
199 M L I T Q E N H S D D T P I N N E E M A P
841 CCGGGTAGAAAAGAACACCAAAAAAGTTAGACACTCTCCAGCAAAGTTGACA
219 P G R K E T Q P K K L D N S C S Q S S T
901 TCACTCAAACTCTGAAAAGCCGTTACGTCATTCATACATGACGACAAATGTGTC
239 S T Q T S E K P F T S F N T M T T S I S
961 GATTCGTCTCAGCAATTCACGACAATTTGAGCGTCAAGAAATGCTTATCCGAATCT
259 D S V I L T N S R Q F E R R N S P I P N I
1021 TCAATTTTAAATTTGATAACGATATAGTCGACGAAGATTCAGGGAAGACGATTACAA
279 S I F N F D K R I V D E D S R E D D L Q
1081 TGGAAACCCGGTCAAGAGCATAGACTACAGGGATTTTGTCTGACAAATCTTGACA
299 W K P R C K S I D Y R D F V R Q K S I T
1141 GTGCCAAAACAGTGACGTGATAGTGACCCAGATGACGACTTCGGGAGCTTCTAAC
319 V P K Q V T C D S D P D D D F R E L S N
1201 TTTACCTTAACTAAAGTCAATTCAAAGAAATGACGGATCTGAcgatltaaceg
339 F T F N I K S N S N E C T D T *
1261 ggllccclggacalcaacatlUggac tacaaaa lacacggUccccaaccllUaaat
1321 atatgcaactottacaataattaacctgaatgcaatattatgtgggaatggcaactttcG
1381 gaalagatlcggalccalglgggaaalcaaaagllglllalllgccgccclaacuca
1441 cagggtcaggttatgcttattttatcattgttgaaatgaggtcaataaataagaana
1501 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

图1 *PmTNFR27* 的核酸序列及编码氨基酸序列

红色方框标注为起始密码子ATG和终止密码子TGA, 黄色部分为CRD结构域, 绿色部分为跨膜结构域, 小写字母表示非编码区。

Fig. 1 Nucleotide and amino acids sequences of *PmTNFR27*

Initial codon ATG and termination codon TGA are marked with the red box, shades of yellow showed CRD domain, shades of green showed transmembrane domain, lowercase letters indicate non-coding zone.

组织中的表达。结果显示, 6种组织中均有表达, 其中*PmTNFR27*在鳃中相对表达量最高, 其次为外套膜与肝胰腺(图6)。

2.5 LPS、Poly (I:C) 两种免疫刺激下 *PmTNFR27* 在鳃中的时序表达

通过qRT-PCR检测马氏珠母贝鳃中*PmTNFR27*在LPS和Poly (I:C)刺激后的表达水平。结果显示, 注射LPS后, *PmTNFR27*在鳃中的相对表达量于3 h显著上升并达到最高值, 6 h表达量开始逐渐下降, 于72 h降至最低值, 最高值约为最低值的9.67倍。注射Poly (I:C)后, *PmT-*

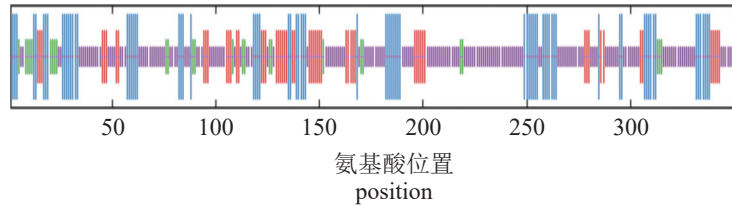


图2 PmTNFR27 蛋白质二级结构图

蓝色表示 α 螺旋, 绿色表示 β 转角, 红色表示延伸链, 紫色表示无规则卷曲。

Fig. 2 Secondary structure of PmTNFR27 protein

Blue areas represent the alpha helix, green areas represent the beta turn, red areas represent the extended strand, and the random coil is represented by purple.

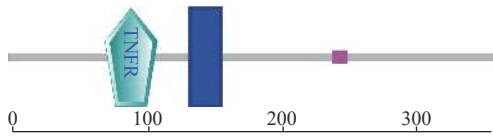


图3 PmTNFR27 蛋白质结构域模式图

青绿色表示 CRD 结构域, 深蓝色表示跨膜结构域, 粉色表示低复杂度区。

Fig. 3 Pattern diagrams of PmTNFR27 structural domain

Turquoise represents the CRD domain, dark blue represents the transmembrane domain, pink represents the low complexity.

TNFR27 在鳃中的相对表达量在 6、12 h 显著上升并达到最高值, 24 h 开始显著下降, 至 96 h 时降至最低值, 最高值约为最低值的 13.16 倍 (图 7)。

2.6 镉胁迫条件下 *PmTNFR27* 在鳃中的时序表达

马氏珠母贝在镉胁迫后, 采用 qRT-PCR 检测马氏珠母贝鳃组织 *PmTNFR27* 的表达水平。结果显示, 鳃中 *PmTNFR27* 在 3 h 相对表达量达到最高, 24、48 h 相对表达量显著下降, 其中 24 h 的相对表达量最低, 与 0 h 相比具有显著差异 ($P < 0.05$) (图 8)。

3 讨论

本研究通过 RACE 技术成功获得 *PmTNFR27* cDNA 全长。生物信息学分析结果显示, *PmTNFR27* 氨基酸序列具有 CRD 结构域和跨膜结构域, 但缺少信号肽与胞内死亡结构域; 人类的 XEDAR (也称为 TNFR27) 也缺乏信号肽与死亡结构域^[23], 说明 *PmTNFR27* 与人类 XEDAR 在结构上具有一定的相似性。与之相反, 香港牡蛎的 ChTNFR27 样蛋白具有信号肽和死亡结构域^[4], 这与 *PmTNFR27* 的结构不一致。此外, *PmTNFR27* 与栉孔扇贝的 *cfTNFR1*^[13] 和黑腹果蝇的 *Wengen*^[11] 相似, 只含一个 CRD 结构域, 并且具有 CXXCXXC 基序。无脊椎动物中的 TNFR 家族蛋白尽管相似性低, 但

至少含有 1 个 CRD 结构域^[24], 由此得出 *PmTNFR27* 属于肿瘤坏死因子受体家族。

研究免疫相关基因的功能表达谱有助于理解机体应对外源病原入侵的应答功能机制, 为基因相关功能研究提供更多参考思路^[21, 25]。为进一步探讨 *PmTNFR27* 在马氏珠母贝中的功能, 实验分析了 *PmTNFR27* mRNA 在马氏珠母贝不同组织中的表达模式。结果显示, *PmTNFR27* 在所有组织中均有表达, 在鳃中显著高表达, 其次为外套膜和肝胰腺。栉孔扇贝中 *CfTNFR1* 和 *CfTNFR2* 基因与马氏珠母贝的 *PmTNFR1* 和 *PmTNFR5* 基因均在鳃组织中高表达^[13-14, 16], 与本研究结果相似。鳃是软体动物重要的免疫器官和滤食器官, 不断与外界进行物质交换, 易受到外来病原的入侵^[26]。对于没有特异性免疫的贝类来说, 鳃的功能显得尤为重要^[27], *PmTNFR27* 在鳃中高表达, 推测其可能参与机体的免疫调控作用。

软体动物缺乏获得性免疫而极其依赖先天免疫系统, 因此, 先天免疫系统是软体动物抵抗外源病原的第一道防线^[28-30]。脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种特有成分^[31], Poly (I:C) 是一种人工合成的 dsRNA, 常用于模拟病毒应用于免疫相关研究^[32]。LPS 刺激诱导哺乳动物单核细胞和巨噬细胞大量分泌 TNF 细胞因子, 激活免疫相关信号通路, 介导机体的免疫应答^[31, 33-34]。为进一步分析 *PmTNFR27* 在马氏珠母贝中免疫应答方面的作用, 本研究分别检测了 LPS 和 Poly (I:C) 刺激后马氏珠母贝 *PmTNFR27* 的时序表达情况, 结果显示, 在两种刺激后分别在 3、6、12 h 表达显著上调, 推测是马氏珠母贝在受到外来病原的入侵后立即启动免疫应答机制, 并分泌免疫细胞因子应答病原体。大量研究表明, 生物体受到外来病原刺激后机体会启动应答机制, 例如招募细胞因子 TNF, 能诱导多种凋亡或者抗凋亡因子传递信

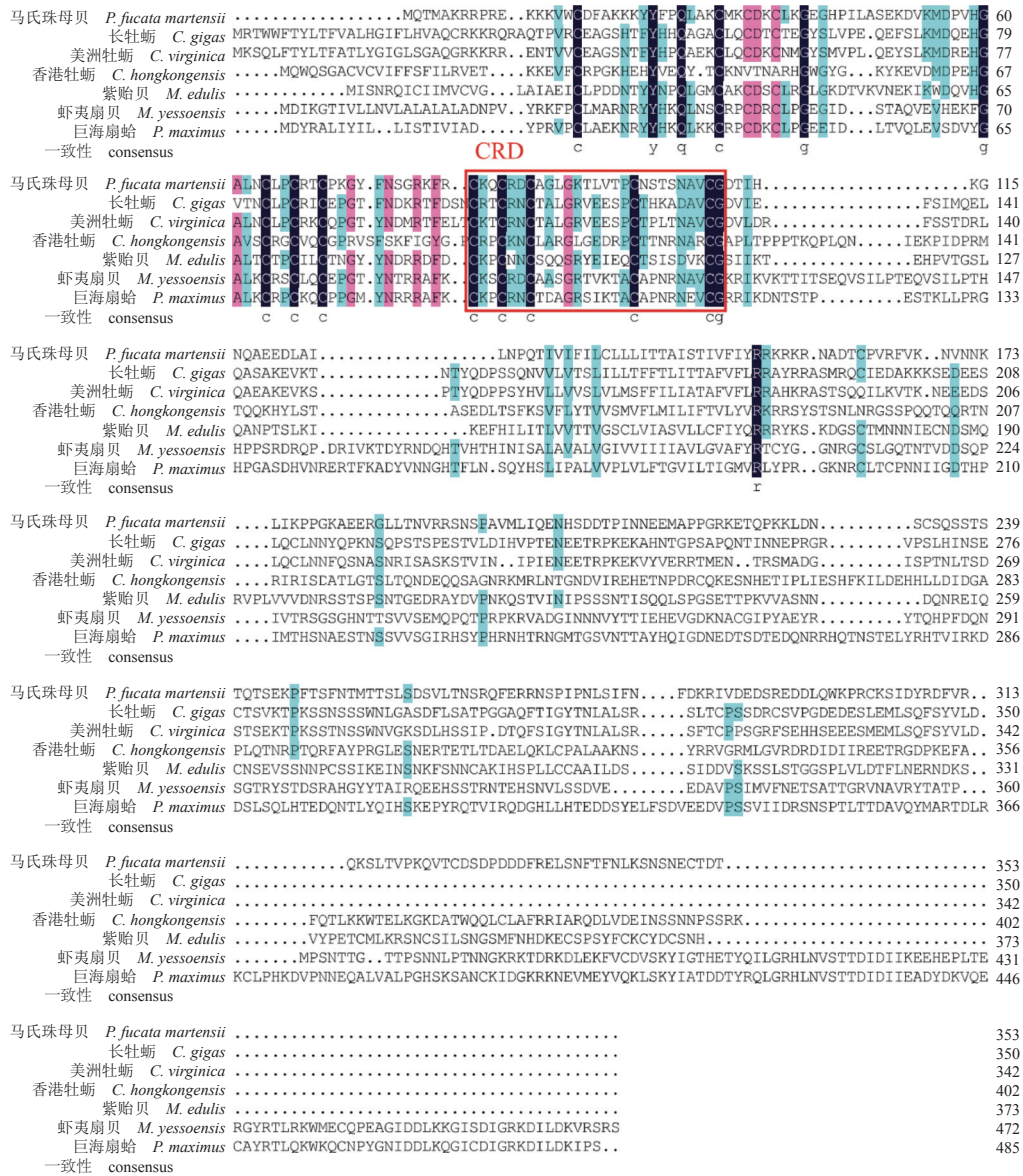


图 4 PmTNFR27 蛋白多序列比对

深蓝色为一致氨基酸，粉色为相似度大于 75%，青绿色为相似度大于 50%，红色框为 CRD 结构域。

Fig. 4 Multi-alignment of PmTNFR27 amino acid sequence

Dark blue. the coincident amino acids; pink. the similarity is more than 75%; turquoise. the similarity is more than 50%; CRD domain is marked with the red box.

号, 从而启动凋亡通路或抗凋亡通路来调节细胞的凋亡与存活^[35-37]。信号通路调控存在表达时序的差异, 因此, 马氏珠母贝在受到 LPS 和 Poly (I:C) 刺激后 *PmTNFR27* 表达上调时间点也存在差异。有效的免疫应答利于贝体及时清除外来病原异物, 保护机体不受侵害^[38]。香港牡蛎中 *ChTNFR27* 在受到革兰氏阴性菌刺激后 3 h 表达量显著上调^[4], 这与本研究 LPS 刺激的表达趋势一致。虹夷扇贝 *CyTNFR1* 受到革兰氏阴性菌刺激^[15] 与马氏珠母贝 *PmTNFR1* 和 *PmTNFR5* 在 LPS 刺激后^[16], 均在组织中表达上调, 但虹鳟 (*Oncorhynchus*

mykiss) 中 *TNFR2* 在受到 LPS 刺激后表达不显著, 而在 Poly (I:C) 刺激下表达显著上调^[39]。在受到鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 和 Poly (I:C) 刺激后 48 h, 日本七鳃鳗 (*Lampetra japonica*) 的 *L-tnfr10-like* 在鳃中显示最高表达量^[40]。Poly (I:C) 刺激尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 后, *TNFR1* 在脾脏中的表达量为先上升后下降, 然而, 其 *TNFR2* 的表达量为先下降后上升^[41]。推测无脊椎动物和脊椎动物的 *TNFR* 在受到免疫刺激后的表达模式可能存在一定差异, 但机体应对外来病原入侵都产生相应的应答。

表 2 各物种 TNFR27 氨基酸序列

Tab. 2 Amino acid sequence of TNFR27 in some species

物种 species	GenBank 登录号 GenBank ID
美洲牡蛎 <i>C. virginica</i>	XP_022320081.1
紫贻贝 <i>M. edulis</i>	CAG2238199.1
长牡蛎 <i>C. gigas</i>	XP_011413188.2
虾夷扇贝 <i>M. yessoensis</i>	XP_021366065.1
巨海扇蛤 <i>P. maximus</i>	XP_033742641.1
香港牡蛎 <i>C. hongkongensis</i>	APG29681.1
小鼠 <i>M. musculus</i>	NP_001154904.1
智人 <i>H. sapiens</i>	XP_011529302.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_001076829.1
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	XP_002938961.2
家牛 <i>Bos taurus</i>	XP_005228114.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_001108536.2

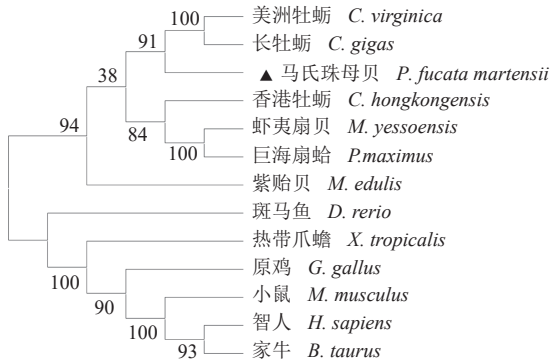


图 5 Neighbor-Joining 法构建 TNFR27 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on TNFR27 amino acid sequences (Neighbor-Joining)

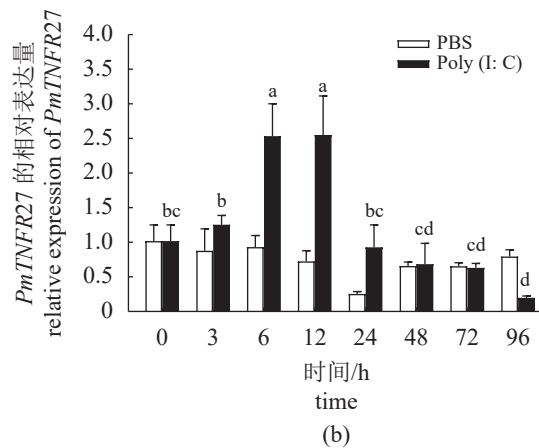
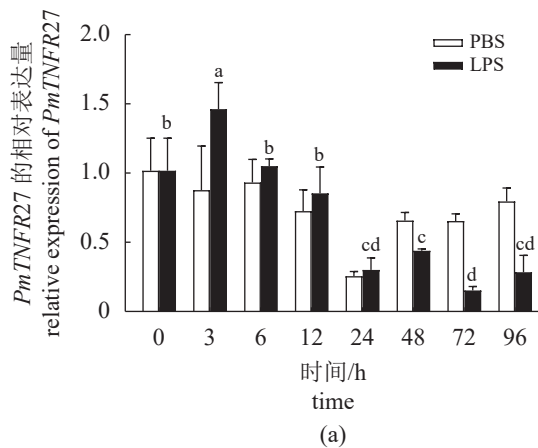


图 7 两种免疫刺激后鳃中 PmTNFR27 的时序表达

Fig. 7 Sequential expression of PmTNFR27 in gills after two kinds of immune stimulation

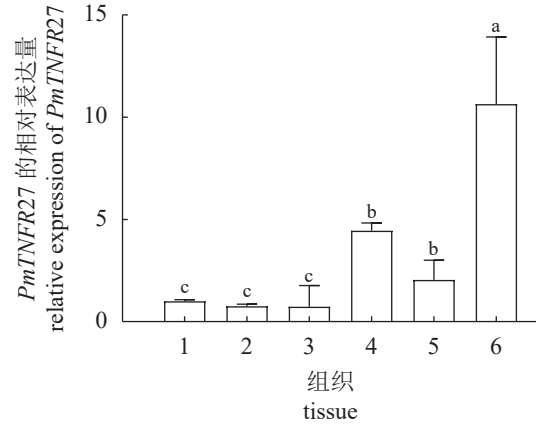


图 6 PmTNFR27 在不同组织中的表达分布

1. 血细胞, 2. 闭壳肌, 3. 性腺, 4. 外套膜, 5. 肝胰腺, 6. 鳃; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 6 Expression distribution of PmTNFR27 in the different tissues

1. hemocytes, 2. adductor muscle, 3. gonads, 4. mantle, 5. hepatopancreas, 6. gill, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), the same below.

镉 (Cd) 是一种有毒重金属, 不参与机体的生物功能^[42]。由于环境的污染, 金属污染物极易在生物体的免疫器官富集。研究发现, 有些软体动物如紫贻贝的鳃组织相较于其他组织对镉的富集能力更强^[43]。Sokolova 等^[19] 研究发现, 镉在美洲牡蛎的鳃中显著富集, 并主要在鳃组织线粒体中累积。本研究检测了马氏珠母贝在镉胁迫 48 h 内 6 个时间点鳃组织中的表达情况。结果发现 PmTNFR27 的表达量出现先上升后下降的趋势, 说明 3 h 时机体对镉胁迫迅速产生应激反应表达上调, 但随着胁迫时间延长, 镉会影响 PmTNFR27 mRNA 的表达, 从而表达下调。过量的镉对生物体产生

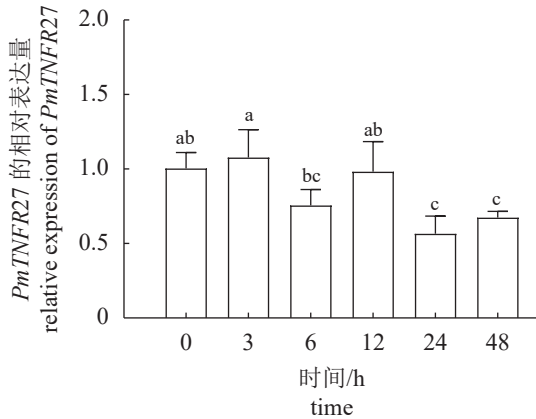


图 8 镉胁迫后鳃中 *PmTNFR27* 的时序表达

Fig. 8 Sequential expression of *PmTNFR27* in gills after cadmium stress

毒害作用, 可诱导生物体内活性物质如活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 过量产生, 过量活性物质积累到一定程度, 最终会致使机体氧化还原失衡而导致凋亡或坏死^[42]。转录因子 κ B 与 JNK 信号通路联合促炎症细胞因子来调节活性氧的生成, 起到保护机体的作用^[44]。TNF/TNFR 系统可以介导 NF- κ B 信号通路, 如香港牡蛎与热带海参的 TNFR 家族成员能够激活 NF- κ B^[4-5, 45]。由此推测 *PmTNFR27* 可能参与机体对镉胁迫的应激反应, 但具体的应激机制还需要进一步研究。

综上, 本研究首次从马氏珠母贝中克隆出 *PmTNFR27* cDNA 全长序列及对组织表达、免疫刺激与镉胁迫在鳃的表达模式进行分析。研究结果发现 *PmTNFR27* 可能参与马氏珠母贝的免疫应答, 后续将进一步探究其具体调控机制, 为其免疫调控机制研究奠定理论基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Bodmer J L, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, 27(1): 19-26.
- [2] Dostert C, Grusdat M, Letellier E, et al. The TNF family of ligands and receptors: communication modules in the immune system and beyond[J]. *Physiological Reviews*, 2019, 99(1): 115-160.
- [3] Ware C F. The TNF superfamily[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003, 14(3-4): 181-184.
- [4] Xiang Z M, Xiao S, Wang F X, et al. Cloning, characterization and comparative analysis of four death receptor TNFRs from the oyster *Crassostrea hongkongensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 59: 288-297.
- [5] Li H P, Chen T, Sun H Y, et al. The first cloned echinoderm tumor necrosis factor receptor from *Holothuria leucospilota*: molecular characterization and functional analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 542-550.
- [6] Wiens G D, Glenney G W. Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1324-1335.
- [7] Jones M D, Hunt J, Liu J L, et al. Determination of tumor necrosis factor binding protein disulfide structure: deviation of the fourth domain structure from the TNFR/NGFR family cysteine-rich region signature[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(48): 14914-14923.
- [8] 何军军, 梁海鹰, 陈崧, 等. 马氏珠母贝 *TRADD* 基因克隆与组织表达分析[J]. *广东海洋大学学报*, 2019, 39(4): 13-19.
He J J, Liang H Y, Chen S, et al. Gene cloning and tissue expression analysis of *TRADD* from *Pinctada martensii*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, 39(4): 13-19 (in Chinese).
- [9] Gravestien L A, Borst J. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system[J]. *Seminars in Immunology*, 1998, 10(6): 423-434.
- [10] Zhu Y G, Pang Y, Li Q W. Molecular evolution of the *tnfr* gene family and expression profiles in response to pathogens in lamprey (*Lethenteron reissneri*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 96: 336-349.
- [11] Kanda H, Igaki T, Kanuka H, et al. Wengen, a member of the *Drosophila* tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(32): 28372-28375.
- [12] Kauppila S, Maaty W S A, Chen P, et al. Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in *Drosophila*[J]. *Oncogene*, 2003, 22(31): 4860-4867.
- [13] Li L, Qiu L M, Song L S, et al. First molluscan TNFR homologue in Zhikong scallop: molecular characterization and expression analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(5): 625-632.
- [14] Su J G, Qiu L M, Li L, et al. cDNA cloning and characterization of a new member of the tumor necrosis factor receptor family gene from scallop, *Chlamys farreri*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(7): 4483-4490.
- [15] Xing Q, Yu Q, Dou H Q, et al. Genome-wide identification, characterization and expression analyses of two *TNFRs* in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) provide insight into the disparity of responses to bacterial infections and heat stress in bivalves[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 52: 44-56.
- [16] Wu Y Y, He J J, Yao G Y, et al. Molecular cloning, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- characterization, and expression of two TNFRs from the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 147-159.
- [17] 房晓宸, 卢金昭, 梁海鹰, 等. 马氏珠母贝 *Bcl-2-like* 基因克隆及其功能初探[J]. 水产学报, 2021, 45(5): 661-671. Fang X C, Lu J Z, Liang H Y, et al. Cloning and preliminary study on the function of *Bcl-2-like* gene in *Pinctada fucata martensii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(5): 661-671 (in Chinese).
- [18] Roméo M, Gnassia-Barelli M. Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper, or zinc[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1995, 111(3): 457-463.
- [19] Sokolova I M, Ringwood A H, Johnson C. Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 74(3): 218-228.
- [20] Wang W, Wu Y Y, Lei Q N, et al. Deep transcriptome profiling sheds light on key players in nucleus implantation induced immune response in the pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 69: 67-77.
- [21] 吴羽媛, 郭志颖, 梁海鹰, 等. 马氏珠母贝 *PmLec-8* 基因的克隆与表达分析 [J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(4): 1-7. Wu Y Y, Guo Z Y, Liang H Y, et al. Clone and expression analysis of *PmLec-8* gene from *Pinctada fucata martensii*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University* 2017, 37(4): 1-7 (in Chinese).
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] Yan M H, Wang L C, Hymowitz S G, et al. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors[J]. *Science*, 2000, 290(5491): 523-527.
- [24] Quistad S D, Traylor-Knowles N. Precambrian origins of the TNFR superfamily[J]. *Cell Death Discovery*, 2016, 2: 16058.
- [25] 焦钰, 杜晓东, 王庆恒, 等. 马氏珠母贝 *IKKε* 同源基因的克隆及表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(2): 266-272. Jiao Y, Du X D, Wang Q H, et al. Molecular characterization and expression analysis of *PmIKKε* cDNA from *Pinctada martensii*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33(2): 266-272 (in Chinese).
- [26] 张英霞, 邹瑗徽, 满初日嘎, 等. 马氏珠母贝鳃组织抗菌活性的研究[J]. 水产科学, 2010, 29(8): 465-468. Zhang Y X, Zou A H, Manchu R G, et al. Antimicrobial activity in gills of shellfish *Pinctada martensii*[J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(8): 465-468 (in Chinese).
- [27] 王志新, 梁海鹰, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝热休克蛋白 *HSP60* 基因的克隆与表达分析[J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(6): 14-23. Wang Z X, Liang H Y, Du X D, et al. Cloning and express characters of *HSP60* gene from *Pinctada martensii*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2013, 33(6): 14-23 (in Chinese).
- [28] Song L S, Wang L L, Zhang H, et al. The immune system and its modulation mechanism in scallop[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 65-78.
- [29] Wang L L, Qiu L M, Zhou Z, et al. Research progress on the mollusc immunity in China[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(1-2): 2-10.
- [30] Wang L L, Song X R, Song L S. The oyster immunity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 80: 99-118.
- [31] Yu Y D, Qiu L M, Song L S, et al. Molecular cloning and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) gene homologue from Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(2): 419-429.
- [32] 李毅, 金一, 孙伦泉, 等. 双链RNA的免疫调节作用及聚肌胞抗病毒应用进展[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(4): 335-336. Li Y, Jin Y, Sun L Q, et al. Immunomodulation and antiviral application of Poly I: C[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2011, 32(4): 335-336 (in Chinese).
- [33] Tang X R, Marciano D L, Leeman S E, et al. LPS induces the interaction of a transcription factor, LPS-induced TNF- α factor, and STAT6(B) with effects on multiple cytokines[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(14): 5132-5137.
- [34] Zhang D C, Jiang J J, Jiang S G, et al. Molecular characterization and expression analysis of a putative LPS-induced TNF- α factor (LITAF) from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(3): 391-396.
- [35] Wong F, Hull C, Zhande R, et al. Lipopolysaccharide initiates a TRAF6-mediated endothelial survival signal[J]. *Blood*, 2004, 103(12): 4520-4526.
- [36] Karsan A, Yee E, Harlan J M. Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor- α is inhibited by the Bcl-2 family member, A1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(44): 27201-27204.

- [37] Shimoya K, Moriyama A, Matsuzaki N, *et al.* Human placental cells show enhanced production of interleukin (IL)-8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumour necrosis factor (TNF)- α , but not to IL-6[J]. *Molecular Human Reproduction*, 1999, 5(9): 885.
- [38] 谷泽丰, 曹艳飞, 杨海霞, 等. Janus 激酶 3 抑制剂对马氏珠母贝珍珠囊发育和免疫相关基因表达的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(2): 1-6.
- Gu Z F, Cao Y F, Yang H X, *et al.* Effect of Janus kinase 3 inhibitor on the development of pearl sac and the expression of immune-related genes in pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University* 2020, 40(2): 1-6 (in Chinese).
- [39] Hong S, Wang T Y, Secombes C J, *et al.* Different origins of paralogues of salmonid TNFR1 and TNFR2: characterisation and expression analysis of four TNF receptor genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 99: 103403.
- [40] Zhu Y G, Li J, Li Q W, *et al.* Characterization of lamprey (*Lampetra japonica*) *tnfr*10-like gene: a potential granulocyte marker molecule and its immune functions[J]. *Molecular Immunology*, 2020, 124: 25-34.
- [41] 叶航宇, 葛岩岩, 吴金英, 等. 尼罗罗非鱼 *TNF-R1* 和 *TNF-R2* 基因克隆及表达[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2020, 59(5): 144-155.
- Ye H Y, Ge Y Y, Wu J Y, *et al.* Cloning and expression analysis of Nile tilapia *TNF-R1* and *TNF-R2* gene[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2020, 59(5): 144-155 (in Chinese).
- [42] Thévenod F, Lee W K. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways[J]. *Archives of Toxicology*, 2013, 87(10): 1743-1786.
- [43] 陈敏嫣, 水珊珊, 周晓娇, 等. 沿海紫贻贝体内重金属含量及相关性分析[J]. *环境科学与技术*, 2020, 43(6): 24-29.
- Chen M Y, Shui S S, Zhou X J, *et al.* Analysis on the content and correlation of heavy metals in *Mytilus edulis*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 43(6): 24-29 (in Chinese).
- [44] Morgan M J, Liu Z G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling[J]. *Cell Research*, 2011, 21(1): 103-115.
- [45] Qu F F, Xiang Z M, Zhang Y, *et al.* Molecular identification and functional characterization of a tumor necrosis factor (TNF) gene in *Crassostrea hongkongensis*[J]. *Immunobiology*, 2017, 222(5): 751-758.

Cloning and preliminary study on the functions of *PmTNFR27* gene in *Pinctada fucata martensii*

LIANG Bidan¹, LU Jinzhao¹, LIANG Haiying^{1,2*}, ZHANG Meizhen¹,
SHEN Chenghao¹, ZHANG Bin¹

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Control and Healthy Culture, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Tumor necrosis factor receptor (TNFR) is an important cytokine receptor, mainly involved in biological processes such as apoptosis, host immune defense, and inflammation. In order to reveal the role of TNFR gene in the immune process of *Pinctada fucata martensii*, a full length of *PmTNFR27* was obtained using rapid amplification of cDNA ends technology, and the expression levels of different tissues, LPS and Poly (I:C) immune stimulation and cadmium stress were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Results showed that the total length of cDNA was 1,524 bp, including a 5'UTR of 186 bp, a 3'UTR of 248 bp and an open reading frame (ORF) of 1,062 bp encoding 353 amino acids. Domain prediction showed that *PmTNFR27* contained a transmembrane domain and a CRD domain which is typical of the TNFR superfamily. Multiple sequence alignment indicated that *PmTNFR27* has low similarity compared with other bivalve species, but its domain regions were highly conservative. Phylogenetic analysis showed that it clustered with other bivalves. In addition, qRT-PCR data indicated that *PmTNFR27* was expressed in all tested tissues, with the highest expression in gill. After LPS stimulation, the relative expression of *PmTNFR27* in gills reached the maximum at 3 h and decreased to the minimum at 72 h, and the maximum was 9.67 times of the minimum. After Poly (I:C) stimulation, the relative expression of *PmTNFR27* in gills was significantly up-regulated, reached the maximum at 6 h and 12 h, and decreased to the minimum at 96 h, the maximum being 13.16 times of the minimum. After cadmium stress, the relative expression of *PmTNFR27* reached the maximum at 3 h, and was significantly down-regulated at 24 h and 48 h. This study suggested that *PmTNFR27* may be involved in the immune defense response of *P. fucata martensii* and could provide basis for the further study of the biological functions of TNFR in the shellfish.

Key words: *Pinctada fucata martensii*; *PmTNFR27*; gene cloning; immune stimulation

Corresponding author: LIANG Haiying. E-mail: zjlianghy@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31472306); Guangdong Natural Science Foundation of China (2023A1515012924, 2021A1515010962); Science and Technology Special Fund of Guangdong Province (2021A05250); Special Project of Harbor Construction and Fishery Industry Development of Guangdong Province (A201608B15); Innovation Team Project from the Department of Education of Guangdong Province 2021KCXTD026)D026)