

DOI: 10.11964/jfc.20220713589



乙酰化修饰对马氏珠母贝植核免疫的作用

卢金昭¹, 张彬¹, 梁海鹰^{1,2*}, 梁碧丹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:

【目的】马氏珠母贝植核育珠技术会导致受体贝发生免疫排斥甚至死亡, 严重影响了珍珠的质量和品质。本研究通过分析提高蛋白质乙酰化修饰水平对马氏珠母贝植核免疫的影响, 从而探究乙酰化修饰在其植核后的作用。

【方法】通过注射赖氨酸去乙酰化酶抑制剂 (lysine deacetylase inhibitor, KDI) 混合物, 并采用荧光定量 PCR (qRT-PCR)、蛋白印迹 (western blot, WB)、抗氧化酶活性检测以及养殖指标等多水平综合分析蛋白质乙酰化修饰水平对马氏珠母贝植核免疫的影响。

【结果】注射 KDI 混合物后, 首先检测 *HDAC 6/10* (10006221)、*Sir2* 家族成员 (10031932 和 10020349) 这 3 个去乙酰转移酶基因的表达水平, 发现均在不同时间出现显著下调, 鳃组织总蛋白乙酰化水平在 72 h 显著提高, 表明注射药物后提高了乙酰化水平; 其次使用 qRT-PCR 检测免疫相关因子的时序表达, 结果显示, *IRAK1*、*IL-17*、*NF-κB* 和 *CASP 2* 基因的表达在 12 h 都出现显著上调, *IκK* 在 48 h 显著上调, 而 *TRAF 3* 从 48 h 后则出现显著下调, 表明经 KDI 刺激后受体贝机体细胞免疫增强; 抗氧化酶 *GSH-Px*、*POD* 和 *CAT* 酶活性在 12 h 和 24 h 表现出显著上调的趋势, 表明受体贝机体体液免疫增强; 最后, 结合养殖数据分析, 发现 60 d 的存活率和留珠率显著提高。

【结论】乙酰化修饰参与了马氏珠母贝的植核免疫反应, KDI 可以作为免疫调节剂调节马氏珠母贝的植核免疫应答, 为深入探究乙酰化修饰的生物学功能和调控机制奠定基础, 为合理控制珍珠贝免疫反应提供理论支撑。

关键词: 马氏珠母贝; 植核; 乙酰化修饰; KDI

第一作者: 卢金昭, 从事珍珠培育与加工研究, E-mail: 571658258@qq.com



通信作者: 梁海鹰, 从事海洋生物功能基因及蛋白质研究, E-mail: zli-anghy@126.com

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); 南海经济动物物种质创新与利用创新团队 (2021KCXTD026)

收稿日期: 2022-07-04

修回日期: 2022-11-10

文章编号:

1000-0615(2025)03-039415-10

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

马氏珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*) 所培育的珍珠又称“南珠”, 其珍珠产量占全国海水珍珠的 95% 以上^[1]。其中, 人工育珠过程中最核心的就是植核育珠技术: 即将珠核和细胞小片 (来自供体贝) 植入到受体贝的内脏团中, 之后受体贝组织和细胞小片共同形成珍珠囊, 珍珠囊从中分泌出珍珠质来形成珍珠^[2]。移植后, 外来物质 (小片、珠核) 以及手术过程中造成的植入伤口, 都会刺激受体贝产生各种免疫



反应。受体贝的有效免疫应答可以帮助其修复手术造成的伤口, 以及清除手术中带入的病原体; 然而, 过强的免疫反应会导致受体贝发生排斥甚至死亡, 这严重影响了珍珠的质量和品质^[3]。因此, 马氏珠母贝的植核耐受机制及如何有效调控珍珠贝植核后的免疫应答备受珍珠产业和研究者的关注。

针对珍珠产业存在的问题, 相关人员对育珠生产技术不断进行改进。首先, 通过对受体贝进行术前处理使其达到一个更适宜植核的生理状态^[4-5], 其次, 采用在池塘中休养的方式避免受体贝因饵料生物不足以及环境波动所造成的不利影响, 使受体贝在植核后前期保持稳定, 有助于度过排斥的困难时期^[6]。最后, 则是通过不同成分的小片培养液来处理育珠小片, 以提高细胞小片的活力, 来促进细胞的分泌以增强其与组织和珠核的亲合力, 并加速珍珠层的形成^[7]。其中, Gu 等^[8]利用免疫抑制剂霉酚酸酯以及 JAK3 抑制剂^[9]作为小片培养液, 发现其可以有效调节受体贝因植核所引起的免疫反应。但是, 植核的过程中伴随着细菌的侵染, 免疫抑制剂可能与抗生素结合使用才能获得更好的效果。

目前, 马氏珠母贝中的赖氨酸乙酰转移酶 (lysine/histone acetyltransferase, KAT/HAT) 和赖氨酸去乙酰化酶 (lysine/histone deacetylase, KDAC/HDAC) 已开展了全基因组鉴定和进化分析, 并且 HDAC 6/10(10006221) 和 2 个 silent information regulator 2(Sir2) 家族基因的表达在植核血细胞转录组不同时间都发生显著上调^[10], 表明 KDAC 参与了马氏珠母贝植核后的免疫反应。KDAC 抑制剂 (KDAC inhibitor, KDI) 是一类可以干扰 KDAC 发挥作用的化合物, 可以提高组蛋白和非组蛋白的乙酰化水平, 介导细胞的凋亡^[11]、分化^[12]、抗肿瘤活性^[13]和调节免疫反应^[14]等。并且, 有进一步研究报道, 曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA)、丁酸盐和 EX-527 等作为潜在的移植后免疫调节剂具有很好的安全性^[15]。

KDI 可以根据其结构的差异分为 5 类: 短链脂肪酸、羧酸类、含有 AOE 基团的环状四肽、不含有 AOE 基团的环状四肽和苯胺类^[16]。常用的 KDI 主要是 TSA、丁酸钠、EX-527 和烟酰胺 (nicotinamide, NAM)。其中 TSA^[11] 和丁

酸钠^[17] 针对于 HDAC I 和 HDAC II, EX-527^[18] 是 SIRT1 的选择性可逆抑制剂, 对 SIRT2 和 SIRT3 也有一定的抑制作用; 而 NAM 则是针对于 HDAC III^[19], 它们也能参与去乙酰化酶涉及的各种功能^[20]。马氏珠母贝组蛋白乙酰化修饰参与调控植核免疫已经得到了证实, 其中丁酸钠刺激可以抑制受体贝血细胞增殖, 激活胞内免疫系统以及激活珍珠贝的体液免疫系统^[10], 但是目前对于珍珠贝非组蛋白的乙酰化修饰还了解甚少。因此, 本实验通过注射 KDI 混合物, 借助分子、生化以及养殖指标等多水平综合分析, 探讨提高蛋白质乙酰化修饰水平对珍珠贝植核免疫的影响。本研究为深入研究蛋白质乙酰化修饰的生物学功能和调控机制奠定了基础, 为进一步阐明珍珠贝植核反应的分子调控机制提供了理论依据, 并为合理控制珍珠贝免疫反应提供了技术指导。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与试剂

样品采集在 5 月下旬, 以养殖在广东省徐闻县大井海区、贝龄为 1.0~1.5 龄的马氏珠母贝作为研究材料。随机分为以下 3 组: 只进行植核手术的马氏珠母贝, 为植核组 (ZH 组); 注射 100 μ L KDI (碧云天生物技术有限公司, 上海) 后进行植核手术的, 为实验组 (KDI 组); 注射 100 μ L 0.7% DMSO 后进行植核手术的, 为对照组 (DMSO 组), 其中 0 h 为未经处理的同一批贝。实验中每只贝植入 2 个珠核, 挑选 3 个技术熟练的插核工, 确保每个技术员分到同一处理组的个数一致, 防止技术误差。处理后的贝放置于适宜且相同的环境下继续养殖。

广谱去乙酰化酶抑制剂 (KDI) 成分 (100 \times) 包含 40 μ mol/L TSA、1 mmol/L EX-527、400 mmol/L NAM 和 200 mmol/L 丁酸钠溶解在 70% DMSO 中。

①以经过术前处理的未植核马氏珠母贝为 0 h 样品, 各组分别于植核后 12、24、48、72 和 96 h 取 8~10 个个体的鳃组织。

②养殖实验分组如上所述, 每组 5 笼重复, 每笼 38 只。处理后的贝放在海区养殖, 在植核手术后 7、45 和 60 d 测量存活率, 并在 60 d 测量留珠率。

1.2 鳃组织总蛋白乙酰化水平检测

使用前, 取适当量的组织 Western 及 IP 细胞裂解液 (碧云天生物技术有限公司, 上海), 加入 PMSF, 并使 PMSF 的最终浓度为 1 mmol/L; 使用已灭菌的剪刀将组织样品剪碎, 按照每 20 mg 组织加入 150 μ L 裂解液的比例加入裂解液, 以及灭菌的钢珠, 匀浆; 样品充分裂解后, 12 000 \times g 离心 4 min, 取其上清液使用 BCA 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 上海) 测定蛋白浓度; 取 40 μ g 蛋白样品继续实验, 其余样品于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

按蛋白电泳凝胶制备试剂盒 (中晖赫彩生物医药科技有限公司, 西安) 制胶, 120 V 电泳 1.5~2.0 h; 将整块胶浸于印迹膜转印缓冲液 (生工生物工程上海股份有限公司) 平衡 10 min, PVDF 膜需先用甲醇浸泡饱和 3~5 s; 以“三明治”形式装配 (滤纸+膜+胶+滤纸), 每层放好后用玻璃棒赶走气泡, 保持电压 150~200 V 转膜 1 h 后; 取出膜后用 TBST (生工生物工程上海股份有限公司) 在室温摇床上洗膜 5 min; 将膜置于封闭缓冲液 [用 TBST 配置 5% 脱脂牛奶 (BB II 生命科学有限公司, 中国)], 37 $^{\circ}$ C 放置摇床上封闭 1 h 或者 4 $^{\circ}$ C 过夜; 如上操作, 洗膜 3 次; 以 1 : 500 用封闭缓冲液稀释乙酰化泛抗体 (景杰生物科技股份有限公司, 杭州), 37 $^{\circ}$ C 放置摇床上封闭 1~2 h 或者 4 $^{\circ}$ C 过夜 (缓慢摇动); 用 TBST 洗涤 5 次 (5 min/次); 以 1 : 1 000 用 TBST 配置 5% 脱脂牛奶稀释碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体 (全式金生物技术有限公司, 北京), 37 $^{\circ}$ C 放置摇床上封闭 40 min (缓慢摇动); TBST 洗涤 5 次 (5 min/次); 成像加入 ECL 显色液 (碧云天生物技术有限公司, 上海), 使用 Tanon 5200 化学发光成像分析系统 (天能科技有限公司, 上海) 拍照。

1.3 鳃组织荧光定量分析

采用 TRIzol 法提取组织的总 RNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop ND1000 紫外分光光度计测 A_{260}/A_{280} 比值检查 RNA 的质量后, 快速转入 -80 $^{\circ}$ C 保存。荧光定量模板制备, 制备方法参考王志新等^[21]。

以 β -actin 作为内参基因, 参考王志新等^[21], 实验结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。运用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行差异显著性检验 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 实时荧光定量引物

Tab. 1 Primer sequences used in the qRT-PCR

引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')
<i>HDAC 6/10-F</i>	TACCACATTCACAAAGCCAA
<i>HDAC 6/10-R</i>	TGTAATAGAGCCTCCTCCCA
<i>Sir2-F</i> (10031932)	CGGGCAAATACCGACCTAA
<i>Sir2-R</i> (10031932)	GCCAATCTCTCCAGTCCATCTA
<i>Sir2-F</i> (10020349)	GGAACACATCAAGAAGGAGGC
<i>Sir2-R</i> (10020349)	CCGCACCTGTGAAAGCAAC
<i>SOD-F</i>	TGCCTTCTTCATGATGGAGTG
<i>SOD-R</i>	ATGTTCTCGTCTGCTCCGAGTT
<i>IRAK-1-F</i>	CGGCAGTAAATCCACAGGTTCT
<i>IRAK-1-R</i>	AGGTTTCTATGGGAGATGGGTG
<i>TRAF-3-F</i>	GTGATCCGTGAGACTCAAGCTA
<i>TRAF-3-R</i>	ACTGCCAGTATTGCCCTCTATT
<i>caspase-2-F</i>	GTAACGTAACAGACGTAGGTGCAG
<i>caspase -2-R</i>	TGGTATGACATCAAGCAGAGCC
<i>NF-κB-S</i>	AGAAGAGACAGGCCAAAGAGCA
<i>NF-κB -A</i>	AGAGAGAACAGGCGTGAGAAGC
<i>Ikk-S</i>	TATTAAGGCTCAGGCAGAGGTAT
<i>Ikk-A</i>	TTGGAGTTGCTGATTACGGATT

1.4 鳃组织抗氧化酶活性检测

用高温灭菌的剪刀和镊子剪组织的样品, 冰冷的灭菌盐水的量是组织重量的 9 倍, 匀浆完全后取上清液测定蛋白浓度。酶活性的测定参考南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行操作^[22-23]。

1.5 存活率和留珠率统计

在植核手术后 7、45 和 60 d 测量存活率, 并在 60 d 测量留珠率, 方法参考 Gu 等^[8] 方法, 使用以下公式计算:

存活率 (%) = 每笼存活的珍珠贝个数 / 实验前每笼珍珠贝的总个数 $\times 100\%$

留珠率 (%) = 每笼收获的珍珠个数 / (实验后每笼珍珠贝的存活个数 $\times 2$) $\times 100\%$

2 结果

2.1 KDAC 的表达变化

在马氏贝植核后血细胞转录组研究的基础上, 实验对 *HDAC 6/10* (10006221)、*Sir2* 家族成员 (10031932) 以及 *Sir2* 家族成员 (10020349) 基

因的表达情况进行了荧光定量验证 (图 1)。实验结果显示, KDAC 相关基因在植核后鳃组织

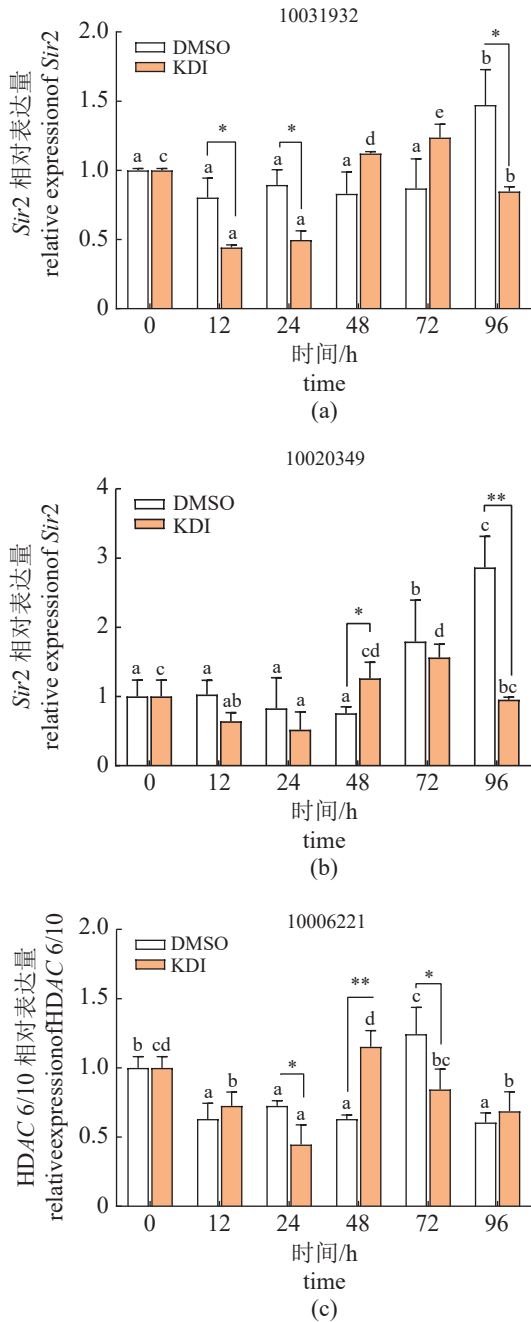


图 1 KDI 刺激并植核后部分 KDAC 在 马氏珠母贝鳃组织中的时序表达

相同组别中, 不同字母代表有显著差异 ($P < 0.05$); 相同时间点与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 图 3 同。

Fig. 1 Relative expression of partial KDAC in gill tissue of *P. fucata martensii* after KDI stimulation of implantation

In the same group, different letters mean a significant difference; compared with the control group at the same time point ($P < 0.05$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, the same as Fig. 3.

的表达水平基本上呈现出先下降后上升的趋势, 这可能与乙酰化修饰参与了马氏珠母贝植核免疫反应有关; 其中, 1003193 在注射药物并植核后 12、24 和 96 h 都显著下调; 10020349 与对照组相比, 在 48 h 小幅度上升后在 96 h 大幅度下降; 而 10006221 与对照组相比在 24 和 72 h 都显著下降。

2.2 鳃组织总蛋白乙酰化修饰变化

对马氏珠母贝注射 KDI 并植核后, 对鳃组织总蛋白的乙酰化修饰程度进行检测, 并对所圈住的位置单独进行曝光。结果显示, 植核后总蛋白的乙酰化修饰程度增加, 且 72 h 总蛋白乙酰化修饰相比对于对照组变化最明显 (图 2)。

2.3 免疫相关因子的荧光定量

对药物注射后鳃组织中马氏珠母贝的免疫相关因子 I κ B 激酶 (I κ B kinase, I κ K)、白介素-17 (interleukin-17, IL-17)、核转录因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)、IL-1 受体相关激酶-1 (interleukin 1 receptor associated kinase 1, IRAK-1)、Caspase 2 (CASP 2) 和肿瘤坏死因子受体相关因子 3 (tumor necrosis factor receptor-associated factors 3, TRAF3) 进行了时序表达检测。结果显示, 注射 KDI 并植核后, NF- κ B 和 Caspase 2 基因的表达变化趋势一致, 都呈现出上升-下降-上升的趋势; 与对照组相比, IRAK1、IL-17、NF κ B 和 Caspase 2 基因的表达在 12 h 都出现显著上调, I κ K 基因在 48 h 显著上调, TRAF3 基因则在 48、72 和 96 h 显著下调 (图 3)。研究表明, 注射 KDI 后马氏珠母贝的细胞免疫增强。

2.4 抗氧化酶活性检测

对谷胱甘肽过氧化酶 (GSH-Px)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的酶活性进行检测, 结果显示, 其在 ZH 组和 DMSO 组的变化趋势基本一致, 而在 KDI 注射组中基本呈现出先上升后下降的趋势, 并且在 12 和 24 h 表现出显著上调 (图 4), 表明 KDI 刺激后马氏珠母贝的抗氧化酶活性增强。

2.5 存活率和留珠率统计

分别在植核手术后 7、45 和 60 d, 统计 3 组 (ZH、DMSO 和 KDI) 植核贝的存活率, 并在 60 d 统计留珠率 (表 2)。结果表明, 60 d KDI

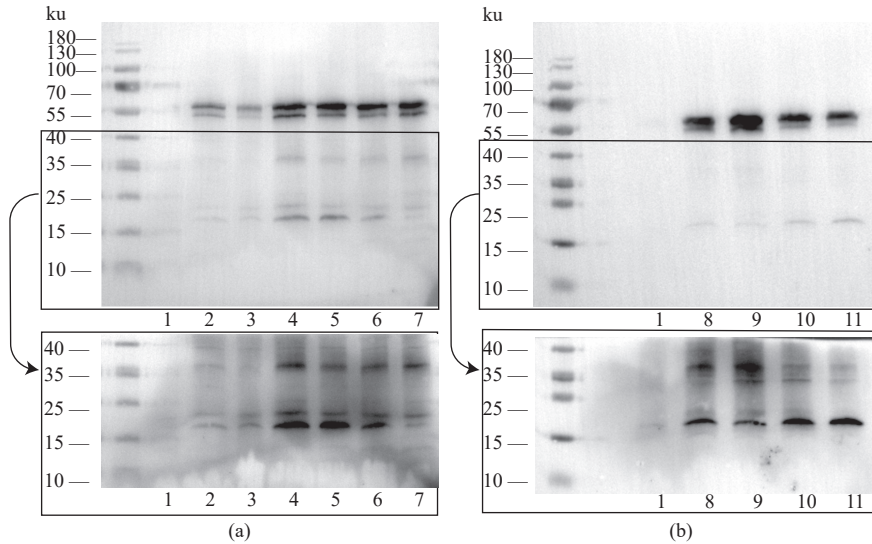


图 2 KDI 刺激并植核后马氏珠母贝鳃组织中总蛋白的乙酰化水平

1. 0 h, 2. DMSO 组 12 h, 3. KDI 组 12 h, 4. DMSO 组 24 h, 5. KDI 组 24 h, 6. DMSO 组 48 h, 7. KDI 组 48 h, 8. DMSO 组 72 h, 9. KDI 组 72 h, 10. DMSO 组 96 h, 11. KDI 组 96 h.

Fig. 2 Acetylation levels of total protein in gill tissues *P. fucata martensii* after KDI stimulation of implantation

1. 0 h, 2. DMSO group 12 h, 3. KDI group 12 h, 4. DMSO group 24 h, 5. KDI group 24 h, 6. DMSO group 48 h, 7. KDI group 48 h, 8. DMSO group 72 h, 9. KDI group 72 h, 10. DMSO group 96 h, 11. KDI group 96 h.

组与植核组以及空白组相比, 存活率和留珠率显著上升。在 60 d, KDI 组、DMSO 组和 ZH 组的留珠率分别为 55.18%±1.81%、51.41%±1.25% 和 72.45%±6.96%。

3 讨论

马氏珠母贝的植核免疫耐受机制和有效的分子调控模式一直是研究的热点, 而目前研究者们已经在基因组、转录组、蛋白质组等方面对其展开研究, 并且通过组学鉴定得到了大量的差异基因和蛋白, 但在植核免疫抑制剂方面的研究还较少。本研究通过注射 KDI 混合物后, 借助分子、生化以及养殖指标等多水平综合分析, 表明 KDI 可作为一种免疫调节剂参与对珍珠贝植核免疫应答的调控。

免疫相关因子 IκK、IRAK1、IL-17、NFκB、Caspase 2 和 TRAF 3 已被证实是在珍珠贝的先天免疫反应中起着重要作用, 其中, IRAK1、IL-17、NFκB 和 IκK 都是 TLR/ NF-κB 信号通路中的关键分子。在马氏珠母贝中, IκK 的功能与脊椎动物相似, 都可以诱导 NFκB 发生易位, 并激活 NFκB 控制的下游靶基因的表达^[24]; IRAK1 是一种细胞内激酶, 与白细胞介素-1 和 Toll 样受体信号通路的调节有关^[25]; IL-17 是一

种促炎因子, 马氏珠母贝中 IL-17 -2 由颗粒细胞产生, 在脂多糖刺激后 IL-17 -2 有强烈应答^[25]; Caspase-2 与抑制肿瘤和细胞凋亡方面有关^[26], TRAF 3 参与调控 IFN, 在马氏珠母贝中 TRAF 3 表现出与在哺乳动物中相似的功能, 参与机体先天免疫反应^[27]。并且, Adzigbli^[28] 在对马氏珠母贝黑壳色选系的产珠性能研究中, 提出在植核后 0 h~3 d 上调的基因主要与植核后的免疫应答有关。因此, 本研究选取了 0 h~4 d 的受体贝鳃组织进行相关检测, 并选取了上述 6 个基因侧面反映受体贝的细胞免疫水平。

在 KDI 刺激后, 结合 KDAC 的荧光定量结果以及总蛋白乙酰化修饰变化情况表明, KDI 提高了受体贝鳃组织总蛋白的乙酰化修饰水平。之后, 结合细胞免疫相关基因的荧光定量结果表明, 与对照组相比, 注射 KDI 并植核后 IRAK1、IL-17 和 NFκB 基因的表达在 12 h 均出现了显著上调, 而 IκK 则在 48 h 发生了显著上调。其中, NFκB 是免疫和炎症反应的媒介, 有研究表明 KDI 可以抑制 HDAC 3 的活性, 并通过对 p65 亚基乙酰化的改变, 从而增强 TNF α 对 NFκB 的转录激活^[29-30]。而 TRAF3 蛋白可以与 NF-κB 诱导激酶 (NF-κB inducing kinase, NIK) 发生相互作用, 并参与对 NF-κB 活化的负

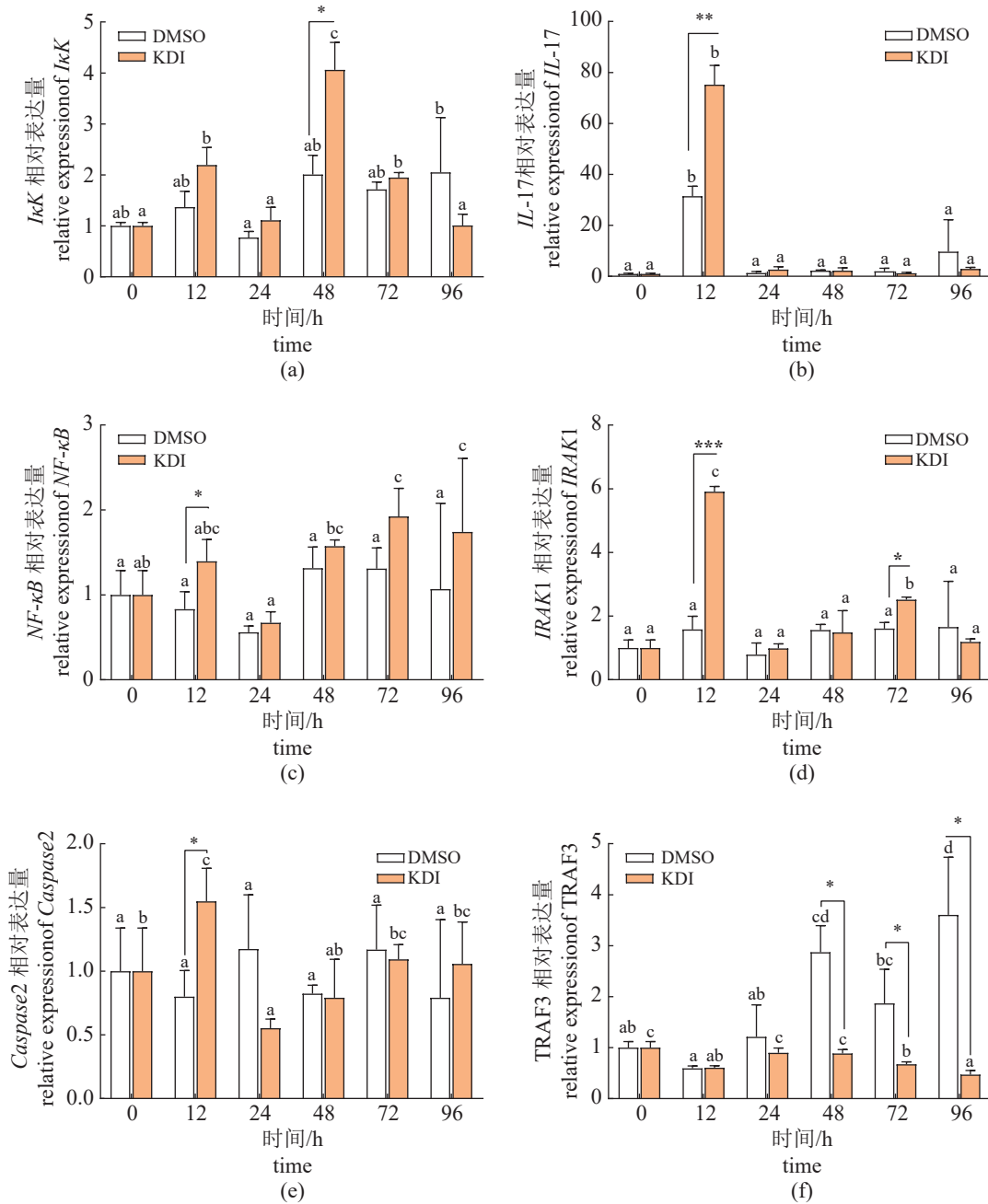


图3 KDI刺激植核后免疫因子在马氏珠母贝鳃组织中的时序表达

Fig. 3 Relative expression of immune factors in gill tissue of *P. fucata martensii* after KDI stimulation of implantation

调控^[31], 这可能是 TRAF 3 基因表达显著下调的原因。最后, IRAK-1 可以通过 C 末端结构域与 TRAF 6 相互作用, 参与正调节 NF-κB 的活化^[32]。以上结果综合表明, 注射 KDI 混合物后, 提高了受体贝鳃组织总蛋白的乙酰化修饰水平, 从而影响了 NF-κB 通路调控的细胞免疫反应。

植核手术会造成受体贝发生氧化应激, 而抗氧化酶可以清除机体内因氧化应激而产生的

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 自由基, 防止机体受到氧化损伤^[33], 这也在一定程度上侧面反映了植核免疫反应的强弱。已有研究表明, HeLa 宫颈癌细胞经 KDI 处理后, 氧化蛋白增加并诱导其细胞中 GSH 的消耗^[34]; 马氏珠母贝注射丁酸钠处理后, CAT、GSH-Px 和 SOD 等多种酶的活性升高^[10]。而在本研究中, 在注射 KDI 混合物后, 受体贝鳃组织的 GSH-

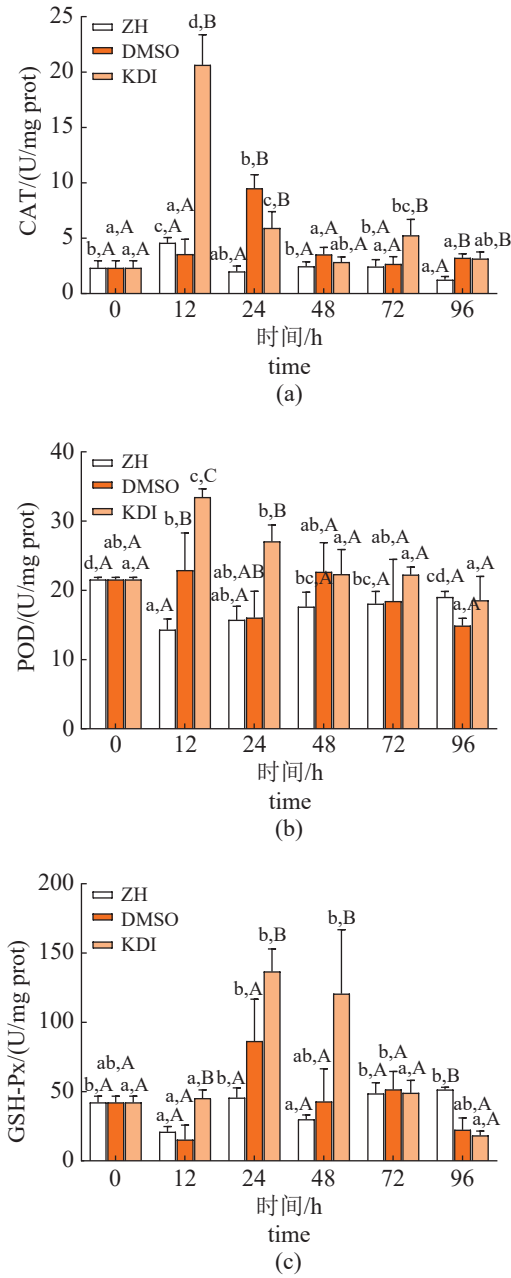


图 4 KDI 刺激植核后抗氧化酶活性的时序变化

相同组别的显著差异用小写字母表示, 相同时间不同组别的显著差异用大写字母表示, 不同字母代表有显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Antioxidant enzyme activity in gill tissue of *P. fucata martensii* after KDI stimulation of implantation

Significant differences between the same groups are indicated by lower case letters, different groups at the same time are indicated by upper case letters, different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

Px、POD 和 CAT 等抗氧化酶活性在 12 h 都有了不同程度的上升, 这可能是由于乙酰化修饰发生了变化, 造成了乙酰-CoA 的波动, 继而影响到机体的抗氧化防御功能。

表 2 KDI 刺激并植核后存活率和留珠率统计

Tab. 2 Survival and retention rates statistics of *P. fucata martensii* after KDI stimulation of implantation

组别 groups	7 d 存活率 survival rate	45 d 存活率 survival rate	60 d 存活率 survival rate	60 d 留珠率 rentation rate
ZH	70.04±8.50 ^a	51.75±10.63 ^a	49.12±9.96 ^a	55.18±1.81 ^a
DMSO	79.63±6.99 ^a	65.79±6.96 ^a	64.91±8.46 ^{ab}	51.41±1.25 ^a
KDI	80.20±2.84 ^a	67.54±5.48 ^a	65.79±4.56 ^b	72.45±6.96 ^b

注: 不同字母代表相同时间的不同组别有显著差异 ($P < 0.05$)。

Notes: Different letter means significant difference within different groups at the same time ($P < 0.05$).

周畅等^[35]发现植核手术会使受体贝的体液和细胞免疫水平都发生显著降低, 继而导致了植核后的高死亡率, 因此珍珠生产的质量和产量很大程度上取决于受体贝的免疫应答^[36]。而焦钰等^[37]对马氏珠母贝植核后珍珠囊发育过程中血清免疫因子的研究表明, 植核手术 0~30 d 可能是受体贝适应性应答的关键时期, 并通过对生产实践的观察, 发现在插核 30 d 后, 珍珠囊开始大量分泌珍珠质, 而到插核 60 d 时, 珍珠囊可以稳定分泌珍珠质^[38]。因此, 本研究在注射 KDI 混合物后, 统计了 60 d 的存活率和留珠率, 并发现受体贝的存活率和留珠率都有显著提高。

综上所述, KDI 处理后增强了马氏珠母贝的细胞免疫和体液免疫水平, 并提高了存活率和留珠率, 这些表明乙酰化修饰参与了珍珠贝的植核免疫反应。而植核后 12 h 多个免疫因子表达升高以及抗氧化酶活性增加, 以及存活率和留珠率在 60 d 的显著提高, 也表明了 KDI 可以作为一种免疫调节剂参与对珍珠贝植核免疫应答的调节。

参考文献 (References):

[1] 王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.
Wang R C, Wang Z P. Science of marine shellfish culture[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008 (in Chinese).

[2] 焦钰, 师尚丽, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝珍珠囊发育的组织和组织化学研究 [J]. 广东海洋大学学报, 2010, 30(4): 7-10.
Jiao Y, Shi S L, Du X D, et al. Histology and histochemistry on the pearl sac formation of pearl oyster *Pinctada martensii*[J].

- Journal of Guangdong Ocean University*, 2010, 30(4): 7-10 (in Chinese).
- [3] 梁飞龙, 邓岳文. 术后处理对马氏珠母贝育珠贝产珠性能的影响 [J]. *广东海洋大学学报*, 2019, 39(5): 50-55.
- Liang F L, Deng Y W. Experiments on post-operative treatment of host oysters of *Pinctada martensii*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, 39(5): 50-55 (in Chinese).
- [4] 邓陈茂, 梁飞龙, 符韶, 等. 马氏珠母贝术前处理与育珠研究 [J]. *海洋湖沼通报*, 2010(4): 124-128.
- Deng C M, Liang F L, Fu S, *et al.* Study on pre-operation condition and pearl production of *Pinctada martensii*[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2010(4): 124-128 (in Chinese).
- [5] 梁飞龙, 林伟财, 邓岳文, 等. 术前处理对马氏珠母贝育珠效果的影响 [J]. *中国农学通报*, 2014, 30(8): 36-41.
- Liang F L, Lin W C, Deng Y W, *et al.* Effect of pre-operative condition on pearl production of pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(8): 36-41 (in Chinese).
- [6] 符韶, 黄邦双, 邓岳文, 等. 马氏珠母贝育珠效果影响因素分析 [J]. *广东海洋大学学报*, 2013, 33(1): 28-32.
- Fu S, Huang B S, Deng Y W, *et al.* The analysis on factors affecting pearl production of pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2013, 33(1): 28-32 (in Chinese).
- [7] 符韶, 梁飞龙, 邓岳文. 影响马氏珠母贝植核育珠绩效的关键技术研究 [J]. *水产养殖*, 2016, 37(7): 45-50.
- Fu S, Liang F L, Deng Y W. Studies on the techniques to affect pearl production performances in pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. *Journal of Aquaculture*, 2016, 37(7): 45-50 (in Chinese).
- [8] Gu Z F, Shi S L, Cao Y F, *et al.* Use of Mycophenolate mofetil as immunosuppressant during pearl production in pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(9): 4043-4049.
- [9] 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).
- [10] 杨帅. 组蛋白及其乙酰化修饰在珍珠贝移植免疫中的作用和机制 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020.
- Yang S. Function analysis of histone and histone acetylation modification in the transplantation immunity in pearl oyster[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [11] Cohen H Y, Lavu S, Bitterman K J, *et al.* Acetylation of the C Terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls bax-mediated apoptosis[J]. *Molecular Cell*, 2004, 13(5): 627-638.
- [12] Van Loosdregt J, Vercoulen Y, Guichelaar T, *et al.* Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabilization[J]. *Blood*, 2010, 115(5): 965-974.
- [13] Yu T, Gan S C, Zhu Q C, *et al.* Modulation of M2 macrophage polarization by the crosstalk between Stat6 and Trim24[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4353.
- [14] Buqué A, Bloy N, Perez-Lanzón M, *et al.* Immunoprophylactic and immunotherapeutic control of hormone receptor-positive breast cancer[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3819.
- [15] Zhang Q, Dai Y F, Cai Z M, *et al.* HDAC inhibitors: Novel immunosuppressants for Allo- and Xeno- transplantation[J]. *ChemistrySelect*, 2018, 3(1): 176-187.
- [16] Gil J, Ramírez-Torres A, Encarnación-Guevara S. Lysine acetylation and cancer: a proteomics perspective[J]. *Journal of Proteomics*, 2017, 150: 297-309.
- [17] Sealy L, Chalkley R. The effect of sodium butyrate on histone modification[J]. *Cell*, 1978, 14(1): 115-121.
- [18] Gertz M, Fischer F, Nguyen G T T, *et al.* Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(30): E2772-E2781.
- [19] Dioum E M, Chen R, Alexander M S, *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor 2 α signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1[J]. *Science*, 2009, 324(5932): 1289-1293.
- [20] Li Z W, Li X, Wang Z Y, *et al.* Antemortem stress regulates protein acetylation and glycolysis in postmortem muscle[J]. *Food Chemistry*, 2016, 202: 94-98.
- [21] 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).

- Chinese).
- [22] Adzibbli L, Wang Z M, Li J H, *et al.* Survival, retention rate and immunity of the black shell colored stocks of pearl oyster *Pinctada fucata martensii* after grafting operation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 691-698.
- [23] Xu Y, Zhang Y H, Liang J, *et al.* Impacts of marine heatwaves on pearl oysters are alleviated following repeated exposure[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2021, 173: 112932.
- [24] Xiong X H, Feng Q L, Chen L, *et al.* Cloning and characterization of an IKK homologue from pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(1): 15-25.
- [25] Flannery S, Bowie A G. The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(12): 1981-1991.
- [26] 房晓宸. 马氏珠母贝内源性细胞凋亡通路关键基因的克隆及功能研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2021.
Fang X C. Cloning and functional study of key genes in intrinsic apoptosis pathway of *Pinctada fucata martensii*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2021 (in Chinese).
- [27] Huang X D, Liu W G, Guan Y Y, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3) from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(3): 652-658.
- [28] Adzibbli L. 植核后马氏珠母贝黑壳色选育群体与对照群体免疫基因表达量与育珠性能比较 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020.
Adzibbli L. The immune response of the black shell colored line and control stocks of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii* to nucleus insertion operation[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [29] Chen L F, Fischle W, Verdine E, *et al.* Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation[J]. *Science*, 2001, 293(5535): 1653-1657.
- [30] Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation[J]. *Journal of Inflammation Research*, 2018, 11: 407-419.
- [31] Sun S C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 17(9): 545-558.
- [32] Liu G, Park Y J, Abraham E. Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) -1- mediated NF- κ B activation requires cytosolic and nuclear activity[J]. *The FASEB Journal*, 2008, 22(7): 2285-2296.
- [33] Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, *et al.* Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 64(2): 178-189.
- [34] You B R, Park W H. Trichostatin A induces apoptotic cell death of HeLa cells in a Bcl-2 and oxidative stress-dependent manner[J]. *International Journal of Oncology*, 2013, 42(1): 359-366.
- [35] 周畅, 谢莉萍, 张荣庆. 插核手术对合浦珠母贝免疫水平的影响 [J]. 水产学报, 2001, 25(5): 419-423.
Zhou C, Xie L P, Zhang R Q. Effect of pearl-nucleus-inserting operation on immune level in *Pinctada fucata*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(5): 419-423 (in Chinese).
- [36] Wei J F, Liu B S, Fan S G, *et al.* Serum immune response of pearl oyster *Pinctada fucata* to xenografts and allografts[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 62: 303-310.
- [37] 焦钰, 杜晓东, 师尚丽, 等. 珍珠囊发育中马氏珠母贝血清免疫因子的变化规律 [J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(4): 21-24.
Jiao Y, Du X D, Shi S L, *et al.* Variation rule of immune factors in serum during the pearl-sac formation of *Pinctada martensii*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2007, 27(4): 21-24 (in Chinese).
- [38] 赵晓霞. 基于 RNA 测序技术的马氏珠母贝珍珠囊转录组及数字基因表达谱分析 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2011.
Zhao X X. Studies on transcriptome and digital gene expression of pearl sac in *Pinctada martensii* by RNA sequencing[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2011 (in Chinese).

Lysine acetylation in the allograft-induced stress response of *Pinctada fucata martensii*

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

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: The pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, can experience transplant rejection or even host death following allografting. This study investigated the impact of increased protein acetylation on the immune response of *P. fucata martensii* after implantation, aiming to elucidate the role of acetylation modifications in this process. A mixture of broad-spectrum lysine deacetylase inhibitors (KDI) was injected into *P. fucata martensii* to assess the effects of increased protein acetylation using multiple analytical methods, including quantitative real-time PCR (qRT-PCR), Western blot (WB), antioxidant enzyme activity assay, and culture indicators. Following KDI injection, the relative expression of *HDAC 6/10* (10006221), and two members of the *Sir2* family (10031932 and 10020349) were significantly down-regulated at different time points. Meanwhile, the acetylation level of total proteins in the gills was significantly increased at 72 h, indicating enhanced protein acetylation in gill tissue. Additionally, the expression of *IRAK1*, *IL-17*, *NF-κB*, and *CASP2* were significantly up-regulated at 12 h, while *IκK* was significantly up-regulated at 48 h. In contrast, *TRAF3* expression was significantly down-regulated from 48 h onward, suggesting that KDI stimulation enhanced cellular immunity in recipient oysters. Furthermore, antioxidant enzymes such as GSH-Px, POD, and CAT were significantly up-regulated at 12 and 24 h post-KDI treatment, indicating enhanced humoral immunity. The retention and survival rates of oysters were significantly higher at 60 d post-KDI treatment compared to the control group. These results suggested that acetylation modifications play a key role in allograft-induced stress in *P. fucata martensii*, and KDI may serve as immunomodulator to regulate the implantation process. In summary, this study provided an important basis for exploring the immune response and adaptive mechanisms associated with acetylation modifications in *P. fucata martensii* during implantation, and offered theoretical support for the rational control of the immune response in *P. fucata martensii*.

Key words: *Pinctada fucata martensii*; allografting; lysine acetylation; KDI

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

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