

# Cloning and Expression Analysis of TNFAIP3 Gene in *Strongylocentrotus intermedius*

Shengmei Liu, Yadong Chen, Yaqing Chang, Xiuli Wang, Xuemei Qiu, Yang Liu\*

Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning  
Email: [liuy78@foxmail.com](mailto:liuy78@foxmail.com)

Received: Nov. 28<sup>th</sup>, 2018; accepted: Dec. 14<sup>th</sup>, 2018; published: Dec. 21<sup>st</sup>, 2018

## Abstract

Using rapid amplification of cDNA ends (RACE) cloned the cDNA full-length sequence of SiTNFAIP3 gene in *Strongylocentrotus intermedius*. We detected the distribution of SiTNFAIP3 gene in tissues and the expression of SiTNFAIP3 gene stimulated by lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan (PGN), Polyinosine (poly I: C), *Vibrio fortis* and glucan (WGP) use real-time quantitative PCR. The results showed that the cDNA full-length of SiTNFAIP3 was 3990 bp, 5'-UTR was 209 bp, open reading frame was 3567 bp, 3'-UTR was 214 bp, encoding 1188 amino acids, with one OTU domain and eight ZnF-A20 domains; qRT-PCR results showed that SiTNFAIP3 was expressed in all detected tissues, and the expression level of SiTNFAIP3 in ovaries was significantly higher than that in other tissues ( $p < 0.05$ ). After stimulation by PGN and *V. fortis*, the expression of SiTNFAIP3 increased significantly in coelomic cells, reaching the highest level 12 hours after stimulation ( $p < 0.05$ ); and after LPS and poly I: C stimulation, the expression of SiTNFAIP3 changed slightly in coelomic cells; but after WGP stimulation, the expression of SiTNFAIP3 gene in coelomic cells decreased. Our studies showed that the SiTNFAIP3 gene was involved in the NLR, TLR and RLR signaling pathway of *S. intermedius*. It plays an important role in innate immunity of sea urchins.

## Keywords

*Strongylocentrotus intermedius*, SiTNFAIP3, Innate Immunity, Negative Regulation

# 虾夷马粪海胆TNFAIP3基因的克隆与表达分析

刘圣美, 陈亚东, 常亚青, 王秀丽, 仇雪梅, 刘洋\*

大连海洋大学, 农业部北方海水增殖重点实验室, 辽宁 大连  
Email: [liuy78@foxmail.com](mailto:liuy78@foxmail.com)

收稿日期: 2018年11月28日; 录用日期: 2018年12月14日; 发布日期: 2018年12月21日

\*通讯作者。

文章引用: 刘圣美, 陈亚东, 常亚青, 王秀丽, 仇雪梅, 刘洋. 虾夷马粪海胆 TNFAIP3 基因的克隆与表达分析[J]. 海洋科学前沿, 2018, 5(4): 144-154. DOI: [10.12677/ams.2018.54017](https://doi.org/10.12677/ams.2018.54017)

## 摘要

采用cDNA末端快速扩增(RACE)技术克隆获得一条虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*) SiTNFAIP3基因cDNA全长序列。实时定量PCR检测了SiTNFAIP3基因在组织中的分布及在经脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)、聚肌胞苷酸(poly I: C)、强壮弧菌(*Vibrio fortis*)和葡聚糖(WGP)刺激后的表达情况。结果表明: SiTNFAIP3的cDNA全长为3990 bp, 5'-UTR为209 bp, 开放阅读框为3567 bp, 3'-UTR为214 bp, 编码1188个氨基酸, 具有1个OTU结构域和8个ZnF-A20结构域; qRT-PCR结果显示SiTNFAIP3在检测的各组织中均有表达, 卵巢中的表达量显著高于其它组织( $p < 0.05$ ); 经PGN、*V. fortis*刺激后, 体腔细胞中SiTNFAIP3表达量显著上升, 在刺激后12 h达到最高值( $p < 0.05$ ); 经LPS、poly I: C刺激后, 体腔细胞中SiTNFAIP3表达变化较小; 而经WGP刺激后, 体腔细胞中SiTNFAIP3表达出现下调。研究表明, SiTNFAIP3基因参与了虾夷马粪海胆的NLR、TLR和RLR信号通路, 但主要参与了NLR信号通路。SiTNFAIP3基因在海胆的先天免疫中发挥重要作用。

## 关键词

虾夷马粪海胆, SiTNFAIP3, 先天免疫, 负调控

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

虾夷马粪海胆原产于日本, 1989年被引入中国, 我国现已掌握室内人工育苗和海上养殖成商品胆技术, 但海胆养殖中存在的病害问题尚较难解决。海胆隶属棘皮动物门, 棘皮动物的免疫系统主要包括吞噬细胞、补体系统和转录因子等[1], 海胆在受到外源物刺激后机体发生的反应不存在特异性, 其免疫应答的机制主要依靠体腔细胞和体腔液中的各种免疫因子[2], 因此对虾夷马粪海胆先天免疫分子水平的研究显得极其重要。先天免疫应答是通过病原性内源基序激活模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)而启动的。这些PRRs包括Toll样受体(Toll-Like receptors, TLRs)、NOD样受体(NOD-like receptors, NLRs)和RIG-I样受体(RIG-I-like receptors, RLRs) [3]。NLRs和TLRs可激活细胞内信号传导途径, 引起机体先天免疫和炎症等效应机制[4]。目前, 虾夷马粪海胆NLR家族基因[5]和TLR家族基因[6]均有与先天免疫分子水平相关的研究, 这些研究在一定程度上揭示了虾夷马粪海胆先天免疫机制, 但并不十分完善。

TNFAIP3 (Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3)基因又称A20基因, 是一种具有泛素化和去泛素化双重功能的泛素编辑酶[7]。TNFAIP3基因的特殊功能与其结构域密切相关, TNFAIP3基因编码的蛋白属于锌指蛋白家族, 该家族蛋白具有1个OTU结构域和几个重复的ZnF-A20结构域[8], N末端OTU结构域是去泛素酶[9], 它与其它去泛素酶家族一样有一个半胱氨酸蛋白酶催化三联体[10], ZnF-A20结构域赋予TNFAIP3蛋白E3泛素连接酶活性[11]。TNFAIP3的去泛素酶活性, 可以从TRAF2/6和RIP1中拆卸Lys63连接的多泛素链; 随后, Lys48连接的多泛素链取代被拆卸掉的泛素链, 重新泛素化TRAF2/6和RIP1 [7] [12]。TNFAIP3通过干扰TRAF和RIP1的泛素化水平, 继而干扰NF- $\kappa$ B信号通路, 并对NF- $\kappa$ B信号通路起负调控作用[13] [14], 在机体的天然免疫过程具有非常重要的调控作用。我们在虾夷马粪海胆

转录组测序数据[15]的基础上,发现了一个与免疫相关的基因 SiTNFAIP3,采用 RACE 技术将筛选出的部分 SiTNFAIP3 基因片段进行克隆,扩增后获得一条 SiTNFAIP3 基因 cDNA 全长,通过 qRT-PCR 检测了该基因在虾夷马粪海胆各组织中的表达情况,利用 5 种不同病原物刺激海胆体腔细胞,分析了体腔细胞中 SiTNFAIP3 基因在刺激后的不同时间点的相对表达情况。分析讨论后推测该基因可能主要参与了虾夷马粪海胆的 NLR 信号通路,在先天免疫中发挥重要作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

虾夷马粪海胆购自大连市旅顺口区碧龙海珍品加工实业有限公司(平均质量 40 g~80 g),实验处理前于大连海洋大学农业部北方海水增殖重点实验室水族箱中适应一个月,海水温度 16℃~23℃,全天持续供氧,根据水温及水质情况及时更换过滤海水,以新鲜海带为饲料,取样前一天停止投喂。

### 2.2. 实验方法

#### 2.2.1. RNA 提取及第一链 cDNA 合成

参照动物 RNA 提取试剂盒(天根)说明,提取虾夷马粪海胆组织总 RNA,用核酸蛋白检测仪检测 RNA 浓度,用 1%的琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性。参照第一链 cDNA 合成试剂盒(全式金)说明反转录合成第一链 cDNA。

#### 2.2.2. 基因克隆

根据虾夷马粪海胆转录组数据[15]中筛选到的 SiTNFAIP3 基因部分片断设计 3'和 5'的 RACE 引物(表 1),以合成的第一链 cDNA 为模板,扩增 TNFAIP3 基因序列。反应体系为 25  $\mu$ L,其中 2.5  $\mu$ L LA PCR buffer (10 $\times$ ), 2  $\mu$ L dNTPs, 2.5  $\mu$ L UPM, 0.5  $\mu$ L 特异引物, 2  $\mu$ L RACE 模板, 0.25  $\mu$ L LA Taq 酶,加 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu$ L。使用降落 PCR 进行扩增: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 sec, 72℃ 3 min 共 5 个循环; 94℃ 30 sec, 70℃ 30 sec, 72℃ 3 min 共 5 个循环; 94℃ 30 sec, 65℃ 30 sec, 72℃ 3 min 共 25 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。1%的琼脂糖凝胶电泳检测并回收与目的基因大小一致的条带,将目的基因与 pEASY-T1 载体(全式金)相连,并转化到 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞(全式金),使用通用引物 M13 进行菌液 PCR 扩增,验证后挑选阳性克隆送至上海英骏生物技术有限公司进行测序。

**Table 1.** Primers and their sequences

**表 1.** 引物名称及序列

引物名称	引物序列(5'-3')	Tm 值	用途
TNFAIP3-3	GGCTTCACGCCACCGAACTACC	71.7	3' RACE 引物
TNFAIP3-5	CCTTCCGCAGCCAGAGGTCAGTGT	71.8	5' RACE 引物
rTNFAIP3-s	TGCGAGACTGTCGGGTTAGA	63.2	实时定量引物
rTNFAIP3-a	TCAACTGCTGCGTGCTCGT	64.4	实时定量引物
r18S_S	GCGTTTAGCCAGCGGAGAT	62.7	内参
r18S_A	GGAGGAGGTTTCAGCGGATTA	61.2	内参

#### 2.2.3. SiTNFAIP3 基因的生物信息学分析

将测序结果进行序列拼接得到 SiTNFAIP3 基因 cDNA 全长,利用 NCBI 的 blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线工具进行序列比对,确认为目标序列后,将得到的目标序列提交到 NCBI 的 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找开放阅读框,在线工具 ExPASy

(<https://www.expasy.org/resources>)预测 SiTNFAIP3 蛋白分子量和等电点, 通过 NCBI 的 Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对所得氨基酸序列进行同源检索, 使用 MEGA7.0 与其它物种进行序列相似性比对并构建系统进化树, 用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线工具对 SiTNFAIP3 蛋白的保守结构域进行预测分析, 用 Clustal X2 对锌指结构域的序列进行比对, 做聚类分析。

#### 2.2.4. 组织差异表达分析

选取 10 只健康的海胆(雌、雄各 5 只), 放入灭菌海水中快速剪下管足(GZ), 用无菌注射器抽取虾夷马粪海胆体腔液(CL), 4℃冷冻离心后弃上清, 留体腔细胞沉淀, 对海胆进行活体解剖, 获取围口膜(WK)、肠道(GT)、精巢(TE)和卵巢(OV), 将组织浸没于 RNAlater (Thermofisher)中, 于 4℃冰箱中浸泡过夜, 第二天转移至-80℃超低温冰箱中保存。总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成参见 2.2.1。

采用 qRT-PCR 检测 SiTNFAIP3 基因在各组织中的相对表达量, 以虾夷马粪海胆 18S rRNA 为内参基因, 每个样品重复 3 次。qRT-PCR 采用 20 μL 体系: 2 × SYBR Realing PCR Master Mix 10 μL, 正反向引物 rTNFAIP3-s、rTNFAIP3-a (表 1)均为 0.8 μL, cDNA 模板 2 μL, RNase free H<sub>2</sub>O 6 μL。扩增程序采用二步法: 95℃ 30 sec 预变性; 95℃ 5 sec, 60℃ 34 sec, 40 个循环。

#### 2.2.5. 免疫刺激

采用直接注射的方式对 150 只健康虾夷马粪海胆进行免疫刺激, 选取强壮弧菌 *Vibrio fortis* (革兰氏阴性菌), 脂多糖 LPS、肽聚糖 PGN、葡聚糖 WGP、聚肌胞苷酸 poly I: C 为病原刺激物, 磷酸缓冲液(PBS)作为对照组。强壮弧菌使用半致死量[16]进行注射, 为防止虾夷马粪海胆死亡致实验数量不足, 注射 50 只海胆。各免疫刺激物每组注射 20 只, 免疫刺激物注射量依次为 LPS: 2 mg/只、PGN: 200 μg/mL、poly I: C: 2 μg/mL、WGP: 600 μg/mL, PBS 注射 20 只。在注射后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 五个时间点进行取样, 分别取体腔细胞、肠道、围口膜、精巢、卵巢浸没于 RNAlater (Thermofisher)中, 于 4℃冰箱中浸泡过夜, 第二天转移至-80℃超低温冰箱中保存。总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成参见 2.2.1。

免疫刺激后, 使用 qRT-PCR 检测 SiTNFAIP3 基因在体腔细胞中的表达情况, 方法同 2.2.4。

采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 SiTNFAIP3 基因在虾夷马粪海胆各组织和在免疫刺激后体腔细胞中的相对表达量, 用 SPSS19.0 ( $P < 0.05$ )检验显著性。

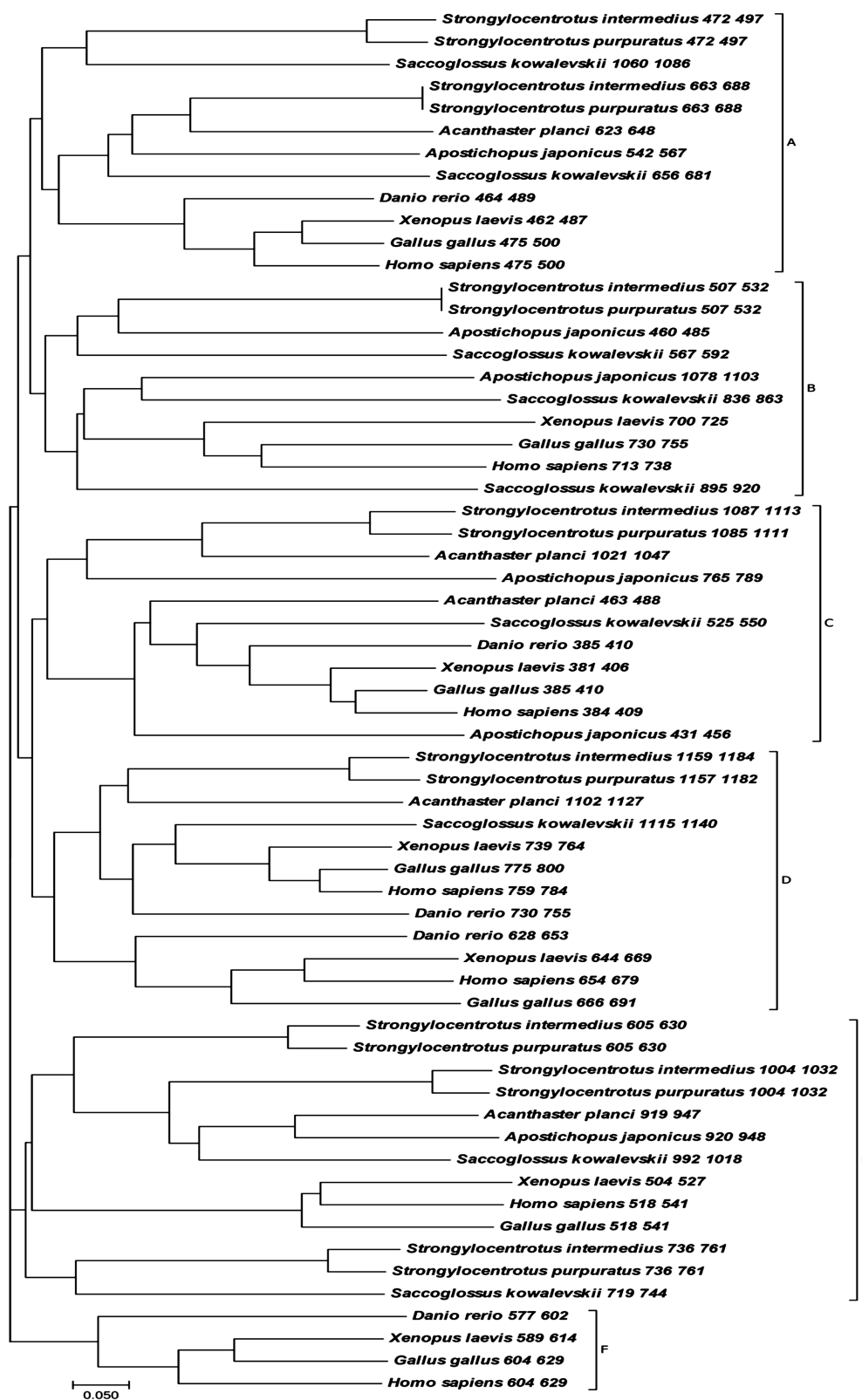
### 3. 结果

#### 3.1. SiTNFAIP3 基因 cDNA 全长克隆及生物信息学分析

RACE 扩增后获得的序列经 BLAST 比对分析发现, 其氨基酸序列与紫海胆、棘冠海星、囊舌虫的相似度最高, 分别为 89%、89%、88%, 确认该基因为虾夷马粪海胆的肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 3 (Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3, TNFAIP3)基因, 因此命名为 SiTNFAIP3。

SiTNFAIP3 基因 cDNA 全长为 3990 bp, 5'-UTR 为 209 bp, 开放阅读框为 3567 bp, 3'-UTR 为 214 bp, 共编码 1188 个氨基酸。ExPASy 预测分子量为 131.969 KDa, 等电点为 8.30, 为碱性蛋白。SMART 结构域预测结果表明, SiTNFAIP3 具有 1 个 OTU 结构域, 8 个 ZnF-A20 结构域(图 1)。利用进化树分析物种间(表 2)亲缘关系(图 2), 14 个物种中所有脊椎动物聚为一支, 所有无脊椎动物聚为一支, 其中虾夷马粪海胆与紫海胆单独聚为一支, 表明它们亲缘关系最近。Clustal X2 对不同物种(表 2) ZnF-A20 结构域的比对和聚类(图 3, 图 4)显示, 所有物种 TNFAIP3 的蛋白结构域均具有 1 个 OTU 结构域和若干 ZnF-A20 结构域, 各物种的 OTU 结构域高度保守, 而不同物种的 ZnF-A20 结构域的数量和种类存在差异。



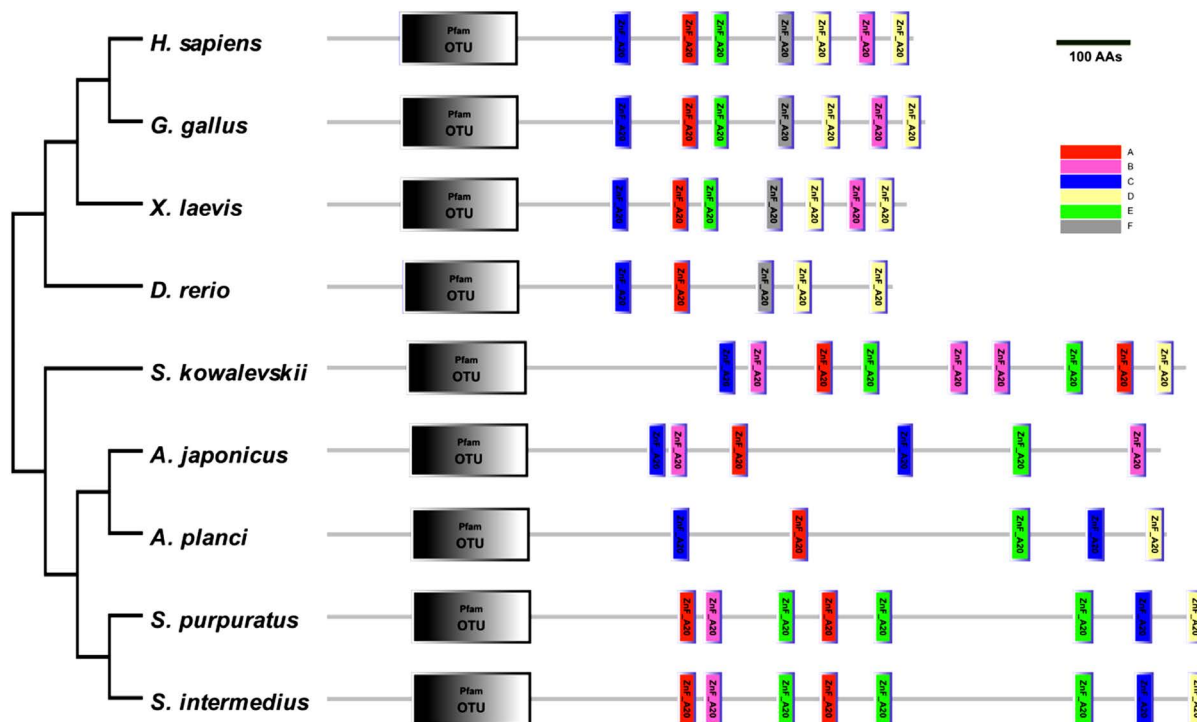


**Figure 3.** Phylogenetic tree based on ZnF-A20 domains of TNFAIP3 protein (Scale represents genetic distance, A - F represents 6 different ZnF-A20 domains)

**图 3.** 基于 TNFAIP3 蛋白 ZnF-A20 结构域的进化树分析(标尺表示遗传距离, A~F 代表 6 种不同的 ZnF-A20 结构域)

**Table 2.** NCBI receiver number of species TNFAIP3 protein used in evolutionary analysis  
**表 2.** 进化分析使用的物种 TNFAIP3 蛋白的 NCBI 接收号

物种	物种拉丁文名	NCBI 接收号
人	<i>Homo sapiens</i>	NP_001257437.1
小鼠	<i>Mus musculus</i>	CAJ18603.1
牛	<i>Bos taurus</i>	NP_001179099.1
鸡	<i>Gallus gallus</i>	XP_015139673.1
非洲爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001087109.1
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	XP_692922.3
紫海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_795196.1
棘冠海星	<i>Acanthaster planci</i>	XP_022081813.1
刺参	<i>Apostichopus japonicas</i>	PIK44277.1
囊舌虫	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	XP_006816095.1
青岛文昌鱼	<i>Branchiostoma belcheri tsingtauense</i>	AGQ17407.1
虾夷扇贝	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	OWF55126.1
太平洋牡蛎	<i>Crassostrea gigas</i>	EKC18030.1

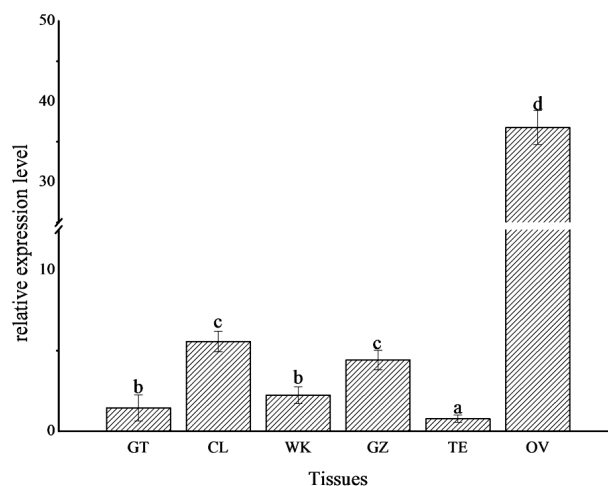


**Figure 4.** Comparison of protein domain results based on TNFAIP3 amino acid sequence prediction (A - F annotate the clustering results based on ZnF-A20 comparison in Figure 3, scale bar represents 100 amino acids)

**图 4.** 基于 TNFAIP3 氨基酸序列预测的蛋白结构域结果比较(A~F 根据图 3 中 ZnF-A20 比对聚类结果标注, 标尺为 100 个氨基酸长度)

### 3.2. 组织差异表达分析

采用 qRT-PCR 检测 SiTNFAIP3 基因在健康虾夷马粪海胆各组织中的表达情况(图 5)。实验结果表明, SiTNFAIP3 基因在检测的各组织中均有表达, 卵巢中的表达量显著高于其它组织( $P < 0.05$ ), 相对表达量为 36.779, 其次是体腔细胞和管足, 表达量最低的组织为精巢, 仅为 0.778。

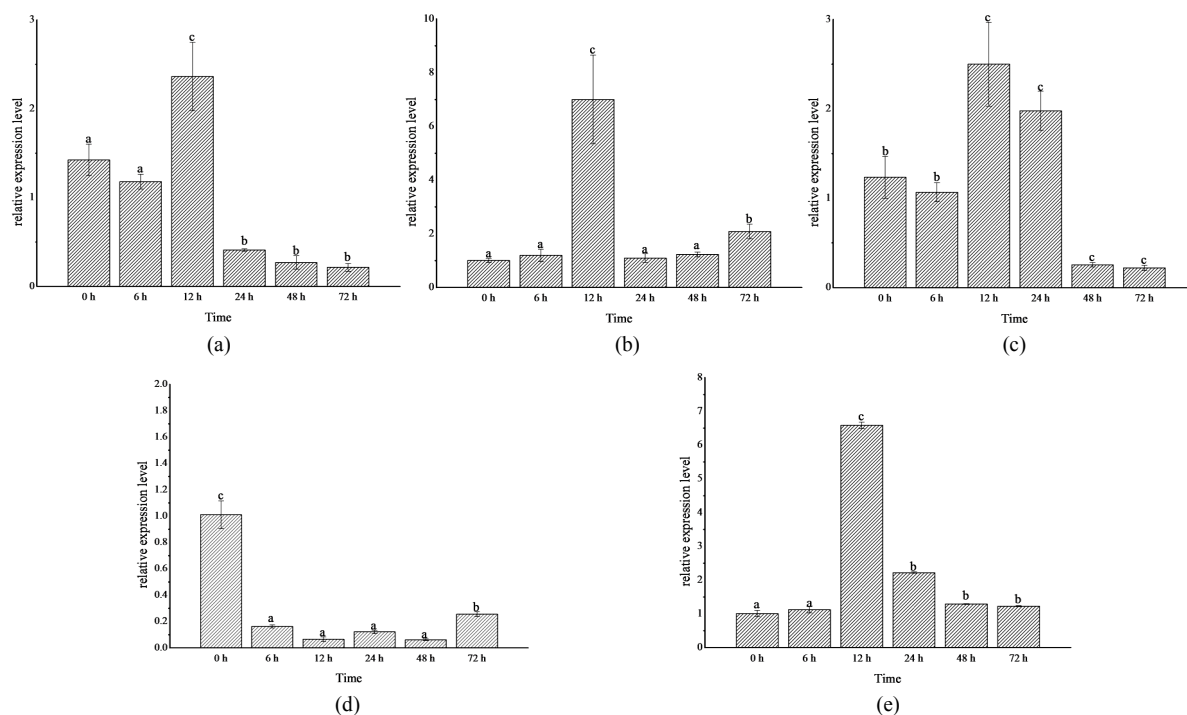


**Figure 5** Expression of SiTNFAIP3 gene in different tissues from normal *Strongylocentrotus intermedius*. Note: GT, CL, WK, GZ, TE and OV denote Intestine, coelomocyte, peristomal membrane, Tube feet, Testis and Ovary, respectively. Duncan's multiple comparisons were carried out and "a, b, c" indicated significant differences between samples ( $p < 0.05$ )

**图 5.** SiTNFAIP3 基因在健康虾夷马粪海胆不同组织中的表达情况。注: GT, CL, WK, GZ, TE 和 OV 分别代表肠, 体腔细胞, 围口膜, 管足, 精巢和卵巢; 使用 Duncan 法进行多重比较, 字母 a、b、c...不同表示差异显著( $p < 0.05$ )

### 3.3. 免疫刺激后 SiTNFAIP3 基因的相对表达量分析

qRT-PCR 结果表明, 经 LPS 刺激后(如图 6(a)), SiTNFAIP3 基因的表达量在 12 h~24 h 出现上调, 12 h 的表达量最高, 24 h 开始下降。PGN 刺激后(如图 6(b)), SiTNFAIP3 基因在 12 h 表达量最高, 表达量较



**Figure 6.** Expression of SiTNFAIP3 gene in coelomic cells stimulated by different immunostimulants: (a) - (e) indicated SiTNFAIP3 expression after stimulation of LPS, PGN, poly I: C, WGP and *Vibrio vulnificus*. Duncan's multiple comparisons were carried out and "a, b, c" indicated significant differences between samples ( $p < 0.05$ )

**图 6.** 体腔细胞中 SiTNFAIP3 基因在不同免疫刺激物刺激后的表达: (a)~(e)分别表示在 LPS、PGN、poly I: C、WGP、强壮弧菌刺激后 SiTNFAIP3 的表达情况, 使用 Duncan 法进行多重比较, 字母 a、b、c...不同表示差异显著( $p < 0.05$ )



0 h 增加了 6 倍, 12 h 后开始下降, 免疫刺激后 5 个时间点的表达量全部高于 0 h。poly I: C 刺激后(如图 6(c)), SiTNFAIP3 基因表达量在 6 h~24 h 呈上升趋势, 12 h 出现表达量最高峰, 48 h 下降到正常水平。WGP 刺激后(如图 6(d)), SiTNFAIP3 基因出现表达下调的情况, 48 h 表达量最低。强壮弧菌刺激后(如图 6(e)), 6 h 时出现表达上调, 但是较 0 h 变化量很小, 12 h 出现表达量最高的峰值, 表达量较 0 h 增加了 6.5 倍。体腔细胞中 SiTNFAIP3 在除 WGP 外的 4 种病原物处理后均出现表达上调, 且经 PGN、强壮弧菌处理后 12 h 显著高于其它时间点, PGN 刺激后 12 h 的表达量为 6.996, 高于强壮弧菌刺激后 12 h 的表达量; 而 LPS、poly I: C 刺激后, 体腔液中 SiTNFAIP3 表达变化较小, 仅在 12 h 略有升高。

#### 4. 讨论

本实验克隆了虾夷马粪海胆 TNFAIP3 基因 cDNA 全长, 发现该基因编码的蛋白质含有 1 个 OTU 结构域和 8 个重复的 ZnF-A20 结构域, 这与其它物种 TNFAIP3 蛋白结构域非常相似。经比对分析可以看到 TNFAIP3 具有非常高的保守性(图 2~4)。所有物种的 TNFAIP3 都具有 1 个 OTU 结构域和 5~8 个 ZnF-A20 结构域, 这些 ZnF-A20 结构域在物种内和物种间都非常相似, 尤其是都具有四个半胱氨酸。脊椎动物和无脊椎动物 ZnF-A20 结构域的数量和种类均存在差异, 脊椎动物的 ZnF-A20 结构域相对无脊椎动物排布更加紧密, 种类更加多样化, 此外, 在高等的脊椎动物中 ZnF-A20 结构域在 TNFAIP3 蛋白中的排列模式更趋向于保守, 而在无脊椎动物中则表现出了多样化的特点。这可能与先天性免疫在高等的脊椎动物和低等的无脊椎动物中的不同进化地位有关。

SiTNFAIP3 基因在健康虾夷马粪海胆 6 种组织中均有表达, 精巢的表达量最低, 卵巢中的表达量最高。卵巢是海胆繁殖的重要器官, 取样时海胆正处于性腺发育成熟时期, TNFAIP3 作为重要的免疫基因, 在 B 细胞、T 细胞等免疫细胞中表达[17], 推测卵巢中 SiTNFAIP3 的高表达量可能和保护卵细胞有较大关系。

LPS 是细菌内毒素的主要成分, 当细菌入侵时作为抗原分子参与 TLR 信号通路, LPS 可以诱导 TNF- $\alpha$  参与的免疫过程, 通过激活 IL-8、趋化因子、抗菌肽等免疫作用, 直接清除入侵的病原体, 引起机体的免疫反应[17][18][19]。经 LPS 刺激后体腔细胞中 SiTNFAIP3 表达呈轻微上调, 推测 SiTNFAIP3 抑制了 TLR 信号通路, 在 TLR 信号通路中起负调控的作用。最近的研究也证明了这一推测, LPS 刺激虹鳟鱼的巨噬细胞后, TNFAIP3 基因在 6 h~24 h 出现表达上调[20], 说明 LPS 刺激可以提高机体免疫力。LPS 刺激河豚鱼后, TNFAIP3 基因的表达量在 12 h 后增加[21]。PGN 是 NLR 信号通路中 NOD2 的反应底物, 可作为 NOD1 和 NOD2 的主要模式识别受体, 当 NOD1 和 NOD2 配体识别 PGN 后通过细胞凋亡抑制剂激活 RIP2, 随后激活促炎症 NF- $\kappa$ B 信号通路[22]。经 PGN 刺激后, 虾夷马粪海胆体腔细胞中 SiTNFAIP3 表达量显著升高, 推测 SiTNFAIP3 基因的高表达量可能是在 NOD 蛋白识别 PGN 后, 作为细胞凋亡抑制剂抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路, 使机体产生免疫反应, 清除易对自身造成伤害的物质, 达到保护自身健康的目的。poly I:C 作为一种模拟 RNA 病毒的免疫抑制剂刺激体腔细胞, 经 poly I:C 刺激后, 体腔细胞中 SiTNFAIP3 基因在 12 h~24 h 呈轻微表达上调, 表明 poly I:C 可以诱导 SiTNFAIP3 基因的表达, 我们推测这是 SiTNFAIP3 对由 poly I:C 引起的 RLR 信号通路中炎症反应的负调节作用。Li 等证明 TNFAIP3 在 poly I:C 触发的肝脏炎症中发挥保护作用[23], 在人角质细胞中, TNFAIP3 显著抑制了 poly I:C 诱导的细胞因子的产生, 这种作用与 NF- $\kappa$ B 信号传导的抑制有关, 表明 TNFAIP3 的下调增加了角质形成细胞对外部刺激的易感性[24]。WGP 存在于真菌中, 目前 WGP 作为一种免疫活性增强剂已被广泛应用于水产动物中[25]。图 6 中 WGP 刺激后诱导 SiTNFAIP3 表达下调, 说明 SiTNFAIP3 基因对 WGP 无免疫应答, SiTNFAIP3 基因不参与由真菌引起的免疫应答的 CLR 信号通路的调控。强壮弧菌是虾夷马粪海胆的条件致病菌, 强壮弧菌刺激海胆体腔细胞后, 在 12 h SiTNFAIP3 基因表达量最高, 证明 SiTNFAIP3 基因

对强壮弧菌有免疫应答, 由此推测 SiTNFAIP3 基因参与了由强壮弧菌引起的免疫信号通路的调控, 说明 SiTNFAIP3 基因在先天免疫信号通路中具有调控作用。

本实验克隆获得了 SiTNFAIP3 基因 cDNA 全长, 生物信息学分析表明该基因编码的蛋白属于锌指蛋白家族, 是一个具有泛素化和去泛素化双重编辑作用的酶。实时定量结果表明, SiTNFAIP3 在健康海胆的卵巢中表达量最高, 免疫刺激后体腔细胞中 SiTNFAIP3 的不同相对表达量表明, SiTNFAIP3 基因参与了虾夷马粪海胆的 TLR、NLR、RLR 信号通路的负调控, 经 PGN 刺激后, SiTNFAIP3 的表达量最高, 推测该基因在 NLR 信号通路的负调控作用强于其它信号通路, 即 SiTNFAIP3 主要参与了 NLR 信号通路的负调控, 在虾夷马粪海胆先天免疫中发挥了重要作用。

## 基金项目

国家自然科学基金“海胆天然免疫分子 NLR 家族的免疫应答机制研究”(31101923), 辽宁省自然科学基金“海胆抗菌肽的基因克隆、表达特征分析及原核表达”(2015020761), 农业部北方海水增殖重点实验室开放课题(2014-MSENC-KF-08)。

## 参考文献

- [1] Coteur, G., Mellroth, P., Lefortery, C.D., *et al.* (2007) Peptidoglycan Recognition Proteins with Amidase Activity in Early Deuterostomes (Echinodermata). *Developmental & Comparative Immunology*, **31**, 790-804. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.11.006>
- [2] 赵新亚, 常亚青, 丁君, 等. 4 种免疫促进剂对 2 种虾夷马粪海胆群体免疫影响[J]. 海洋科学进展, 2011(a01): 9-16.
- [3] Hansen, J.D., Vojtech, L.N. and Laing, K.J. (2011) Sensing Disease and Danger: A Survey of Vertebrate PRRs and Their Origins. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**, 886-897. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.008>
- [4] Coll, R.C. and O'Neill, L.A.J. (2010) New Insights into the Regulation of Signalling by Toll-Like Receptors and Nod-Like Receptors. *Journal of Innate Immunity*, **2**, 406-421. <https://doi.org/10.1159/000315469>
- [5] 陈亚东, 刘晓飞, 常亚青, 等. 虾夷马粪海胆 NLR 家族基因片段的克隆及表达特征分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(4): 336-341.
- [6] 王轶南, 于卓, 刘洋, 等. 虾夷马粪海胆 TLR 基因 cDNA 克隆及表达分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(4): 329-335.
- [7] Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., *et al.* (2004) De-Ubiquitination and Ubiquitin Ligase Domains of A20 Down-regulate NF- $\kappa$ B Signalling. *Nature*, **430**, 694-699. <https://doi.org/10.1038/nature02794>
- [8] 左云龙, 匡凤梧, 吴丽娟. A20 的泛素修饰抑制 NF- $\kappa$ B 活性[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(5): 552-553.
- [9] Evans, P.C., Ova, H., Hamon, M., *et al.* (2004) Zinc-Finger Protein A20, a Regulator of Inflammation and Cell Survival, Has De-Ubiquitinating Activity. *Biochemical Journal*, **378**, 727-734. <https://doi.org/10.1042/bj20031377>
- [10] Evans, P.C., Smith, T.S., Lai, M.J., *et al.* (2003) A Novel Type of Deubiquitinating Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 23180-23186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301863200>
- [11] 艾罗燕, 范竹萍. 去泛素化酶锌指蛋白 A20 调控 NF- $\kappa$ B 信号通路的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2013, 33(1): 43-46.
- [12] Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., *et al.* (2004) The Ubiquitin-Modifying Enzyme A20 Is Required for Termination of Toll-Like Receptor Responses. *Nature Immunology*, **5**, 1052-1060. <https://doi.org/10.1038/ni1110>
- [13] Chen, Z.J. (2005) Ubiquitin Signalling in the NF- $\kappa$ B Pathway. *Nature Cell Biology*, **7**, 758-765. <https://doi.org/10.1038/ncb0805-758>
- [14] Kovalenko, A. and Wallach, D. (2006) If the Prophet Does Not Come to the Mountain: Dynamics of Signaling Complexes in NF- $\kappa$ B Activation. *Molecular Cell*, **22**, 433-436. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.002>
- [15] Chen, Y., Chang, Y., Wang, X., *et al.* (2015) *De Novo* Assembly and Analysis of Tissue-Specific Transcriptomes Revealed the Tissue-Specific Genes and Profile of Immunity from *Strongylocentrotus intermedium*. *Fish & Shellfish Immunology*, **46**, 723-736. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.013>
- [16] Wang, Y., Feng, N., Li, Q., *et al.* (2013) Isolation and Characterization of Bacteria Associated with a Syndrome Disease of Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedium* in North China. *Aquaculture Research*, **44**, 691-700.

- [17] Dumitru, C.D., Ceci, J.D., Tsatsanis, C., *et al.* (2000) TNF-Alpha Induction by LPS Is Regulated Posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-Dependent Pathway. *Cell*, **103**, 1071-1083. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00210-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00210-5)
- [18] Kayagaki, N., Wong, M.T., Stowe, I.B., *et al.* (2013) Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. *Science*, **341**, 1246-1249. <https://doi.org/10.1126/science.1240248>
- [19] 杨一新, 李桂源. LPS 所介导的信号转导通路研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2006, 31(1): 141-145.
- [20] Iliev, D.B., Goetz, G.W., Mackenzie, S., *et al.* (2006) Pathogen-Associated Gene Expression Profiles in Rainbow Trout Macrophages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics Proteomics*, **1**, 416-422. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2006.10.003>
- [21] Hikima, J., Morita, M., Kinoshita, S., *et al.* (2017) Molecular Characterization and Expression Analysis of Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3 (TNFAIP3/A20) Gene from Japanese Pufferfish *Takifugu rubripes*. *Fish Pathology*, **52**, 15-22. <https://doi.org/10.3147/jsfp.52.15>
- [22] Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L.D., *et al.* (2002) RICK/Rip2/CARDIAK Mediates Signalling for Receptors of the Innate and Adaptive Immune Systems. *Nature (London)*, **416**, 194-199. <https://doi.org/10.1038/416194a>
- [23] Li, X.M., Yang, T.Y., He, X.S., *et al.* (2017) Orphan Nuclear Receptor Nur77 Inhibits Poly (I:C)-Triggered Acute Liver Inflammation by Inducing the Ubiquitin-Editing Enzyme A20. *Oncotarget*, **8**, 61025-61035. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17731>
- [24] Sohn, K.C., Back, S.J., Choi, D.K., *et al.* (2016) The Inhibitory Effect of A20 on the Inflammatory Reaction of Epidermal Keratinocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, **37**, 1099-1104. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2514>
- [25] 温周瑞, 刘慧集, 周敏, 等. 微生物多糖对水产动物免疫作用研究进展[J]. 水生态学杂志, 2004, 24(4): 1-3.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2376-4260, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [ams@hanspub.org](mailto:ams@hanspub.org)