

皱纹盘鲍基质金属蛋白酶基因的克隆与表达分析

陈玉磊¹, 李婉玉¹, 吴裕玲¹, 杨汝晴¹, 章 骞^{1,2},
张凌晶¹, 刘光明^{1,2}, 曹敏杰^{1,2}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;
2. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了探索基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在软体动物中的存在形式及其在机体抗菌免疫中的作用,以皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)为研究对象,采用分子生物学技术克隆得到皱纹盘鲍MMP-16、MMP-17和MMP-21 3个基因部分序列,并对其进行生物信息学分析和多序列比对。此外,利用荧光定量PCR技术检测了Hdh-MMPs在皱纹盘鲍不同组织及副溶血弧菌感染前后各组织中的表达情况。结果显示,克隆得到的Hdh-MMPs序列包含完整的催化结构域和(或)类血红素结合区,Hdh-MMPs蛋白与多种软体动物的MMPs具有序列相似性。荧光定量PCR结果显示,Hdh-MMP-16和Hdh-MMP-17在血淋巴细胞中表达量最高,而Hdh-MMP-21在鳃中表达量最高。副溶血弧菌感染后,Hdh-MMP-16的表达量在鳃中呈现上升趋势,而Hdh-MMP-17的相对表达量呈现先上升后下降的趋势,Hdh-MMP-21基因在鳃和肝胰腺中呈现一定程度的上调表达。本研究结果表明,Hdh-MMP-16/17/21可能与皱纹盘鲍抵御病原菌入侵的先天免疫性调控相关。

[关键词] 基质金属蛋白酶;皱纹盘鲍;副溶血弧菌;基因克隆;荧光定量PCR

[中图分类号] Q 781

Molecular Cloning and Expression Analysis of Matrix Metalloproteinases from Abalone(*Haliotis discus hannai*)

CHEN Yulei¹, LI Wanyu¹, WU Yuling¹, YANG Ruqing¹, ZHANG Qian^{1,2},
ZHANG Lingjing¹, LIU Guangming^{1,2}, CAO Minjie^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. National & Local Joint Engineering Research Center of Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to explore the existence of matrix metalloproteinases (MMPs) in molluscs and their role in the antibacterial immunity of the organisms, partial sequences of three MMP genes from *Haliotis discus hannai*, named as Hdh-MMP-16/17/21 were cloned, and the bioinformatics analysis and multiple sequence alignment were performed. In addition, the relative expression levels of Hdh-MMPs in different tissues of *Haliotis discus hannai* were preliminarily tested using quantitative real-time PCR (qPCR) before and after *Vibrio parahemolyticus* infection. The results showed that Hdh-MMP-16/17/21 contained the complete catalytic domain and (or) hemopexin domain, and they presented a varying extent of sequence similarities with MMPs of various

[收稿日期] 2019-04-04

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFD0901004);国家自然科学基金项目(31702372, 31772049);农业部贝类产业技术体系项目(CARS-49)

[作者简介] 陈玉磊(1990—),女,讲师,主要从事生化与分子生物学、免疫学研究。通信作者:曹敏杰(1964—),男,教授,主要从事蛋白质化学及水产品深加工研究。E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

molluscs. The results revealed that the transcript levels of *Hdh-MMP-16* and *Hdh-MMP-17* were highest in hemocytes, while that of *Hdh-MMP-21* was highest in gill. After *Vibrio parahaemolyticus* infection, the expression of *Hdh-MMP-16* increased significantly in gill during the trial, while the relative expression of *Hdh-MMP-17* increased first and then decreased in gill and hepatopancreas. The *Hdh-MMP-21* gene expression was upregulated in gill and hepatopancreas to some extent post infection. Hence, it was shown that *Hdh-MMP-16/17/21* might be involved in the innate immune responses to pathogen infection in abalone.

Keywords: matrix metalloproteinases; *Haliotis discus hannai*; *Vibrio parahaemolyticus*; gene cloning; quantitative real-time PCR

0 引言

鲍鱼隶属于软体动物门 (Mollusca)、腹足纲 (Gastropoda)、原始腹足目 (Archaeogastropoda)、鲍科 (Haliotidae)、鲍属 (*Haliotis*)，自古以来就被认为是海洋中最珍贵的美味。鲍鱼已经成为全球水产养殖的一种重要经济品种^[1]。据统计，2016 年我国鲍鱼产量达到近 14 万 t，比 2014 年增长 9.2%。福建省作为鲍鱼养殖大省，年产量占全国 81%^[2]。随着水产养殖业的迅速发展，质量管理、疾病预防与控制等相关技术的缺乏容易导致鲍鱼疾病的流行，其中，副溶血性弧菌是导致养殖鲍鱼成活率下降的主要病原菌。感染了副溶血性弧菌的鲍鱼表现为萎缩，从受疾病感染的鲍鱼多样性血淋巴中分离出的副溶血性弧菌可导致幼年鲍鱼的死亡^[3]。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一类活性依赖于锌离子和钙离子的蛋白水解酶^[4]。典型的 MMPs 结构包括：1) 疏水信号肽序列；2) 前肽区，主要作用是保持酶原的稳定，当该区域被外源性酶切断后，MMPs 酶原被激活；3) 催化活性区，有锌离子结合位点，对酶催化作用的发挥至关重要；4) 富含脯氨酸的铰链区；5) 类血红素结合区，与酶的底物特异性有关^[5]。不同的 MMP 具有不同的底物特异性。MMPs 的表达由糖皮质激素、类维生素 A、病菌感染和外界压力等因素调控^[6]，其活性受转录水平、酶原激活和天然抑制剂 (tissue inhibitors of MMPs, TIMP) 的严格控制^[7]。作为降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的主要酶类，MMPs 能够参与生物体多种生理和病理过程，如胚胎发育、组织重排、免疫反应和疾病发生等^[8-9]。目前，对 MMPs 的研究主要集中于哺乳动物，以水产动物特别是贝类为研究对象的报道较少。因此，本文以皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 为研究对象，克隆得到 3 个 MMPs (*Hdh-MMP-16/17/21*) 部分基因序列，并对这 3 个基因进行生物信息学分析及蛋白质高级结构预测。还对 *Hdh-MMPs* 在皱纹盘鲍不同组织中的相对表达量及其在副溶血弧菌感染前后基因相对表达量变化情况进行了初步试验，以探究 MMPs 在皱纹盘鲍免疫调控环节中的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大小均一的健康皱纹盘鲍购于厦门市夏商国际水产交易中心，平均质量约 40 g，于 20 ℃ 暂养 3 ~ 4 d 后根据相关实验分组进行处理。养殖用海水取于集美大学水产学院养殖场，每 12 h 更换一次。

1.2 实验动物分组及致病菌处理

实验用皱纹盘鲍暂养后，随机挑取 3 只鲍鱼，收集血淋巴细胞、肝胰腺、鳃、肌肉、腹足、外套膜和性腺，不同个体相同组织混合后置于液氮备用。将剩余鲍鱼随机分为两组，每组 20 只，试验组注射副溶血弧菌 (2×10^7 CFU)，对照组注射同等体积磷酸缓冲液。注射 12、24、48 和 72 h 后，分别随机挑取 3 只鲍鱼，收集鲍鱼主要免疫器官 (血淋巴细胞、鳃、肝胰腺)，不同个体相同组织混合后置于液氮备用。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

按总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen) 提供的方法提取各组织 (血淋巴细胞、肝胰腺、鳃、肌肉、腹

足、外套膜和性腺）的总 RNA。使用质量分数 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物的完整性，使用 NanoDrop ND1000 检测 RNA 浓度及纯度。利用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（TAKARA）将血淋巴细胞 mRNA 反转录成用于基因克隆的 cDNA。将不同组织 mRNA 浓度调为一致，利用 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（TOYOBO）合成用于荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR，qPCR）的 cDNA。

1.4 皱纹盘鲍 MMPs 基因克隆

通过拼接 NCBI SRA 数据库中皱纹盘鲍转录组测序数据（登录号：SRP059307），得到完整的皱纹盘鲍转录组序列。利用 BLAST 在线软件预测得到与其他物种 MMP 同源的 *Hdh-MMP-16/17/21* 基因部分序列。用 Primer 5.0 软件设计 *Hdh-MMPs* 特异性引物（见表 1），以皱纹盘鲍血淋巴细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增反应体系（20 μL）如下：Taq 酶 0.2 μL，10 × buffer 2.0 μL，dNTP（10 mmol/L）2.0 μL，正向引物（10 μmol/L）1.0 μL，反向引物（10 μmol/L）1.0 μL，cDNA 1.0 μL，ddH₂O 12.8 μL。PCR 扩增条件为：94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 变性 30 s，58 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 2 min，循环 35 次；最后 72 ℃ 延伸 10 min。将 3 μL 扩增产物上样于质量分数 1.0% 的琼脂糖凝胶，并进行电泳检测。扩增产物经 DNA 纯化试剂盒（Tiangen）回收后，连接 pEASY-T1 载体（TransGen Biotech），并进行转化和菌落 PCR，挑取阳性菌落送厦门铂瑞生物科技有限公司测序。

表 1 基因克隆所用引物
Tab. 1 PCR primers for gene cloning

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	$T_m/^\circ\text{C}$	引物长度 Primer length/bp	扩增基因及长度 Amplified genes and length
MMP-16-F	TGTGGACTGGCTGGGTCGAT	66.3	20	MMP-16, 1150 bp
MMP-16-R	GGCGTCCATTTTGCCATTCC	46.8	20	
MMP-17-F	TACTCCAACGAGATCG	46.4	17	MMP-17, 1913 bp
MMP-17-R	CTAGTGTGACTGATGATATAAGAA	50.8	24	
MMP-21-F	CTTCTGTGGATGTTTACTGT	50.0	20	MMP-21, 2112 bp
MMP-21-R	CACTTTTCATACCACTTGCCTCTGT	62.8	25	

1.5 生物信息学分析

根据克隆得到的 *Hdh-MMPs* 基因序列，利用 DNAMAN 软件推导 *Hdh-MMPs* 氨基酸序列；利用 interpro 在线分析软件（<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>）对其蛋白质结构域进行分析；用 NCBI 中 BLAST 工具（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）进行序列比对和相似性分析；用 ProtParam（<http://web.expasy.org/protparam/>）分析蛋白质的理化性质；通过 PSIPRED（<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>）在线预测 MMPs 蛋白质二级结构；利用 DNAMAN 软件进行不同物种间同一基因多序列比对。

1.6 qPCR 检测 *Hdh-MMPs* 基因表达

根据克隆得到的皱纹盘鲍 *Hdh-MMPs* 基因序列设计 qPCR 用引物（见表 2），以 EF-1α 作为内参基因，利用 TransStart® Top Green qPCR SuperMix（TransGen Biotech）分析 *Hdh-MMPs* 基因在皱纹盘鲍各组织及副溶血弧菌感染前后的表达差异性。qPCR 反应体系（10 μL）如下：2 × qPCR SuperMix 5 μL，正向引物（10 μmol/L）0.2 μL，反向引物（10 μmol/L）0.2 μL，50 × Passive Reference Dye 0.2 μL，cDNA 1.0 μL，ddH₂O 3.4 μL。于 ABI 7300 仪器（Applied Biosystems）中进行两步法 PCR 扩增，程序如下：94 ℃ 预变性 30 s；94 ℃ 变性 5 s，60 ℃ 延伸 31 s（荧光采集），循环 40 次；扩增结束后，从 55 ℃ 升温至 94 ℃ 制备溶解曲线。每个样品设置 3 个重复，每组反应均设置无模板对照。

表 2 qPCR 所用引物
Tab. 2 Primers for qPCR

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	T _m /℃	引物长度 Primer length/bp	扩增基因及长度 Amplified genes and length
MMP-16-QF	ATGTCACCTCCGCTAACCTTCT	61.9	21	MMP-16, 176 bp
MMP-16-QR	GTGGGTGTCTCTCTCCAATCAG	57.9	21	
MMP-17-QF	TCATCTGTCATTAGGCAGGAGG	59.9	21	MMP-17, 223 bp
MMP-17-QR	GCTTCAAGATAAGTTGGCGTTG	60.3	21	
MMP-21-QF	GGTAATCATCAAAACTGTCCCGATA	61.4	21	MMP-21, 146 bp
MMP-21-QR	CGCAGAAGATAAATCCCTCA	62.2	25	
EF-1α-QF	GTTGGTGAGTTTGAAGCTGGTA	59.3	22	EF-1α, 144 bp
EF-1α-QR	AAATCGTGCCTCAGAGTATGCT	60.0	22	

1.7 数据处理

运用 Graphpad Prism 5 软件处理数据及图表绘制, 采用单因素方差分析法 (One-way ANOVA) 进行统计分析, 显著性水平为 $P < 0.05$, 极显著性水平为 $P < 0.01$ 。

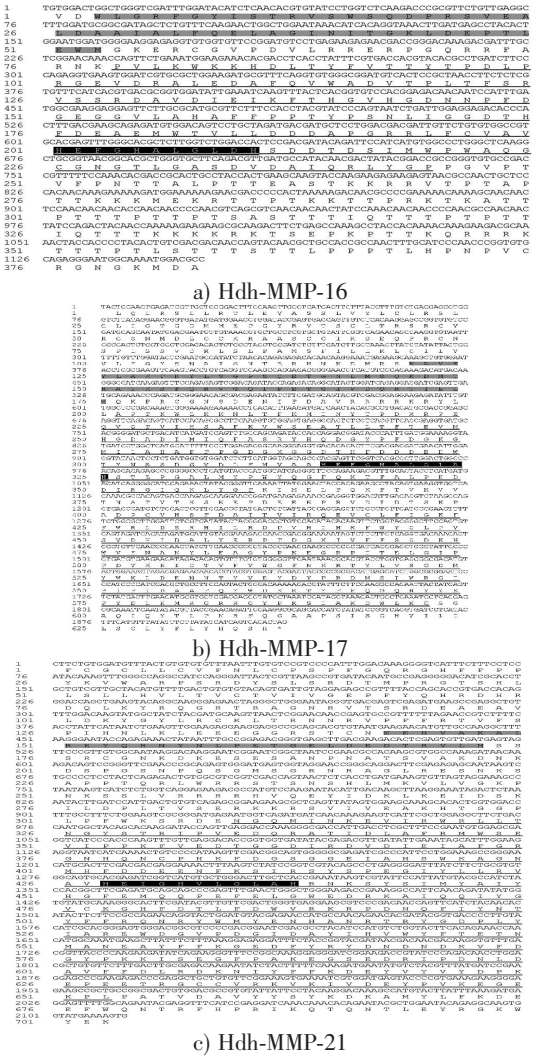
2 结果

2.1 Hdh-MMPs 基因的克隆及序列分析

通过拼接 NCBI SRA 数据库中皱纹盘鲍转录组测序数据 (登录号: SRP059307)^[10], 得到完整的皱纹盘鲍转录组序列。利用 BLAST 在线软件预测得到与其他物种 MMP 同源的 *Hdh-MMP-16/17/21* 基因部分序列。通过 PCR 扩增, 克隆得到 *Hdh-MMP-16*、*Hdh-MMP-17* 和 *Hdh-MMP-21* cDNA 编码区部分序列。*Hdh-MMP-16* 片段长度 1150 bp, 编码 383 个氨基酸残基, 包含 MMP 完整的催化区和肽聚糖结合结构域 (见图 1a)。*Hdh-MMP-17* 和 *Hdh-MMP-21* 片段长度分别为 1913 bp 和 2112 bp, 分别编码 636 和 703 个氨基酸残基, 包含 MMP 完整的催化区、肽聚糖结合结构域和类血红素结合区 (见图 1b 和图 1c)。氨基酸序列分析表明, *Hdh-MMP-16/17/21* 3 个蛋白质均含有保守结构片段, 即位于催化结构域的催化活性中心 HEXGHXXGXXH 序列 (见图 1)。

2.2 Hdh-MMPs 蛋白质特性和结构分析

根据 ProtParam 预测结果, 克隆得到的 *Hdh-MMP-16* 蛋白质相对分子质量为 42.28 ku, 理论等电点为 9.39。基因编码的 383 个氨基酸中, 带有正电荷的碱性氨基酸精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys) 共 52 个, 带有负电荷的酸性氨基酸天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu) 共 42 个。该蛋白质的不稳定系数和疏水值分别为 33.89 和 -0.670, 是一种稳定的亲水性蛋白质。使用 PSIPRED 对 *Hdh-MMP-16* 二级结构进行预测, 结果



说明: 肽聚糖结合结构域由灰底表示; 催化结构域由黑色下划线表示; 类血红素结合区由双下划线表示; 催化活性中心由黑底表示。
Notes: Peptidoglycan binding domain is shown in grey background. The catalytic domain is indicated by black underline. The hemopexin-like domain is indicated by double underline. The catalytic site is shown in black background.

图 1 Hdh-MMPs 基因序列及推导的氨基酸序列
Fig 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Hdh-MMPs

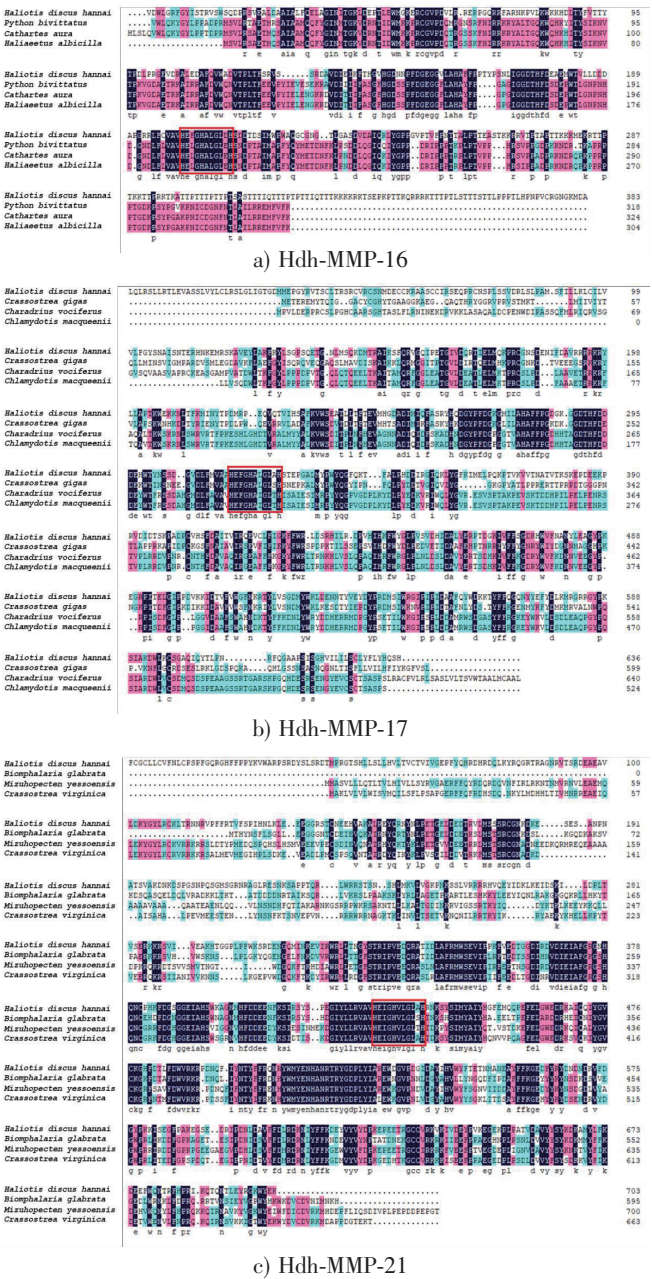
表明, α - 螺旋结构占 15.4%, β - 折叠占 6.0%, 无规则卷曲占 78.6%。

预测 Hdh-MMP-17 蛋白质相对分子质量为 73.15 ku, 理论等电点为 8.60。基因编码的 636 个氨基酸中, 带有正电荷的碱性氨基酸精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys) 共 80 个, 带有负电荷的酸性氨基酸天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu) 共 72 个。该蛋白质的不稳定系数和疏水值分别为 40.02 和 -0.367, 是一种不稳定的亲水性蛋白质。二级结构预测结果表明, Hdh-MMP-17 蛋白质中, α - 螺旋结构占 19.5%, β - 折叠占 12.7%, 无规则卷曲占 67.8%。

预测 Hdh-MMP-21 蛋白质相对分子质量为 82.36 ku, 理论等电点为 8.55。基因编码的 703 个氨基酸中, 带有正电荷的碱性氨基酸精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys) 共 108 个, 带有负电荷的酸性氨基酸天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu) 共 101 个。该蛋白质的不稳定系数和疏水值分别为 42.76 和 -0.839, 是一种不稳定的亲水性蛋白质。Hdh-MMP-21 蛋白质二级结构组成为: α - 螺旋结构占 14.8%, 延伸链占 12.5%, 无规则卷曲占 72.7%。

2.3 Hdh-MMPs 氨基酸序列比对及序列相似性分析

通过 NCBI 在线 BLAST 工具进行 Hdh-MMP 氨基酸序列相似性搜索, 结果表明, Hdh-MMP-16/17/21 序列与多种物种的 MMP-16/17/21 具有序列相似性, 表明 MMP 在不同物种间较保守。进而利用 DNAMAN 软件对不同物种 MMP-16/17/21 氨基酸序列进行比对, 结果显示, Hdh-MMP-16 氨基酸序列与缅甸蟒蛇 (*Python bivittatus*, XP_015745754.1)、红头美洲鹫 (*Cathartes aura*, KFP55131.1) 和白尾海雕 (*Haliaeetus albicilla*, XP_009910615.1) MMP-16 的同源性分别为 32%、32% 和 31% (见图 2a); Hdh-MMP-17 的氨基酸序列与太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*, EKC39793.1)、双胸斑沙鸟 (*Charadrius vociferus*, XP_009886438.1) 和波斑鸻 (*Chlamydotis macqueenii*, KFP39531.1) MMP-17 的序列相似性分别为 43%、33% 和 33% (见图 2b); Hdh-MMP-21 氨基酸序列与光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*, XP_013079423.1)、虾夷盘扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*, OWF51000.1) 和美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*, XP_022341852.1) MMP-21 的序列相似性分别为 47%、43% 和 46% (见图 2c)。

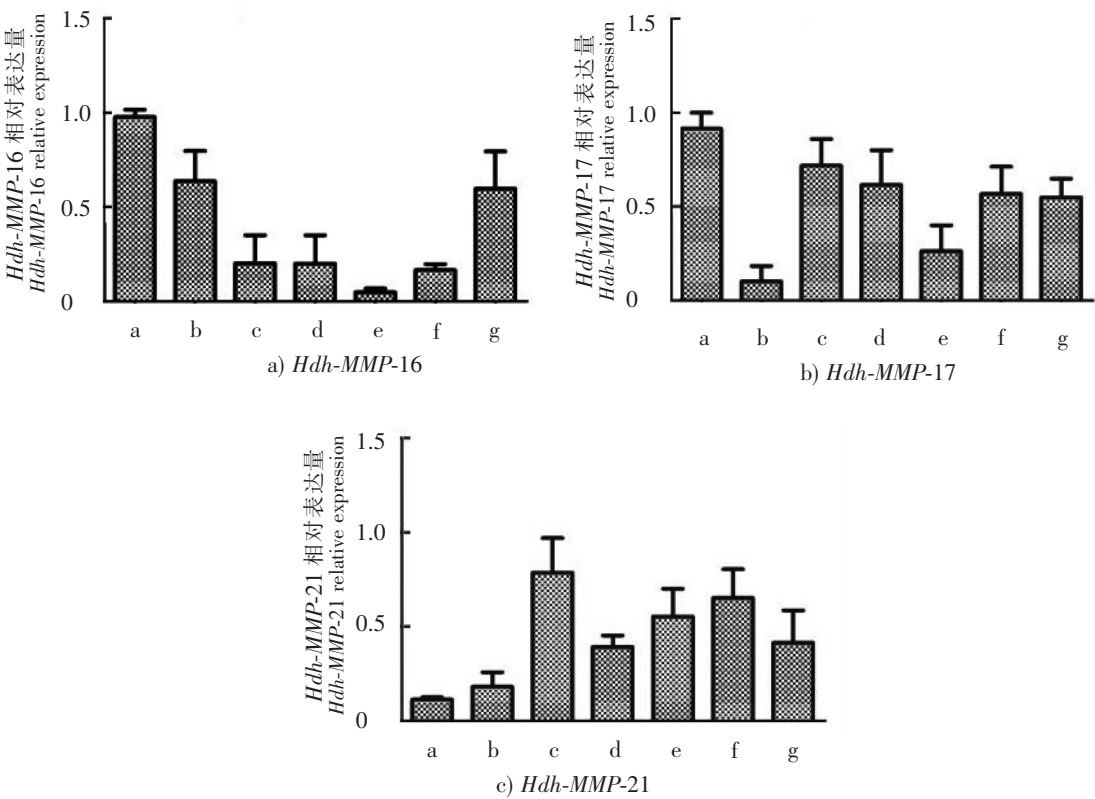


说明: 红色方框所示为催化活性中心 HEXGHXXGXXH。
Notes: The red frame shows the catalytic site HEXGHXXGXXH.

图 2 Hdh-MMPs 与其他物种 MMPs 的多序列比对
Fig.2 Amino acid sequence alignment of Hdh-MMPs and other organisms

2.4 *Hdh-MMPs* 基因在皱纹盘鲍不同组织中的相对表达量分析

qPCR 是一种在 DNA 扩增反应中以荧光化学物质监测每次 PCR 循环后产物总量的方法, 可通过内参或外参法定量分析样品中的特定 DNA 序列。本研究利用 qPCR 检测 *Hdh-MMPs* 基因在皱纹盘鲍不同组织中表达量差异, 探究 MMPs 在皱纹盘鲍体内的组织分布情况。结果显示, *Hdh-MMP-16/17/21* 基因在检测的不同组织均有不同程度的表达。其中, *Hdh-MMP-16* 在血淋巴细胞中表达量最高, 其次为肝胰腺和外套膜, 在其他组织中表达水平较低 (见图 3a)。*Hdh-MMP-17* 在血淋巴细胞中表达量最高, 其次为鳃、腹足、性腺和外套膜, 肝胰腺和肌肉中表达量较低 (见图 3b)。*Hdh-MMP-21* 在鳃中表达量最高, 其次为性腺和肌肉, 在其他组织中表达量较低 (图 3c)。



说明:a~g 分别为血淋巴细胞、肝胰腺、鳃、腹足、肌肉、性腺、外套膜。
Notes:a~g represents hemocytes,hepatopancreas,gill,pleopod,muscle,gonad and mantle,respectively.

图 3 *Hdh-MMPs* 在皱纹盘鲍不同组织中的相对表达量
Fig.3 Relative expression levels of *Hdh-MMPs* gene in different tissues of abalone

2.5 *Hdh-MMPs* 在皱纹盘鲍感染弧菌前后表达量差异的分析

近年来研究表明, MMP 参与调控机体抗菌和抗病毒先天性免疫反应。本研究中, 将副溶血弧菌以肌肉注射的方式感染鲍鱼, 并检测感染不同时间后鲍鱼主要免疫器官肝胰腺、鳃、血淋巴细胞中 *Hdh-MMPs* 基因相对表达量变化情况, 如图 4a ~ 图 4c 所示。可见, 与 PBS 组对比, 副溶血弧菌感染后鳃中 *Hdh-MMP-16* 表达量整体呈现上升的趋势, 而在血淋巴细胞和肝胰腺中则与对照组接近。*Hdh-MMP-17* 相对表达量在弧菌感染后呈现先上升后下降的趋势。在肝胰腺和鳃中, *Hdh-MMP-17* 相对表达量在注射后 12 h 达到最高值; 而在血淋巴细胞中, 在注射后 48 h 达到最高值 (图 4d ~ 图 4f)。弧菌感染后, 鳃和肝胰腺中的 *Hdh-MMP-21* 基因一定程度上调表达, 而血淋巴细胞中该基因表达水平与对照组无异 (图 4g ~ 图 4i)。综上所述, *Hdh-MMP-16/17/21* 可能与鲍鱼抵御病原菌入侵的先天性免疫性调控相关。

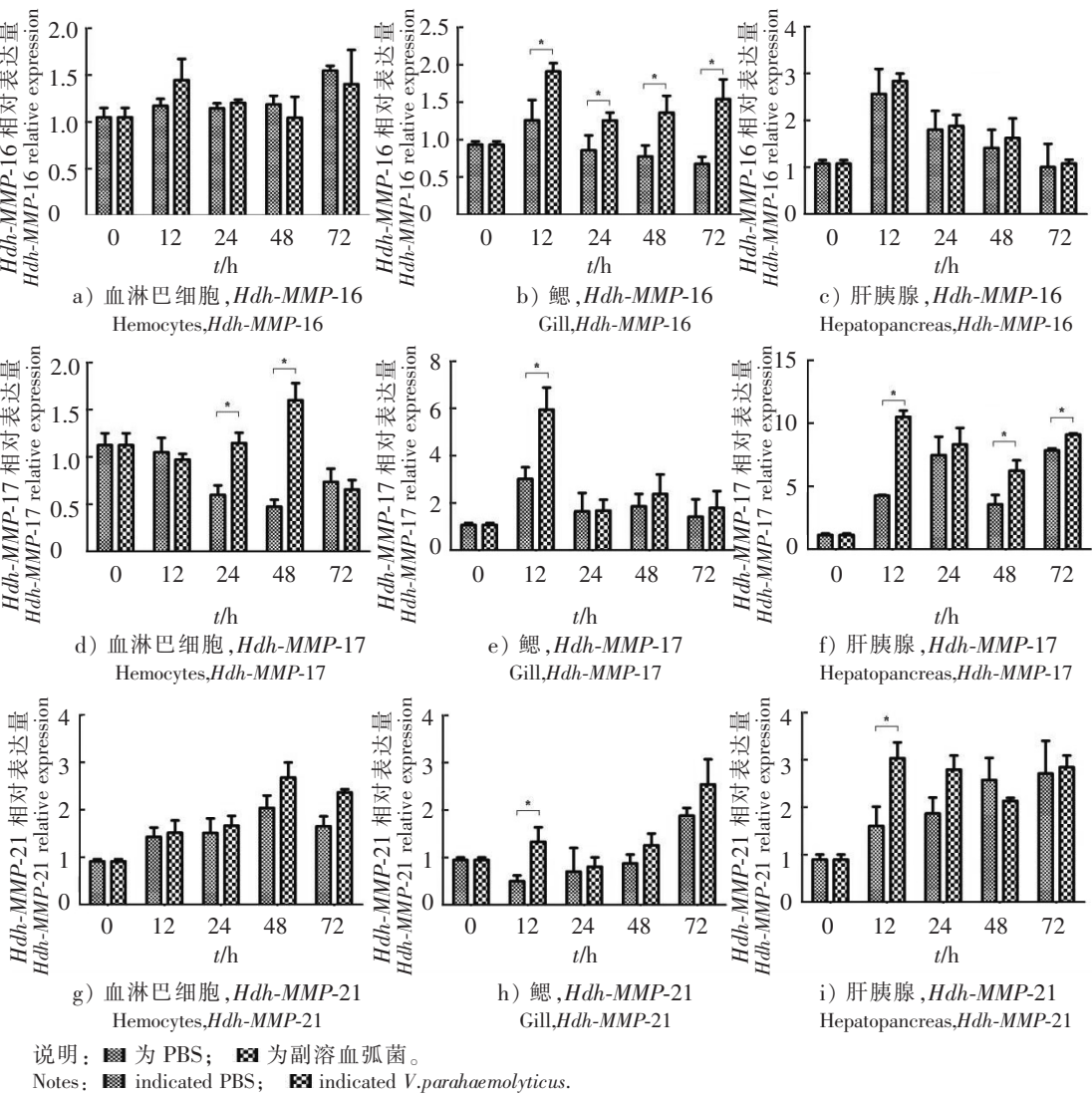


图 4 副溶血弧菌刺激前后 *Hdh-MMPs* 基因在皱纹盘鲍不同组织中的表达情况

Fig.4 Relative expression levels of *Hdh-MMPs* gene in different tissues of abalone after *V. parahaemolyticus* challenge

3 讨论

基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）是一类锌离子依赖型内肽酶，它是降解 ECM 的主要酶类，能够参与生物体多种生理和病理过程^[11-12]。截至目前，已发现了至少 26 种结构与功能各异的 MMP，根据其细胞亚定位可分为分泌型 MMPs 和膜型 MMPs（membrane-type MMPs, MT-MMPs）。新合成的 MMP 以酶原的形式存在，当其前肽区被剪切后，酶原得以活化。而后，基质金属蛋白酶的内源性抑制剂金属蛋白酶抑制剂（tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP）结合在活化的 MMP 的活性位点，从而影响其酶活性^[13]。在前期研究中，本课题组已从鲤鱼（*Cyprinus carpio*）和刺参（*Stichopus japonicus*）中克隆得到 MMP-2 基因全长序列，通过异源表达得到具有活性的 MMP-2 催化结构域，并探索了 MMP-2 降解胶原蛋白的特性^[14-15]；从皱纹盘鲍中克隆得到 MMP-1 基因全长序列，但是并未获得具有酶解活性的 MMP-1 蛋白质^[16]。已有研究报道，哺乳动物中多种 MMP（如 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-17 和 MMP-25 等）可以直接或间接影响机体内参与炎症反应和组织修复的细胞因子与趋化因子的活性，其中 MMP-7 能直接杀死入侵的病原菌^[17-18]。

此外,巨噬细胞分泌的 MMP-12 能被运输到感染了病毒的宿主细胞内,进而转运到细胞核内,作为一个转录因子起始 NFKBIA 基因的转录,最终导致 IFN- α 的大量分泌并发挥保护宿主的作用^[9]。因此,除了参与胞外基质的降解,MMP 在机体的炎症反应和先天性免疫反应中也发挥重要作用。本研究克隆得到皱纹盘鲍 3 个 MMPs 基因 (*Hdh-MMP-16/17/21*) 部分序列,序列分析结果表明,该 3 个基因编码的蛋白质含有 MMP 典型的催化结构域和类血红素结合区。催化活性中心 HEXGHXXGXXH 3 个组氨酸残基(H)与 Zn^{2+} 形成的配位键是 MMP 发挥生物学活性的关键。多序列比对结果表明,*Hdh-MMPs* 蛋白质与某些软体动物的 MMPs 具有序列相似性,而 *Hdh-MMP-17* 还和人 MMP-17 蛋白质具有较高的同源性,表明结构相似的 MMPs 在不同物种间较保守。

MMP-16 (membrane-type 3 MMP, MT3-MMP) 和 MMP-17 (membrane-type 4 MMP, MT4-MMP) 属于膜型基质金属蛋白酶,可在细胞边缘降解 ECM,从而参与调控细胞增殖、凋亡、分化和迁移等活性。MMP-16 是 I 型跨膜基质金属蛋白酶,在正常的成纤维细胞中高度表达。它不仅可以降解 III 型胶原蛋白、聚糖、明胶和纤连蛋白等,还可一定程度上激活 MMP-2,随着蛋白酶原从细胞排出而进入其活性形式。MMP-16 的活性受 TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4 严格调控。有趣的是,在低浓度 TIMP-2 作用下,MMP-16 激活 MMP-2 酶原的活性显著提高,这一作用可能与三元复合物的形成有关^[19]。已有研究表明,MMP-16 不仅参与晚期软骨细胞分化、椎间盘退变等过程^[20-21],同时也参与上皮-间质细胞转化和细胞迁移^[22]。与 MMP-16 不同的是,MMP-17 通过与糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 结合而锚定在细胞膜上,因此被称为 GPI 固定化蛋白,其活性主要受 TIMP-1 和 TIMP-2 调控^[23]。MMP-17 缺陷型小鼠并未呈现出明显的病态,说明 MMP-17 缺失不影响机体的正常发育和个体存活^[24]。在软骨关节炎、乳腺癌和头颈癌等病人样品中 MMP-17 大量表达,表明 MMP-17 与疾病发生和发展相关^[23]。脂多糖刺激之后,马氏珠母贝 *MMP-17* 基因表达水平在 12 h 后达到最大值,之后逐渐下降至正常水平^[25]。本研究结果显示,*Hdh-MMP-16* 在皱纹盘鲍血淋巴细胞和肝胰腺中表达量最高,而 *Hdh-MMP-17* 在血淋巴细胞和鳃中表达量最高。由于血淋巴细胞、鳃和肝胰腺是鲍鱼主要的免疫器官,*Hdh-MMPs* 在这些组织中的高表达可能与皱纹盘鲍的先天免疫相关。致病菌感染机体后,皱纹盘鲍鳃组织中 *MMP-16* 转录水平显著上调,但血淋巴细胞和肝胰腺中 *MMP-16* 转录水平基本无变化。*Hdh-MMP-17* 在血淋巴细胞、鳃和肝胰腺中表达量均一定程度上调。已有研究表明,副溶血弧菌主要侵染鲍鱼的血窦和鳃上皮细胞^[26]。用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的副溶血弧菌感染鲍鱼后,其主要粘附和进入鳃组织^[27]。鲍鱼的肝胰腺也是非常重要的免疫器官,其分泌的多种蛋白酶可通过水解作用来抵御病原菌的侵染^[28]。因此,弧菌感染鲍鱼后鳃组织中 *Hdh-MMP-16* 表达量的上调以及三个免疫器官中 *Hdh-MMP-17* 表达量的上调可能与宿主抗病原菌感染有关。

MMP-21 属于转化酶激活的基质金属蛋白酶,在多种恶性肿瘤中高表达。与其他 MMPs 不同的是,MMP-21 主要由上皮细胞和肿瘤细胞表达与分泌,表明 MMP-21 的主要作用是参与肿瘤的发生和转移^[29]。本研究结果显示,*Hdh-MMP-21* 在上皮细胞丰富的鳃组织中表达量最高,这与 MMP-21 的表达特性相一致。此外,利用反转录聚合酶链式反应 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术可以在几种正常的人体组织中检测到 *MMP-21* 的转录本,这些组织包括肾脏、胎盘、脑、肺和白细胞等,说明 MMP-21 可能在维持机体稳态和代谢过程中发挥一定作用^[30]。已有研究显示,斑马鱼中 *MMP-21* 基因表达的抑制能显著影响斑马鱼心脏环化^[31]。由于鲍鱼肌肉中富含胶原蛋白,其含量直接影响肌肉嫩度^[32]。在本研究中,肌肉组织中表达量较高的 *MMP-21* 可能参与胶原蛋白的新陈代谢,进而影响鲍鱼肌肉质构。此外,副溶血弧菌感染 12 h 后,鳃和肝胰腺中 *Hdh-MMP-21* 表达量上调,说明其也可能参与皱纹盘鲍抗菌感染的早期阶段。

为了进一步探索 *Hdh-MMPs* 在皱纹盘鲍先天性免疫中的作用,下一步需体外表达 *Hdh-MMPs* 重组蛋白并制备特异性多克隆抗体,通过检测 *Hdh-MMPs* 在皱纹盘鲍不同组织和弧菌感染前后各组织蛋白

水平的变化情况, 进一步阐明 Hdh-MMPs 在鲍鱼体内的存在形式及其参与非特异免疫应答的机制。

[参 考 文 献]

- [1] 蔡明夷, 柯才焕, 周时强, 等. 鲍遗传育种研究进展 [J]. 水产学报, 2004, 28(2): 201-208. DOI:10.3321/j.issn:1000-0615.2004.02.014.
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [3] LEE K K, LIU P C, HUANG C Y. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone [J]. Microbes Infection, 2003, 5(6): 481-485. DOI:10.1016/S1286-4579(03)00065-0.
- [4] 刘巍, HUBER S A, 李淑清. 基质金属蛋白酶研究进展 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2011, 45(5): 500-503. DOI:10.3969/j.issn.1000-1905.2011.05.034.
- [5] CERDÀCOSTA N, GOMISRÜTH F X. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains [J]. Protein Science, 2014, 23(2): 123-144. DOI:10.1002/pro.2400.
- [6] FANJULFERNÁNDEZ M, FOLGUERAS A R, CABRERA S, et al. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models [J]. BBA-Mol Cell Res, 2010, 1803(1): 3-19. DOI:10.1016/j.bbamer.2009.07.004.
- [7] LOFFEK S, SCHILLING O, FRANZKE C W. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance [J]. Eur Respir J, 2011, 38(1): 191-208. DOI: 10.1183/09031936.00146510.
- [8] GUTIÉRREZFERNÁNDEZ A, SORIAVALLES C, OSORIO F G, et al. Loss of MT1-MMP causes cell senescence and nuclear defects which can be reversed by retinoic acid [J]. EMBO Journal, 2015, 34(14): 1875-1888. DOI: 10.15252/embj.201490594.
- [9] MARCHANT D J, BELLAC C L, MORAES T J, et al. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in anti-viral immunity [J]. Nature Medicine, 2014, 20(5): 493-502. DOI:10.1038/nm.3508.
- [10] NAM B H, JUNG M, SUBRAMANIYAM S, et al. Transcriptome analysis revealed changes of multiple genes involved in *Halotis discus hannai* innate immunity during *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. PloS One, 2016, 11(4): e0153474. DOI:10.1371/journal.pone.0153474.
- [11] ECKHARD U, HUESGEN P F, SCHILLING O, et al. Active site specificity profiling of the matrix metalloproteinase family: proteomic identification of 4300 cleavage sites by nine MMPs explored with structural and synthetic peptide cleavage analyses [J]. Matrix Biology, 2016, 49:37-60. DOI:10.1016/j.matbio.2015.09.003.
- [12] MUVVA C, PATRA S, VENKATESAN S. MMPi: a widerange of available compounds of matrix metalloproteinase inhibitors [J]. PloS One, 2016, 11(8): e0159321(1-12). DOI:10.1371/journal.pone.0159321.
- [13] KHOKHA R, MURTHY A, WEISS A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity [J]. Nature Review Immunology, 2013, 13(9): 649-665. DOI:10.1038/nri3499.
- [14] WANG C, ZHAN C L, CAI Q F, et al. Expression and characterization of common carp (*Cyprinus carpio*) matrix metalloproteinase-2 and its activity against type I collagen [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 177: 45-52. DOI:10.1016/j.jbiotec.2014.02.019.
- [15] YAN L J, JIN T, CHEN Y L, et al. Characterization of a recombinant matrix metalloproteinase-2 from sea cucumber (*Stichopus japonicas*) and its application to prepare bioactive collagen hydrolysate [J]. Process Biochemistry, 2018, 72: 63-70. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.06.023.
- [16] 段雪昆, 杜翠红, 胡健健, 等. 皱纹盘鲍 Hdh-MMP-I 基因 cDNA 的克隆及原核表达 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2016, 21(5): 321-329.
- [17] PARKS W C, WILSON C L, LOPEZ-BOADO Y S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity [J]. Nature Review Immunology, 2004, 4(8): 617-629. DOI:10.1038/nri1418.
- [18] SORIA-VALLES C, GUTIERREZ-FERNANDEZ A, OSORIO F G, et al. MMP-25 metalloprotease regulates innate immune response through NF- κ B signaling [J]. Journal of Immunology, 2016, 197(1): 296-302. DOI:10.4049/jimmunol.1600094.

- [19] ZHAO H, BERNARDO M M, OSENKOWSKI P, et al. Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(10): 8592-8601. DOI:10.1074/jbc.M308708200.
- [20] SEKIYA I, VUORISTO J T, LARSON B L, et al. *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(7): 4397-4402. DOI:10.1073/pnas.052716199.
- [21] ZHANG W L, CHEN Y F, MENG H Z, et al. Role of miR-155 in the regulation of MMP-16 expression in intervertebral disc degeneration [J]. Journal of Orthopaedic Research, 2017, 35(6): 1323-1334. DOI:10.1002/jor.23313.
- [22] LIU J, VAN MIL A, AGUOR E N, et al. MiR-155 inhibits cell migration of human cardiomyocyte progenitor cells (hCMPCs) via targeting of MMP-16 [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2012, 16(10): 2379-2386. DOI:10.1111/j.1582-4934.2012.01551.x.
- [23] SOHAIL A, MARCO M, ZHAO H, et al. Characterization of the dimerization interface of membrane type 4 (MT4)-matrix metalloproteinase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(38): 33178-33189. DOI:10.1074/jbc.M111.253369.
- [24] RIKIMARU A, KOMORI K, SAKAMOTO T, et al. Establishment of an MT4-MMP-deficient mouse strain representing an efficient tracking system for MT4-MMP/MMP-17 expression *in vivo* using beta-galactosidase [J]. Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms, 2007, 12(9): 1091-1100. DOI:10.1111/j.1365-2443.2007.01110.x.
- [25] 罗少杰, 闫芳, 郑哲, 等. 马氏珠母贝基质金属蛋白酶基因 *MMP-17* 的克隆及表达分析 [J]. 水产学报, 2015, 39(7): 978-988. DOI:10.11964/jfc.20150109686.
- [26] TRAVERS M A, BARBOU A, LE G N, et al. Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 289(1): 34-40. DOI:10.1111/j.1574-6968.2008.01367.x.
- [27] CABELLO A E, ESPEJO R T, ROMERO J. Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a green fluorescent protein tag [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2005, 327(2): 157-166. DOI:10.1016/j.jembe.2005.06.009.
- [28] HU J J, CHEN Y L, DUAN X K, et al. Involvement of clip-domain serine protease in the anti-*Vibrio* immune response of abalone (*Haliotis discus hannai*) -molecular cloning, characterization and functional analysis [J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 72: 210-219. DOI:10.1016/j.fsi.2017.10.062.
- [29] WU T, LI Y, LU J, et al. Increased MMP-21 expression is associated with poor overall survival of patients with gastric cancer [J]. Medical Oncology, 2013, 30(323): 1-6. DOI:10.1007/s12032-012-0323-8.
- [30] SKOOG T, AHOKAS K, ORSMARK C, et al. MMP-21 is expressed by macrophages and fibroblasts *in vivo* and *in culture* [J]. Experimental Dermatology, 2006, 15(10): 775-783. DOI:10.1111/j.1600-0625.2006.00460.x.
- [31] 刘兰, 谭宇亭, 张攀, 等. MMP21 基因表达下调对斑马鱼心脏环化的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(5): 430-435. DOI:10.16016/j.1000-5404.201609136.
- [32] 游银川, 麻金花, 段雪昆, 等. 皱纹盘鲍酶促溶性胶原蛋白的性质研究及抗体制备 [J]. 水产学报, 2016, 40(2): 267-277. DOI:10.11964/jfc.20150810041.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)