

大黄鱼(*Larimichthys crocea*) Tristetraprolin 基因的克隆与功能分析*

汪慧娟¹ 何志巧¹ 石戈¹ 周素明² 张晓林¹ 申望¹

(1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院 浙江舟山 316022; 2. 宁波大学海洋学院 浙江宁波 315211)

摘要 Tristetraprolin (TTP)是广泛存在于真核生物的 RNA 结合蛋白。TTP 通过促进 mRNA 降解或抑制翻译在转录后水平抑制炎症因子表达,是炎症性疾病的潜在治疗靶点。采用 RACE 技术获取了大黄鱼(*Larimichthys crocea*) TTP (命名为 *LcTTP*) cDNA 的全长序列。*LcTTP* 全长 cDNA 1 508 bp, 包括 77 bp 的 5'-非编码区(5'-UTR)、183 bp 的 3'-UTR 和 1 248 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 418 个氨基酸残基。推导的 *LcTTP* 理论分子量 44 897.78 Da, 预测等电点 pI 8.37; 哺乳动物 TTP 的重要功能结构域: N-端核输出序列(NES)、中央串联锌指结构域(TZF)、C-端 NOT1-结合结构域(NOT1-BD)也在 *LcTTP* 中保守存在; 系统发育分析显示 *LcTTP* 和其他脊椎动物 TTP 聚为一支, 并与哺乳动物 ZFP36 家族其他成员 ZFP36L1、ZFP36L2 和 ZFP36L3 的进化支分离。组织表达特异性分析显示检测的 9 个组织均表达 *LcTTP* mRNA, 但不同组织间表达水平差异大, 其中肌肉组织表达水平最高。大黄鱼头肾细胞系 LYC-hK 细胞中过表达 *LcTTP* 上调 LPS 诱导早期(1 h) TNF- α mRNA 表达量, 之后 TNF- α mRNA 表达量快速下调至接近对照组水平(1.5 h); 放线菌 D 抑制转录后过表达 *LcTTP* 上调 TNF- α mRNA 降解速率, 表明 *LcTTP* 可通过促进 TNF- α mRNA 降解调节 TNF- α 表达。以上研究结果提示 *LcTTP* 可能是大黄鱼炎症反应平衡关键调控蛋白, 在大黄鱼感染性病害防治策略开发中有潜在应用价值。

关键词 大黄鱼; RNA 结合蛋白; Tristetraprolin 蛋白; 炎症反应; 转录后调控

中图分类号 Q789; S965 **doi:** 10.11693/hyhz20230500103

炎症反应是病原感染、组织损伤等胁迫作用诱导的机体适应性反应。受控的适度炎症反应清除入侵病原或修复组织损伤, 而失控的高炎症反应则导致组织器官损伤, 诱发炎症性疾病甚至死亡(Medzhitov, 2008)。因此, 炎症因子表达在转录水平和转录后水平都受到严格调控(Yoshinaga *et al.*, 2019)。RNA 结合蛋白(RNA binding protein, RBP)介导的在转录后水平调节炎症因子 mRNA 加工、定位、降解和翻译, 是炎症因子表达调控的关键机制(Kafasla *et al.*, 2014; Uchida *et al.*, 2019)。

Tristetraprolin (TTP, 别名 ZFP36、TIS11、GOS24、NUP475)是 ZFP36 家族 RBP 的原型蛋白, 广泛存在于

真核生物中(Makita *et al.*, 2021)。哺乳动物 TTP 都有 3 个保守功能结构域: N-端的核输出信号(nuclear export signal, NES)、中央串联的 2 个 CCCH 型锌指结构域(tandem zinc-finger domain, TZF)和 C-端的 NOT1-结合结构域(NOT1-binding domain, NOT1-BD)(Akira *et al.*, 2021)。TZF 结构域识别、结合靶 mRNA 3'-非翻译区(untranslating region, UTR)的 AU-富集元件(AU-rich element, ARE), N 端和 C 端结构域募集 CCR4-NOT1 脱腺嘌呤复合体(CCR4-NOT1 deadenylase complex)、脱帽复合体(decapping complex, Dcp)、核酸外切体(exosomes)、5'~3'外切核糖核酸酶 1 (5'~3' exoribonuclease 1, XRN1)等促进靶 mRNA 降解, 调节

* 浙江海洋大学科研启动经费, 2020。汪慧娟, 硕士研究生, E-mail: wang_hui_j@163.com

通信作者: 申望, 副教授, E-mail: shenwang@zjou.edu.cn

收稿日期: 2023-05-08, 收修改稿日期: 2023-07-29

靶基因表达(Akira *et al.*, 2021)。TTP 靶 RNA 组研究显示 TTP 的靶 mRNA 主要是炎症和免疫相关基因 mRNA, 包括经典炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA (Kratochvill *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2014)。与之相对应, TTP 参与调控多种炎症和免疫相关疾病的发生和发展 (Zhang *et al.*, 2021)。例如, 基因敲除 TTP, TTP-KO 小鼠表现出严重的炎症型疾病综合征, 包括恶液质、关节炎、皮肤炎、结膜炎、白血病等, TNF- α 中和抗体处理可显著减轻症状(Taylor *et al.*, 1996; Carballo *et al.*, 2001)。反之, 敲除 TTP mRNA 3'-UTR 的 AREs 顺式元件过表达 TTP, 下调 LPS 诱导的巨噬细胞和小鼠炎症因子表达, 减轻风湿性关节炎、内毒素血症、牛皮癣、多发性硬皮病等免疫相关疾病小鼠模型的临床症状(Patial *et al.*, 2016b)。因此, TTP 被认为是炎症性疾病的潜在治疗靶点(Mahmoud *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022)。感染性养殖病害一直是制约水产养殖业发展的瓶颈问题。例如, 在亚洲鱼类养殖业总经济损失中, 仅弧菌病所造成的经济损失就约占 50% (Xu *et al.*, 2022)。高炎症反应也是鱼类感染性病害的病理基础(Dai *et al.*, 2023), 但迄今还未见鱼类 TTP 功能的研究报道, 特别是 TTP 对鱼类炎症因子表达的调节作用。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国养殖规模最大的海水鱼(农业农村部渔业渔政管理局等, 2022)。随着养殖规模和养殖密度的增大, 大黄鱼感染性病害防治压力也越来越大(王凡等, 2019)。而抗生素等传统感染性病害防治方法由于环境安全和食品安全等问题, 已被禁用或严格限制使用(胡洋等, 2022), 开发抗生素替代物等大黄鱼感染性病害防治新方法成为保障产业健康发展的迫切需求。因此, 本研究以大黄鱼 TTP (命名为 *LcTTP*)为研究对象, 采用 RACE (rapid amplification of cDNA end)技术克隆 *LcTTP* 基因全长 cDNA 序列并进行生物信息学分析, 研究 *LcTTP* 的结构特征和系统发生; 采用实时荧光定量技术 (Real-time Quantitative PCR, RT-qPCR) 检测 *LcTTP* 基因的组织表达模式; 并通过在大黄鱼头肾细胞系 LYC-hK 中过表达 *LcTTP*, 研究 *LcTTP* 对 LPS 诱导的 TNF- α mRNA 表达水平的调节作用及其机制。研究结果可为进一步探讨 *LcTTP* 对大黄鱼抗感染炎症反应的调控作用以及评估其应用价值提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康大黄鱼[平均体重(142.7 \pm 12.2) g]购买自浙江省舟山市半岛水产养殖有限公司, 在实验室循环

海水养殖系统中使用过滤海水饲养一周适应环境后取样, 水温 24~25 $^{\circ}$ C。

为检测 *LcTTP* 基因的组织表达特异性, 5 条健康大黄鱼浸泡于 0.02% MS-222 (国药, 中国)麻醉后, 取肝、肠、胃、肌肉、心、脾、肾、鳃和脑等 9 个组织的样本放置于 1.5 mL EP 管中, 加入 RNALaterTM动物组织 RNA 稳定保存液(碧云天, 上海), -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.2 全长 cDNA 克隆

从大黄鱼 NCBI 基因组数据库(登录号: 12197)中检索到一个 TTP 基因同源物(基因登录号: 104928501)及其预测的 mRNA 序列(登录号: XM_010742797.3) (Ao *et al.*, 2015)。以预测的大黄鱼 TTP mRNA 序列为参考, 使用 NCBI 在线引物设计工具 Primer-Blast 设计大黄鱼 TTP mRNA 5'-RACE、3'-RACE 和开放阅读框(opening reading frame, ORF) PCR 引物(表 1) (Ye *et al.*, 2012)。Trizol 法提取总 RNA, 按 TaKaRa RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)说明书操作。5'-RACE 和 3'-RACE 使用 TaKaRa SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit (TaKaRa, 日本), 操作按说明书进行。3'-RACE 引物组合: 第一轮 PCR 引物 *LcTTPF1/3'*-RACE UPM long primer, 第二轮巢式 PCR 引物 *LcTTPF2/3'*-RACE UPM short primer; 5'-RACE 引物组合: 第一轮 PCR 引物 *LcTTPR2/5'*-RACE UPM long primer, 第二轮巢式 PCR 引物 *LcTTPR1/5'*-RACE UPM short primer。ORF PCR 扩增使用 TaKaRa *Ex Taq*[®] DNA Polymerase (TaKaRa, 日本), 模板为 5'/3'-RACE cDNA, 引物为 *ELcTTPF/ELcTTPR*, 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 次循环。PCR 产物经电泳检测、琼脂糖胶回收后连接 simple pMD-19T vector (TaKaRa, 日本), 转化 *E.coli* DH5 α (TaKaRa, 日本), 挑阳性单克隆送上海生工测序, 拼接 5'-RACE、3'-RACE 和 ORF 序列获得 *LcTTP* 全长 cDNA 序列。

1.3 生物信息学分析

使用 ExPASy 在线工具包 Compute pI/MW (https://web.expasy.org/compute_pi/)在线预测理论分子量和等电点; 使用 NCBI 在线工具包 CD-Search 识别保守结构域(Marchler-Bauer *et al.*, 2017); 使用 SignalP 6.0 预测信号肽(Teufel *et al.*, 2022); 使用 Euk-mPloc 2.0 预测 *LcTTP* 的亚细胞定位(Chou *et al.*, 2010); 使用 NetNES 1.1 工具包预测核输出信号(NES) (Fu *et al.*, 2011); 使用 BLASTP 程序在 NCBI 非冗余(nr)数据库中搜索同源序列(Johnson *et al.*, 2008); 多序列比对使用 ClustalW1.83 软件包(Larkin *et al.*, 2007);

表 1 引物信息
Tab.1 Information of the primers

引物名称	序列(5'→3')	用途
LcTTPF1	TCCGAAATGCTTGACGAC	3'-RACE
LcTTPR1	AGGGAGTCACCAAACACTGG	5'-RACE
LcTTPF2	CTAACATGGGGTTCAGCCGT	3'-RACE, RT-qPCR
LcTTPR2	TGGCTCCAGGATGAGAGGAA	5'-RACE, RT-qPCR
ELcTTPF	TGTACAAGTCCGAAATGCTTGACGA	表达
ELcTTPR	GCGGCCGCTTAGTCAGACAGGGACAG	表达
LcACTF	CCTTACCACCACAGCCGAG	RT-qPCR
LcACTR	ATTCCGCAAGATTCCATACCGA	RT-qPCR
LcTNFaF	AACGCCTCACACCTCTCA	RT-qPCR
LcTNFaR	GTCCACAGTTGTCTCCTCTATT	RT-qPCR
LcIL1βF	ATCTGGCAAGGATCAGCTCA	RT-qPCR
LcIL1βR	ACCAGTTGTTGTAGGGGACG	RT-qPCR

表 2 多序列比对和系统树构建所用的 ZFP36 家族成员信息
Tab.2 The sequences of ZFP36 family used for multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis

GenBank 登录号	拉丁名	中文名	与 LcTTP 的序列一致性/%
XP_010741099.1	<i>Larimichthys crocea</i>	大黄鱼	100.00
XP_036937641.1	<i>Acanthopagrus latus</i>	黄鳍鲷	91.46
XP_035535819.1	<i>Morone saxatilis</i>	条纹鲈鱼	91.28
XP_045930373.1	<i>Micropterus dolomieu</i>	小口黑鲈	86.76
XP_047449844.1	<i>Mugil cephalus</i>	鲮鱼	81.36
NP_001106542.1	<i>Xenopus tropicalis</i>	热带爪蟾	45.27
XP_040262428.1	<i>Bufo bufo</i>	中华大蟾蜍	42.76
XP_032083892.1	<i>Thamnophis elegans</i>	吊带蛇	45.85
XP_026546747.1	<i>Notechis scutatus</i>	虎蛇	44.68
XP_038238166.1	<i>Dermochelys coriacea</i>	棱皮龟	43.77
XP_037740475.1	<i>Chelonia mydas</i>	绿海龟	43.63
XP_029769063.1	<i>Terrapene carolina triunguis</i>	三指箱龟	43.61
XP_039181066.1	<i>Crotalus tigris</i>	虎斑响尾蛇	43.54
XP_015676155.1	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	原矛头蝮	42.48
XP_026578640.1	<i>Pseudonaja textilis</i>	东部拟眼镜蛇	43.47
XP_048358068.1	<i>Sphaerodactylus townsendi</i>	圣胡安角球趾壁虎	43.17
NP_003398.3	<i>Homo sapiens</i>	人	40.69
NP_004917.2	<i>Homo sapiens</i>	人	38.08
NP_008818.3	<i>Homo sapiens</i>	人	36.27
NP_035886.1	<i>Mus musculus</i>	小鼠	39.58
NP_031590.1	<i>Mus musculus</i>	小鼠	38.08
NP_001001806.1	<i>Mus musculus</i>	小鼠	36.09
NP_001009549.1	<i>Mus musculus</i>	小鼠	32.75

使用 MEGA version 7 软件包的邻接(Neighbor-Joining, NJ)法构建系统发育树(Kumar *et al.*, 2016); 本研究中多序列比对和系统发育树分析使用的序列见表 2。

1.4 RT-qPCR

Trizol 法提取总 RNA, 按 TaKaRa RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)说明书操作。取 1 μg 总 RNA 按 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa, 日本)使用说明合成 cDNA 第

一链。20 μL RT-qPCR 反应体系按 BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (碧云天, 中国)试剂盒说明书配制, 即 SYBR Green qPCR Mix 10 μL、上下引物混合物 2.0 μL、cDNA 2.0 μL、超纯水 6 μL, 引物序列见表 1; 反应程序: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 40 次循环, 反应在 ABI QuantStudio 1 实时检测系统 (Applied Biosystems, 美国)上运行; 扩增完成后, 采用熔解曲线分析验证扩增特异性。以 *β-actin* 为内参基

因, 采用 2^{-ΔΔCt} 法分析目的基因的相对表达水平; 在 mRNA 稳定性分析中, 以放线菌素 D 处理 0 h TNF-α mRNA 表达水平为参照, 采用 2^{-ΔCt} 法分析其他时间点 TNF-α mRNA 的相对表达水平(Livak *et al*, 2001)。

1.5 构建 pEGFP-N1-LcTTP 重组载体

(1.2)中测序验证正确 *LcTTP* ORF 单克隆扩大培养后提取 pMD-19T-*LcTTP* 重组质粒, pMD-19T-*LcTTP* 重组质粒和 pEGFP-N1 表达载体质粒(Clontech, 美国)分别用限制性内切酶 *NotI* 和 *BsrGI* (TaKaRa, 日本)双酶切, 酶切片段胶回收纯化后使用 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa, 日本)连接, 连接产物转化 *E.coli* DH5α 挑单克隆送上海生工测序, 测序验证正确的 pEGFP-N1-*LcTTP* 单克隆扩大培养后使用 Endo-free Plasmid Mini Kit II (Omega, 美国)提取无内毒质粒。重组表达载体 pEGFP-N1-*LcTTP* 表达产物为 GFP-*LcTTP* 融合蛋白。

1.6 细胞培养和转染

大黄鱼头肾细胞系 LYC-hK 按之前报道培养 (Zhou *et al*, 2023)。简而言之, 使用含 15%胎牛血清 (FBS; 四季青, 中国)、100 U/mL 青霉素/链霉素(P/S) 的 DMEM/HAM'S F-12 完全培养基(Hyclone, 美国)

置于 26 °C、5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中培养。

细胞转染按 GP-transfect-Mate 转染试剂(吉玛, 中国)说明书操作。简而言之: 6 孔板按 2×10⁵ 细胞/孔接种 LYC-hK 细胞, 24 h 后 3 μg 质粒 DNA 与 6 μL GP-transfect-Mate 试剂混合于 400 μL 无 FBS 的 DME/F-12 培养基静置 20 min 后转染 LYC-hK 细胞, 转染 6 h 换完全培养基继续培养 48 h, 荧光显微镜 (Leica, 德国)观察转染效率后进行后续实验。

1.7 数据分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 6.0 软件(GraphPad software Inc., 美国)进行分析, 并以均数±均数标准误差(SEM)表示。组间统计学差异采用非配对双尾学生 *t* 检验, *P* 值小于 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 *LcTTP* 全长 cDNA 序列分析

将 5'-RACE、3'-RACE 和 ORF 扩增序列拼接得到的 *LcTTP* 全长 cDNA 序列共 1 508 bp, 其中 ORF 1 248 bp, 5'-UTR 77 bp, 3'-UTR 183 bp, polyA 结构上游 63 bp 处有一加尾信号 AATAA (图 1)。

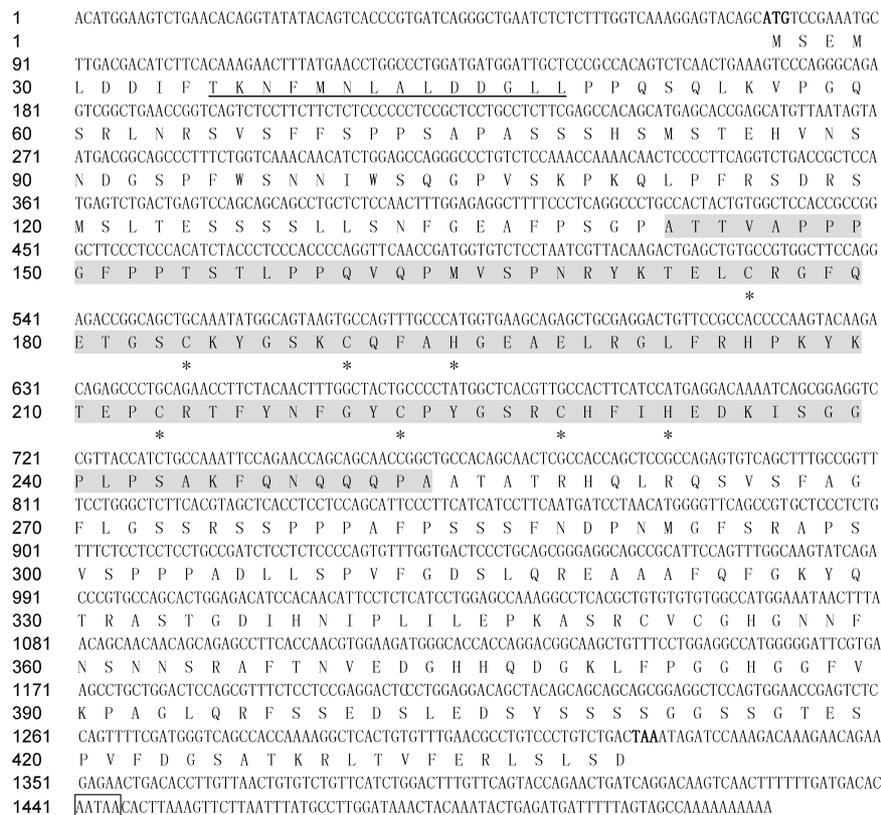


图 1 *LcTTP* cDNA 核酸序列和推导的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *LcTTP*

注: 下划线示核输出信号(NES); 阴影区示串联重复锌指结构域(TZF); 星号示 CCCH 型锌指结构域的保守氨基酸残基位点; 粗体表示起始密码子和终止密码子; 方框表示加尾信号

推导的 *LcTTP* 蛋白序列包含 415 个氨基酸残基, 理论分子量(MW) 44 897.78 Da, 预测等电点(pI) 8.37。SignalP 6.0 分析 *LcTTP* 未在 N 端检测到信号肽, Euk-mPLoc 2.0 亚细胞定位分析预测 *LcTTP* 定位在细胞核, NetNES 1.1 分析显示在 *LcTTP* 的 N 端有一 NES 序列(T₁₀KNFMNLALDDGLL₂₃; 图 1)。CD-Search 分析显示 ZFP36 家族特征结构域 TZF 也保守存在于 *LcTTP* 中央区域。多序列比对显示 *LcTTP* 氨基酸序列与黄鳍鲷(XP_036937641.1)、条纹鲈鱼(XP_035535819.1)、人(NP_003398.3)和小鼠(NP_035886.1) TTP 氨基酸序列的同源性分别为 91.46%、91.28%、40.69%和 39.58%; 且哺乳动物 TTP 保守的重要功能结构域: 中央 TZF 结构域和 C 端 NOT1-BD 结构域也在 *LcTTP* 中保守存在(图 2)。

2.2 *LcTTP* 的系统发生分析

系统发育分析显示: 脊椎动物 TTP 聚为一支(置信度 99%), 与哺乳动物 ZFP36 家族的其他成员 ZFP36L1、ZFP36L2 和 ZFP36L3 分开。在脊椎动物中, TTP 又聚类为哺乳动物、爬行动物、两栖动物和鱼类 4 个进化支, *LcTTP* 与其他硬骨鱼 TTP 聚为一支(图 3)。以上结果提示本研究克隆得到的 *LcTTP* 是大

黄鱼 ZFP36 家族成员 TTP。

2.3 *LcTTP* 基因的组织表达特异性

基因的组织表达特异性与其生理功能密切相关。为检测 *LcTTP* 基因的组织表达特异性, 本研究采集 5 条健康大黄鱼的脑、胃、鳃、肝、脾、肾、头肾、肌肉、心脏等 9 个组织, RT-qPCR 检测不同组织中 *LcTTP* mRNA 的表达水平。结果显示 9 个组织均检测到 *LcTTP* mRNA 表达, 但不同组织表达量差异较大(图 4)。肌肉组织 *LcTTP* mRNA 表达量最高(53.63±27.43), 其次为胃(16.99±14.38)和鳃(10.18±4.27), 而脑(1.10±0.23)、肝(2.58±1.02)、肾(2.98±1.25)、脾(3.01±1.03)、头肾(4.42±1.26)、心脏(4.89±1.93)等组织 *LcTTP* mRNA 表达量均较低。

2.4 LPS 诱导 LYC-hK 细胞 *LcTTP* 和炎症因子基因表达

LPS 是诱导炎症因子表达的经典病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)分子。哺乳动物研究显示 LPS 通过诱导巨噬细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞等免疫细胞 TTP 表达, 促进 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子 mRNA 降解, 下调 LPS 诱导的炎症因子表达(Mahtani *et al*, 2001; Fairhurst *et al*,

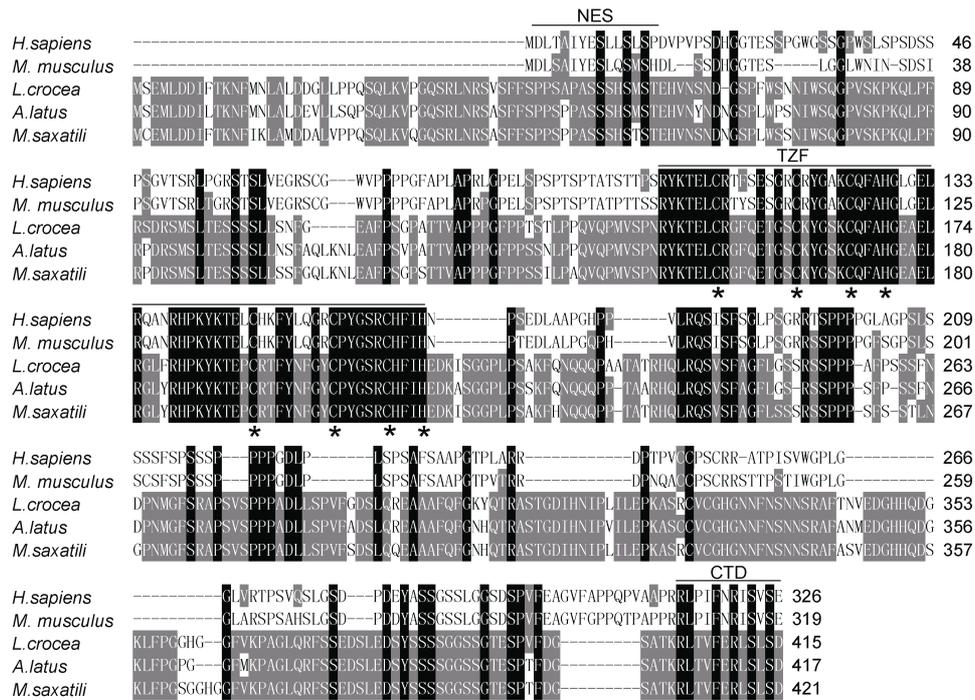


图 2 脊椎动物代表物种 TTP 多序列比对

Fig.2 The multiple alignment of the predicted *LcTTP* with other vertebrate species

注: 黑色阴影示相同氨基酸位点; 灰色示相似氨基酸残基位点; 上划线以人 TTP 为参考, 示保守结构域; NES: 核输出序列; TZF: 串联锌指结构域; CTD: C 端结构域; 星号示 CCCH 型锌指结构域保守氨基酸位点

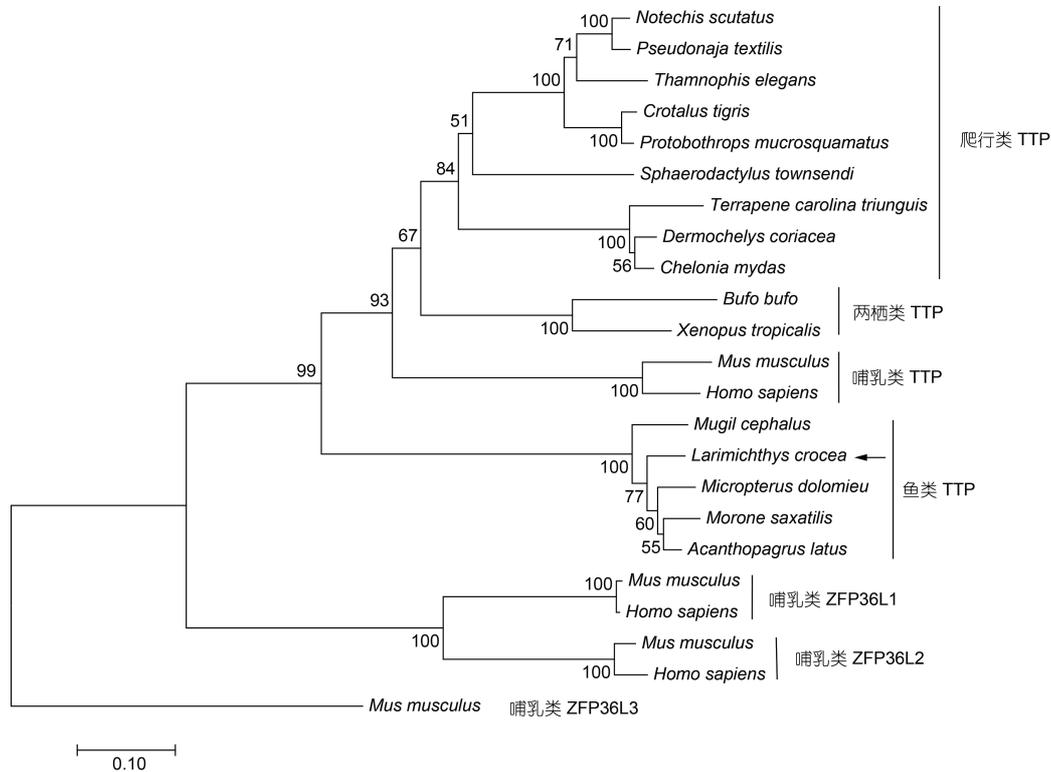


图3 *LcTTP* 与其他脊椎动物 ZFP36 家族代表性成员的系统发生分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of *LcTTP* with other representative vertebrate ZFP36 family members based on the neighbor-joining method

注: 使用 MEGA 7.0 软件包采用 NJ 法构建系统发育树; 分支上数值为通过 1000 次分析得到的 bootstrap 值; 比例尺代表分支长度; 箭头示 *LcTTP* 在 NJ 树中的位置; 构建系统树所用序列的 GenBank 登录号见表 2

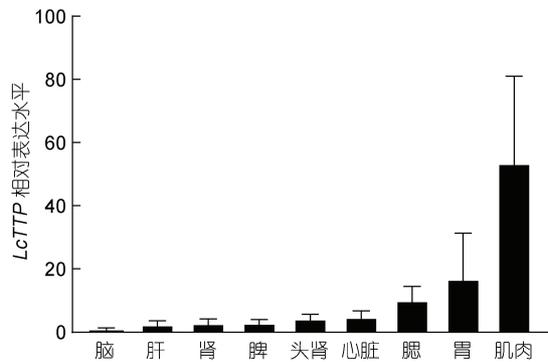


图4 *LcTTP* 基因的组织表达谱($n=5$)

Fig.4 Tissue-specific expression patterns of *LcTTP* ($n=5$)

2003; Tchen *et al*, 2004)。因此, 本研究首先调查 LPS 是否诱导 LYC-hK 细胞炎症因子和 *LcTTP* 基因表达。研究结果显示(图 5): LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)处理 LYC-hK 细胞 3 h 显著上调 TNF- α mRNA 表达量(1.48 倍; $P<0.01$), 6 h 时显著下调(0.77 倍; $P<0.05$); 而 IL-1 β mRNA 表达量在 LPS 处理 2 h 时显著上调(1.98 倍; $P<0.01$), 6 h 时显著下调(0.69 倍; $P<0.01$), 之后逐渐上升, 24 h 时又显著上调(1.64 倍; $P<0.05$); *LcTTP* mRNA 表达量在

LPS 处理 3 h 时显著上调(1.57 倍; $P<0.001$), 其他时间点均出现小幅下调(1 h 0.80 倍、2 h 0.83 倍、6 h 0.75 倍、12 h 0.78 倍、24 h 0.81 倍)。以上结果提示 LYC-hK 细胞中 *LcTTP* 可能参与调控 LPS 诱导的炎症因子表达。

2.5 LYC-hK 细胞过表达 *LcTTP* 调节 LPS 诱导的 TNF- α 基因表达

炎症因子 TNF- α mRNA 是哺乳动物中最早鉴定研究的 TTP 靶 mRNA, TTP 通过结合 TNF- α mRNA 3'-UTR 的 ARE 顺式元件促进 TNF- α mRNA 降解, 抑制 TNF- α 表达(Taylor *et al*, 1996; Carballo *et al*, 1997)。因此, 本研究在大黄鱼 LYC-hK 细胞中过表达 *LcTTP*, 调查 *LcTTP* 是否调节 LPS 诱导的 TNF- α 表达及其作用机制。研究结果显示(图 6): 与空载体 pEGFP-N1 转染对照组相比, pEGFP-N1-*LcTTP* 转染的过表达组在 LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)处理 0.5 h (3.48 vs 4.80; $P<0.01$), 1 h (3.44 vs 11.27; $P<0.001$), 1.5 h (3.50 vs 4.52; $P<0.05$), 3 h (2.24 vs 3.12; $P<0.01$), 6 h (1.34 vs 2.36; $P<0.01$)均显著上调 TNF- α mRNA 表达量, 峰值在 LPS 处理 1 h 时。表明过表达 *LcTTP* 在 LPS 诱导

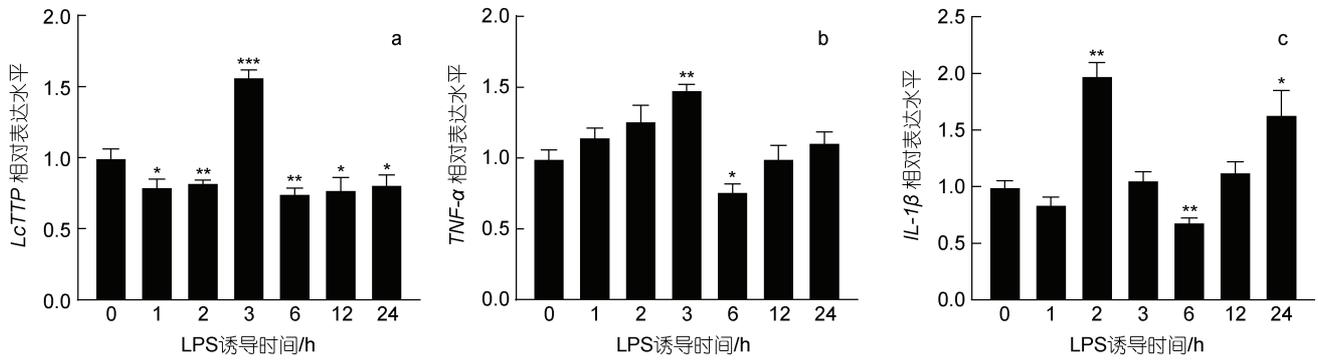


图5 LPS 诱导 LYC-hK 细胞 *LcTTP* 和炎症因子表达

Fig.5 The expression of *LcTTP* and inflammatory factor induced by LPS in LYC-hK cells

注: a. *LcTTP*; b. *TNF-α*; c. *IL-1β*

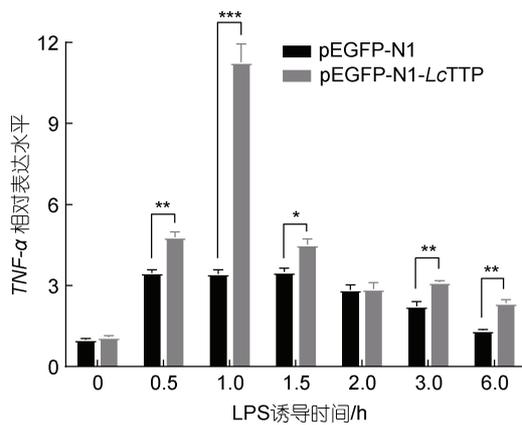


图6 过表达 *LcTTP* 调节 LYC-hK 细胞 LPS 诱导的 *TNF-α* 基因表达

Fig.6 The overexpression of *LcTTP* regulates LPS-induced *TNF-α* expression in LYC-hK cells

早期大幅上调 *TNF-α* mRNA 表达量, LPS 处理 1 h 后 *TNF-α* mRNA 表达量快速下调到接近对照组水平, 提示大黄鱼 *TNF-α* mRNA 可能是 *LcTTP* 的靶 mRNA。

2.6 *LcTTP* 促进 *TNF-α* mRNA 降解

促进靶 mRNA 降解是哺乳动物 TTP 调节炎症因子表达的主要机制之一(Bataclan *et al*, 2021)。本研究在 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 LYC-hK 细胞 1 h 后, 以放线菌 D (5 mg/mL) 抑制转录, RT-qPCR 分析转录抑制后 pEGFP-N1 转染对照组和 pEGFP-N1-*LcTTP* 转染过表达组 *TNF-α* mRNA 的降解速率, 调查 *LcTTP* 对靶 mRNA 稳定性的影响。研究结果如图 7 所示, 过表达 *LcTTP* 显著上调 *TNF-α* mRNA 的降解速率, pEGFP-N1 转染对照组和 pEGFP-N1-*LcTTP* 转染过表达组 *TNF-α* mRNA 的半衰期($t_{1/2}$)分别为 115 min 和 40 min, 表明 *LcTTP* 可通过促进 *TNF-α* mRNA 降解调节 *TNF-α* 表达。

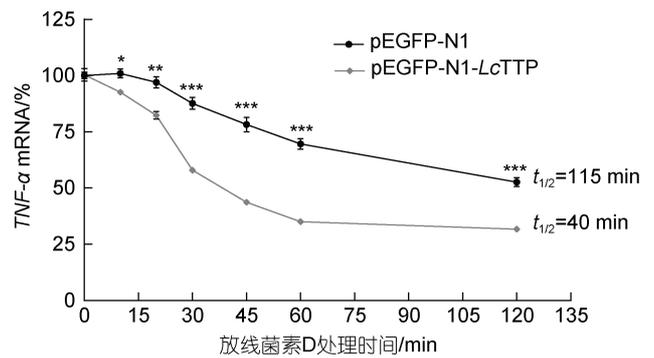


图7 *LcTTP* 促进 *TNF-α* mRNA 降解

Fig.7 *LcTTP* promotes *TNF-α* mRNA decay

3 讨论

哺乳动物研究显示 TTP 可通过促进细胞因子 mRNA 降解调节免疫反应(Makita *et al*, 2021), 是炎症和免疫相关疾病的潜在治疗靶点(Patial *et al*, 2016a)。显然, 借鉴哺乳动物研究成果开展鱼类 TTP 的功能研究, 可为鱼类感染性养殖病害的防治提供新线索。本研究采用 RACE 技术克隆了大黄鱼 *LcTTP* 的全长 cDNA 序列, 推导的氨基酸序列分析显示哺乳动物 TTP 重要功能结构域在 *LcTTP* 中也保守存在, 系统发生分析显示 *LcTTP* 与其他脊椎动物 TTP 聚为一支且与哺乳动物 ZFP36 家族的其他成员 ZFP36L1、ZFP36L2 和 ZFP36L3 等分离; 组织表达特异性分析显示 *LcTTP* 基因在检测的 9 个大黄鱼组织中广泛表达, 但不同组织表达水平差异较大; 在大黄鱼头肾细胞系 LYC-hK 中, LPS 处理诱导炎症因子表达时也调节 *LcTTP* 基因的表达, 提示 LYC-hK 细胞中 *LcTTP* 可能参与调控 LPS 诱导的炎症因子表达; LYC-hK 细胞过表达 *LcTTP* 证实 *LcTTP* 可通过促进 *TNF-α* mRNA 降解调节 LPS 诱导的 *TNF-α* 表达。这些研究

结果提示脊椎动物中 TTP 的结构和功能可能非常保守, 大黄鱼 *LcTTP* 也可通过促进炎症因子 mRNA 降解调节炎症因子表达, 可能是大黄鱼炎症反应的关键调控蛋白, 在大黄鱼感染性病害防治策略开发中有潜在应用价值。

ZFP36 蛋白家族是以中央 TZF 结构域为结构特征的一类 RNA 结合蛋白, 广泛存在于从单细胞真核生物、无脊椎动物到哺乳动物的整个真核生物界 (Blackshear *et al*, 2014)。哺乳动物 ZFP36 蛋白家族通常有 3 个成员: TTP、ZFP36L1 和 ZFP36L2, 小鼠 ZFP36 蛋白家族还有一个在胎盘和胚胎外组织特异表达的 ZFP36L3 (Blackshear *et al*, 2005)。鱼类和两栖类包含哺乳动物 ZFP36 家族的直系同源物和一个独特的 C3H-4 蛋白, 该蛋白有一个典型的 TZF 结构域和 2 个退化的锌指结构域 (De *et al*, 1999)。TTP 是 ZFP36 家族首先报道的原型蛋白, 通常有 3 个保守结构域: N-端的 NES 信号序列、中央 TZF 结构域和 C-端的 NOT1-BD (Ciais *et al*, 2013)。多序列比对显示哺乳动物 TTP 的 3 个功能结构域在 *LcTTP* 中也保守存在, 但 LocNES 工具包分析显示 *LcTTP* 的 NOT1-BD 结构域可能还是潜在的 NES 信号序列。ZFP36 家族成员 ZFP36L1 和 ZFP36L2 缺失 N 端的 NES 信号序列, NES 定位在 C 端替代 TTP 的 NOT1-BD 结构域 (Ciais *et al*, 2013)。而在系统树中, *LcTTP* 与其他硬骨鱼 TTP 聚在一起, 合并其他脊椎动物 TTP 聚为一支, 与哺乳动物的 ZFP36L1、ZFP36L2、ZFP36L3 等分离。这些结果表明本研究克隆的 *LcTTP* 属于典型的 TTP 蛋白, 也提示 *LcTTP* 可能与哺乳动物 TTP 有相似的功能。

基因组织表达水平与其生理功能密切相关, 调查目的基因的组织表达特异性可为其功能研究提供线索 (Lu *et al*, 2004)。TTP mRNA 在成年小鼠各种组织中表达量均较低, 肾和肺中 TTP mRNA 表达量相对较高, 脂肪、心、肝、脾相对较低, 而在骨骼肌、睾丸和脑中只有痕量表达 (Lai *et al*, 1990)。在蛋白水平, 肝、卵巢和睾丸中 TTP 水平高, 而脑、心、肠、脾、胸腺、肾、骨骼肌 TTP 水平较低, 肺中几乎检测不到 TTP 蛋白 (Lu *et al*, 2004)。本研究检测的 9 个大黄鱼组织器官中均检测到 *LcTTP* mRNA 表达, 这与小鼠中观察到 TTP mRNA 广泛表达现象类似, 提示 *LcTTP* 可能也如哺乳动物 TTP 广泛参与机体免疫反应的调节。但大黄鱼 *LcTTP* 基因的组织表达特异性与小鼠 TTP 基因存在差异, *LcTTP* mRNA 在肌肉中的表达量最高, 其余依次为胃、腮、心、头肾、脾、肾、

肝和脑, 提示 TTP 基因的组织表达特异性可能存在种间差异, 而种间差异的生理、病理意义还需在后续功能研究进一步探讨。

炎症是宿主清除入侵病原的必需生理反应, 但高炎症反应和炎症因子过量分泌也导致组织损伤甚至死亡, 因此, 免疫细胞炎症因子的表达在转录水平和转录后水平都受到严格调控 (Akira *et al*, 2021)。TTP 是在转录后水平通过促进炎症因子 mRNA 降解下调炎症因子表达的抑炎蛋白 (Mukherjee *et al*, 2014)。哺乳动物巨噬细胞、树突状细胞、嗜中性粒细胞、T 细胞、B 细胞等免疫细胞中均表达 TTP (Makita *et al*, 2021; Zhang *et al*, 2021)。哺乳动物巨噬细胞是 TNF- α 等炎症因子的主要分泌细胞, 研究显示 LPS 等炎症诱导物处理巨噬细胞早期 TTP 与炎症因子表达水平同步上调, 处理后期 TTP 通过促进炎症因子 mRNA 降解抑制炎症因子表达 (Ostareck *et al*, 2019), 所以巨噬细胞是研究 TTP 调控炎症因子表达的首选细胞类型。本研究曾尝试转染大黄鱼原代单核/巨噬细胞过表达 *LcTTP* 研究 *LcTTP* 对 TNF- α mRNA 表达的调控效应及其机制, 但因转染效率低 (<10%) 放弃。而大黄鱼头肾细胞系 LYC-hK 转染效率较高 (50%~80%), 且 LPS 处理 LYC-hK 细胞早期, 炎症因子 TNF- α (3 h) 和 IL-1 β (2 h) mRNA 表达量显著上调, 并在诱导 6 h 时回复到基础水平之下; *LcTTP* mRNA 表达量小幅下调 (1 h 和 2 h) 后显著上调 (3 h)。这与 LPS 诱导哺乳动物炎症因子和 TTP mRNA 表达的模式相似 (Ostareck *et al*, 2019), 提示 LYC-hK 细胞中 *LcTTP* 可能参与调控 LPS 诱导的炎症因子表达。因此, 本研究选择大黄鱼 LYC-hK 细胞系研究 *LcTTP* 对炎症因子表达的调节效应及其作用机制。

小鼠巨噬细胞 TTP 的主要靶 RNA 是炎症因子 (TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 等) 以及其他免疫相关蛋白的 mRNA (Mukherjee *et al*, 2014; Sedlyarov *et al*, 2016)。TTP 基因敲除巨噬细胞 TNF- α (Carballo *et al*, 1997, 1998)、GM-CSF (Carballo *et al*, 2000) mRNA 的稳定性增强, mRNA 及其编码蛋白的表达量均上调; 反之, 过表达 TTP 则显著下调巨噬细胞 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 、Cxcl2 等 mRNA 的表达量 (Patil *et al*, 2016b)。但在本研究中, LYC-hK 细胞过表达 *LcTTP* 显著上调 LPS 诱导早期 (1 h) TNF- α mRNA 表达量, 之后迅速下降到对照组水平 (2 h)。Lai 等 (1999) 报道 HEK293 细胞低水平过表达 TTP 下调 TNF- α mRNA 表达量, 但高水平过表达 TTP 反而上调 TNF- α

mRNA 表达量(Lai *et al*, 1999); 以重组 nLuc-ARE 为靶 mRNA, 过表达野生型 TTP 和组成型激活 TTP-AA 也观察到相同现象, 即低水平过表达 TTP 下调 nLuc-ARE mRNA 表达量, 而高水平过表达 TTP 反而上调 nLuc-ARE mRNA 表达量(Mahmoud *et al*, 2019)。这些研究提示 TTP 作为核糖核酸外切酶复合体(exoribonuclease complex)支架蛋白, 高水平表达后可能由于复合体其他组分不足, 组装完全的活性复合体反而减少, 导致核糖核酸外切酶总活性降低, 上调靶 mRNA 表达量; 随着 LPS 诱导时间延长, 核糖核酸外切酶复合体其他结构组分表达水平上调, 组装完全活性复合体增多, 靶 mRNA 降解加速而急剧下降(Burack *et al*, 2000; Mahmoud *et al*, 2019)。同时在本研究中也发现: 放线菌素 D 抑制转录后, 过表达 *LcTTP* 促进 TNF- α mRNA 降解, 下调 TNF- α mRNA 的半衰期, 表明 *LcTTP* 也如哺乳动物 TTP, 可通过促进靶 RNA 降解下调靶基因表达(Carballo *et al*, 1998; Deleault *et al*, 2008)。因此, *LcTTP* 可能是大黄鱼炎症反应的关键调控蛋白。

4 结论

本研究采用 RACE 技术克隆鉴定了 *LcTTP* 基因的全长 cDNA 序列, 序列分析显示哺乳动物 TTP 重要的功能结构域在 *LcTTP* 中保守; 组织表达特异性分析显示 *LcTTP* 基因在大黄鱼机体中广泛表达, 但不同组织表达水平差异较大; LYC-hK 细胞过表达 *LcTTP* 发现 *LcTTP* 通过促进 TNF- α mRNA 降解调节 LPS 诱导的 TNF- α 表达。这些结果提示脊椎动物中 TTP 的结构和功能可能非常保守, 大黄鱼 *LcTTP* 可通过促进炎症因子 mRNA 降解调节炎症因子表达, 可能是大黄鱼炎症反应的关键调控蛋白, 在大黄鱼感染性病害防治策略开发中有潜在应用价值。

参 考 文 献

- 王凡, 廖碧钗, 孙敏秋, 等, 2019. 福建大黄鱼产业发展形势分析[J]. 中国水产(3): 45-49.
- 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会, 2022. 2022 中国渔业统计年鉴[J]. 北京: 中国农业出版社: 22.
- 胡洋, 张旭, 王欢, 等, 2022. 药用植物资源在水产动物疾病控制中的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 42(11): 43-58.
- AKIRA S, MAEDA K, 2021. Control of RNA stability in immunity [J]. Annual Review of Immunology, 39: 481-509.
- AO J Q, MU Y N, XIANG L X, *et al*, 2015. Genome sequencing of the perciform fish *Larimichthys crocea* provides insights into molecular and genetic mechanisms of stress adaptation [J]. PLoS Genetics, 11(4): e1005118.
- BATACLAN M, LEONI C, MONTICELLI S, 2021. RNA - binding proteins and RNA methylation in myeloid cells [J]. Immunological Reviews, 304(1): 51-61.
- BLACKSHEAR P J, PERERA L, 2014. Phylogenetic distribution and evolution of the linked RNA-binding and NOT1-binding domains in the tristetraprolin family of tandem CCCH zinc finger proteins [J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 34(4): 297-306.
- BLACKSHEAR P J, PHILLIPS R S, GHOSH S, *et al*, 2005. *Zfp3613*, a rodent X chromosome gene encoding a placenta-specific member of the Tristetraprolin family of CCCH tandem zinc finger proteins [J]. Biology of Reproduction, 73(2): 297-307.
- BURACK W R, SHAW A S, 2000. Signal transduction: hanging on a scaffold [J]. Current Opinion in Cell Biology, 12(2): 211-216.
- CARBALLO E, BLACKSHEAR P J, 2001. Roles of tumor necrosis factor- α receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome [J]. Blood, 98(8): 2389-2395.
- CARBALLO E, GILKESON G S, BLACKSHEAR P J, 1997. Bone marrow transplantation reproduces the tristetraprolin-deficiency syndrome in recombination activating gene-2 (-/-) mice. Evidence that monocyte/macrophage progenitors may be responsible for TNF α overproduction [J]. The Journal of Clinical Investigation, 100(5): 986-995.
- CARBALLO E, LAI W S, BLACKSHEAR P J, 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin [J]. Science, 281(5379): 1001-1005.
- CARBALLO E, LAI W S, BLACKSHEAR P J, 2000. Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability [J]. Blood, 95(6): 1891-1899.
- CHOU K C, SHEN H B, 2010. A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0 [J]. PLoS One, 5(4): e9931.
- CIAIS D, CHERRADI N, FEIGE J J, 2013. Multiple functions of tristetraprolin/TIS11 RNA-binding proteins in the regulation of mRNA biogenesis and degradation [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 70(12): 2031-2044.
- DAI Y F, LV Z M, YOU M X, *et al*, 2023. PPAR α alleviates inflammation via inhibiting NF- κ B/Rel pathway in *Vibrio splendidus* challenged *Apostichopus japonicus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 135: 108701.
- DE J, LAI W S, THORN J M, *et al*, 1999. Identification of four CCCH zinc finger proteins in *Xenopus*, including a novel vertebrate protein with four zinc fingers and severely restricted expression [J]. Gene, 228(1/2): 133-145.
- DELEAULT K M, SKINNER S J, BROOKS S A, 2008. Tristetraprolin regulates TNF TNF- α mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways [J]. Molecular

- Immunology, 45(1): 13-24.
- FAIRHURST A M, CONNOLLY J E, HINTZ K A, *et al*, 2003. Regulation and localization of endogenous human tristetraprolin [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 5(4): 1-12.
- FU S C, IMAI K, HORTON P, 2011. Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESsential [J]. *Nucleic Acids Research*, 39(16): e111.
- JOHNSON M, ZARETSKAYA I, RAYTSELIS Y, *et al*, 2008. NCBI BLAST: a better web interface [J]. *Nucleic Acids Research*, 36: W5-W9.
- KAFASLA P, SKLIRIS A, KONTOYIANNIS D L, 2014. Post-transcriptional coordination of immunological responses by RNA-binding proteins [J]. *Nature Immunology*, 15(6): 492-502.
- KRATOCHVILL F, MACHACEK C, VOGL C, *et al*, 2011. Tristetraprolin - driven regulatory circuit controls quality and timing of mRNA decay in inflammation [J]. *Molecular Systems Biology*, 7(1): 560.
- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870-1874.
- LAI W S, CARBALLO E, STRUM J R, *et al*, 1999. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 19(6): 4311-4323.
- LAI W S, STUMPO D J, BLACKSHEAR P J, 1990. Rapid insulin-stimulated accumulation of an mRNA encoding a proline-rich protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 265(27): 16556-16563.
- LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, *et al*, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
- LI S M, LIU S Y, CHEN R A, *et al*, 2022. Activation of the MKK3-p38-MK2-ZFP36 Axis by coronavirus infection restricts the upregulation of AU-rich element-containing transcripts in proinflammatory responses [J]. *Journal of Virology*, 96(5): e0208621.
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 25(4): 402-408.
- LU J Y, SCHNEIDER R J, 2004. Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13): 12974-12979.
- MAHMOUD L, MOGHRABI W, KHABAR K S A, *et al*, 2019. Bi-phased regulation of the post-transcriptional inflammatory response by Tristetraprolin levels [J]. *RNA Biology*, 16(3): 309-319.
- MAHTANI K R, BROOK M, DEAN J L E, *et al*, 2001. Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 21(19): 6461-6469.
- MAKITA S, TAKATORI H, NAKAJIMA H, 2021. Post-transcriptional regulation of immune responses and inflammatory diseases by RNA-binding ZFP36 family proteins [J]. *Frontiers in Immunology*, 12: 711633.
- MARCHLER-BAUER A, BO Y, HAN L Y, *et al*, 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures [J]. *Nucleic Acids Research*, 45(D1): D200-D203.
- MEDZHITOV R, 2008. Origin and physiological roles of inflammation [J]. *Nature*, 454(7203): 428-435.
- MUKHERJEE N, JACOBS N C, HAFNER M, *et al*, 2014. Global target mRNA specification and regulation by the RNA-binding protein ZFP36 [J]. *Genome Biology*, 15(1): R12.
- OSTARECK D H, OSTARECK-LEDERER A, 2019. RNA-binding proteins in the control of LPS-induced macrophage response [J]. *Frontiers in Genetics*, 10: 31.
- PATIAL S, BLACKSHEAR P J, 2016a. Tristetraprolin as a therapeutic target in inflammatory disease [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(10): 811-821.
- PATIAL S, CURTIS II A D, LAI W S, *et al*, 2016b. Enhanced stability of tristetraprolin mRNA protects mice against immune-mediated inflammatory pathologies [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(7): 1865-1870.
- SEDLYAROV V, FALLMANN J, EBNER F, *et al*, 2016. Tristetraprolin binding site atlas in the macrophage transcriptome reveals a switch for inflammation resolution [J]. *Molecular Systems Biology*, 12(5): 868.
- TAYLOR G A, CARBALLO E, LEE D M, *et al*, 1996. A pathogenetic role for TNF α in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency [J]. *Immunity*, 4(5): 445-454.
- TCHEN C R, BROOK M, SAKLATVALA J, *et al*, 2004. The stability of tristetraprolin mRNA is regulated by mitogen-activated protein kinase p38 and by tristetraprolin itself [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31): 32393-32400.
- TEUFEL F, ALMAGRO ARMENTEROS J J, JOHANSEN A R, *et al*, 2022. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models [J]. *Nature Biotechnology*, 40(7): 1023-1025.
- UCHIDA Y, CHIBA T, KURIMOTO R, *et al*, 2019. Post-transcriptional regulation of inflammation by RNA-binding proteins via *cis*-elements of mRNAs [J]. *The Journal of Biochemistry*, 166(5): 375-382.
- XU K P, WANG Y S, YANG W X H, *et al*, 2022. Strategies for prevention and control of vibriosis in Asian fish culture [J]. *Vaccines*, 11(1): 98.
- YE J, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, *et al*, 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction [J]. *BMC Bioinformatics*, 13: 134.
- YOSHINAGA M, TAKEUCHI O, 2019. Post - transcriptional

control of immune responses and its potential application [J]. *Clinical & Translational Immunology*, 8(6): e1063.

ZHANG Y W, ZHOU J, WEI Z Y, *et al*, 2021. TTP-mediated regulation of mRNA stability in immune cells contributes to adaptive immunity, immune tolerance and clinical

applications [J]. *RNA Biology*, 18(12): 2150-2156.

ZHOU S M, WANG Y, SHU F L, *et al*, 2023. Functional insights of a two-component system sensor kinase GacS in a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida* [J]. *Aquaculture*, 562: 738866.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF TRISTETRAPROLIN FROM LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA*

WANG Hui-Juan¹, HE Zhi-Qiao¹, SHI Ge¹, ZHOU Su-Ming², ZHANG Xiao-Lin¹, SHEN Wang¹

(1. Marine Science and Technical College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Tristetraprolin (TTP) is an RNA binding protein and widely distributed in eukaryotes. In mammals, TTPs decrease the expression of inflammatory factors by promoting mRNA decay or inhibiting translation to regulate the balance of inflammatory response, and has been considered as a potential therapeutic target for inflammatory diseases. A full-length cDNA sequence of TTP in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*; denoted as *LcTTP*) was obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. The full-length cDNA of *LcTTP* was 1 508 bp, including a 77-bp 5'-untranslated region (5'-UTR), a 183-bp 3'-UTR, and a 1 248-bp open reading frame (ORF) encoding 418 amino acid residues. The theoretical molecular weight (MW) of *LcTTP* is 44 897.78 Da, and the predicted isoelectric point (pI) was 8.37. The important functional domains of mammalian TTP are well conserved in *LcTTP*, including the N-terminal nuclear export sequence (NES), the central CCCH-type tandem zinc finger domain (TZF), and the C-terminal NOT1-binding domain (NOT1-BD). Phylogenetic analysis showed that *LcTTP* is clustered into one clade with other vertebrate TTPs and separated from the other mammalian ZFP36 family members, including ZFP36L1, ZFP36L2, and ZFP36L3. Tissue expression pattern analysis indicated that the mRNA transcripts of *LcTTP* were detected in all the 9 examined tissues with the highest expression level in muscle. In LYC-hK cells (a large yellow croaker kidney cell line), the overexpression of *LcTTP* significantly increased the expression level of TNF- α in the early phase after LPS challenge and peaked in 1 h, and then rapidly decreased near to the control level in 1.5 h. After inhibition of transcription by actinomycin D, the overexpression of *LcTTP* significantly increased the degradation rate of TNF- α mRNA, indicating that *LcTTP* can regulate the expression of TNF- α by promoting mRNA decay. These results imply that *LcTTP* is the key regulator of inflammatory responses and a potential target for the control of infectious diseases in large yellow croaker.

Key words *Larimichthys crocea*; RNA binding protein; Tristetraprolin; inflammatory response; posttranscriptional regulation