

栉孔扇贝 *Smad* 基因家族的表达特征和对鳃弧菌侵染的免疫应答分析*

董正¹ 曾启繁^{1,2①} 刘亮洁¹ 王师^{1,2}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266237)

摘要 栉孔扇贝是我国海水养殖业的重要品种之一,但养殖扇贝陆续暴发大规模细菌性疾病,造成了巨大的经济损失。深入研究扇贝的免疫防御机制,是改良种质、培育抗病品系的必要措施。近年来研究发现, *Smad* 基因可以通过调控增强子结合蛋白(CEBP/ε)来促进中性粒细胞的成熟和功能极化,在引发脊椎动物的先天免疫调节中发挥着重要的作用。然而目前对于 *Smad* 及其在免疫中的作用的研究大都集中于脊椎动物中,在海洋贝类中的研究还较为匮乏。因此,对栉孔扇贝的 *Smad* 基因家族进行了系统发生、共表达网络的构建、以及鳃弧菌侵染的免疫应答分析,以解析贝类 *Smad* 基因家族的表达调控机制和在免疫应答中的作用。结果表明, *Smad3* 和 *Smad6* 可能在两侧对称动物的共同祖先中位于同一染色体上;栉孔扇贝 *Smad5* 与 *Toll* 样受体信号通路的关键基因协同表达;受鳃弧菌侵染后,血淋巴中的 *Smad5* 显著上调,说明 *Smad5* 基因可能通过与 *Toll* 样受体信号通路相互作用,参与了机体的免疫应答。研究结果可为深入研究贝类 *Smad* 基因在天然免疫系统中的作用提供重要参考。

关键词 栉孔扇贝; *Smad* 基因家族; 表达模式; 免疫应答反应

中图分类号 G173 doi: 10.11693/hyhz20210200029

在脊椎动物中, *Smad* 基因通过调节 T 细胞、中性粒细胞等免疫细胞功能,在机体的免疫调节中发挥着重要作用(Massagué *et al.*, 2000; Weinstein *et al.*, 2000; Derynck *et al.*, 2003)。

Smad 基因家族从结构和功能上主要可以分为 3 个亚族:受体调节 *Smad*(*R-Smad*)、通用性 *Smad* (*Co-Smad*)和抑制型 *Smad* (*I-Smad*),其中 *R-smad* 可分为 TGF-β 通路 *Smad* 和 BMP 通路 *Smad*。*Smad* 蛋白含有高度保守的 N 端结构域 mad homologous domain1 (MH1)和 C 端结构域 mad homologous domain2 (MH2) (Grishin, 2001; Wu *et al.*, 2001)。近年来研究发现,在脊椎动物中 *Smad3* 基因通过调控增强子结合蛋白(CEBP/ε)来促进中性粒细胞的成熟和功能极化,发挥免疫调节作用(吴婷婷等, 2014)。中性粒细胞是动物体内天然免疫系统的重要组成部分,作为效应细胞抗击

病原菌入侵,在介导先天免疫防御和获得性免疫反应方面都有非常重要的作用(Datto *et al.*, 1999)。贝类的免疫机制包括细胞免疫和体液免疫,主要靠血淋巴细胞来完成。与脊椎动物相比,缺乏获得性免疫功能(刘世良等, 2003)。近些年来研究暗示, *Smad* 基因家族也参与了软体动物的免疫应答,但其在贝类免疫反应中的作用机制仍不清晰(Hu *et al.*, 2017)。

栉孔扇贝是我国山东一带重要的经济贝类,也是我国重要的海水养殖品种(李成林等, 2011)。自 20 世纪 90 年代以来,高密度的人工养殖加上海洋水质资源的恶化,经常引发大规模的细菌性疾病。其中,鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)病是主要的病原之一,广泛存在于海洋动物体内及沿岸海水沉积物中(窦海鸽等, 2005)。目前,在双壳贝类中关于 *Smad* 基因家族的研究大多局限于鉴定和克隆(郭慧慧, 2012; Liu *et*

* 国家自然科学基金青年科学基金项目, 32002388 号。董正, 硕士研究生, E-mail: DongZheng1995@163.com

通信作者: 曾启繁, 博士, 副教授, E-mail: zengqifan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2021-02-01, 收修改稿日期: 2021-04-10

al, 2014; 钱雪骏等, 2015), 对 *Smad* 基因家族的系统性分析以及免疫调控功能的相关理解仍然有限。因此, 我们对栉孔扇贝进行了 *Smad* 基因家族的系统发生和表达模式分析, 以深入理解栉孔扇贝中 *Smad* 基因的共表达网络和调控机制。此外, 我们也开展了鳗弧菌侵染实验, 以分析 *Smad* 基因的免疫应答反应, 为研究双壳贝类的免疫应答机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 *Smad* 基因的全基因组筛查与鉴定

为了筛查和鉴定 *Smad* 基因, 本研究使用脊椎动物和无脊椎动物 *Smad* 同源蛋白质序列对栉孔扇贝的全基因组数据库(Li *et al*, 2017)进行检索, 使用的物种包括人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、斑点雀鳢(*Lepisosteus oculatus*)、果蝇(*Drosophilidae*

melanogaster)、海葵(*Nematostella vectensis*)、紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、福寿螺(*Pomacea canaliculata*)和虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) (表 1)。利用 TBLASTN 将这些物种的 *Smad* 蛋白序列与栉孔扇贝的转录组和基因组数据进行比对(e 值小于 $1e-5$), 得到栉孔扇贝候选 *Smad* 基因(e 值小于 $1e-5$)。通过查询基因组的结构注释文件, 获得上述所选物种的 *Smad* 基因在染色体或 scaffold 上的位置信息。使用 SMART (Letunic *et al*, 2018)识别 *Smad* 蛋白的保守结构域, 并进一步使用 Compute pI/Mw 工具(Bjellqvist *et al*, 1993)计算 *Smad* 蛋白的等电点(pI)和分子量。选用 MEME (Bailey *et al*, 1994)的默认参数对 *Smad* 蛋白的基序进行识别和分析。使用 IBS1.0.3 (Liu *et al*, 2015)展示 *Smad* 蛋白结构域和基序的分布。

表 1 *Smad* 基因鉴定分析所用蛋白序列注册号
Tab.1 Accession numbers of *Smad* proteins used for *Smad* gene identification

物种	基因	检索号	物种	基因	检索号
人 <i>H. sapiens</i>	<i>Smad1</i>	AAC50790.1	斑点雀鳢 <i>L. oculatus</i>	<i>Smad1</i>	XP_006629559.1
	<i>Smad2</i>	AAC39657.1		<i>Smad2</i>	XP_006627302.1
	<i>Smad3</i>	AAL68976.1		<i>Smad3</i>	XP_006628801.1
	<i>Smad4</i>	Q13485.1		<i>Smad4</i>	XP_015224305.1
	<i>Smad5</i>	AAB92396.1		<i>Smad5</i>	XP_006631964.1
	<i>Smad6</i>	AAC82331.1		<i>Smad6</i>	XP_006628799.1
	<i>Smad7</i>	AAL68977.1		<i>Smad7</i>	XP_015224305.1
	<i>Smad9</i>	AAI04763.1		<i>Smad9</i>	XP_006628242.1
	小鼠 <i>M. musculus</i>	<i>Smad1</i>		AAG41407.1	果蝇 <i>D. melanogaster</i>
<i>Smad2</i>		AAH89184.1	<i>Smox</i>	NP_477017.1	
<i>Smad3</i>		AAB81755.1	<i>Med</i>	NP_524610.1	
<i>Smad4</i>		AAM74472.1	<i>Dad</i>	AAN13728.1	
<i>Smad5</i>		AAC83580.1	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	<i>Smad1/5/8</i>	AHB37076.1
<i>Smad6</i>		AAB81351.1		<i>Smad3</i>	XP_011441244.1
<i>Smad7</i>		AAB81353.1		<i>Smad4</i>	AHB37077.1
<i>Smad9</i>		AAI04763.1		<i>Smad6</i>	NP_001295807.1
<i>Smad1/5</i>		ABC88374.1		虾夷扇贝 <i>P. yessoensis</i>	<i>Smad3</i>
<i>Smad3</i>	XP_001631657.1	<i>Smad4</i>	OWF37845.1		
<i>Smad4</i>	EDO31382.1	<i>Smad5</i>	OWF47058.1		
<i>Smad6</i>	EDO39628.1	<i>Smad6</i>	OWF38654.1		
福寿螺 <i>P. canaliculata</i>	<i>Smad3</i>	XP_025084166.1	紫海胆 <i>S. purpuratus</i>	<i>Smad3</i>	BAF45857.1
	<i>Smad4</i>	XP_025081820.1		<i>Smad4</i>	XP_030853090.1
	<i>Smad5</i>	XP_025086090.1		<i>Smad5</i>	XP_030836187.1
	<i>Smad6</i>	XP_025080867.1		<i>Smad6</i>	XP_798238.2

1.2 系统发生分析

将人(*H. sapiens*)、小鼠(*M. musculus*)、斑点雀鳝(*L. oculatus*)、果蝇(*D. melanogaster*)、海葵(*N. vectensis*)、紫海胆(*S. purpuratus*)、长牡蛎(*C. gigas*)、福寿螺(*P. canaliculata*)、虾夷扇贝(*P. yessoensis*)以及栉孔扇贝的 *Smad* 蛋白序列进行序列比对和系统发生分析。使用 ClustalX (Larkin *et al*, 2007)进行多重序列比对, 导入 MEGA7 (Kumar *et al*, 2016), 运用最大似然法 (Maximum Likelihood)构建进化树, Bootstrap 1000 次检验。使用 iTOL 展示进化树(Letunic *et al*, 2007)。

1.3 *Smad* 基因的表达量计算、共表达网络的构建和 GO 富集

用 STAR (Dobin *et al*, 2013)软件将栉孔扇贝的成体组织(横纹肌、血、肝胰腺、眼、性腺、足、鳃、肾、外套膜、平滑肌)转录组数据(Li *et al*, 2017)比对到栉孔扇贝参考基因组序列, 用 Samtools (Li *et al*, 2009)软件处理比对结果件, 用 featureCounts (Liao *et al*, 2014)软件统计基因的 counts 值, 最后基因的表达量用 TPM (Transcripts Per Million)表示。

将 23 506 个在栉孔扇贝各组织中 TPM>1 的基因, 导入“WGCNA”包(Langfelder *et al*, 2008)构建共表达网络(WGCNA)。根据之前构建贝类共表达网络的方法, 选择权重系数 softpower=13, 网络类型参数 networkType=“unsigned”, 最小模块大小 minModuleSize=450, 设定切树高度 detectCutHeight=0.997 来构建栉孔扇贝共表达网络(Wang *et al*, 2020)。使用“pheatmap”包绘制表达热图, 对均一化的表达量进行展示。

利用 EnrichPipeline 软件(Huang *et al*, 2009)对

Smad 基因所在模块的基因进行功能富集分析, FDR 校正后的 *P* 值(adjusted *P*-value)<0.05 为阈值, 筛选富集的 GO term。

1.4 鳃弧菌感染实验

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)的培养和感染方法参考 Cong 等(2008)所述。在 28 °C 下利用 2216E 液体培养基(5 g/L 胰蛋白胨, 1 g/L 酵母提取物和 0.1 g C₆H₅Fe·5H₂O, pH=7.6)培养鳃弧菌, 通过 2000 g 离心 5 min 进行收集, 将沉淀物悬浮于过滤海水中(0.22 μm 滤膜), 将鳃弧菌浓度调节至 1×10⁷ CFU/mL 用于进行感染实验。选取健康 1 龄栉孔扇贝, 在实验室暂养 3 d 后, 用于革兰氏阴性细菌鳃弧菌感染实验。随后挑选 50 只, 随机分成对照组与实验组, 在利用鳃弧菌感染后 0、5、24、48、72 h 进行取样, 每个时间点取 5 个个体做为生物学重复。使用注射器从横纹肌中收集血淋巴。收集完血淋巴样品后, 立即将其在 800 g, 4 °C 条件下离心 10 min 以收集血细胞。然后将血细胞立即在液氮中冷冻, 在使用前用-80 °C 冰箱冷藏。

1.5 RNA 提取和实时定量 PCR 分析

按照本课题组前期发表的方法提取总 RNA (Hu *et al*, 2006), 使用 Nanovue Plus 分光光度计(GE Healthcare, NJ, USA)测定 RNA 浓度和纯度, 并通过琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 完整性。使用莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)逆转录酶(Thermo, USA)合成第一链 cDNA 用作实时定量 PCR 的模板。*Smad* 基因的实时定量 PCR 扩增按照说明书体系使用 SsoFast™EvaGreen®试剂进行, 引物序列见表 2, 在 LightCycler480 进行实时定量 PCR 分析(Roche

表 2 荧光定量 PCR 引物列表
Tab.2 Primers used for qRT-PCR

基因名称	引物序列
<i>Smad3</i> -F	5'-CTCAAGAGGGATGAAGTGTGTGTA-3'
<i>Smad3</i> -R	5'-CTGTGGAAATTTGTCTGGAACC-3'
<i>Smad4</i> -F	5'-CACCAAGTCTGGCTATTACAGGAAG-3'
<i>Smad4</i> -R	5'-GACATGATCAAGCCCCTAGGT-3'
<i>Smad5</i> -F	5'-CTAGAACTGGAGGAAGCACTGG-3'
<i>Smad5</i> -R	5'-CCACGAACTGAAACCTCTTGAAT-3'
<i>Smad6</i> -F	5'-CGCTGTCGTAACCCCAATAG-3'
<i>Smad6</i> -R	5'-GAAACGGGAAACACACCTACC-3'
<i>EF1A</i> -F	5'-AGCAATGTGAGCGGTATGGC-3'
<i>EF1A</i> -R	5'-TGATCCCCCTGCTGGAGTAG-3'

Diagnostics 公司, 曼海姆, 德国)。PCR 运行程序如下: 50 °C 2 min, 94 °C 10 min, 40 个循环, 94 °C 15 s, 62 °C 1 min, 选取 *EF1A* 基因作为鳃弧菌侵染实验中实时定量 PCR 分析的内参基因(Li *et al.*, 2016)。所有引物设计均使用 Primer Premier5.0 软件, 所设计引物首先通过 BLASTN (1e-10) 比对栉孔扇贝基因组来评估特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法基于对照组计算鳃弧菌侵染后各 *Smad* 成员的相对表达量。使用 SPSS20.0 软件 (IBM, 2013) 中独立 t 检验的统计软件包, 分析各 *Smad* 各成员的表达变化。

2 结果

2.1 栉孔扇贝 *Smad* 基因的鉴定及结构分析

我们在栉孔扇贝总共鉴定出 *Smad3*、*Smad4*、*Smad5* 和 *Smad6* 四个 *Smad* 基因(表 3)。四个基因全长差异较大, 其中 *Smad3* 基因最长, 达 50 088 bp, *Smad5* 基因最短, 为 13 759 bp。在外显子数量方面, *Smad3* 最多, 有 13 个外显子, *Smad6* 数量最小, 有 5 个外显子。这些 *Smad* 的预测分子量范围从 41.28 到 62.46 kDa, 预测的等电点(pI)范围从 6.34 到 8.37 (表

3)。通过 *Smad* 蛋白序列在 SMRT 上进行结构域预测(图 1), 4 个 *Smad* 基因都具有 N 端结构域 MH1 和 C 端结构域 MH2。同一亚族的成员含有大致相同的基序组成和排列顺序, 例如 R-*Smad* 成员均具有 Motif1-13。不同亚族中的蛋白序列 Motif 组成和分布存在较大差异, 仅 Motif1、Motif2、Motif4 和 Motif8 是三个亚家族共有的。

2.2 栉孔扇贝 *Smad* 基因家族的系统发生分析及 *Smad* 成员共线性分析

系统发生分析表明, *Smad* 基因主要聚为 4 个支, 即 TGF- β 通路 R-*Smad*、BMP 通路 R-*Smad*、Co-*Smad* 和 I-*Smad* (图 2)。其中 TGF- β 通路 R-*Smad* 和 BMP 通路 R-*Smad* 同属 R-*Smad* 亚家族。栉孔扇贝中的 *Smad3*、*Smad4*、*Smad5*、*Smad6* 分别聚到 TGF- β 通路 R-*Smad*、Co-*Smad*、BMP 通路 R-*Smad* 和 I-*Smad* 四个亚族中。在本文所分析的所有无脊椎动物中, *Smad* 数量都为 4 个。软体动物 *Smad* 基因家族成员基本类似。其中栉孔扇贝、虾夷扇贝和牡蛎享有完全相同的 *Smad* 基因家族成员, 这与它们高度相近的亲缘关系情况相一致。栉孔扇贝的 *Smad3* 与其他物种的

表 3 栉孔扇贝 *Smad* 基因家族序列特征
Tab.3 Sequences of *C. farreri Smad* genes

基因名称	基因长度(bp)	开放阅读框长度(bp)	外显子数量	蛋白长度(aa)	等电点 pI	蛋白分子量(kDa)
<i>Smad3</i>	50 088	1 286	10	431	6.39	48.57
<i>Smad4</i>	23 264	1 718	13	575	7.34	62.46
<i>Smad5</i>	13 759	1 376	6	461	8.15	51.44
<i>Smad6</i>	39 942	1 079	5	362	8.37	41.28

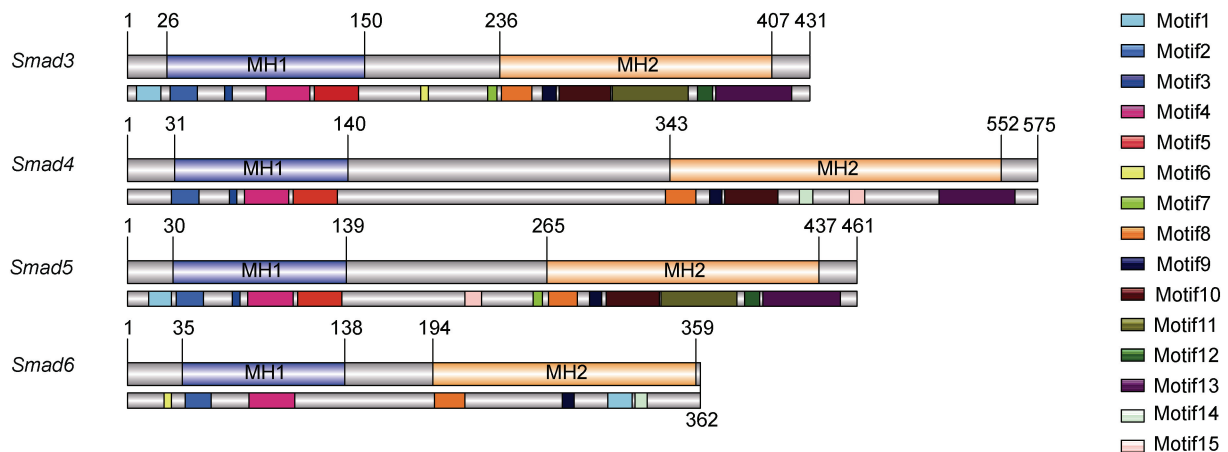
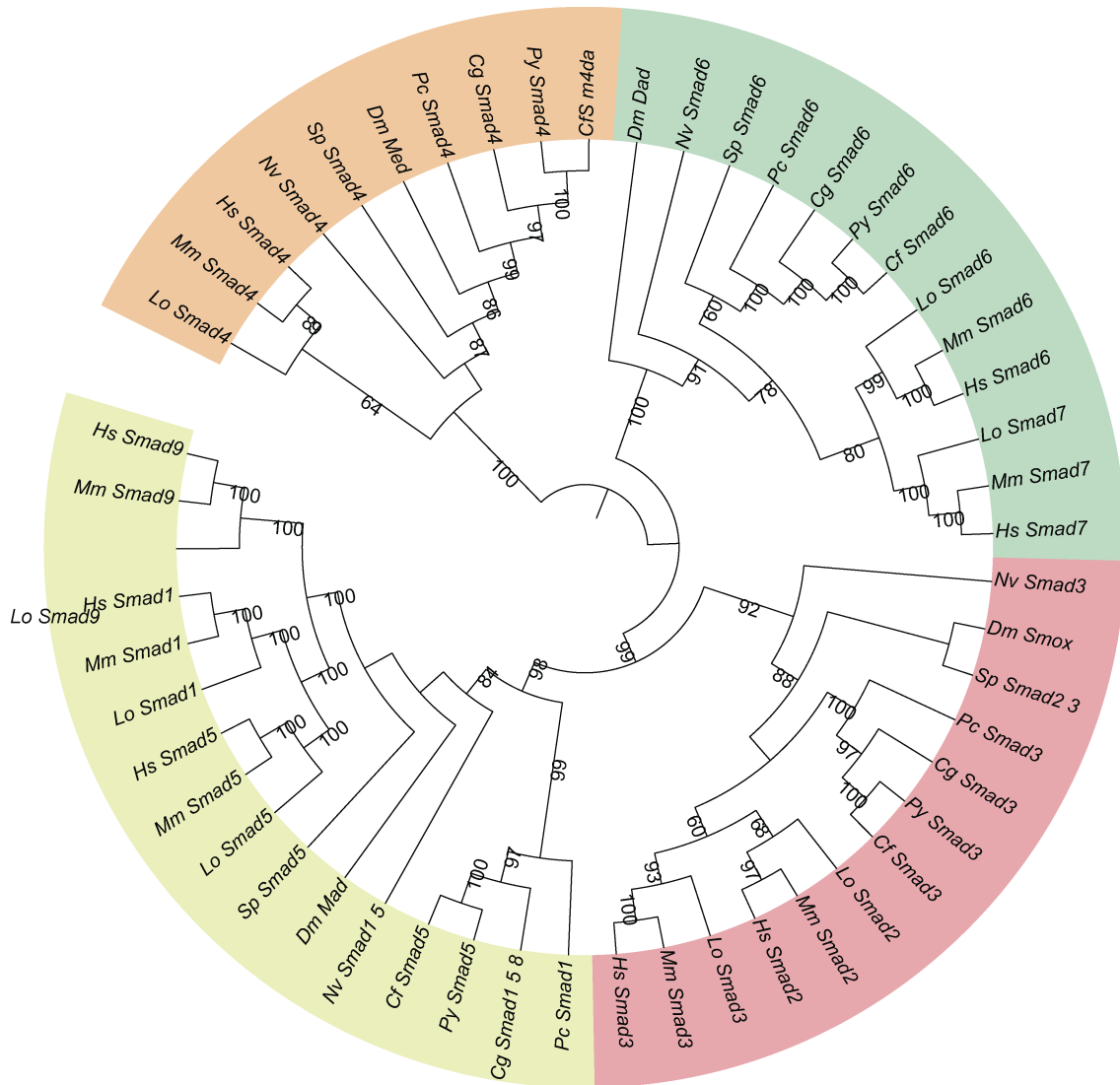


图 1 栉孔扇贝 *Smad* 蛋白结构域和基序的分布

Fig.1 Domains and motifs of *Smad* proteins

注: 蓝色框为 MH1 结构域, 黄色框为 MH2 结构域, 上面为蛋白结构域分布图, 下面为基序分布图

图 2 *Smad* 家族系统进化分析Fig.2 Phylogenetic tree of *Smad* genes

注: Hs. 人; Mm. 小鼠; Lo. 斑点雀鲷; Dm. 果蝇; Sp. 紫海胆; Cg. 牡蛎; Py. 虾夷扇贝; Nv. 海葵; Ps. 鹦鹉螺; Cf. 栉孔扇贝。绿色: *I-Smad* 亚群; 粉色: 介导 TGF- β 通路的 *R-Smad* 亚群; 黄色: 介导 BMP 通路的 *R-Smad* 亚群; 橘黄色: *Co-Smad* 亚群

Smad2 和 *Smad3* 聚在一起; *Smad5* 与其他物种的 *Smad1*、*Smad5*、*Smad9* 聚类, 两者所在的亚族分别调控不同的信号通路, TGF- β 通路 *R-Smad* 和 BMP 通路 *R-Smad* 的同源性高于其与 *Co-Smad* 和 *I-Smad* 的同源性。栉孔扇贝的 *Smad4* 与其他物种的 *Smad4* 聚类, *Co-Smad* 亚族中只有一种 *Smad4*, 负责与 *R-Smad* 蛋白形成异源复合物。栉孔扇贝 *Smad6* 与其他物种的 *Smad6*、*Smad7* 聚类。脊椎动物含有完备的 *Smad* 基因家族成员, 数量都为 8 个。其中, *Smad1*、*Smad2*、*Smad7* 和 *Smad9* 为脊椎动物特异性 *Smad* 基因。*Smad1*、*Smad5* 和 *Smad9* 聚为一支; *Smad2* 和 *Smad3* 聚为一支; *Smad6* 和 *Smad7* 具有更近的共同祖先, 暗

示这些 *Smad* 基因可能由基因或染色体加倍产生。这一发现也得到了共线性分析的支持(图 3)。软体动物的 *Smad3*、*Smad4* 和 *Smad6* 分布在同一条染色体上。而在本文所分析的脊椎动物中 *Smad3* 和 *Smad6* 在同一条染色体上, *Smad2*、*Smad4* 和 *Smad7* 在同一条染色体。暗示 *Smad* 基因家族在脊椎动物的演化中发生了加倍。

2.3 共表达网络分析及 GO 富集结果

共表达网络结果发现, 栉孔扇贝 *Smad3*、*Smad4*、*Smad5* 和 *Smad6* 分别富集在 M14、M12、M9 和 M6 模块中(图 4a)。M14、M12、M9 和 M6 模块分别包含 2 025、2 709、2 369 和 2 564 个基因。*Smad* 基因在

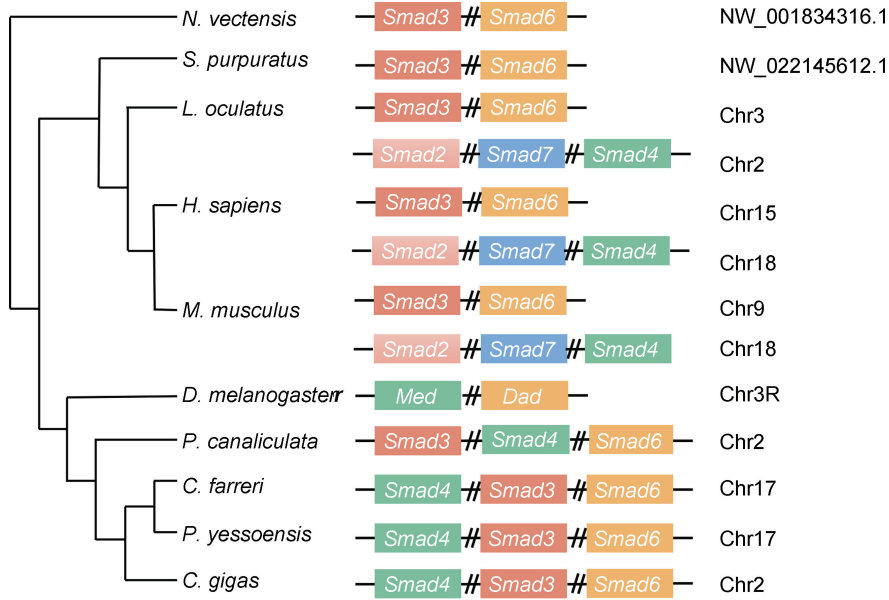
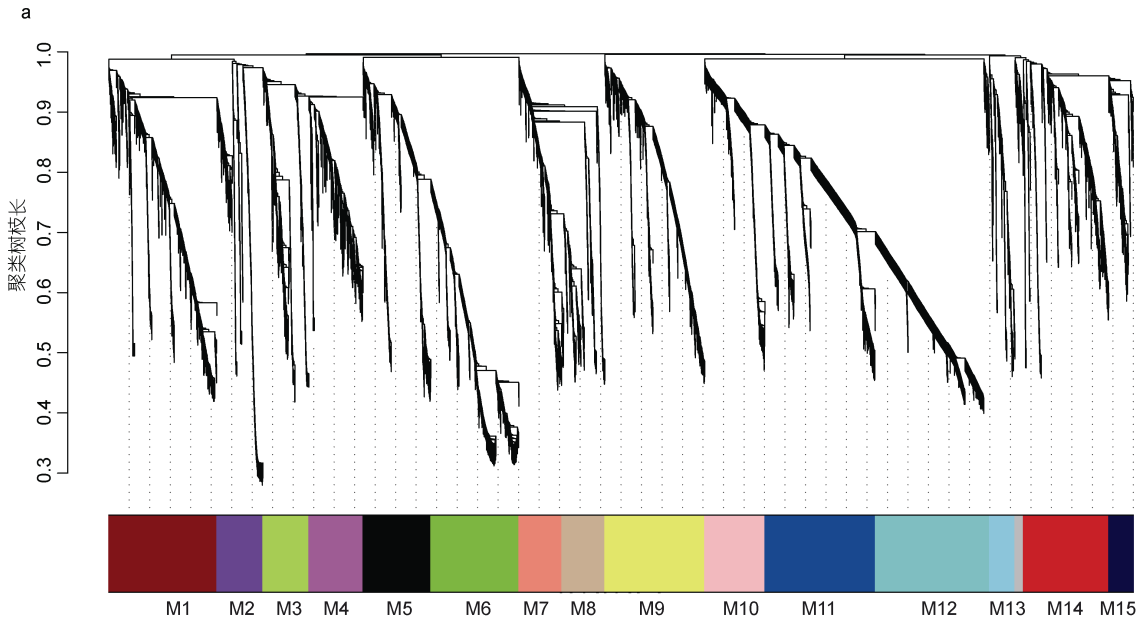


图3 Smad 基因在染色体或 scaffold 上的分布
Fig.3 Distribution of Smad genes on chromosomes and scaffolds

10 种成体组织中的表达具有明显特异性, *Smad3* 在横纹肌和平滑肌中表达量最高, 暗示其参与了肌肉的形成和发育(图 4b)。 *Smad3* 基因所在的模块主要富集到细胞增殖和蛋白质复合物等 GO 功能(表 4)。 *Smad4* 在栉孔扇贝各个成体组织中均有表达, 其中性腺中表达量最高, 表明其可能在性腺的形成和发育中起重要作用(图 4c)。 *Smad4* 所在的基因模块主要富集到细胞器组织和信号受体活性等 GO 功能(表 5)。 *Smad5*

在血液中特异性高表达, 暗示其调控血细胞的生成(图 4d)。 另外, 我们发现与 *Smad5* 共表达的基因中包含大量 *Toll* 样受体信号通路的关键基因(表 6)。 *Smad5* 所在的基因模块主要富集到蛋白质结合和蛋白质复合物等 GO 功能(表 7)。 *Smad6* 在鳃中表达量最高, 暗示其可能在鳃中起调控作用(图 4e)。 *Smad6* 所在的基因模块主要富集到对外界刺激的反应调节和蛋白质结合等 GO 功能(表 8)。



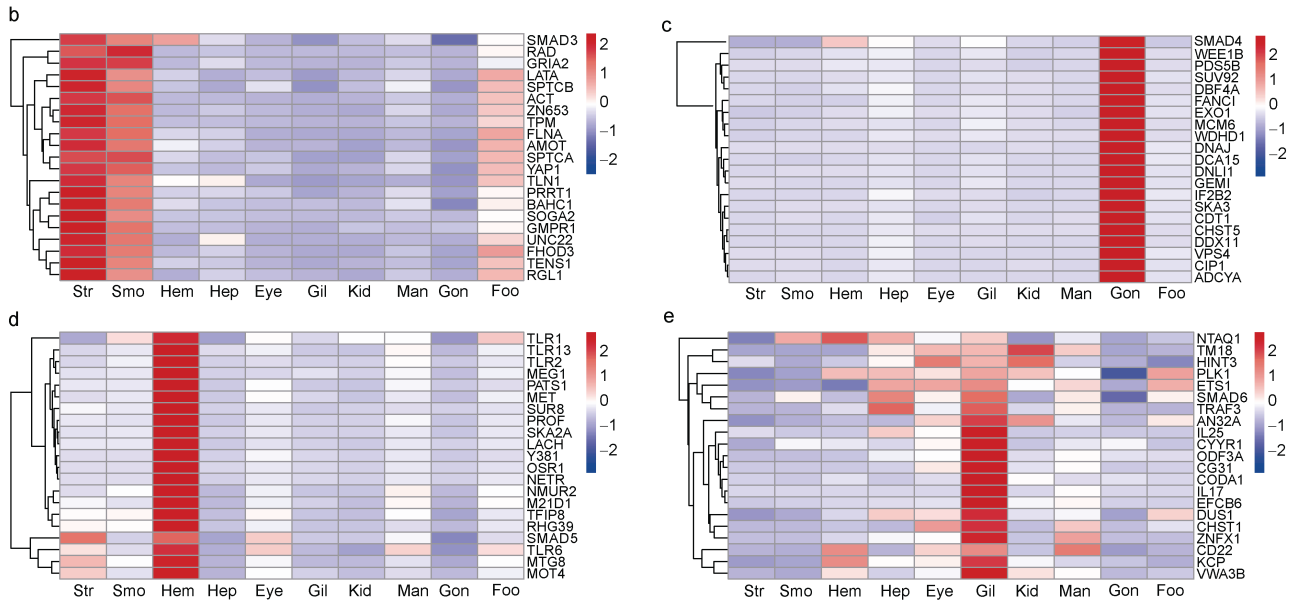


图 4 共表达网络和 *Smad* 及其共表达基因在栉孔扇贝成体组织中的表达量热图

Fig.4 WGCNA and heatmaps of *Smad* and their co-expressed genes among adult tissues in *C. farreri*

注: a. 共表达网络; b. *Smad3* 及其共表达基因表达热图; c. *Smad4* 及其共表达基因表达热图; d. *Smad5* 及其共表达基因表达热图; e. *Smad6* 及其共表达基因表达热图; 绘制热图基因来自与 *Smad* 基因共表达系数最高的前 20 个基因。Str: 横纹肌; Smo: 平滑肌; Hem: 血; Hep: 肝胰; Eye: 眼; Gil: 鳃; Kid: 肾; Man: 外套膜; Gon: 性腺; Foo: 足

表 4 M14 模块基因 GO 富集结果

Tab.4 GO enrichment analysis of the M14 genes

GO 号	GO 项	校正后 P 值	基因数
GO: 0048522	Positive regulation of cellular process	0.006	6
GO: 0008283	Cell proliferation	0.022	2
GO: 1902578	Single-organism localization	0.022	4
GO: 0009719	Response to endogenous stimulus	0.026	6
GO: 0009893	Positive regulation of metabolic process	0.027	3
GO: 0019222	Regulation of metabolic process	0.035	44
GO: 0042221	Response to chemical	0.038	7
GO: 0043021	Ribonucleoprotein complex binding	0.041	2

表 5 M12 模块基因 GO 富集结果

Tab.5 GO enrichment analysis of the M12 module genes

GO 号	GO 项	校正后 P 值	基因数
GO: 0006996	Organelle organization	0.000	37
GO: 0065008	Regulation of biological quality	0.000	21
GO: 0044237	Cellular metabolic process	0.001	298
GO: 0016043	Cellular component organization	0.001	51
GO: 0044238	Primary metabolic process	0.006	337
GO: 0007155	Cell adhesion	0.007	6
GO: 0006807	Nitrogen compound metabolic process	0.007	175
GO: 0071704	Organic substance metabolic process	0.008	357
GO: 0051641	Cellular localization	0.025	36
GO: 0051649	Establishment of localization in cell	0.042	34

表 6 M9 模块中 *Toll* 样受体信号通路的关键基因
Tab.6 The key genes of *Toll* like receptor signaling pathway in M9 module

基因	主要功能
<i>TLR1</i>	<i>TLR1</i> 可与 <i>TLR2</i> 和 <i>TLR6</i> 协同作用识别酰基脂肽
<i>TLR2</i>	促进细菌脂蛋白的凋亡
<i>TLR6</i>	主要识别细菌的肽和多脂糖
<i>TLR13</i>	激活 NF- κ B 通路
<i>TRAF2</i>	调节 TNF-R1 介导的 NF- κ B 通路
<i>TRAF3</i>	参与 TLR 非依赖性的调节抗病毒反应
<i>MyD88</i>	调节许多促炎基因的激活
<i>NFκB2</i>	氧化细菌或病毒抗原

2.4 鳃弧菌侵染 72 h 内 *Smad* 基因的免疫应答分析
为研究 *Smad* 基因响应鳃弧菌侵染的表达模式, 本研究监测了侵染 72 h 内栉孔扇贝的 *Smad* 基因表达变化。结果显示, *Smad3* 基因在侵染 24 h 时上调表达, 48 h 之后与 0 h 的表达量基本一致。*Smad5* 基因在侵染 24 h 时, 表达量上调 1.74 倍, 显著上调。在侵染 48 h 时, *Smad5* 基因的表达量较 24 h 有所降低, 但仍显著高于 0 h 时。直至侵染后的 72 h, *Smad5* 基因的表达逐步恢复正常, 与 0 h 的表达量基本一致 (图 5)。暗示 *Smad3* 和 *Smad5* 基因参与了栉孔扇贝的免疫应答。

表 7 M9 模块 GO 富集结果
Tab.7 GO enrichment analysis of the M9 module genes

GO 号	GO 项	校正后 P 值	基因数
GO: 0051716	Cellular response to stimulus	0.003	129
GO: 0023051	Regulation of signaling	0.007	17
GO: 0048583	Regulation of response to stimulus	0.012	17
GO: 0044765	Single-organism transport	0.015	74
GO: 0043234	Protein complex	0.020	25
GO: 0043227	Membrane-bounded organelle	0.030	38
GO: 0008047	Enzyme activator activity	0.001	12
GO: 0060589	Nucleoside-triphosphatase regulator activity	0.002	12
GO: 0005515	Protein binding	0.004	305
GO: 0043167	Ion binding	0.018	233
GO: 0038023	Signaling receptor activity	0.034	58
GO: 0016787	Hydrolase activity	0.043	109

表 8 M6 模块 GO 富集结果
Tab.8 GO enrichment analysis of M6 module gene

GO 号	GO 项	校正后 P 值	基因数
GO: 0006955	Immune response	0.000	9
GO: 0044238	Primary metabolic process	0.002	193
GO: 0051707	Response to other organism	0.003	3
GO: 0071704	Organic substance metabolic process	0.004	212
GO: 0048584	Positive regulation of response to stimulus	0.008	3
GO: 0002682	Regulation of immune system process	0.010	2
GO: 0051606	Detection of stimulus	0.010	2
GO: 0006807	Nitrogen compound metabolic process	0.010	87
GO: 0009605	Response to external stimulus	0.015	3
GO: 0044237	Cellular metabolic process	0.033	171
GO: 0009607	Response to biotic stimulus	0.042	4

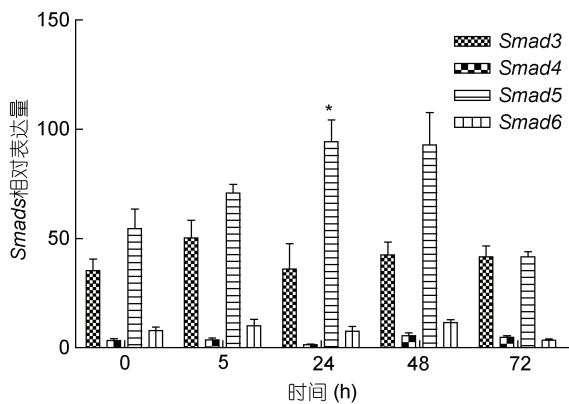


图 5 鳃弧菌感染后 *Smad* 基因在栉孔扇贝血淋巴中的表达模式

Fig.5 Expression of *Smad* genes in the hemolymph of *C. farreri* after *V. anguillarum* challenge

注: 竖线表示平均值±SE (n=3), 星号表示显著差异 ($P<0.05$)

3 讨论

本研究通过检测 *Smad* 基因的表达量以及构建共表达网络, 分析了 *Smad* 基因及其共表达基因在栉孔扇贝不同成体组织中的表达模式。 *Smad* 基因家族各基因在栉孔扇贝成体各组织均产生了不同程度的表达, *Smad3* 在横纹肌中表达量最高, 暗示其在肌肉组织生长和发育过程中具有重要作用。在哺乳动物中, 成肌细胞中的 *Smad3* 可以与转录因子 *Myod1* 结合, 促进成肌细胞的肌源性分化 (Huang *et al*, 2016)。在三角帆蚌中, 敲降 *Smad3* 可加速伤口的愈合 (Hu *et al*, 2017)。 *Smad4* 是目前发现的哺乳动物中唯一一个 *Co-Smad* 成员, 可以介导所有 TGF- β 超家族成员信号的传递 (Nakao *et al*, 1997)。 *Smad4* 在栉孔扇贝肌肉、眼、鳃、肾、性腺、肝胰腺、外套膜、血和足中均有不同程度的表达, 这说明与哺乳动物中 *Smad4* 广泛的生物学作用一致。其中, 性腺中 *Smad4* 表达量最高, 暗示了该基因可能参与了扇贝的性腺发育。在哺乳动物中, *Smad4* 对于卵巢颗粒细胞的增殖与分化、颗粒细胞和膜细胞的增殖与凋亡、卵母细胞的成熟、排卵、繁殖性能等方面有着重要作用。 *Smad4* 在水牛和绵羊的卵巢中高度表达。有实验证明, 特异性敲除小鼠卵巢颗粒细胞中的 *Smad4* 基因, 会导致雌性小鼠生育能力下降甚至不育; 特异性敲除卵母细胞中的 *Smad4* 基因, 也会导致小鼠不育 (秦智娟等, 2016)。 *Smad5* 在血液中特异性高表达, 暗示其参与调控了血细胞的生成与发育。在哺乳动物中, *Smad5* 调控胚胎的造血发育机制并且介导由中胚层细胞向造血特化的负向

调控。 *Smad5* 缺失小鼠的原始红系祖细胞增殖形成集落的能力减弱。 *Smad6* 在鳃中的表达量最高, 推测其在鳃中发挥调控作用。鳃是贝类滤食、呼吸的重要器官, 其与外界接触最多, 需要对外部环境的变化及时做出调节反应 (郭海燕等, 2007)。

贝类只存在天然免疫, 其主要通过血淋巴细胞行使天然免疫功能 (刘世良等, 2003)。为探究 *Smad* 基因家族在贝类免疫调节中的作用机制, 本研究分析了鳃弧菌感染 72 h 内血细胞中 *Smad* 基因家族各成员的表达情况。结果发现, *Smad3* 和 *Smad5* 均上调表达。其中, *Smad5* 在感染后的 24 h 时, 发生显著上调。这与 Hu 等 (2017) 在用嗜水气单胞菌感染三角帆蚌后, 血细胞中 *Smad3* 和 *Smad5* 的表达变化情况基本相一致。在哺乳动物中, *Smad3* 可通过调控增强子结合蛋白 (CEBP/ ϵ) 来促进中性粒细胞的成熟和功能极化, 进而增强机体的抗感染能力, 发挥天然免疫调节作用。我们推测, *Smad3* 在扇贝中也发挥天然免疫调控功能。另外我们发现与 *Smad5* 共表达的基因中包含大量 *Toll* 样受体信号通路的关键基因 (表 8)。 *Toll* 样受体 (TLRs) 是一类在脊椎动物和无脊椎动物中发挥天然免疫反应极为重要的蛋白质分子。 *Toll* 样受体对病原体的病原相关分子模式 (PAMPs) 进行识别, 是天然免疫发挥防御作用的关键。到目前为止, 已发现 11 个 *TLR* 家族成员 (胡宁克等, 2011)。邱丽梅 (2006) 在栉孔扇贝中克隆得到了 *CfToll-1*、*CfMyD88*、*CfTRAF6*、*CfNFkB* 和 *CfIkB* 基因, 表明贝类中确实存在 *TLR* 信号通路。据此, 可以推测 *Smad5* 与 *TLR* 家族相互作用, 共同调控扇贝的免疫应答。

此外, 我们还分析了各 *Smad* 成员的共线性情况。结果发现, 在所有分析物种中 *Smad3* 和 *Smad6* 均在分布同一条染色体上。考虑到软体动物的早期起源及其相对原始的基因组, 这意味着 *Smad3* 和 *Smad6* 的共染色体现象可能早已存在于两侧对称动物的共同祖先中 (Li *et al*, 2017)。

4 结论

综上所述, 本研究中通过对栉孔扇贝 *Smad* 基因家族进行系统发生、共表达网络构建、以及鳃弧菌感染的免疫应答分析, 解析了贝类 *Smad* 基因家族的表达调控机制和在免疫应答中的作用。结果表明, *Smad3* 和 *Smad6* 的共染色体现象可能早已存在于两侧对称动物的共同祖先中; *Smad5* 基因可能通过与 *Toll* 样受体信号通路相互作用, 参与机体的免疫应

答。本研究将为贝类 *Smad* 基因在天然免疫系统中的作用提供进一步参考。

参 考 文 献

- 刘世良, 麦康森, 2003. 贝类免疫系统和机理的研究进展. 海洋学报, 25(2): 95—105
- 李成林, 宋爱环, 胡 炜等, 2011. 山东省扇贝养殖产业现状分析与对策. 海洋科学, 35(3): 92—98
- 吴婷婷, 赵 阳, 赵 勇, 2014. *Smad3* 对中性粒细胞分化及功能极化的调控作用. 见: 中国免疫学会主编. 第九届全国免疫学学术大会论文集. 济南: 山东省免疫学会
- 邱丽梅, 2006. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) Toll 样受体及其信号传递相关基因的克隆与表达. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士学位论文, 18—30
- 胡宁克, 陆欢平, 2011. Toll 样受体功能研究进展. 现代检验医学杂志, 26(1): 14—16
- 秦智娟, 杨晓清, 2016. 基因敲除在雌性小鼠生殖系统研究中的应用. 国际生殖健康/计划生育杂志, 35(1): 51—55
- 钱雪骏, 董迎辉, 姚韩韩等, 2015. 泥蚶 *Smad1/5* 基因 cDNA 全长克隆及时空表达特征分析. 水产学报, 39(9): 1302—1312
- 郭海燕, 叶 嘉, 陈 雷等, 2007. 瓣鳃纲贝类摄食器官组织学研究进展. 邯郸学院学报, 17(3): 74—76
- 郭慧慧, 2012. 栉孔扇贝 TGF- β /*Smad* 信号通路基因的克隆、表达分析及生长性状相关 SNP 位点筛查. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 50—51
- 窦海鸽, 黄 捷, 王秀华等, 2005. 工厂化海水养殖中刺激隐核虫病的综合防治新技术. 北京水产, (2): 34—35
- Bailey T L, Elkan C, 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proceedings of International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 2: 28—36
- Bjellqvist B, Hughes G J, Pasquali C *et al*, 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. Electrophoresis, 14(1): 1023—1031
- Cong M, Song L S, Wang L L *et al*, 2008. The enhanced immune protection of Zhikong scallop *Chlamys farreri* on the secondary encounter with *Listonella anguillarum*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 151(2): 191—196
- Datto M B, Frederick J P, Pan L *et al*, 1999. Targeted disruption of *Smad3* reveals an essential role in transforming growth factor β -mediated signal transduction. Molecular and Cellular Biology, 19(4): 2495—2504
- Derynck R, Zhang Y E, 2003. *Smad*-dependent and *Smad*-independent pathways in TGF- β family signalling. Nature, 425(6958): 577—584
- Dobin A, Davis C A, Schlesinger F *et al*, 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics, 29(1): 15—21
- Grishin N V, 2001. Mh1 domain of *Smad* is a degraded homing endonuclease. Journal of Molecular Biology, 307(1): 31—37
- Hu X L, Bao Z M, Hu J J *et al*, 2006. Cloning and characterization of tryptophan 2, 3-dioxygenase gene of Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones and Preston 1904). Aquaculture Research, 37(12): 1187—1194
- Hu B Q, Yi P P, Li Z F *et al*, 2017. Molecular characterization of two distinct *Smads* gene and their roles in the response to bacteria change and wound healing from *Hyriopsis cumingii*. Fish & Shellfish Immunology, 67: 129—140
- Huang Q K, Qiao H Y, Fu M H *et al*, 2016. MiR-206 attenuates denervation-induced skeletal muscle atrophy in rats through regulation of satellite cell differentiation via TGF- β 1, *Smad3*, and HDAC4 signaling. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 22: 1161—1170
- Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A, 2009. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Research, 37(1): 1—13
- IBM, 2013. IBM, SPSS statistics for windows, version 20.0. New York: IBM
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870—1874
- Langfelder P, Horvath S, 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics, 9: 559
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P *et al*, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23(21): 2947—2948
- Letunic I, Bork P, 2007. Interactive Tree of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Bioinformatics, 23(1): 127—128
- Letunic I, Bork P, 2018. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. Nucleic Acids Research, 46(D1): D493—D496
- Li H, Handsaker B, Wysoker A *et al*, 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics, 25(16): 2078—2079
- Li Y L, Sun X Q, Hu X L *et al*, 2017. Scallop genome reveals molecular adaptations to semi-sessile life and neurotoxins. Nature Communications, 8(1): 1721
- Li Y P, Zhang L L, Sun Y *et al*, 2016. Transcriptome sequencing and comparative analysis of ovary and testis identifies potential key sex-related genes and pathways in scallop *Patinopekten yessoensis*. Marine Biotechnology, 18(4): 453—465
- Liao Y, Smyth G K, Shi W, 2014. FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics, 30(7): 923—930
- Liu G, Huan P, Liu B Z, 2014. Cloning and expression patterns of two *Smad* genes during embryonic development and shell formation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 32(6): 1224—1231
- Liu W Z, Xie Y B, Ma J Y *et al*, 2015. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. Bioinformatics, 31(20): 3359—3361
- Massagué J, Wotton D, 2000. Transcriptional control by the TGF- β /*Smad* signaling system. The EMBO Journal, 19(8):

1745—1754

Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, 1997. TGF- β receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *The EMBO Journal*, 16(17): 5353—5362

Wang J, Yu H W, Yao L J *et al*, 2020. Genomic and transcriptomic landscapes and evolutionary dynamics of molluscan glycoside hydrolase families with implications for algae-feeding biology. *Computational and Structural*

Biotechnology Journal, 18: 2744—2756

Weinstein M, Yang X, Deng C X, 2000. Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 11(1/2): 49—58

Wu J W, Hu M, Chai J J *et al*, 2001. Crystal structure of a phosphorylated Smad2. recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-signaling. *Molecular Cell*, 8(6): 1277—1289

EXPRESSION CHARACTERISTICS OF *Smad* GENE FAMILY AND ITS IMMUNE RESPONSE TO *VIBRIO ANGUILLARUM* INFECTION IN *CHLAMYS FARRERI*

DONG Zheng¹, ZENG Qi-Fan^{1,2}, LIU Liang-Jie¹, WANG Shi^{1,2}

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding (Ministry of Education), College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

Abstract *Chlamys farreri* is one of the most important scallops in Chinese mariculture industry. However, bacteria-caused diseases occasionally break out in scallop aquaculture in recent years, resulting in huge economic losses. Therefore, the immune defense mechanism of scallop was studied to improve germplasm and cultivate disease resistant strains. It has been found that *Smad* genes could mediate neutrophil maturation and functional polarization by regulating enhancer binding protein ϵ (cebp/ ϵ), which plays an important role in the innate immune regulation of vertebrates. At present, most of the researches on *Smad* genes and their roles in immunity focused on vertebrates, those on shellfish are relatively scarce. Therefore, we characterized the phylogeny of *Smad* gene family in *C. farreri*, constructed the co-expression network, and analyzed the immune response to *V. anguillarum* infection, in order to analyze the expressional regulation mechanism of *Smad* genes in shellfish and its role in immune response. The results show that *Smad3* and *Smad6* co-chromosomes existed in the common ancestor of bilateran animals. *Smad5* was co-expressed with a large number of key genes of Toll-like receptor signaling pathway in *C. farreri*. *Smad5* was significantly up-regulated in hemolymph after infection by *V. anguillarum*, which indicated that *Smad5* might participate in the immune function through interaction with Toll like receptor signaling pathway. This study provides an important reference for further study on the role of *Smad* genes in the innate immune system of shellfish.

Key words *Chlamys farreri*; *Smad* gene family; expression pattern; immune responses