

# 马氏珠母贝 *PfAQP4* 免疫功能初探

潘肖兰<sup>1,2</sup>, 刘惠茹<sup>1,2</sup>, 许濛<sup>1,2</sup>, 许瀚之<sup>1,2</sup>, 张华<sup>1</sup>, 何毛贤<sup>1</sup>

1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东省应用海洋生物学重点实验室, 中国科学院南海生态环境工程创新研究院, 广东 广州 510301;
2. 中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:** 文章对马氏珠母贝水通道蛋白基因 *PfAQP4* 进行免疫功能分析。利用实时荧光定量分析免疫刺激和 RNA 干扰后 *PfAQP4* 及免疫相关基因的表达模式, 旨在为马氏珠母贝自然免疫研究提供新的资料。结果表明, 注射脂多糖 LPS 后, 在外套膜组织中 *PfAQP4* mRNA 表达量在 24h 时显著上调( $p < 0.05$ ), 在消化腺中 *PfAQP4* mRNA 表达量先在 12h 时显著下调( $p < 0.05$ ), 后在 24h、36h 和 48h 时显著上调( $p < 0.05$ )。注射聚肌胞 poly(I:C)后, 在外套膜组织中 *PfAQP4* mRNA 表达量在 36h 时和 48h 时显著上调( $p < 0.05$ ), 在消化腺中 *PfAQP4* mRNA 表达量在 48h 时显著上调( $p < 0.05$ )。RNA 干扰 *PfAQP4* 表达后, 免疫相关基因 *CuZn-SOD* 在外套膜中的表达量显著下降( $p < 0.05$ ), Pearson 相关性分析显示 *PfAQP4* 与 *CuZn-SOD* 的表达存在显著正相关( $r = 0.818$ ,  $p < 0.001$ )。综上所述, *PfAQP4* 参与马氏珠母贝的免疫应答。

**关键词:** 马氏珠母贝; 水通道蛋白 4 基因; 免疫刺激; RNA 干扰; 基因表达

中图分类号: P735.4 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2021)02-0083-7

## Preliminary study on immunity function of aquaporin *AQP4* in the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*

PAN Xiaolan<sup>1,2</sup>, LIU Huiru<sup>1,2</sup>, XU Meng<sup>1,2</sup>, XU Hanzhi<sup>1,2</sup>, ZHANG Hua<sup>1</sup>, HE Maoxian<sup>1</sup>

1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, Institution of South China Sea Ecology and Environmental Engineering, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** To identify the immunity function of Aquaporin of *Pinctada fucata martensii* (*PfAQP4*), the mRNA expression patterns of *PfAQP4* and immune-related genes were detected by qPCR after immunostimulation and RNA interference. The results showed that the mRNA expression of *PfAQP4* in the mantle was significantly up-regulated at 24 h ( $p < 0.05$ ), while that in the digestive gland was significantly down-regulated at 12 h, and increased at 24 h, 36 h and 48 h after LPS injection ( $p < 0.05$ ). After poly (I : C) injection, the expression of *PfAQP4* was significantly up-regulated in the mantle at 36 h and 48 h ( $p < 0.05$ ), and up-regulated at 48 h in the digestive gland ( $p < 0.05$ ). When *PfAQP4* was knocked down by RNA interference, the mRNA expression of *CuZn-SOD* in the mantle was significantly down-regulated ( $p < 0.05$ ); a significant

收稿日期: 2020-05-22; 修订日期: 2020-08-16。殷波编辑

基金项目: 国家贝类产业技术体系岗位科学家项目(CARS-49); 中国科学院南海生态环境工程创新研究院自主部署项目(ISEE2018PY03); 以农产品为单元的广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目(贝藻产业)(2019KJ146); 广东省科技计划项目(2017B0303014052)

作者简介: 潘肖兰(1996—), 女, 广西壮族自治区河池市人, 硕士研究生, 研究方向为贝类分子遗传。email: panxiaolan17@mailsucas.edu.cn

通信作者: 何毛贤。email: hmx2@scsio.ac.cn

Received date: 2020-05-22; Revised date: 2020-08-16. Editor: YIN Bo

**Foundation item:** Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-49); Innovation Academy of South China Sea Ecology and Environmental Engineering, Chinese Academy of Sciences (ISEE2018PY03); Shellfish and Large Algae Industry Innovation Team Project of Guangdong Province, China (2019KJ146); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China (2017B0303014052)

**Corresponding author:** HE Maoxian. email: hmx2@scsio.ac.cn

positive correlation of expression level between *CuZn-SOD* and *PfAQP4* was found ( $r = 0.818$ ,  $p < 0.001$ ). We showed that *PfAQP4* plays an important role in the immune response of *P. f. martensii*, which provide new data for the innate immunity of *P. f. martensii*.

**Key words:** *Pinctada fucata martensii*; aquaporin 4; immunoregulation; RNA interference; gene expression

水通道蛋白 4 (Aquaporin 4, AQP4) 是一类参与水运输的膜转运蛋白, 通常以四聚体形式存在, 在渗透压调节中起重要作用 (Ho et al, 2009; Pannicke et al, 2010)。AQP4 与多种人类疾病的发生发展有关, 如脑水肿 (Papadopoulos et al, 2007)。血脑屏障 (Blood-brain Barrier, BBB) 破坏后 AQP4 大量表达可致脑水肿形成和发展, 该过程伴随着氧化应激水平的增加 (Yang et al, 2014)。研究发现基质金属蛋白分解酶 (Matrix Metalloproteinase, MMP) 可通过降解细胞外基质来增加毛细血管通透性从而促进 BBB 的破坏 (武柠子等, 2016), MMP 与 AQP4 的表达关系密切, 某些药物可以通过抑制 MMP 的表达从而抑制 AQP4 的表达来减轻 BBB 的破坏, 在 mice 中 MMP 敲除可直接引起 AQP4 表达量下调, AQP4 敲除会导致 MMP 表达异常 (Zhou et al, 2010; Cao et al, 2016; Pérez-Hernández et al, 2017)。提高超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 活力和下调 AQP4 的表达可减轻脑水肿症状 (Belayev et al, 2012; 王晶等, 2018)。此外, 在人自身免疫性视神经脊髓炎 (NMO) 患者的血清中 AQP4 抗体 (AQP4-IgG) 显著升高, AQP4 肽的刺激可使 NMO 患者的 T 细胞分泌白细胞介素 17 (Interleukin, IL-17) 等细胞因子 (Nelson et al, 2010; Ulusoy et al, 2012; Wang et al, 2012)。AQP4 基因缺失可抑制或激活重要免疫转录调控因子核因子  $\kappa$ B (Nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 信号通路, 从而抑制或促进细胞因子的释放 (Sun et al, 2016; Dai et al, 2018; Wang et al, 2019; Hua et al, 2020); 若抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路, 则会导致 AQP4 基因的表达受到抑制 (Sun et al, 2019)。这些研究表明 AQP4 影响多种免疫相关因子的合成和分泌。目前已证实 AQP4 参与水产动物渗透压调节 (高沿, 2016), 但关于其免疫功能还没有报道。

马氏珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*) 是人工培育海水珍珠的主要母贝, 除了在自然状态下可能会受到病原菌的入侵之外, 用其进行人工育珠的过程中, 经常会观察到插核手术贝因病原菌入侵伤口而死亡的现象, 机体免疫显著影响插核手术贝的成活率 (Adzighli et al, 2019, 2020)。我们前期克隆了马氏珠母贝 AQP4 (*PfAQP4*) 并研究了其

在渗透压调节中的功能 (潘肖兰等, 2020), 本文拟探究 *PfAQP4* 是否具有免疫调节功能, 以期为马氏珠母贝的抗性育种及病害防治等提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用约 1 龄的马氏珠母贝, 养殖于深圳大鹏澳海区。将试验贝暂养于室内水池中, 水温和盐度等条件与海区一样, 24h 充气, 每天 8:00 投喂饵料 (亚心形扁藻) 1 次, 14:00 换水 1 次。

### 1.2 免疫刺激试验

根据注射物不同分为脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 组、聚肌胞 [Polyinosinic-polycytidylic acid, Poly (I:C)] 组和磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 组 (阴性对照) 3 个组, 每组 60 只贝。将 3 种注射物按试剂说明书分别配置成质量浓度为  $1\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  溶液后进行注射, 每只贝注射剂量为  $100\mu\text{L}$ 。分别于注射后 12h、24h、36h、48h 和 72h, 从每个组别中随机取 9 只贝, 取消化腺和外套膜组织立即置于液氮中保存。每 3 只贝的同一组织混合作为 1 个生物学重复, 共 3 个生物学重复。

### 1.3 RNA 干扰试验

用美国 Promega 公司的 T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System 试剂盒进行 *PfAQP4* dsRNA 的合成, 合成引物见表 1。将 15 只马氏珠母贝随机分成 3 组, 分别是 AQP 组、绿色荧光蛋白 (GFP) 组和 PBS-r 组。其中 AQP 组为试验组, 注射浓度为  $4\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  的 *PfAQP4* dsRNA 溶液  $40\mu\text{L}$ ; GFP 是水母特有的一类发光蛋白, 在其他生物体内不存在, 因此不会出现假阳性结果, 故将 GFP 组作为阳性对照组, 注射质量浓度为  $4\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  的 GFP dsRNA 溶液  $40\mu\text{L}$ ; PBS-r 组作为阴性对照组, 注射  $40\mu\text{L} 1\times\text{PBS}$ 。7d 后分别对每只贝的外套膜组织进行固定, 用于 RNA 提取。

### 1.4 总 RNA 提取、cDNA 模板合成和实时荧光定量 PCR

用 Magen 公司通用 RNA 提取试剂盒提取组织的总 RNA, 用 UV-Vis Spectrophotometer Q5000 (QUAWELL) 测定 RNA 浓度, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳

表 1 本研究所用的引物序列  
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5' — 3')	用途
dsAQP4-T7F	<b>GGATCCTAATACGACTCACTATAGG</b> TTGCCTTTGGGCTATCGG	<i>PfAQP4</i> RNAi 含 T7 启动子序列正向引物
dsAQP4-T7R	<b>GGATCCTAATACGACTCACTATAGG</b> CGGAAGGAGCAGCAAAGAC	<i>PfAQP4</i> RNAi 含 T7 启动子序列反向引物
dsGFP4-T7F	<b>GGATCCTAATACGACTCACTATAGG</b> CGACGTAAACGGCCACAAGTT	<i>GFP</i> RNAi 含 T7 启动子序列正向引物
dsGFP4-T7R	<b>GGATCCTAATACGACTCACTATAGG</b> ATGGGGGTGTTCTGCTGGTAG	<i>GFP</i> RNAi 含 T7 启动子序列反向引物
dsAQP4-F	TTGCCTTTGGGCTATCGG	<i>PfAQP4</i> RNAi 正向引物
dsAQP4-R	CGGAAGGAGCAGCAAAGAC	<i>PfAQP4</i> RNAi 反向引物
dsGFP-F	CGACGTAAACGGCCACAAGTT	<i>GFP</i> RNAi 正向引物
dsGFP-R	ATGGGGGTGTTCTGCTGGTAG	<i>GFP</i> RNAi 反向引物
Faqp	CTGTGATGGCGTCAACTGATG	<i>PfAQP4</i> qPCR 正向引物
Raqp	CGCAATCGTGAGAAGATGACC	<i>PfAQP4</i> qPCR 反向引物
F18S	CGTTTCAACAAGACGCCAGTAG	<i>18S</i> qPCR 正向引物
R18S	ACGAAAAAAAGGTTTGAGAGACG	<i>18S</i> qPCR 反向引物
QT5Rel143	GATGGCAGAGGATGATTCTTCTT	<i>NF-κB</i> qPCR 正向引物
QT3Rel332	TGATGGACCTTCACACTCATACC	<i>NF-κB</i> qPCR 反向引物
MMPF	TCTGGCTCATGCGTTTTTCC	<i>MMP</i> qPCR 正向引物
MMPR	AGGGCATGTCCAATCTCATGAG	<i>MMP</i> qPCR 反向引物
QT5IL17seq460	CCAGTCCTCGTAATAAATGTGAACC	<i>IL-17</i> qPCR 正向引物
QT3IL17seq636	CGCTCCGCTGCTAGATTCTT	<i>IL-17</i> qPCR 反向引物
LAMPF	TGCCTGTCAACAATAAACC	<i>LAMP</i> qPCR 正向引物
LAMPR	AGACTCAAAGTAAGACCACCT	<i>LAMP</i> qPCR 反向引物
CuZn-SODF	GAAACTGCAAACCCTATA	<i>CuZn-SOD</i> qPCR 正向引物
CuZn-SODR	AGACATTCGTCAAACCTCA	<i>CuZn-SOD</i> qPCR 反向引物

注: 下划线表示 T7 启动子序列, 粗体表示额外的碱基, 可允许聚合酶更有效的结合和启动

检验 RNA 质量。用带有去除基因组功能的逆转录试剂盒 ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix With gDNA Remover (Toyobo)进行 cDNA 第一链合成, 用 SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo)和 Light Cycler 480 (Roche, Switzerland), 18S rRNA 为内参基因进行实时荧光定量分析, 每个样品 3 个技术重复, 所检测基因的实时荧光定量引物见表 1。反应体系为: SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix 5μL, 双蒸馏水 3.4μL, cDNA 模板 1μL, 上下游引物各 0.3μL, 共 10μL。反应程序为: 95 预变性 10min; 95 10s, 56 15s, 72 15s, 45 个循环。2<sup>-ΔCt</sup> 法计算相对 mRNA 表达量。用 SPSS19.0 软件的单因素方差分析法(ANOVA)进行显著性分析, Tukey 法进行多组样本间差异显著性分析, 置信区间为 95%。数据以均值±标准差(SD)表示, 在  $p<0.05$  时具有统计学意义。用 SPSSAU-在线 SPSS 分析软件 (<https://spssau.com/front/spssau/index.html>) 进行 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 免疫刺激后 *PfAQP4* 在外套膜和消化腺组织的表达情况

免疫刺激后 *PfAQP4* 在外套膜中的相对表达情况如图 1a。在注射 LPS 后 12h, *PfAQP4* mRNA 相对表达量与对照组(PBS 组)间无显著性差异; 注射 LPS 后 24h, *PfAQP4* mRNA 相对表达量为 0.0103, 与 PBS 组相比显著升高( $p<0.05$ ), 是 PBS 组的 2.2 倍; 注射后 36h, *PfAQP4* 转录表达量降至 PBS 组水平。注射 Poly(I:C)后 12h 和 24h, *PfAQP4* mRNA 相对表达量与相应时刻 PBS 组相比均无显著性差异; 注射后 36h 和 48h, *PfAQP4* mRNA 相对表达量分别为 0.0063 和 0.0093, 与相应时刻 PBS 组相比均显著升高( $p<0.05$ ), 分别是 PBS 组的 2.2 和 1.5 倍; 注射后 72h, *PfAQP4* 转录表达量已降至 PBS 组水平。

免疫刺激后 *PfAQP4* 在消化腺中的相对表达情况如图 1b。注射 LPS 后 12h, *PfAQP4* mRNA 的相对

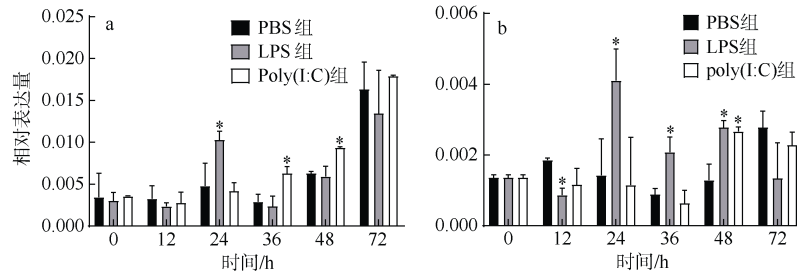


图 1 3 种免疫刺激引起 *PfAQP4* mRNA 相对表达量在外套膜(a)和消化腺(b)中的随时间变化情况

\*表示同一时刻试验组与对照组有显著差异( $p < 0.05$ )

Fig. 1 Relative mRNA expression of *PfAQP4* in the mantle (a) and digestive gland (b) after immune stimulation. \* indicates that the experimental group and control group are significantly different at the same time ( $p < 0.05$ )

表达量为 0.0009, 与 PBS 组相比显著降低( $p < 0.05$ ), 为 PBS 组的 0.5 倍; 注射后 24h、36h 和 48h, *PfAQP4* 的转录表达量与相应时刻 PBS 组相比均显著升高( $p < 0.05$ ), 基因转录表达量分别为 0.0041、0.0021 和 0.0028, 分别是 PBS 组的 2.9、2.3 和 2.2 倍; 注射后 72h, *PfAQP4* 转录表达量与 PBS 组相比已无显著性差异。注射 Poly(I:C)后 12h、24h 和 36h, *PfAQP4* mRNA 相对表达量与相应时刻 PBS 组相比均无显著性差异; 注射后 48h, *PfAQP4* mRNA 的相对表达量为 0.0027, 与 PBS 组相比显著上升( $p < 0.05$ ), 是 PBS 组的 2.1 倍; 注射后 72h 时 *PfAQP4* 转录表达量恢复至 PBS 组水平。

## 2.2 RNA 干扰后免疫相关基因在外套膜的表达情况

*PfAQP4* RNA 干扰效果及干扰后免疫相关基因的表达情况如图 2。AQP 组、PBS-r 组和 GFP 组中 *PfAQP4* mRNA 相对表达量分别为 0.003、0.011 和

0.015, *PfAQP4* 转录表达量在试验组与两个对照组间均具有显著性( $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ ), 基因干扰效率为 77%。溶酶体膜相关糖蛋白 *LAMP* 基因在 AQP 组、PBS-r 组和 GFP 组的 mRNA 相对表达量分别为 0.01、0.04 和 0.18, 其中 AQP 组 *LAMP* 转录表达量与 GFP 组相比显著下降( $p < 0.05$ ), 与 PBS-r 组相比无显著性差异; 核因子  $\kappa$ BNF- $\kappa$ B 基因在 AQP 组、PBS-r 组和 GFP 组的 mRNA 相对表达量分别为 0.01、0.02 和 0.04, AQP 组 *NF- $\kappa$ B* 转录表达量与 GFP 组相比显著下降( $p < 0.01$ ), 与 PBS-r 组相比无显著性差异; 铜锌超氧化物歧化酶 *CuZn-SOD* 基因在 AQP 组、PBS-r 组和 GFP 组的 mRNA 相对表达量分别为 0.02、0.07 和 0.10, 与两个对照组相比, *CuZn-SOD* 表达显著下降( $p < 0.05$ 、 $p < 0.001$ ); 基质金属蛋白分解酶 *MMP* 和白细胞介素 *IL-17* 基因的 mRNA 相对表达量各组间均无显著性差异。

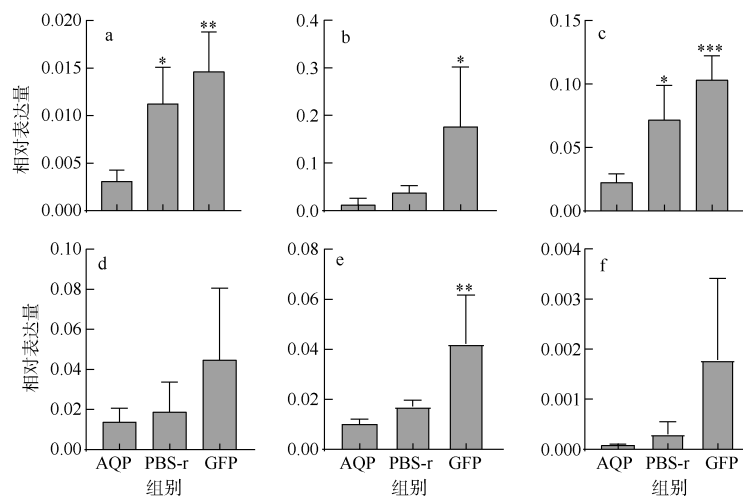


图 2 *PfAQP4* 表达抑制后 5 个免疫相关基因在外套膜中的随时间变化情况

a. *PfAQP4* mRNA; b. *LAMP* mRNA; c. *CuZn-SOD* mRNA; d. *MMP* mRNA; e. *NF- $\kappa$ B* mRNA; f. *IL-17* mRNA. \*表示对照组与 AQP 组差异显著( $p < 0.05$ ), \*\*表示  $p < 0.01$ , \*\*\*表示  $p < 0.001$

Fig. 2 Relative mRNA expression of 5 immune-related genes in the mantle after inhibition of *PfAQP4* expression. \* Indicates significant difference between the control group and AQP group ( $p < 0.05$ ), \*\* indicates  $p < 0.01$ , and \*\*\* indicates  $p < 0.001$

将 AQP 组、PBS-r 组和 GFP 组的 *PfAQP4* 基因转录表达量与 *LAMP*、*NF-κB*、*CuZn-SOD*、*MMP* 和 *IL-17* 基因的转录表达量进行 Pearson 相关性分析(表 2)。结果发现: 在 5 个免疫相关基因中, *CuZn-SOD*、*LAMP* 和 *NF-κB* 基因与 *PfAQP4* 基因的相关系数分别为 0.818 ( $p<0.001$ )、0.674 ( $p<0.01$ ) 和 0.655 ( $p<0.05$ ), 这 3 个基因与 *PfAQP4* 基因表现出显著正相关性; *IL-17* 基因与 *PfAQP4* 基因的相关系数为 0.515, 无显著相关性; *MMP* 基因与 *PfAQP4* 基因的相关系数仅为 0.356, 两者也无显著相关性。

表 2 RNA 干扰后 *PfAQP4* 与免疫相关基因 mRNA 表达量的相关性分析

Tab. 2 Correlation analysis of mRNA expression between *PfAQP4* and immune-related genes in the mantle after RNA interference

基因名称	相关系数	$p$ 值
基质金属蛋白分解酶	0.356	0.212
核因子 $\kappa B$	0.655*	0.011
白细胞介素 17	0.515	0.060
溶酶体膜相关糖蛋白	0.674**	0.008
铜锌超氧化物歧化酶	0.818***	0.000

注: \*表示  $p<0.05$ , \*\*表示  $p<0.01$ , \*\*\*表示  $p<0.001$

### 3 讨论

自 1994 年 AQP4 在人脑中被发现以来, 其在高等脊椎动物中的免疫调节功能已被广泛认知, 该基因的表达变化涉及免疫相关通路的激活和抑制, 与多种免疫相关因子的表达变化有关。本研究分析了免疫刺激后 *PfAQP4* mRNA 相对表达量的改变以及 *PfAQP4* RNA 干扰后免疫相关基因的表达变化, 研究结果表明 *PfAQP4* 参与马氏珠母贝免疫应答。LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分, 通常被用来模拟细菌感染, Poly(I:C)是一种人工合成的双链 RNA 类似物, 通常被用来模拟病毒感染(孙乐 等, 2016; Liu et al, 2018)。在马氏珠母贝中, 消化腺和外套膜都是重要的免疫器官(Zhang et al, 2018)。本试验结果显示注射 LPS 和 Poly(I:C)后, *PfAQP4* 基因的表达在外套膜和消化腺中均出现显著变化, 说明该基因参与马氏珠母贝因 LPS 和 Poly(I:C)刺激引起的免疫应答。在消化腺中, LPS 注射后 24h 开始出现 *PfAQP4* mRNA 表达量的显著上调, 而 Poly(I:C)注射后出现 *PfAQP4* mRNA 表达量显著上调的时间为 48h, 说明在消化腺中 *PfAQP4* 响应 LPS 刺激比响应 Poly(I:C)刺激早。同样, 在外套膜中, LPS 注射后

24h 开始出现 *PfAQP4* mRNA 表达量的显著上调, 而 Poly(I:C)注射后 *PfAQP4* mRNA 表达量的显著上调在 36h 才观察到, 也说明了 *PfAQP4* 对 LPS 诱导的免疫反应更为敏感。在本试验中, *PfAQP4* 在消化腺中的表达在 LPS 刺激后 12h 显著下降, 该现象在外套膜中没有观察到, 这可能是由于不同组织的功能特异性, 对免疫刺激信号做出的响应存在差异。消化腺是海洋软体动物的主要免疫组织已得到了广泛的认知。最近研究报道, 外套膜也作为重要的免疫器官参与马氏珠母贝的免疫防御(Zhang et al, 2018)。马氏珠母贝作为海水珍珠培育的主要母贝, 在进行插核手术后外套膜小片增生形成珍珠囊, 此过程历经免疫识别、珍珠囊细胞分泌珍珠质包裹珠核形成珍珠。因此, 对于马氏珠母贝来说, 外套膜免疫显得尤为重要(Zhao et al, 2012)。本试验分析了 *PfAQP4* RNA 干扰后外套膜免疫相关基因的表达变化, 以此来说明 *PfAQP4* 与免疫相关基因之间的关系。 *PfAQP4* RNA 抑制后外套膜免疫相关基因(*LAMP*、*CuZn-SOD*、*NF-κB*、*MMP* 和 *IL-17*)中除 *CuZn-SOD* 基因在 *PfAQP4* 注射组出现显著下降外, 其他 4 个基因(*MMP*、*NF-κB*、*IL-17*、*LAMP*)与对照组相比无显著变化, 说明在马氏珠母贝中, *PfAQP4* 对这 4 个免疫相关基因的调节作用较小。Pearson 相关性分析发现 *PfAQP4* 和 *CuZn-SOD* 相关系数为 0.818 ( $p<0.001$ ), 抑制 *PfAQP4* 的表达可显著抑制 *CuZn-SOD* 的表达, 说明 *PfAQP4* 和 *CuZn-SOD* 位于同一条信号通路中。鉴于 *CuZn-SOD* 最主要的功能是参与机体氧化应激, 是重要的免疫相关基因(袁牧等, 2016), 说明 *PfAQP4* 可能与 *CuZn-SOD* 共同在免疫调节网络中发挥重要作用。在水产动物中, *CuZn-SOD* 在文蛤(*Meretrix meretrix*)(朱丹 等, 2010)、菲律宾蛤仔(*Venerupis philippinarum*)(Li et al, 2010)、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)(Lin et al, 2008)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus discus*)(Kim et al, 2007)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(Ni et al, 2007)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)(Bao et al, 2009)等中均被发现与所研究物种的免疫应答有关, 该基因可在短时间内诱导免疫系统, 是一种急性期蛋白。本研究结果表明, 在马氏珠母贝中 *PfAQP4* 可调节 *CuZn-SOD* 参与免疫应答。

本研究首次发现 *PfAQP4* 基因响应 LPS 和 Poly(I:C)的免疫刺激。干扰 *PfAQP4* 基因表达可导致 *CuZn-SOD* 基因表达量出现显著下降, 两者具有较高的正相关性, 说明 *PfAQP4* 可调节 *CuZn-SOD* 基因

的表达。鉴于 *CuZn-SOD* 是一个公认的免疫调节因子, 故推测 *PfAQP4* 可能通过调节 *CuZn-SOD* 从而参

与马氏珠母贝的免疫应答。但 *PfAQP4* 如何调节 *CuZn-SOD* 还需更深入的试验研究。

## 参考文献 References

- 高沿, 2016. 凡纳滨对虾水孔蛋白-4 基因克隆、表达及其对盐度胁迫的反应研究[D]. 北京: 中国科学院大学(in Chinese).
- 潘肖兰, 刘惠茹, 许濛, 等, 2020. 马氏珠母贝水通道蛋白基因 *AQP4* cDNA 克隆和表达分析[J]. 热带海洋学报, 39(3): 66–75. PAN XIAOLAN, LIU HUIRU, XU MENG, et al, 2020. Cloning and expression analysis of aquaporin gene *AQP4* cDNA from *Pinctada fucata martensii*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 39(3): 66–75 (in Chinese with English abstract).
- 孙乐, 倪云翔, 丁之德, 2016. 宫内环境变化对子代大脑海马发育影响的分子机制[J]. 国际妇产科学杂志, 43(5): 547–551, 560. SUN LE, NI YUNXIANG, DING ZHIDE, 2016. The epigenetic influence of intrauterine environment changes on offspring's hippocampal development[J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 43(5): 547–551, 560 (in Chinese with English abstract).
- 王晶, 李红玲, 赵龙, 等, 2018. 不同疗程高压氧治疗对脑出血大鼠血肿周围 AQP4 和 SOD 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 33(1): 29–35. WNAG JING, LI HONGLING, ZHAO LONG, et al, 2018. Effects of different hyperbaric oxygen treatment courses on perihematomal edema and expression of aquaporin-4 and superoxide dismutase in rats with intracerebral hemorrhage[J]. Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 33(1): 29–35 (in Chinese with English abstract).
- 武柠子, 马慧萍, 王宁, 等, 2016. 脑水肿分子机制的研究进展[J]. 解放军医药杂志, 28(6): 14–18. WU NINGZI, MA HUIPING, WANG NING, et al, 2016. Progression on molecular mechanisms of cerebral edema[J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 28(6): 14–18 (in Chinese with English abstract).
- 袁牧, 王昌留, 王一斐, 等, 2016. 超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 25(6): 550–558. YUAN MU, WANG CHANGLIU, WANG YIFEI, et al, 2016. Progress in the research of superoxide dismutase[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 25(6): 550–558 (in Chinese with English abstract).
- 朱丹, 李宏俊, 高祥刚, 等, 2010. 文蛤胞内铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆与序列分析[J]. 生物技术通报, (11): 123–128, 133. ZHU DAN, LI HONGJUN, GAO XIANGGANG, et al, 2010. Molecular cloning and sequence analysis of an intracellular Cu/Zn-superoxide dismutase gene from Hard Clam (*Meretrix meretrix*)[J]. Biotechnology Bulletin, (11): 123–128, 133 (in Chinese with English abstract).
- ADZIGBLI L, YU WANMEI, LI JUNHUI, et al, 2019. Influence of age on pearl production performance, enzymatic activity, and immune-related gene expression of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. North American Journal of Aquaculture, 81(4): 430–437.
- ADZIGBLI L, WANG ZIMAN, LI JUNHUI, et al, 2020. Survival, retention rate and immunity of the black shell colored stocks of pearl oyster *Pinctada fucata martensii* after grafting operation[J]. Fish & Shellfish Immunology, 98: 691–698.
- BAO YONGBO, LI LI, XU FEI, et al, 2009. Intracellular copper/zinc superoxide dismutase from bay scallop *Argopecten irradians*: its gene structure, mRNA expression and recombinant protein[J]. Fish & Shellfish Immunology, 27(2): 210–220.
- BELAYEV L, LU YOUMING, BAZAN N G. 2012. Chapter 35-brain ischemia and reperfusion: cellular and molecular mechanisms in stroke injury[M]//BRADY S T, SIEGEL G J, ALBERS R W, et al, Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology. New York: Academic Press: 621–642.
- CAO SHENGLONG, ZHU PING, YU XIAOBO, et al, 2016. Hydrogen sulfide attenuates brain edema in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats: Possible involvement of MMP-9 induced blood-brain barrier disruption and AQP4 expression[J]. Neuroscience Letters, 621: 88–97.
- DAI WANGSHU, YAN JUNJUN, CHEN GUANGZONG, et al, 2018. AQP4-knockout alleviates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in astrocytes via SPHK1/MAPK/AKT signaling[J]. International Journal of Molecular Medicine, 42(3): 1716–1722.
- HO J D, YEH R, SANDSTROM A, et al, 2009. Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(18): 7437–7442.
- HUA WEI, CHEN XUEMEI, WANG JUNMIN, et al, 2020. Mechanisms and potential therapeutic targets for spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. Brain Hemorrhages, 1(2): 99–104.
- KIM K Y, LEE S Y, CHO Y S, et al, 2007. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc-and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 23(5): 1043–1059.
- LI CHENGHUA, SUN HUILI, CHEN AIQIN, et al, 2010. Identification and characterization of an intracellular Cu, Zn-superoxide dismutase (icCu/Zn-SOD) gene from clam *Venerupis philippinarum*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 28(3): 499–503.
- LIN Y C, VASEEHARAN B, CHEN J C, 2008. Identification of the extracellular copper-zinc superoxide dismutase (ecCuZnSOD) gene of the mud crab *Scylla serrata* and its expression following  $\beta$ -glucan and peptidoglycan injections[J]. Molecular Immunology, 45(5): 1346–1355.
- LIU YANJUN, TANG XIANGQI, 2018. Depressive syndromes in autoimmune disorders of the nervous system: prevalence, etiology, and influence[J]. Frontiers in Psychiatry, 9: 451.

- NELSON P A, KHODADOUST M, PRODHOMME T, et al, 2010. Immunodominant T cell determinants of aquaporin-4, the autoantigen associated with neuromyelitis optica[J]. *PLoS One*, 5(11): e15050.
- NI DUOJIAO, SONG LINSHENG, GAO QIANG, et al, 2007. The cDNA cloning and mRNA expression of cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) gene in scallop *Chlamys farreri*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(5): 1032–1042.
- PANNICKE T, WURM A, IANDIEV I, et al, 2010. Deletion of aquaporin-4 renders retinal glial cells more susceptible to osmotic stress[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 88(13): 2877–2888.
- PAPADOPOULOS M C, VERKMAN A S, 2007. Aquaporin-4 and brain edema[J]. *Pediatric Nephrology*, 22(6): 778–784.
- PÉREZ-HERNÁNDEZ M, FERNÁNDEZ-VALLE M E, RUBIO-ARAIZ A, et al, 2017. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) produces edema due to BBB disruption induced by MMP-9 activation in rat hippocampus[J]. *Neuropharmacology*, 118: 157–166.
- SUN H, LIANG R, YANG B, et al, 2016. Aquaporin-4 mediates communication between astrocyte and microglia: implications of neuroinflammation in experimental Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 317: 65–75.
- SUN LIN, LI MAN, MA XUN, et al, 2019. Inhibiting high mobility group box-1 reduces early spinal cord edema and attenuates astrocyte activation and aquaporin-4 expression after spinal cord injury in rats[J]. *Journal of Neurotrauma*, 36(3): 421–435.
- ULUSOY C, TÜZÜN E, KÜRTÜNCÜ M, et al, 2012. Comparison of the cytokine profiles of patients with neuronal-antibody-associated central nervous system disorders[J]. *International Journal of Neuroscience*, 122(6): 284–289.
- WANG HONGHAO, ZHONG XIAONAN, WANG KAI, et al, 2012. Interleukin 17 gene polymorphism is associated with anti-aquaporin 4 antibody-positive neuromyelitis optica in the Southern Han Chinese-A case control study[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 314(1–2): 26–28.
- WANG LIUHUA, TANG HUA, WANG CHAO, et al, 2019. Aquaporin 4 deficiency alleviates experimental colitis in mice[J]. *The FASEB Journal*, 33(8): 8935–8944.
- YANG JINGYU, XUE XUE, TIAN HUA, et al, 2014. Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 144(3): 321–337.
- ZHANG HUA, OU ZEKUI, XU MENG, et al, 2018. Molecular cloning and characterization of a putative mitogen-activated protein kinase (Erk1/2) gene: Involvement in mantle immunity of *Pinctada fucata*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 80: 63–70.
- ZHAO XIAOXIA, WANG QINGHENG, JIAO YU, et al, 2012. Identification of genes potentially related to biomineralization and immunity by transcriptome analysis of pearl sac in Pearl Oyster *Pinctada martensii*[J]. *Marine Biotechnology*, 14(6): 730–739.
- ZHOU YU, LU ZUNENG, GUO YUANJIN, et al, 2010. Favorable effects of MMP-9 knockdown in murine herpes simplex encephalitis using small interfering RNA[J]. *Neurological Research*, 32(8): 801–809.