

CgLITAF通过调节CgTNF介导的细胞凋亡参与长牡蛎的免疫反应

An LPS-induced TNF- α factor involved in immune response of oyster *Crassostrea gigas* by regulating CgTNF mediated apoptosis

汤春雨, 乔雪, 靳昱昊, 杨文文, 于卓, 王玲玲*, 宋林生

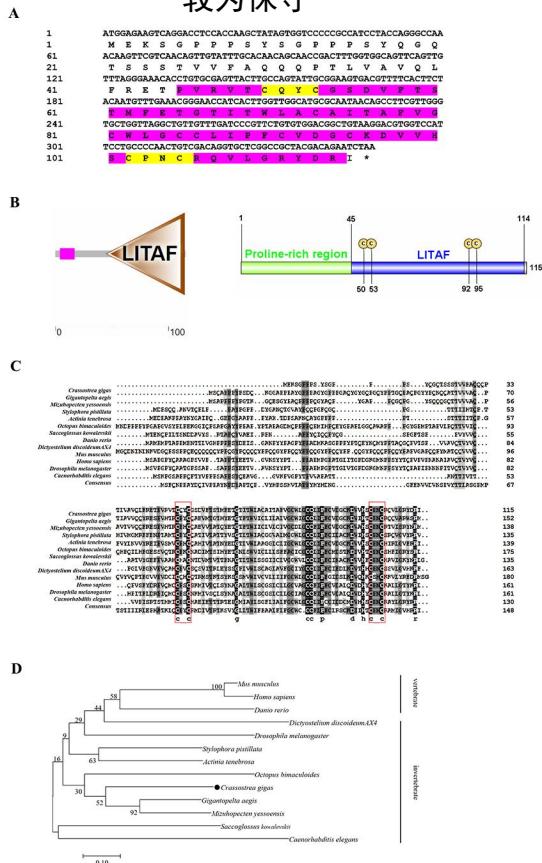
大连海洋大学辽宁省海洋动物免疫学重点实验室, 大连, 116023, 中国
大连海洋大学水生动物疫病防治重点实验室, 大连, 116023, 中国

摘要

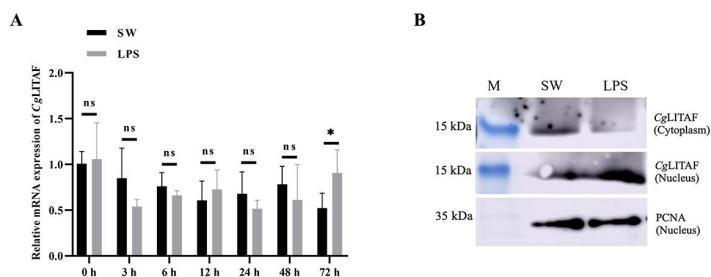
LPS诱导的TNF- α 因子 (LPS induced TNF- α factor, LITAF) 是一种参与炎症反应调控的转录因子, 能够诱导肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) 的表达。本研究从长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 中鉴定到一个具有保守zf-LITAF样锌指结构域的LITAF同源物 (CgLITAF)。CgLITAF在长牡蛎外套膜、鳃、肝胰腺、唇瓣、性腺、血淋巴、神经节和闭壳肌等组织中均有表达, 其中在肝胰腺、神经节和血淋巴细胞中表达量较高。LPS处理后, 血淋巴细胞中CgLITAF mRNA表达量的变化不显著, 但CgLITAF蛋白发生明显的转位入核现象。注射CgLITAF的siRNA后, 成功抑制CgLITAF的表达, 是对照组的0.31倍 ($p < 0.01$)。在CgLITAF-RNAi牡蛎中, 血淋巴细胞的总凋亡率显著下降, 为对照组的0.39倍 ($p < 0.001$)。血淋巴细胞中CgTNF3 (LOC105343080)、CgTNF4 (LOC105341146) 及细胞凋亡相关分子 (CgBax、CgCytochrome c、CgCaspase3和CgCaspase9) 的表达量显著降低, 分别为对照组的0.54倍 ($p < 0.05$)、0.50倍 ($p < 0.01$)、0.59倍 ($p < 0.001$)、0.55倍 ($p < 0.01$)、0.85倍 ($p < 0.05$) 和0.64倍 ($p < 0.05$)。但血淋巴细胞中CgBcl的mRNA表达水平显著升高, 为对照组的1.34倍 ($p < 0.05$)。同时, CgTNFs (LOC105343080、LOC105341146) 均可以和受体CgTNFR (LOC105322800) 蛋白进行相互结合, 结合系数分别为 1.069×10^{-5} M和 1.197×10^{-6} M。以上结果表明, CgLITAF可能通过介导CgTNF表达, 进而与相应受体结合影响细胞凋亡相关因子的表达, 在长牡蛎免疫应答过程中发挥着重要的作用。

结果

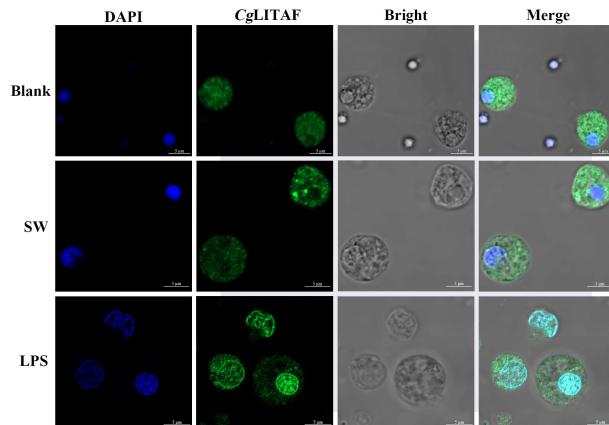
1. CgLITAF含有CXXC基序, 在进化上较为保守



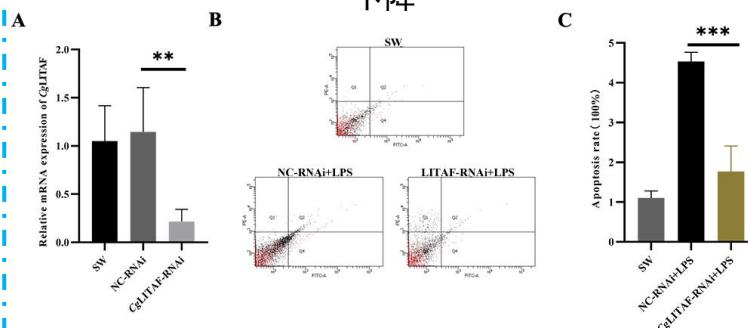
4. LPS刺激后血淋巴细胞中CgLITAF mRNA表达量变化不显著, 但其蛋白发生了明显的转位入核现象



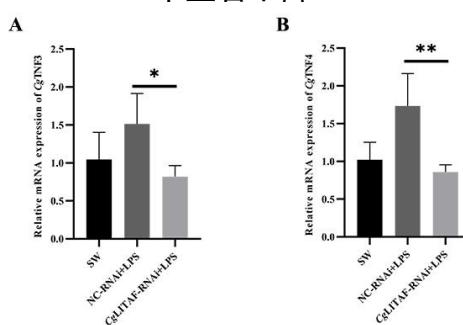
5. LPS刺激后CgLITAF在血淋巴细胞中发生了明显的入核现象



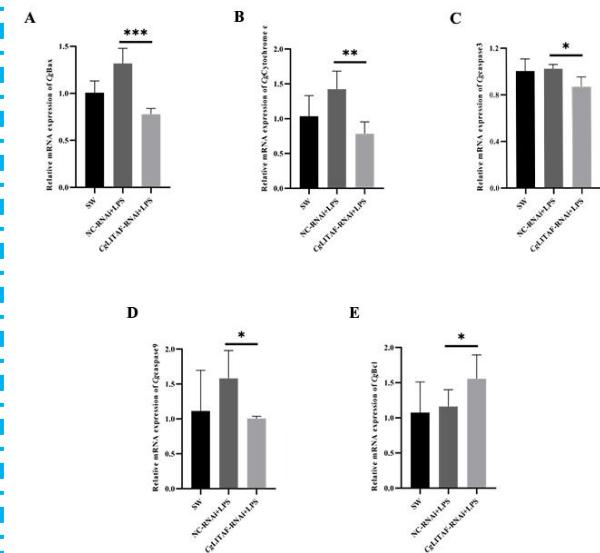
6. 干扰CgLITAF后牡蛎血淋巴细胞的凋亡水平显著下降



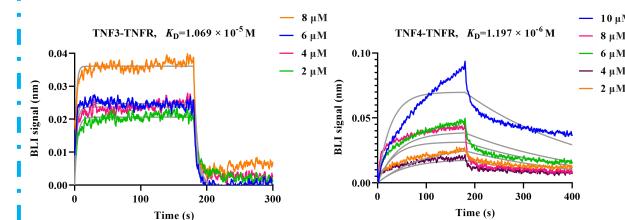
7. 干扰CgLITAF后牡蛎中CgTNFs的mRNA表达水平显著下降



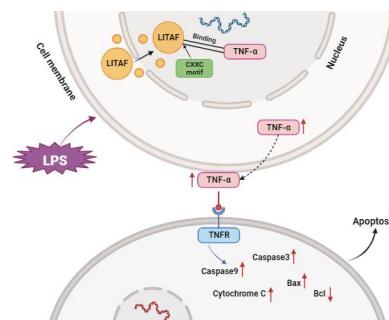
8. 干扰CgLITAF后牡蛎中促凋亡因子的mRNA表达水平显著下降, 抑凋亡因子的mRNA表达水平则显著升高



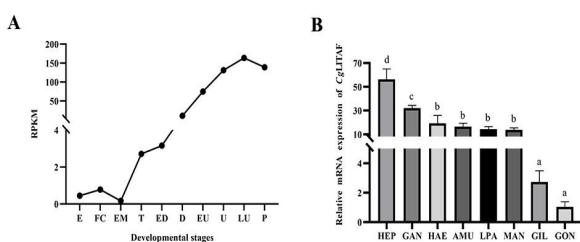
9. CgTNFs和CgTNFR能相互结合



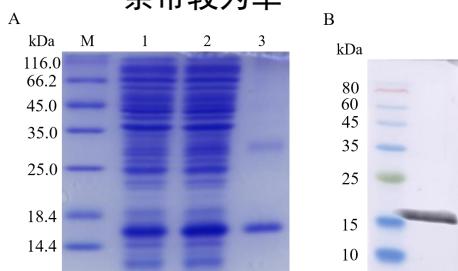
结论



2. CgLITAF在牡蛎幼虫和成体不同组织中均有表达



3. CgLITAF的重组蛋白和多克隆抗体条带较为单一



1. CgLITAF具有能和CgTNF启动子区结合的CXXC基序;
2. CgLITAF在幼体和成体各组织中都有表达, 且在肝胰腺、神经节和血淋巴细胞中表达量较高, 说明其能够参与牡蛎的免疫反应;
3. LPS刺激后, CgLITAF会发生转位入核, 说明LPS是诱导CgLITAF转位入核的强效刺激物;
4. LPS刺激后, CgLITAF能显著诱导凋亡相关因子和CgTNFs的表达;
5. CgLITAF诱导的CgTNFs能和受体CgTNFR相互结合, 进而诱导凋亡。