



高温胁迫下长牡蛎RIPK通过泛素化修饰调控细胞凋亡

The involvement of *CgRIPK* ubiquitination in regulating haemocyte apoptosis after high temperature stress in Pacific oyster *Crassostrea gigas*

刘倩, 刘畅*, 赫倩倩, 宋林生, 王玲玲*

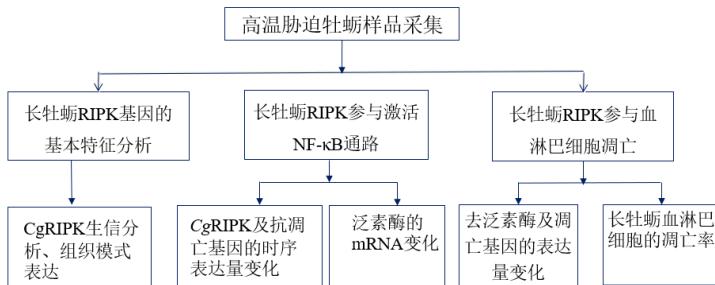
大连海洋大学辽宁省海洋动物免疫学重点实验室, 大连, 116023, 中国

前言

受体相互作用蛋白激酶 (RIPK) 是细胞凋亡的关键调节因子, RIPK存在多种多聚泛素化修饰, 且多聚泛素化修饰种类和水平的变化能决定细胞的命运——炎症、凋亡或坏死。RIPK1激酶的死亡结构域与死亡受体结合并参与调节细胞凋亡, 细胞凋亡抑制蛋白IAP1/2催化RIPK1的K63和K11泛素链修饰, 促进NF- κ B的下游激活,进而控制促生存基因的表达。去泛素酶CYLD和A20可以去除RIPK1的泛素链, 去泛素化的RIPK1参与细胞凋亡复合物的形成, 介导细胞凋亡。

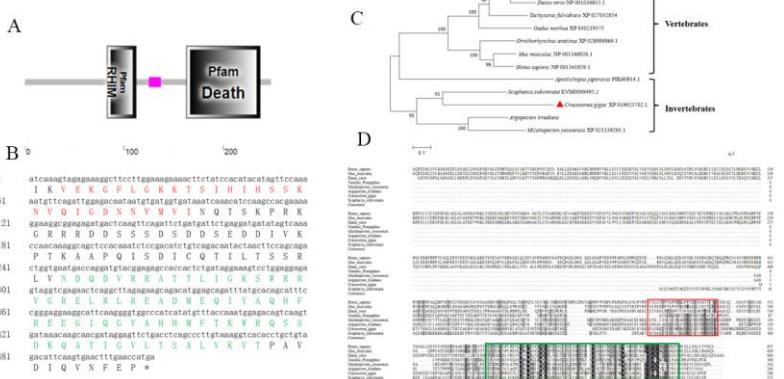
作为夏季牡蛎的主要应激源之一, 高温通常会影 响牡蛎的新陈代谢、免疫、生长发育等许多基本生理过程。本研究以长牡蛎为研究对象, 利用分子生物学和细胞生物学等技术手段, 分析*CgRIPK*在高温胁迫刺激后泛素化水平变化和细胞凋亡率的关系, 以期为进一步深入研究*CgRIPK*在血淋巴细胞的外源性死亡受体通路中参与调控细胞生存及凋亡的机理奠定基础。

材料与方 法



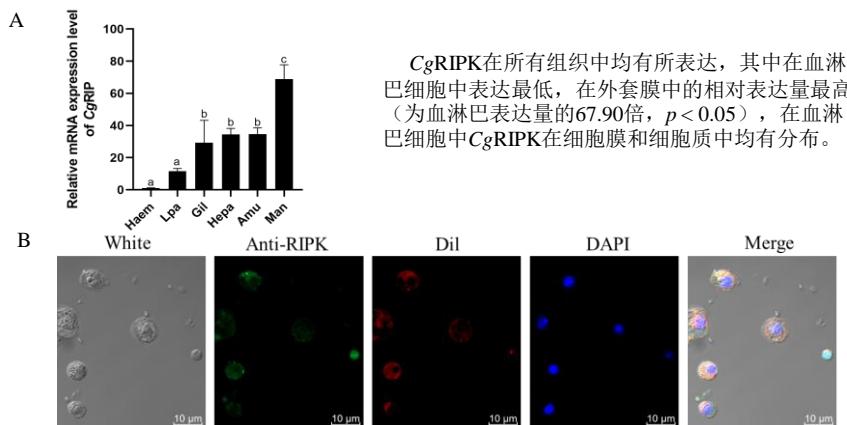
结果

1. *CgRIPK*的序列特征及系统发育关系



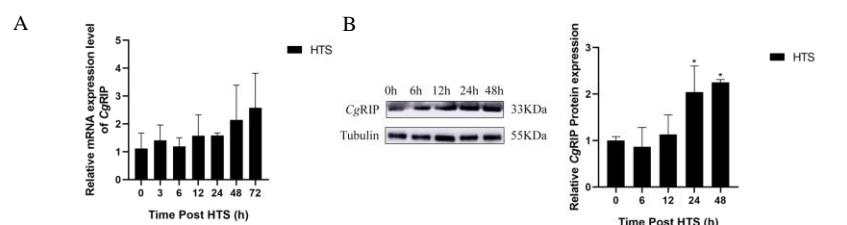
*CgRIPK*的开放阅读框为747bp, 编码248个氨基酸预测其分子量为27.6kDa。包括RHIM结构域和Death结构域。13个RIPK在系统发育树中分为原口动物和后口动物两个分支。*CgRIPK*的推导氨基酸序列与毛蚶具有较高的相对相似性 (EVM0009495.1, 27.60%), 与其他物种的RIPK相似性较低。

2. *CgRIPK*mRNA的组织分布及其在血淋巴细胞中的亚细胞定位



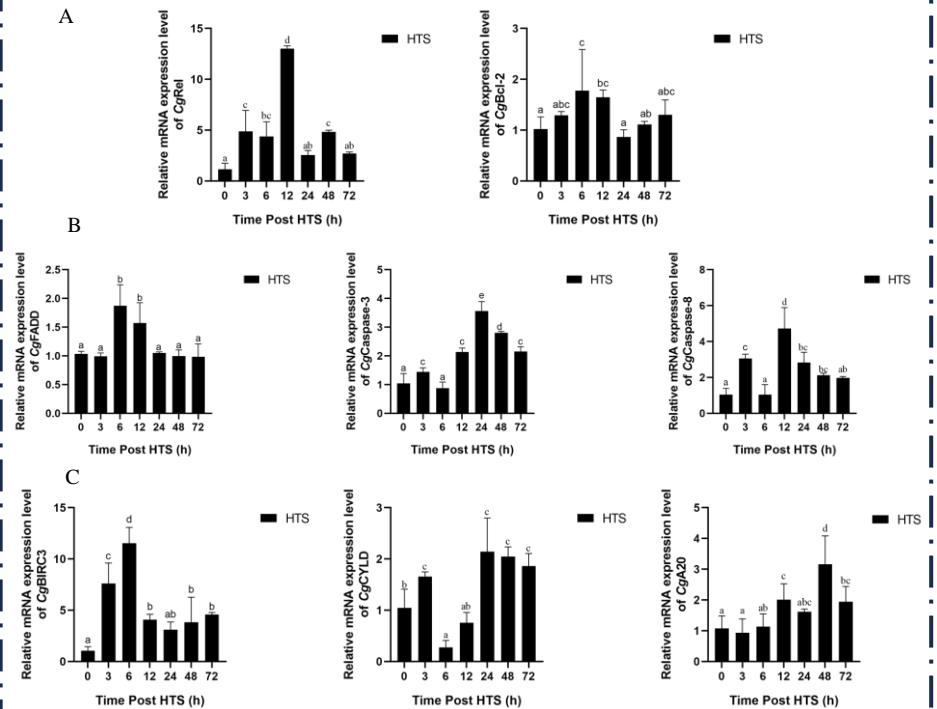
*CgRIPK*在所有组织中均有所表达, 其中在血淋巴细胞中表达最低, 在外套膜中的相对表达量最高 (为血淋巴表达量的67.90倍, $p < 0.05$), 在血淋巴细胞中*CgRIPK*在细胞膜和细胞质中均有分布。

3. 高温胁迫后 *CgRIPK*的mRNA及蛋白表达情况



高温胁迫后*CgRIPK*的mRNA及蛋白表达量逐渐升高, 其中*CgRIPK*的mRNA表达量变化不明显, 高温刺激24h及48h *CgRIPK*蛋白表达量与对照组 (15 $^{\circ}$ C) 相比显著增加。

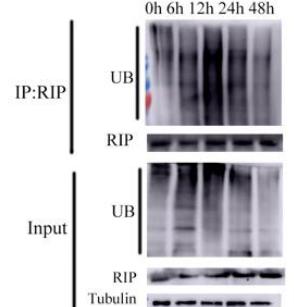
4. 高温胁迫后 *CgRIPK*泛素修饰酶及 *CgRIPK*下游基因的mRNA表达情况



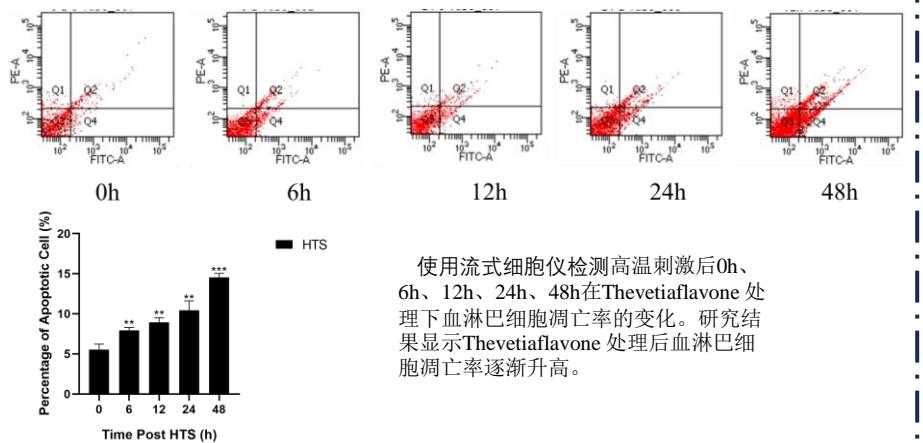
抗凋亡相关基因的mRNA表达量在胁迫前12小时逐渐上升, 在12小时达到最高, 之后逐渐下降。凋亡相关基因的mRNA表达量在28 $^{\circ}$ C胁迫12小时后开始升高。泛素酶C-IAP1表达量在高温胁迫后逐渐升高, 在6小时达到最高, 12小时后逐渐降低。去泛素化酶CYLD及A20表达量在胁迫12小时后显著升高。

5. 高温刺激后RIPK泛素化变化

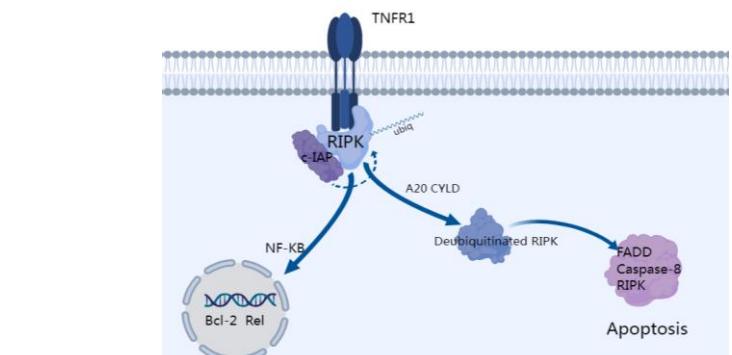
高温刺激后*CgRIPK*泛素化情况。高温刺激后RIPK的泛素化的 smear条带先强后弱, 表明高温胁迫后*CgRIPK*的泛素化水平呈现先升高后降低的趋势。



6. 高温刺激后血淋巴细胞凋亡率的检测



使用流式细胞仪检测高温刺激后0h、6h、12h、24h、48h在Thevetiaflavone处理下血淋巴细胞凋亡率的变化。研究结果显示Thevetiaflavone处理后血淋巴细胞凋亡率逐渐升高。



CONCLUSION

在高温胁迫12小时内, *CgRIPK*被泛素化修饰, 启动抗凋亡途径; 胁迫12小时后, *CgRIPK*去泛素化, 开启凋亡途径, *CgRIPK*可能通过不同程度的泛素化修饰调节细胞存活和凋亡。