

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2018.02.009

合浦珠母贝胸腺素 $\beta 4$ (thymosin $\beta 4$) 插核损伤和发育时期的表达研究

何文耀^{1,2}, 范嗣刚¹, 刘宝锁¹, 张 博¹, 周 童^{1,2},
苏家齐¹, 邓正华¹, 喻达辉³

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 钦州学院, 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西 钦州 535011)

摘要: 胸腺素 $\beta 4$ (thymosin $\beta 4$) 具有抗菌、抑制炎症和促进伤口愈合等作用。该研究克隆了合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 胸腺素 $\beta 4$ (*Pfthymosin $\beta 4$*) 的基因序列。该基因长 261 bp, 其中开放阅读框 (open reading frame, ORF) 126 bp, 编码 42 个氨基酸。生物信息学分析发现, 胸腺素 $\beta 4$ 的蛋白理论分子量为 4.78 ku; 具有典型的“THY”特征模体和胸腺素 β 家族的特征序列; 氨基酸序列保守性很高, 与其他物种相似性达 90% 以上。荧光定量 PCR 结果表明, *Pfthymosin $\beta 4$* 在各组织中均有表达, 其中在血细胞中表达量最高, 其次是足与鳃。插核手术后取血细胞和伤口组织, *Pfthymosin $\beta 4$* 在血细胞和伤口组织的表达量显著升高, 第 6 小时达到最高, 推测表达量升高的原因是 *Pfthymosin $\beta 4$* 促进血细胞向伤口处移动来参与合浦珠母贝伤口的前期修复。在各个发育时期中 *Pfthymosin $\beta 4$* 均有表达, 在变态期的表达量突然升高, 推测其可能参与了合浦珠母贝的变态附着过程。

关键词: 合浦珠母贝; 胸腺素 $\beta 4$; 表达分析; 伤口愈合; 发育时期

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2018)02-0066-09

Surgical injury and developmental stage expression of *thymosin $\beta 4$* gene in pearl oyster (*Pinctada fucata*)

HE Wenya^{1,2}, FAN Sigang¹, LIU Baosuo¹, ZHANG Bo¹, ZHOU Tong^{1,2},
SU Jiaqi¹, DENG Zhenghua¹, YU Dahui³

(1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea

Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. National Demonstration

Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation; Qinzhou University, Qinzhou 535011, China)

Abstract: Thymosin $\beta 4$ has antibacterial properties and inflammation inhibition function which can promote wound healing. This study cloned the gene sequence of *Pfthymosin $\beta 4$* from *Pinctada fucata*. The total length of the gene was 261 bp, with 126 bp open reading frame encoding 42 amino acids. Bioinformatics analysis reveals that the theoretical molecular weight of *Pfthymosin $\beta 4$* was

收稿日期: 2017-09-12; 修回日期: 2017-11-17

资助项目: 广东省自然科学基金项目 (2016A030313142); 广东省海洋与渔业局科技推广专项项目 (B201601-Z01); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2015TS28, 2016TS08); 广西自然科学基金重点项目 (2016GDNSTDA380013); 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室开放课题 (2017KB07); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项 (B201601-Z03)

作者简介: 何文耀 (1993—), 男, 硕士研究生, 从事水产生物功能基因研究。E-mail: 619150609@qq.com

通信作者: 喻达辉 (1963—), 男, 博士, 研究员, 从事水产养殖与生物技术研究。E-mail: pearlydh@163.com

4.78 ku, which had typical “THY” motif and thymosin β family signature sequences. It was highly conserved and had more than 90% similarity to other species. The results of qPCR show that *Pfthymosin $\beta 4$* was expressed in all tissues with the highest expression in hemolymph, followed by foot and gills. Hemolymphs and wound tissues were collected after the mantle-transplantation. The expression of *Pfthymosin $\beta 4$* in hemolymphs and wound tissues increased significantly and reached the maximum at 6th hour, which might be the reason that it promotes hemolymphs to move to the wound to participate in the wound pre-repair. The expression level of *Pfthymosin $\beta 4$* , which elevated at metamorphosis stage, was detected at each developmental stage of *P.fucata*. Therefore, it is speculated that *Pfthymosin $\beta 4$* might be involved in metamorphosis of *P.fucata*.

Key words: *Pinctada fucata*; *Pfthymosin $\beta 4$* ; expression analysis; wound repair; developmental stage

胸腺素是一类小分子多肽, 由 Goldstein 等^[1]于 1966 年在胎牛胸腺蛋白中首次发现。根据蛋白等电点 (PI) 的不同, 可以把胸腺素分成 α 、 β 、 γ 三个家族, 其等电点分别为 $PI < 5$ 、 $5 < PI < 7$ 、 $PI > 7$ ^[1-3]。其中胸腺素 β 是一段含有 40~44 个氨基酸且保守性很高的多肽, 至今为止发现了 15 种, 广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物之中^[4]。胸腺素 β 的功能很广, 具有一个能与肌动蛋白结合的结构域 (LK-KTET), 与肌动蛋白结合后, 使得肌动蛋白能以单体的形式存在于细胞内^[3]。除此之外, 胸腺素 $\beta 4$ 还有促进血管生成^[5-6]、创伤愈合^[7-8]、抑制炎症^[9]、修复心肌损伤^[10]、促进角膜修复^[11]、调节肿瘤转移和细胞迁移^[7,12]、参与机体免疫和抗菌^[13-14]、降低体内活性氧^[15]和促进毛囊生长^[16]等作用。胸腺素 $\beta 4$ 的研究主要集中在癌症、血管修复、角膜修复和心肌损失修复等医学研究方面, 在水生生物中的研究有机体免疫和抗菌、文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) 的发育^[17]、斑马鱼 (*Barchydanio rerio*) 的脑^[18]和心脏^[19]等, 尚未见合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 中的研究。

合浦珠母贝又称马氏珠母贝, 属于软体动物门、双壳纲、珍珠贝科, 是中国用于海水珍珠人工培育的主要贝类。在珍珠培育过程中会出现育珠贝死亡率高、留核率低等问题。为了解决这些问题, 在养殖过程中一般会对育珠贝进行术前处理和术后暂养。术前处理是通过促进育珠贝排精产卵或抑制性腺发育和降低生理机能使得其处于一个适合插核手术的状态, 为珍珠囊发育提供空间和降低育珠贝对插核小片的拮抗作用^[20], 而术后暂养同样是为了降低育珠贝对插核小片的排异能力, 增加留核率^[21]。虽然这些措施会明显降低死亡率和提高留核率, 但如果能对育珠贝伤口修复的分子机制进行研究, 了解伤口修复过程各种分子的变化及其所起的作用, 且找到一些比较重要的基因并加以利用, 使伤口恢复更快或珍珠囊形成更快, 将对进一步降低死亡率

和提高留核率有积极作用。胸腺素 $\beta 4$ 具有抑制炎症, 促进创伤愈合, 参与免疫反应等功能, 研究其在合浦珠母贝伤口修复过程中所起的作用具有很大的意义。本文通过荧光定量实验对胸腺素 $\beta 4$ 在合浦珠母贝的不同组织和插核手术后 (血细胞和伤口组织) 不同的时间点进行表达分析, 对其在伤口修复分子机制中所起到的作用进行初步研究, 以丰富合浦珠母贝伤口修复分子机制的研究资料。另外, 有报道^[17]指出胸腺素 $\beta 4$ 在文昌鱼的胚胎中可能发挥了保护的作用, 因此同时开展了胸腺素 $\beta 4$ 在合浦珠母贝的 5 个不同发育时期的表达分析, 为进一步探讨其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验于 2016 年 12 月在海南省陵水县新村热带水产研究开发中心进行。随机取 10 只合浦珠母贝 [(47±1.25) mm, 12 月龄] 的性腺、消化盲囊、闭壳肌、鳃、外套膜、足、肠和血细胞用于基因克隆与各组织表达分析。合浦珠母贝不同发育时期的样品参照王珍珍等^[22]的实验方法, 在合浦珠母贝卵细胞受精后第 8 小时、第 24 小时、第 14 天、第 20 天和第 24 天取 5 个不同发育时期 (担轮期、D 型期、壳顶期、眼点期、变态期) 的样品, 每个时期收集 3 管, 每管不少于 500 个幼虫 [育苗时温度 (27±3) °C, 盐度 30]。取 70 只贝进行插核手术, 但只插入小片不插入珠核, 并于第 0、第 2、第 4、第 6、第 12、第 24 和第 48 小时各取 10 只贝的血细胞 (6 000 g 离心 5 min 收集血细胞) 和伤口组织 (伤口周围 2 mm) 用于基因在插核手术后各小时血细胞和伤口组织上的表达分析。组织样品中加入 Sample Protector for RNA/DNA (TaKaRa) 后, 置于液氮中保存。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

用 RNAiso Plus (TaKaRa) 提取以上样品的总

RNA, 具体过程同说明书所述。用核酸微量定量仪 NanoDrop-2000 检测总 RNA 的浓度、纯度和 A_{260}/A_{280} 值。用 M-MLV (TaKaRa) 反转录酶进行反转录, 合成 cDNA 链, 用于 cDNA 序列扩增; 用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 试剂盒得到 cDNA 链, 用于实时定量 PCR 实验。

1.3 合浦珠母贝胸腺素 $\beta 4$ 基因验证

在合浦珠母贝转录组数据库中筛选出胸腺素 $\beta 4$ 序列。用 Primer Premier 5 设计引物 T $\beta 4$ -1F (AAACCCATTACCGACCAAAGAAA) 和 T $\beta 4$ -1R (TTGCTGGTTCACTCCACTGTCATAC), 以 cDNA 为模板进行 PCR, 反应总体积 20 μ L, 内含引物各 0.8 μ L, cDNA 模板 1 μ L。反应程序是 94 $^{\circ}$ C, 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。把目的片段进行胶回收 (上海生工), 用 pMDTM18-T (TaKaRa) 克隆试剂盒进行连接, 转化进 DH5 α (全式金) 并挑取单克隆。菌液 PCR 筛选出阳性克隆并送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.4 合浦珠母贝胸腺素 $\beta 4$ 基因生物信息学分析

BLASTX 对基因序列进行注释; 用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测开放阅读框; 用 BLASTN 进行基因的相似性分析, 下载其他物种的胸腺素序列用于进化树分析和多重序列比对; 用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测; 用 ExPASy 的 ProtParam 功能 (<http://web.expasy.org/prot-param/>) 分析蛋白性质; TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 预测跨膜螺旋; 跨膜结构域的预测用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 用 SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维结构预测; 用 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1) 进行功能域预测; 使用 DNASTAR 进行蛋白的二级结构预测; 运用 PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) 进行功能位点预测; 磷酸化位点预测用 NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>); 糖基化位点用 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测; 使用 Clustal X 和 Texmaker 进行多序列比对; 用 MEGA 5.0 的邻位相连法 (neighbor-joining, NJ) 构建进化树。

1.5 实时荧光定量 PCR

用胸腺素 $\beta 4$ 的 T $\beta 4$ -1F 和 T $\beta 4$ -1R 引物, 以合浦珠母贝的 18S [18S-F(GAGAAACGGCTAC CATCC)、18S-R(CACCAGACTTGCCCTCC AA)] 作为内参基因, 进行实时 qPCR。按照 TaKaRa 的 SYBR Premix Ex TaqTM Kit (Perfect Real Time) 说明书配制反应体系, 反应程序是 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 53 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环。每个样品 3 次重复, 每次设置 3 个复孔。实验数据使用 Δ CT 法 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 进行分析, 最后用 SPSS Statistical 17.0 进行数据统计分析。

2 结果

2.1 合浦珠母贝胸腺素 $\beta 4$ 序列与生物信息学分析

验证片段的测序结果与合浦珠母贝转录组数据中得到的胸腺素 $\beta 4$ 序列相同, 将其命名为 *Pf-thymosin $\beta 4$* (图 1)。基因核苷酸序列已提交到 NCBI, 获得的基因序列号为 MF807225。 *Pf-*

```

1 GAAGTACGTTGCAGAACCTAGGTTAAACATAAGGACCAAAATGTCGGACAAACCAGACA 60
1 M S D K P D M 7
61 TGAAGAAGTTACAAAGTTCGATAAATCAAAATTGAAGAAAAGTACAGACAGGAGAAAA 120
8 E E V T K F D K S K L K K T E T Q E K N 27
121 ACCCATTTACCGACCAAAGAAACAATTGATCAAGAGAAGAAAGGATAAGGAACGTATGTCA 180
28 P L P T K E T I D Q E K K G * 41
181 CCATAGCTTCTTAAAGGAGTGCCTGTAGCGGGTGGGGTATGACAGTGGAGTGAACCAGCA 240
241 AACTCTCGTTTTTTGAATGAA 261

```

图1 *Pfthymosin $\beta 4$* 基因cDNA序列展示

加粗字体为起始密码子和终止密码子, 下划线是 "THY" 特征模体, 阴影部分为胸腺素 β 家族特征序列, 方框表示磷酸化位点

Fig.1 Exhibition of *Pfthymosin $\beta 4$* cDNA

The start codon and the stop codon are in bold. The underlined is the "THY" characteristic pattern, and the shadowed section is the *thymosin β* family signature sequence. The box represents the phosphorylation site.

thymosin $\beta 4$ 的 5'非编码区 (UTR) 41 bp, 3'UTR 94 bp, 开放阅读框 126 bp, 共编码 41 个氨基酸。ProtParam 预测得知 *Pfthymosin* $\beta 4$ 的蛋白理论分子量为 4 781.43 u, 理论等电点 (PI) 是 6.19, 由 14 种氨基酸组成, 其中赖氨酸 (24.4%) 和谷氨酸 (14.6%) 占比较大, 半衰期为 30 h, 不稳定系数为 31.58。经 TMHMM、SignalP 4.1、NetNGlyc 1.0 和 TMPred 预测, *Pfthymosin* $\beta 4$ 没有跨膜结构域、信号肽、糖基化位点和跨膜螺旋区。NetPhos 3.1 预测发现基因有 7 个磷酸化位点 (2 个丝氨酸、5 个苏氨酸)。DNASTAR 软件预测蛋白二级结构有 3 个 α -螺旋, 4 个 β -转角和无规则卷曲。蛋白三维结构预测模型如图 4 所示。利用 SMART 和 PROSITE 预测发现, *Pfthymosin* $\beta 4$ 蛋白序列中的第 7 和第 40 个氨基酸之间是典型的“THY”特征模体, 第 18 和第 29 个氨基酸之间 (LKKTETQEKNPL) 的氨基酸序列是胸腺素 β 家族的特征序列。

2.2 胸腺素 $\beta 4$ 基因序列比对与进化分析

多重序列比对表明, 胸腺素 β 的保守性非常高 (图 2)。从氨基酸序列来看, 胸腺素 β 家族的特征序列 (LKKTETQEKNPL) 和 MSDKPD 序列的保守性高; 而从物种方面看, 与其他物种相似性达到了 90% 以上 (表 1), 相似性最高是眼斑雀鲋 (*Lepisosteus oculatus*)、双团刺胸蛙 (*Nanorana yunnanensis*)、白颊长臂猴 (*Nomascus leucogenys*)、南极岩斑鲑鱼 (*Notothenia coriiceps*)、花溪鲮 (*Kryptolebias marmoratus*)、海葵 (*Exaiptasia pallida*), 相似性为 95%; 而一致性达到 80% 以上, 最高是一致性 90% 的海蜗牛 (*Aplysia californica*), 其次是 88% 的海葵和花溪鲮。从 NJ 系统进化树 (图 3) 中可以看到, *Pfthymosin* $\beta 4$ 先与长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的 *thymosin* β 聚为一支, 再与南极岩斑鲑鱼聚为一支, 最后与陆生动物、两栖类动物聚为群组。

2.3 *Pfthymosin* $\beta 4$ 的时空表达及其对插核手术和不同发育时期的响应

Pfthymosin $\beta 4$ 在合浦珠母贝的血细胞中的表达量最高, 其次是足和鳃, 性腺、消化盲囊、闭壳肌、外套膜和肠表达量最低, 没有显著差异 (图 5)。在不同发育阶段中 *Pfthymosin* $\beta 4$ 均有表达 (图 6), 担轮期、壳顶期和眼点期的相对表达量没有统计学上的差异, D 型期与之相比下调了约 40%, 相对表达量在变态期时达到最高, 是眼点期的 2.2 倍

(相对表达量均用平均值 \pm 标准误表示, $n=4$)。

在插核手术后, 血细胞的 *Pfthymosin* $\beta 4$ 相对表达量在第 2、第 4 和第 6 小时持续升高, 并在第 6 小时达到高峰后下降, 第 24 小时回复正常水平, 第 48 小时升高 1 倍 (图 7-A); 而伤口组织的相对表达量开始时稍有下调, 到第 6 小时突然上调达到最高, 第 12 小时稍有下调, 第 24 小时回复正常, 第 48 小时下调, 相对表达量最低 (图 7-B)。

3 讨论

生物信息学分析显示所克隆的 *Pfthymosin* $\beta 4$ 含有“THY”特征模体和胸腺素 β 家族的特征序列, 表明所获得基因为胸腺素 β 家族成员之一。“THY”是胸腺素 β 家族成员特有的特征模体; 特征序列 LKKTETQEKNPL 是一段在胸腺素 $\beta 4$ 家族中高度保守的氨基酸序列, 涉及与肌动蛋白的结合^[23]。胸腺素 $\beta 4$ 与肌动蛋白结合是胸腺素 $\beta 4$ 发挥作用的一个重要过程。经预测 *Pfthymosin* $\beta 4$ 缺少跨膜结构域、信号肽、糖基化位点和跨膜螺旋区, 是一个结构简单的小分子蛋白。*Pfthymosin* $\beta 4$ 的不稳定系数为 31.58, 可以推测出 *Pfthymosin* $\beta 4$ 能稳定存在于水溶液中。多重序列比对结果显示, 合浦珠母贝胸腺素 $\beta 4$ 与其他物种相比一致性在 80% 以上, 且与海蜗牛的一致性更是达到 90%, 说明胸腺素 $\beta 4$ 是一个保守性很高的蛋白。基于 *Pfthymosin* $\beta 4$ 较高的保守性可推测胸腺素 $\beta 4$ 在合浦珠母贝体内发挥的功能可能与它在其他物种体内相似, 具有促进伤口愈合、血管生成、参与机体抗菌和降低体内活性氧等功能。从进化树中得出, *Pfthymosin* $\beta 4$ 先与长牡蛎的 *thymosin* β 聚为一支, 再与南极岩斑鲑鱼聚为一支, 最后与陆生动物、两栖类动物聚为群组, 这个趋势与生物学分类相符合。在已报道的文献中存在着相似的结果^[24-25], 其所研究的基因都先与亲缘相近的贝类聚为一支, 然后再与鱼类、两栖类和陆生生物聚为一支, 但是在合浦珠母贝的 *OAR* 基因构建的进化树中, 其与贝类聚类后先与节肢动物聚合后再与鱼类聚合, 最后再与两栖类和陆生生物聚为一支^[26]。

本实验通过实时荧光定量发现 *Pfthymosin* $\beta 4$ 在血细胞表达量最高, 其次是足与鳃, 而性腺、消化盲囊、闭壳肌、外套膜和肠的相对表达量与血细胞相比相差很大, 所以其低表达的原因可能是由于

表1 进化树和多重序列比对所用物种

Tab.1 Species used in phylogenetic trees and multiple sequences

物种名 species	基因 gene	一致性/% identity	相似性/% positive	登录号 accession No.
海葵 <i>Exaiptasia pallida</i>	<i>thymosin beta-12</i>	88	95	KXJ22858.1
花溪鲮 <i>Kryptolebias marmoratus</i>	<i>thymosin beta-12</i>	88	95	XP_017290006.1
南极岩斑鲑鱼 <i>Notothenia coriiceps</i>	<i>thymosin beta-like</i>	83	95	XP_010773615.1
智人 <i>Homo sapiens</i>	<i>TMSB4X</i>	83	92	AAH83509.1
白颊长臂猴 <i>Nomascus leucogenys</i>	<i>thymosin beta-4</i>	85	95	XP_012356370.1
双团刺胸蛙 <i>Nanorana yunnanensis</i>	<i>thymosin beta 4</i>	85	95	ABQ12775.1
绵羊 <i>Ovis aries</i>	<i>thymosin beta-4</i>	83	92	XP_014959023.1
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	<i>thymosin beta-4</i>	85	92	XP_005812264.1
眼斑雀鲷 <i>Lepisosteus oculatus</i>	<i>thymosin beta-4</i>	83	95	XP_006637965.1
海蜗牛 <i>Aplysia californica</i>	<i>thymosin beta</i>	90	94	NP_001191437.1
杂色鲮 <i>Cyprinodon variegatus</i>	<i>thymosin beta-4</i>	85	90	XP_015247492.1
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	<i>thymosin beta-4</i>	83	92	AAA42246.1
灰短尾负鼠 <i>Monodelphis domestica</i>	<i>thymosin beta-4</i>	83	92	XP_001364937.1
野骆驼 <i>Camelus ferus</i>	<i>thymosin beta-4</i>	83	92	XP_006195381.1
短嘴鸦 <i>Corvus brachyrhynchos</i>	<i>thymosin beta-4</i>	83	92	KFO55790.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	<i>thymosin beta-4</i>	83	92	NP_001001315.1
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	<i>Thymosin beta</i>	85	92	AKC01246.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	<i>thymosin beta-4</i>	80	95	NP_001124169.1
牛 <i>Bos taurus</i>	<i>thymosin beta-4</i>	80	92	DAA33518.1
非洲爪蛙 <i>Xenopus laevis</i>	<i>thymosin beta-4</i>	80	92	NP_001084321.1
西部锦龟 <i>Chrysemys picta bellii</i>	<i>thymosin beta-4</i>	80	92	XP_005287825.1
布氏鼠耳蝠 <i>Myotis brandtii</i>	<i>thymosin beta-4</i>	83	92	XP_014400899.1

组织中存在少量的血细胞,也可能是上述组织的 *Pfthymosin β4* 表达量相对于血细胞低很多。对皱纹盘鲍 (*Haliotis discus discus*)^[27]、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[28]、九孔鲍 (*H.diversicolor supertexta*)^[29] 等研究结果与本研究相似,血细胞在各组织中表达量最高;且在免疫刺激后对组织进行荧光定量 PCR 实验发现其在免疫刺激后上调,表明参与了机体免疫反应;研究人员对香港牡蛎 (*C.hongkongensis*) 注射胸腺素 β4 和溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 的混合物后发现其具有加速清除溶藻弧菌的功能^[15]。合浦珠母贝属于软体动物,只有先天免疫,缺乏特异性免疫,机体发挥免疫功能主要依赖血细胞,通过 *Pfthymosin β4* 在血细胞里高表达的现象和之前报道过的现象,可以推测胸腺素 β4 在

合浦珠母贝中很可能也参与了免疫反应。

在合浦珠母贝各个发育时期实时定量的结果中发现, *Pfthymosin β4* 在担轮期、壳顶期和眼点期之间的表达量无明显变化,与之相比 D 型期发生了下调,而变态期突然上调 2.23 倍。变态期是贝类幼苗发育的关键时期,在这个时期幼苗的生活习性会发生改变,从浮游生活转为附着生活。贝类附着变态过程受到物理因子、化学因子和生物因子的影响。其中蛋白激酶属于能影响贝类附着变态的一种影响因子,蛋白激酶 A 和 C 通过打开离子通道,使细胞发生去极化,使得幼虫对外界诱导物的敏感性增强,从而参与幼苗变态过程中的形态发生途径和调控途径^[30-31]。对于胸腺素 β4 与蛋白激酶 A 和 C 的关系暂时还未见有报道,但是有人报道过胸腺

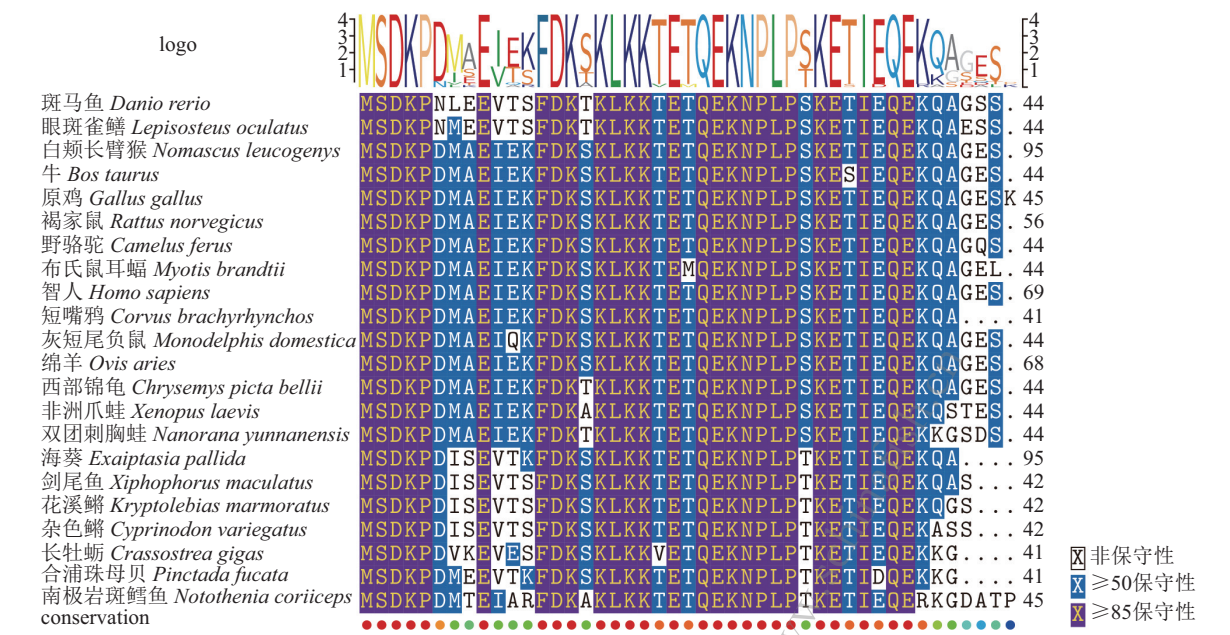


图2 *Pfthymosin* $\beta 4$ 与其他物种胸腺素 β 氨基酸序列的多重比对
相似性用首行字母的大小表示, 序列氨基酸数在右侧

Fig.2 Multiple alignment of amino acid sequences of *thymosin* β from *P.fucata* and others species
The similarity is indicated by the size of the first line of letters and the number of amino acids on the right side of the sequence.

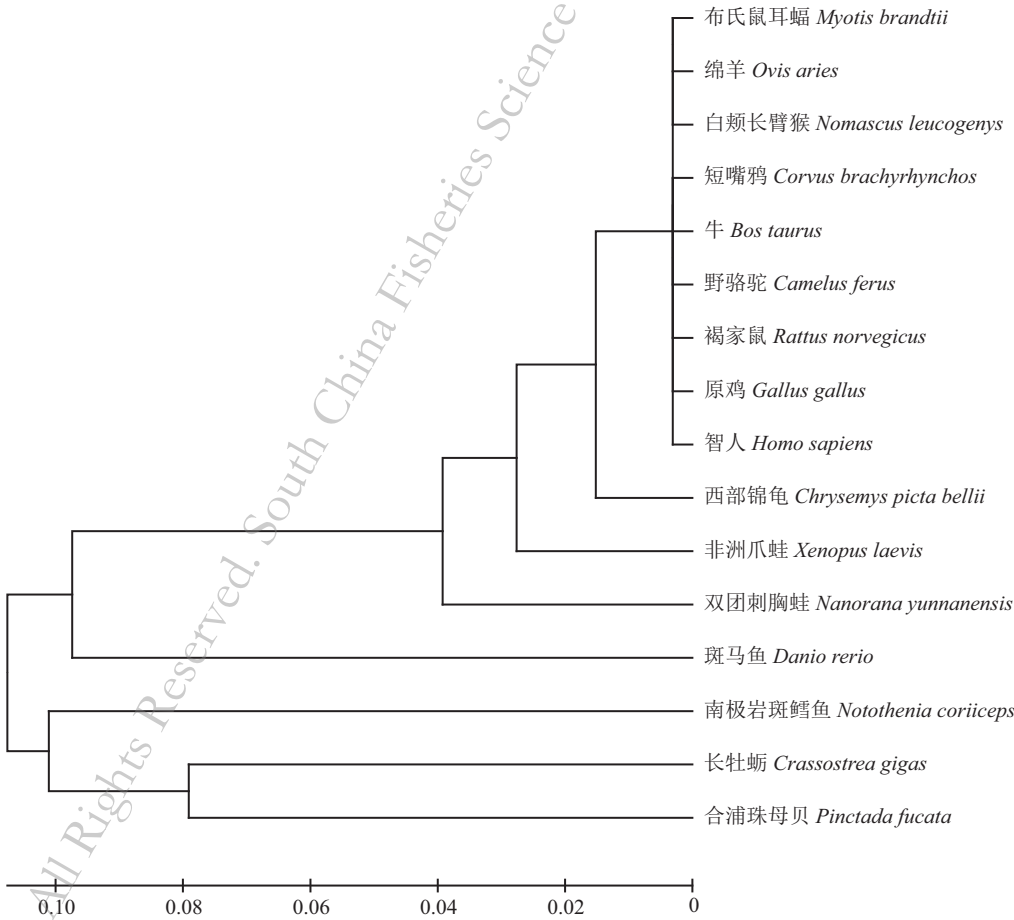


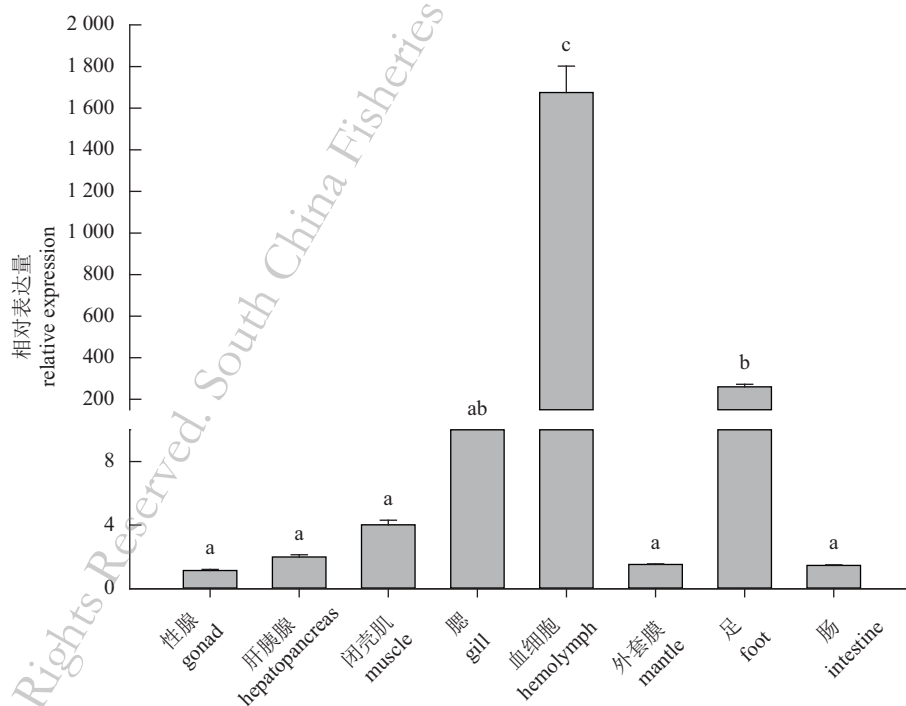
图3 基于*Pfthymosin* $\beta 4$ 氨基酸序列构建的NJ系统进化树
Fig.3 NJ phylogenetic tree based on amino acid sequences of *Pfthymosin* $\beta 4$

图4 *Pfthymosin* $\beta 4$ 基因蛋白三级结构的模型Fig.4 Protein tertiary structure model of *Pfthymosin* $\beta 4$

素 $\beta 4$ 能增强蛋白激酶 B 的活性和促进其磷酸化^[32-33], 而蛋白激酶家族成员存在着一段相似的约 270 个氨基酸构成的催化结构域, 所以胸腺素 $\beta 4$ 也可能存在着增强蛋白激酶 A 和 C 的活性和促使其磷酸化的能力, 从而参与幼苗的变态附着。

在插核手术后, *Pfthymosin* $\beta 4$ 在血细胞的相对表达量在第 0~第 6 小时持续升高, 并达到顶峰然后开始下降恢复到正常水平; 而在伤口组织中相对表达量与在血细胞中相似, 在第 6 小时上调达到最高。Bodendorf 等^[34]的研究证明, 机体受到损伤后的伤口液里会存在大量的胸腺素 $\beta 4$, 且在短时间内, 细胞内的胸腺素 $\beta 4$ 会大量的减少。他推测胸腺素 $\beta 4$ 是转谷氨酰胺酶的底物, 参与了胶原蛋白和纤维蛋白的交联, 且因子 XIII 会将胸腺素 $\beta 4$ 掺

入到纤维蛋白的 αC 结构中。所以合浦珠母贝在受到创伤后的第 0~第 6 小时相对表达量升高可能是因为血液和伤口组织在受到创伤后释放出了大量的胸腺素 $\beta 4$, 导致细胞内的胸腺素 $\beta 4$ 减少。胸腺素 $\beta 4$ 的减少可能会引起细胞内与胸腺素 $\beta 4$ 结合的肌动蛋白单体和装配的肌动蛋白之间的平衡发生紊乱, 导致了 *Pfthymosin* $\beta 4$ 的表达量升高, 以恢复细胞内的胸腺素 $\beta 4$ 水平, 维持肌动蛋白单体的平衡。另外, 贝类的伤口修复包括发炎、细胞增殖和组织重塑 3 个过程^[35], 伤口修复前期血细胞会清除伤口组织处受损的细胞, 发生炎症, 而胸腺素 $\beta 4$ 具有促进细胞迁移、细胞增殖、减低炎症等功能, 所以 *Pfthymosin* $\beta 4$ 在插核手术后表达量升高可能是因为 *Pfthymosin* $\beta 4$ 增加了血细胞的迁移速度, 使得血液中的血细胞数量增多且血细胞能更快地聚集在伤口处清除受损细胞, 抑制或者防止过激的炎症。而且有学者研究发现, 在香港牡蛎中注射重组的胸腺素 $\beta 4$ 后, 血液中的血细胞在第 6 小时有所增加, 而在第 12 小时达到最高, 与空白组相比血液中增加了约 1 倍的血细胞, 得出了胸腺素 $\beta 4$ 能增加香港牡蛎血液中的血细胞数量的结论^[15]。

图5 *Pfthymosin* $\beta 4$ 基因在不同组织中的表达

不同字母间表示差异显著 ($P < 0.05$), 后图同此

Fig.5 Relative expression level of *Pfthymosin* $\beta 4$ in different tissues

Significant different letters above vertical bars indicate significant difference ($P < 0.05$). The same case in the following figures.

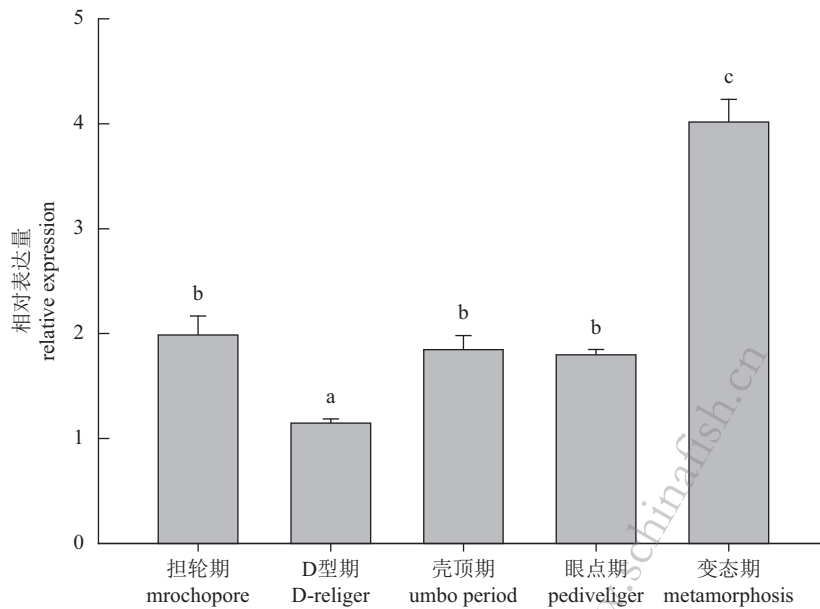


图6 *Pfthymosin* $\beta 4$ 基因在不同发育时期的表达

Fig.6 Relative expression level of *Pfthymosin* $\beta 4$ at different developmental stages

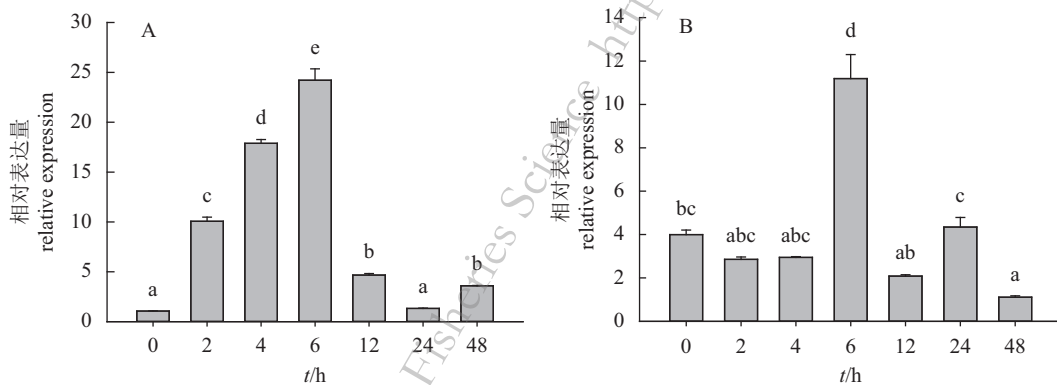


图7 *Pfthymosin* $\beta 4$ 基因在手术处理后不同时间的表达

A. 血细胞; B. 伤口组织

Fig.7 Relative expression level of *Pfthymosin* $\beta 4$ in different time after mantle-translate operation

A. hemolymph; B. wound tissue

参考文献:

- [1] GOLDSTEIN A L, SLATER F D, WHITE A. Preparation, assay and partial purification of thymic lymphocytopoietic factor (thymosin)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1966, 56(3): 1010-1017.
- [2] HOOPER J A, MCDANIEL M C, THURMAN G B, et al. Purification and properties of bovine thymosin[J]. Ann NY Acad Sci, 1975, 249(1): 125-144.
- [3] BADAMCHIAN M, MORA C A, BAUMANN C A, et al. Biodistribution of synthetic thymosin α_1 in the serum, urine and major organs of mice[J]. Int J Immunopharmacol, 1997, 19(2): 59-66.
- [4] 刘羽佳, 李集临. 胸腺素 $\beta 4$ 研究进展[J]. 安徽农学通报: 下半月刊, 2010(4): 38-44.
- [5] 王新波, 熊斌, 周瑞, 等. 胸腺素 $\beta 4$ 真核表达载体的构建及其对血管内皮细胞增殖的影响[J]. 武汉大学学报 (医学版), 2006(5): 564-568.
- [6] CHA H J, JEONG M J, KLEINMAN H K. Role of Thymosin $\beta 4$ in tumor metastasis and angiogenesis[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(22): 1674-1680.
- [7] 李艳, 王冠, 于虎, 等. 胸腺素 $\beta 4$ 促进创伤愈合过程中对多种生长因子及新生细胞迁移的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008(11): 2143-2147.
- [8] PHILP D, BADAMCHIAN M, SCHEREMETA B, et al. Thymosin $\beta 4$ and a synthetic peptide containing its actin-binding domain promote dermal wound repair in db/db diabetic mice and in aged mice[J]. Wound Repair Regen, 2003, 11(1): 19-24.
- [9] EVANS M A, SMART N, DUBE K N, et al. Thymosin $\beta 4$ -sulfoxide attenuates inflammatory cell infiltration and promotes cardiac wound healing[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2081.

- [10] 李晋菊, 吴柱国, 李涛. 胸腺素 $\beta 4$ 对心肌损伤修复的作用[J]. 广东医学院学报, 2012(1): 80-83.
- [11] 龙安华, 李明, 王晓坤, 等. 胸腺素 $\beta 4$ 促进角膜损伤修复研究现状[J]. 眼科新进展, 2010(6): 597-600.
- [12] SRIBENJA S, SAWANYAWISUTH K, KRAIKLANG R, et al. Suppression of thymosin $\beta 10$ increases cell migration and metastasis of cholangiocarcinoma[J]. BMC Cancer, 2013, 13(1): 1-14.
- [13] MA J Y, RUAN L W, XU X, et al. Molecular characteristics of three thymosin-repeat proteins from *Marsupenaeus japonicus* and their responses to WSSV infection[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2016, 35(4): 44-50.
- [14] SHI X Z, SHI L J, ZHAO Y R, et al. β -Thymosins participate in antiviral immunity of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Dev Comp Immunol, 2015, 51(2): 213-225.
- [15] LI J, ZHANG Y E, LIU Y, et al. A thymosin beta-4 is involved in production of hemocytes and immune defense of Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis*[J]. Dev Comp Immunol, 2016, 57: 1-9.
- [16] 陈颖, 杨涛, 程波, 等. 胸腺素 $\beta 4$ 影响毛囊生长的研究[J]. 临床皮肤科杂志, 2011(8): 457-460.
- [17] HUANG X W, ZHANG W, ZHANG H W. Phylogenetic analysis and developmental expression of *Thymosin- $\beta 4$* gene in amphioxus[J]. Dev Genes Evol, 2005, 215: 364-368.
- [18] ROTH L W, BORMANN P, BONNET A, et al. β -Thymosin is required for axonal tract formation in developing zebrafish brain[J]. Development, 1999, 126: 1365-1374.
- [19] SHIN S H, LEE S, BEA J S, et al. Thymosin beta4 regulates cardiac valve formation via endothelial-mesenchymal transformation in zebrafish embryos[J]. Mol Cells, 2014, 37(4): 330-336.
- [20] 邓陈茂, 梁飞龙, 符韶, 等. 马氏珠母贝术前处理与育珠研究[J]. 海洋湖沼通报, 2010(4): 124-128.
- [21] 邓陈茂, 童银洪, 符韶, 等. 马氏珠母贝的研究进展[J]. 现代农业科技, 2009(2): 204-206.
- [22] 王珍珍, 黄桂菊, 范嗣刚, 等. 合浦珠母贝 *matrilin-1* 基因的克隆和表达分析[J]. 南方水产科学, 2017, 13(1): 76-84.
- [23] SAFER D. The interaction of actin with thymosin beta 4[J]. J Muscle Res Cell Motil, 1992, 13(3): 269-271.
- [24] 王珍珍, 黄桂菊, 范嗣刚, 等. 合浦珠母贝骨形态发生蛋白 10 (BMP10) 基因的克隆与表达分析[J]. 南方水产科学, 2016, 12(6): 83-90.
- [25] 罗少杰, 陈伟耀, 杨创业, 等. 马氏珠母贝生长激素诱导跨膜蛋白基因 GHITM 克隆与表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 35(8): 1973-1980.
- [26] 王德清, 李海梅, 黄桂菊, 等. 合浦珠母贝章鱼胶受体 (OAR) 基因的克隆与表达分析[J]. 南方水产科学, 2017, 13(1): 58-65.
- [27] KASTHURI S R, PREMACHANDRA H K, UMASUTHAN N, et al. Structural characterization and expression analysis of a beta-thymosin homologue (T β) in disk abalone, *Haliotis discus discus*[J]. Gene, 2013, 527(1): 376-383.
- [28] GAI Y C, ZHAO J M, SONG L S, et al. Two thymosin-repeated molecules with structural and functional diversity coexist in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33(7): 867-876.
- [29] WU L, WU X. Molecular cloning and expression analysis of a β -thymosin homologue from a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(2): 379-382.
- [30] 张涛. 海洋无脊椎动物幼虫附着变态研究进展 I. 影响因素[J]. 海洋科学, 2000(1): 25-29.
- [31] 张涛. 海洋无脊椎动物幼虫附着变态研究进展 II: 附着变态模型及人工诱导物在经济贝类苗种生产中的应用[J]. 海洋科学, 2000(2): 38-41.
- [32] 乔海兵, 丁大有, 聂李亚, 等. 胸腺素 $\beta 4$ 对急性心肌梗死大鼠心肌磷酸化蛋白激酶表达及纤维化的影响[J]. 解剖学杂志, 2011, 34(5): 609-611.
- [33] SMART N, RISEBRO C A, MELVILLE A A, et al. Thymosin beta 4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization[J]. Nature, 2007, 445(7124): 177-182.
- [34] BODENDORF S, BORN G, HANNAPPEL E. Determination of thymosin $\beta 4$ and protein in human wound fluid after abdominal surgery[J]. Ann NY Acad Sci, 2010, 1112(1): 418-424.
- [35] 王玉树. 胸腺素 $\beta 4$ 的研究与开发进展[J]. 中国医药生物技术, 2009(1): 43-46.