

文章编号: 1674-5566(2023)03-0472-09

DOI:10.12024/jsou.20210603465

小体鲟 *Ar-tnfsf10* 和 *Ar-tnfrsf10* 基因的克隆、表达和功能初步探究

展敏月^{1,2,3}, 王 建^{2,3}, 范纯新^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 国际海洋研究中心海洋生物系统和神经科学研究所, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 为了探究 TNFSF 和 TNFRSF 在硬骨鱼中的表达和功能, 克隆小体鲟 *Ar-tnfsf10* 和 *Ar-tnfrsf10* 基因, 并对小体鲟 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 序列进行进化分析以及蛋白高级结构预测。结果表明, 小体鲟 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 在进化树中位于辐鳍亚纲的基部, 虽然与四足动物的 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 同源性不高, 但其三维结构与人的 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 相近。原位杂交结果显示: *Ar-tnfsf10* 和 *Ar-tnfrsf10* 均在小体鲟躯干水平肌隔、眼部的眶下管、前鳃盖管和腹侧吻端的神经丘处有较强表达。经 *Tnfrsf10* 特异性激活剂 Bioymifi 处理后, 小体鲟仔鱼整体结构无显著变化, 但神经丘中毛细血管显著增多。综上所述表明: 小体鲟 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 代表了硬骨鱼同源蛋白的原始形式, 可能特异性参与侧线神经丘毛细血管的发育。

关键词: 小体鲟; *Tnfsf10*; *Tnfrsf10*; 表达; 侧线; 机械感受器感觉细胞; 电感受器感觉细胞

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

肿瘤坏死因子超家族(TNFSF)和肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)是一类重要的细胞因子和受体。目前在人类中鉴定出了 19 种 TNFSF 和 29 种 TNFRSF, 它们除了促进细胞死亡外, 还参与细胞增殖、分化、炎症反应、自噬等多种生物学功能^[1]。

TNFSF 和 TNFRSF 广泛地存在于各类后生动物中。在珊瑚、果蝇、扇贝和海胆等物种中鉴定了多个 TNFSF 和 TNFRSF 成员, 尽管它们与脊椎动物序列相似性较低, 但都展示了调节发育、细胞凋亡和免疫的功能^[2-3]。鱼类的 TNFSF 和 TNFRSF 同样在免疫、代谢和发育中发挥重要作用。基因组加倍造成硬骨鱼 TNFSF 和 TNFRSF 成员更加多样化, 产生了多个新型家族成员^[4]。斑马鱼(*Danio rerio*)的 TNFSF 和 TNFRSF 研究得最为清楚, 它们除了诱导细胞凋亡作用外, 在斑马鱼脊索、造血细胞前体和侧线等结构中特异表达, 在多种器官发育和再生中起到重要作用^[5-7]。

TNFSF10 又称为 TNF 相关凋亡诱导配体

(TRAIL)。TNFRSF10 是 TNFSF10 的受体, 又称为死亡受体(Death receptor)。TNFSF10 和 TNFRSF10 是 TNF 超家族和受体超家族的重要成员, 在细胞死亡和炎症中发挥重要作用。本研究克隆了软骨硬鳞鱼类小体鲟(*Acipenser ruthenus*)的 *tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 两个基因的 cDNA, 预测了它们的三维结构, 并构建了系统进化树; 然后, 通过整体原位杂交检测了 *tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 在小体鲟仔鱼中的表达; 最后, 利用 TNFRSF10 激活剂 Bioymifi 研究了 *tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 在小体鲟仔鱼发育中的作用, 为进一步理解小体鲟 *tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 的表达和功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用小体鲟胚胎购于衢州市柯城区花园鲟鱼专业合作社。小体鲟胚胎在上海海洋大学实验室条件下进行孵化。养殖水温为 18 ~ 20 °C, 并向水体中曝气充氧。小体鲟的胚胎和仔

收稿日期: 2021-06-01 修回日期: 2022-01-19

基金项目: 国家自然科学基金(31772406, 31702329)

作者简介: 展敏月(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类发育生物学。E-mail: zhanminyue@126.com

通信作者: 范纯新, E-mail: cxfan@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

鱼分期参考前人关于西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 早期发育的报道^[8]。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 36 期的小体鲟初孵仔鱼 2 尾,用 TRIzol Reagent 采用一步法提取总 RNA。用第三代高效 cDNA 第一链合成试剂盒(诺唯赞)合成 cDNA。根据厂家说明书,小体鲟 RNA 和随机引物(Random hexamers)变性后,加入反转录试剂,于 50 °C 反转录 45 min,合成 cDNA,保存于 -20 °C。

1.2.2 基因克隆

以小体鲟仔鱼 cDNA 为模板,根据 GenBank

中的小体鲟 *tnfsf10* (XM_034904096) 和 *tnfrsf10* (XM_034912575) 基因设计引物(表 1)进行 PCR 扩增其阅读框(ORF)。PCR 程序:预变性 95 °C 5 min,变性 95 °C 30 s,退火 59 °C 30 s,延伸 72 °C 2 min,共 35 个循环,72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物用 DNA 产物纯化试剂盒(天根生物)纯化,然后用 TA 克隆方法连入拓扑异构酶的超快速克隆试剂盒(pCE2 TA/Blunt-Zero vector, 诺唯赞)。通过菌液 PCR 初步筛选阳性菌落,提质粒,并送往苏州金唯智生物科技有限公司进行测序鉴定,将小体鲟的两个基因命名为 *Ar-tnfsf10* 和 *Ar-tnfrsf10*。

表 1 本研究中所用的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequence	用途 Application
tnfsf10-O-F1	ATGCCATGGCTAACCAGAAC	基因克隆
tnfsf10-O-R1	GAGTGAAGGGCGTACTCTGC	基因克隆
tnfsf10-O-F2	CAGGTCTACTTCCGCTACCC	基因克隆
tnfsf10-O-R2	CATTCCCTGAGGTCACCACT	基因克隆
Tnfsf10-O-F1	CGTGACTCCGGTAAGACTG	基因克隆
Tnfsf10-O-R1	GCGAGGGTGACGTTACTTGA	基因克隆
Tnfrsf10-O-F2	ACAACGAGTCTCAGATGCCG	基因克隆
Tnfrsf10-O-R2	CCAGACACTCCATGAGAGCG	基因克隆
tnfsf10-P-F	CGCTACTACCTGTACTCTCA	原位杂交
tnfsf10-P-R	TAATACGACTCACTATAGGCCTCCCTGCTAGACAGAGTG	原位杂交
Tnfrsf10-P-F	GTGTGTGGGACCAGAGACAG	原位杂交
Tnfrsf10-P-R	TAATACGACTCACTATAGGAGACTCCGCATCTGAGACT	原位杂交

1.2.3 序列分析及进化树构建

利用 DNAMAN 对 *Ar-tnfsf10* 和 *Ar-tnfrsf10* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列进行分析。利用 Swiss-Model 基于小体鲟 Tnfsf10 和 Tnfrsf10 的同源蛋白,人 Tnfsf10 (TRAIL/Apo2L, PBD: 4N90) 和 Tnfrsf10 (DR5, PBD: 6T3J) 进行同源建模,预测 *Ar-Tnfsf10* 和 *Ar-Tnfrsf10* 三维结构。从 NCBI 下载斑点雀鳊 (*Lepisosteus oculatus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、原鸡 (*Gallus gallus*)、人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 的 Tnfsf10 和 Tnfrsf10 蛋白质序列(表 2 和表 3),分别以文昌鱼 Tnfrsf10 和 Tnfrsf21 为外群,用 Clustal X 进行多序列比对,利用 Mega 7 软件基于最大似然法(Maximum Likelihood)构建系统进化树。

1.2.4 整体原位杂交

以小体鲟初孵仔鱼(35 期)的 cDNA 为模板,

用含有 T7 启动子的特异性引物(表 1)扩增 *Ar-tnfsf10* 和 *Ar-tnfrsf10* 的 cDNA 片段。以该片段为模板,用 T7 聚合酶合成地高辛(DIG)标记的反义 RNA 探针。以含反义 RNA 探针的杂交液孵育仔鱼(44 期)进行杂交,以未加探针的杂交液作为空白对照。具体的原位杂交和显色过程参考文献[9]。

1.2.5 小分子化合物 Bioymifi 处理

Bioymifi (购自 MCE) 是人 TNFRSF10 的特异性激活剂,可以促进 DR5 聚合,启动下游信号转导^[10]。将 20 尾小体鲟初孵仔鱼(35 期)转至含有 50 μmol/L Bioymifi 胚胎水中培养,并以含等量 DMSO 胚胎水培养的同时期的的小体鲟仔鱼作为对照。待仔鱼发育至 44 期,用 4% PFA 固定过夜,甲醇梯度脱水,保存于 -20 °C 冰箱中。

表 2 其他物种的 *Tnfsf10* 与小体鲟 *Tnfsf10* 的氨基酸序列相似性对比
Tab. 2 Similarity between *Tnfsf10* of *Acipenser ruthenus* and other species

物种 Species	种名 Species name	基因登录号 GenBank Access No.	相似性 Similarity/%
斑点雀鳢	<i>Lepisosteus oculatus</i>	XP_006632788.2	71.34
青鳉	<i>Oryzias latipes</i>	XP_011485941.1	63.50
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	NP_571918.2	63.41
非洲爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001163915.1	40.44
原鸡	<i>Gallus gallus</i>	NP_989710.2	32.29
人	<i>Homo sapiens</i>	NP_003801.1	29.02
小鼠	<i>Mus musculus</i>	NP_033451.1	27.27
河鲀	<i>Takifugu rubripes</i>	XP_003966894.1	63.72
文昌鱼	<i>Branchiostoma floridae</i>	XP_035693834.1	34.04

表 3 其他物种的 *Tnfrsf10* 与小体鲟 *Tnfrsf10* 的氨基酸相似性对比
Tab. 3 Similarity between *Tnfrsf10* of *Acipenser ruthenus* and other species

物种 Species	种名 Species name	基因登录号 GenBank Access No.	相似性 Similarity/%
非洲爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001084466.1	51.75
斑点雀鳢	<i>Lepisosteus oculatus</i>	XP_015198636.1	40.59
原鸡	<i>Gallus gallus</i>	NP_989446.2	37.16
文昌鱼	<i>Branchiostoma floridae</i>	XP_035698158.1	36.30
青鳉	<i>Oryzias latipes</i>	XP_011479782.1	35.14
人	<i>Homo sapiens</i>	014763.2	34.23
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	NP_571915.2	33.77
小鼠	<i>Mus musculus</i>	NP_064671.2	32.92
牙鲆	<i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019937270.1	42.79
河鲀	<i>Takifugu rubripes</i>	XP_011617566.2	32.64

1.2.6 免疫组化及侧线感受器感觉细胞计数

小清蛋白 (Parvalbumin) 是一类 Ca^{2+} 结合蛋白, 可用于特异性标记侧线系统的机械感受器毛细胞和电感受器感觉细胞^[11]。将保存于甲醇的小体鲟仔鱼(44 期)梯度复水, 并用 PBST (1 × PBS, 0.1% Tween-20) 洗 5 次, 每次 5 min。将样品用封闭液(用 PBST 配制的 5% BSA)于室温封闭 2 h, 再用小清蛋白抗体 (Merck, 用封闭液以 1:200 稀释)于 4 °C 孵育过夜。经 PBST 洗 5 次, 每次 5 min 后, 加入二抗 (AF488 Goat anti-mouse IgG, Invitrogen, 用封闭液以 1:200 稀释)于室温、暗处孵育 2 h。经过 PBST 洗 5 次, 每次 5 min。在荧光体视显微镜下分别对侧线机械感受器和电感受器的感觉细胞计数并拍照。

2 结果

2.1 小体鲟 *Ar-tnfsf10* 和 *Ar-tnfrsf10* 基因的克隆与序列分析

Ar-tnfsf10 基因的开放阅读框 (ORF) 为 937

bp, 编码 323 个氨基酸, 该蛋白质的理论等电点 (PI) 为 6.86。利用 SMART 进行结构域分析发现: *Ar-tnfsf10* 的 36 ~ 58 位氨基酸为典型的跨膜结构域, 1 ~ 35 位氨基酸为胞内结构域, 172 ~ 321 位氨基酸为 TNF 同源结构域 (THD, 与 Tnf 受体结合), 见图 1。

Ar-tnfrsf10 基因的开放阅读框 (ORF) 长度为 1 311 bp, 编码 436 个氨基酸, 理论等电点 (PI) 为 5.46。利用 SMART 进行结构域分析发现: *Ar-tnfrsf10* 蛋白的 1 ~ 17 位氨基酸为信号肽; 46 ~ 80、83 ~ 123、125 ~ 165 位为胞外的富含半胱氨酸结构域 (CRD); 183 ~ 205 位氨基酸是跨膜结构域; 328 ~ 422 位氨基酸是胞质的死亡结构域 (DD), 见图 2。

另外, 以人 TRAIL 和 DR5 三级结构为模板, 用 SWISS-MODEL 预测 *Ar-tnfsf10* 和 *Ar-tnfrsf10* 的蛋白质三级结构 (图 3)。结果表明: *Ar-tnfsf10* 和 *Ar-tnfrsf10* 的三级结构与人的 TRAIL 和 DR5 高度相似。

```

1  ATGGCTAACCAACAACAGGATTACTTTAGATCCAACAGCAACGACTCAAAAACGTACATGGTGATCCCGCGG
1  M A N Q N N Q D Y F R S N S N D S K T Y M V I P A
76  GCCAAGCGAGGGGATGGTACATCTTCAAAGCTATGGATCGCCATGGTGGTCACTGTAGTAATTGTGCTACAGATT
26  A K R G D G T S S K L W I A M V V T V V J V L Q J
151  GCGTCTACCACGGGGCTGTCGTTTATTTCAACATGTCGATTTACAGACAAAAACCAAGGTGTGACTGAGGAG
51  A S T T G L F V Y F N M S I S Q T K N Q G V T E E
226  CTTAAATGCCTGAAACTCCTGAACAAGTAGAATACAATCGCTGGAGGACAGATCCCAGAGGAAGTGAGGGTG
76  L K C L K L L N K L E D T I A G G Q I P E E V R V
301  TTCATGGAGCCCTGCATGAAAGTGGCAGACAGCATCAAGTCATACATATCCAAGTTACTGAAAATGCCATCAGG
101  F M E P C M K V A D S I K S Y I S K V T E N A I R
376  AGACATGTCCTTCAAGAAGCAAGAAACATTCCAAGGAGTTTCAACAAATCGGATGTTCAAGTTGTGAGCGAAGTC
126  R H V L Q E A R N I P R S F N K S D V Q F V S E V
451  ACCCAAAGACCTTCCGCACACCTTTCTCTGAGGGACGCCAGCCATCAACCACACGATGAATCCCAGAGCAACGAC
151  T Q R P S A H L S L R D A S H Q P H D E S Q S N D
526  TTGCACCAGTCTTGCCGTCACCCCATCAGAACTGGGACACCGGCAGCTTCGGGTCGCACATCCACAACATGAGC
176  L H Q S C R H P I R N W D T G S F G S H I H N M S
601  CTGAGCGAGGGGTGGCTGAAAGTGCCCGGGACGGCCGCTACTACTGTACTCTCAGGCTACTTCCGCTACCCC
201  L S E G W L K V P R D G R Y Y L Y S Q V Y F R Y P
676  TCGGACTCCTCCCTGGACCCCAACGACGCCCGGAGAGCCAGTAGCAGCAGCCACCAGCTCGTCCAGTGT
226  S D S S L D P H N A A P E S H S S S S H Q L V Q C
751  GTCTACAAGAAGACGTCTACTGAAAGCCATTCTGCTGCTGAAAGGCGTGGGCACCAAGTCTGGCGGAAGAC
251  V Y K K T S Y L K P I L L L K G V G T K C W A E D
826  GCAGAGTACGCCCTTCACTCTGTCTACCAGGAGGGCTGTTTGAGTGAGATCAGGCGACGAGGCTTTGTGTGG
276  A E Y A L H S V Y Q G G L F E L R S G D E V F V S
901  GTGTGCTCCATGCCATGGTCTACGCCGACGAAACCTCCAGCTATTTCGGGGCCTCCGACTTGACCTGTGAGCG
301  V S S M P M V Y A D E T S S Y F G A F R L D L *

```

方框、星号、横线、虚线、阴影分别表示起始密码子、终止密码子、预测蛋白的胞内结构域、跨膜结构域和 TNF 同源结构域。

Box, asterisk, horizontal line, dashed line, and shaded box indicate the start codon, stop codon, intracellular domain, transmembrane domain and TNF homology domain of the predicted protein, respectively.

图 1 小体鲟 *tnfsf10* 基因的 cDNA 及其氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *tnfsf10* of *Acipenser ruthenus*

2.2 Ar-Tnfsf10 和 Ar-Tnfrsf10 的系统进化分析

将小体鲟 Ar-Tnfsf10 和 Ar-Tnfrsf10 氨基酸序列与代表性脊椎动物同源序列进行比对,发现 Ar-Tnfsf10 的氨基酸序列和斑点雀鳢的 Tnfsf10 相似性最高(71.34%),与小鼠 Tnfsf10 的相似性最低(27.27%),见表 2。Ar-Tnfrsf10 的氨基酸序列和非洲爪蟾 Tnfrsf10 的相似性最高(51.75%),和小鼠 Tnfrsf10 的相似性最低(32.92%),见表 3。

为了确定 Ar-Tnfsf10 和 Ar-Tnfrsf10 与其同源基因的系统进化关系,构建 Ar-Tnfsf10 和 Ar-Tnfrsf10 的系统进化树。Tnfsf10 进化树显示:人、小鼠、非洲爪蟾、原鸡的 Tnfsf10 聚为一支,Ar-Tnfsf10 与青鳉、斑马鱼、斑点雀鳢、河鲀等辐鳍鱼类的 Tnfsf10 聚为一支,且 Ar-Tnfsf10 位于辐鳍鱼类的基部[图 4(a)]。与 Tnfsf10 进化树相似,在 Tnfrsf10 进化树中:Ar-Tnfrsf10 与青鳉、斑马鱼、斑点雀鳢、河鲀等辐鳍鱼类的 Tnfrsf10 聚为一支,且 Ar-Tnfrsf10 位于辐鳍鱼类的基部[图 4(b)]。以上结果表明:脊椎动物 Tnfsf10 和 Tnfrsf10 进化速

度较快,但 2 个基因的系统进化树基本与脊椎动物的物种进化树一致,Ar-Tnfsf10 和 Ar-Tnfrsf10 的氨基酸序列均与其辐鳍亚纲祖先的遗传距离较近,代表了 2 个蛋白较原始的形式。

2.3 Ar-tnfsf10 和 Ar-tnfrsf10 在小体鲟仔鱼中的表达

为了了解 Ar-tnfsf10 和 Ar-tnfrsf10 在小体鲟仔鱼发育中的表达,采用整体原位杂交检测两者在第 44 期仔鱼中的表达。Ar-tnfsf10 集中表达在小体鲟头部的眶下管(io)、前鳃盖管(pop)、躯干后侧线系统(pll)、耳囊(ov)和腹侧吻端的神经丘(nm)周围组织(图版 I)。空白对照组中没有明显的信号,说明了 Ar-tnfsf10 探针的特异性(图版 I)。

Ar-tnfrsf10 的表达模式和 Ar-tnfsf10 基本重合,也主要表达于眶下管、前鳃盖管、躯干后侧线系统、耳囊和腹侧吻端的神经丘周围组织(图版 II)。2 个基因的表达模式提示其可能在侧线发育中发挥作用。

```

1   ATGACATTCTTTGGGATTAACACTATTACTTTAATTGCTCCATCTTTATGTATCCCGTGGACTCCGGTAAG
1   M N I L L L G L L T L F T L L I A P S L △△ P V D S G K
76  ACTGATCGGCTTGACAACGATGTATCGCTCAGAGAGAACGAGCAGCCCGAGAGATCACTGCCGAGGCGAGCAG
26  T D R L D N D V S L R E N R T A R E I T C R G E Q
151 TATCCTAACTCCGGTTCTGTCTGTTGAACTGTCTGCGGGACATATGTGAAGAAGAAGTGCACAACAGCGGGC
51  Y P N S G F C C L N C P A G T Y V K K K C T T A G
226 TCTAGTGGCAGTGTGCGGCGTGCACCCCTGGCACAGACTACACGGAGCACAGCAGCGGCTGGATCGCTGTCTT
76  S S G Q C A A C T P G T D Y T E H S S G L D R C L
301  CAGTGCCTCGCTGCTGCTCGGACCAAGAAGAGGGCGGTACCTTGCCTCCGTCGCAGAACCAGCGTTTGCAGTGC
101 Q C T R C R S D Q E E A V P C T P S Q N R V C Q C
376  AAGTCTGGCACCCTACTGCCTCCCGAGGAGCCCTGCGAGGTTTGAACAGCGTGTCTCAAAGTCCCGGAGGGG
126  K S G T H Y C L P E E P C E V C K R C S K C P E G
451  AAGGAGTGAGAAGAACTGCAATGCCACTGCAAAACCGTGTGTGGGACCAGAGACAGCCCTCCAGTGGCACA
151  K E V R R N C N A T A N T V C G T R D S P P A G T
526  GAATCAGATTCTTCTCAAGTAACGTACCCTCGCTGTGACTGCCCTTGATCTTTGTGGTGCTGTAGTGATT
176  E S D S S S S N V T L A V A L P L I F V V L L V I
601  GGGTTAATCTGTGGAGAAATCGTCCAGACGAGAACAGGGAGTGCATGTGAACACAGAACTCCCACGGACATT
201  G L L L W R N R P D E N R E L H V N T E T P T D I
676  CCAAGCACCTCTCCCCATAGAGATGCAGAACCACAACAACAACAGGCTCAGATCGGGAGTCTACCCAC
226  P S T S S P I E M Q N H N N N N E S Q M R E S T H
751  TTGCTGCAGGCTGAGCGCTCTCCCGAGACTGCAGGCCAGGACAGTGTACTGTGGACTGGGGGCGAGTCTCTCT
251  L L Q A E R S P E T A G Q D S D D C G L G G S L S
826  GACACAGCCCGCTGTCAGAACAGCCTCAGCAGCGCCCGTACCACAGCACCCTCCCGAGCGAGGAGCAGC
276  D T A A S S Q N S L S S A P Y H S T P P Q R G S S
901  ACCCTCCCGAGGAGGCCCTCCGTCTGACAGGCCAGTCTGCCAGCGTCCACGCTTGGAGTCAAGC
301  T P P Q R G S P P S D R A S L A S A A T L E D S S
976  CAATTATACAGCCTTACTCCACTGCAGGACAACGCTCTCATGGACTGTCTGGATGAATTTATAAAGTCCGATT
326  Q L Y S L T P L Q D N A L M D C L D E F Y K V P I
1051 AAATCCCGCATCAGACTCATGAGGAAAGTAGGACTCCATAATAACAAAATCGAGATGGCTCGGAAAACCCCT
351  K S R I R L M R K V G L H N N K I E M A R E N H P
1126  GGTACGTGGAGGAGCAGTTTCATGAGATGCTGCTCACCTGGCACGAGGAACGAGGACAAGCAGCCGATTAAT
376  G N V E E Q F H E M L L T W H E E R G Q A A D I N
1201  ACCCTGCTGAGGGCCCTGCTGAACCTGGAGCACAGGCTTACTGTGGAAACAATTATAGAAGAAGTCATCAAAAAT
401  T L L R A A L L N L E H R L T V E T I I E E V I K N
1276 CAATTTATACAAAATCAGATGTACACCTTTTATAG
426  Q F Y T K S D V H L L *

```

方框、星号、波浪线、三角形、实线、虚线、阴影分别为起始密码子、终止密码子、信号肽、信号肽剪切位点、TNF受体结合区、跨膜区及死亡结构域。

Box, asterisk, wavy line, triangle, solid lines, dashed line, and shaded box represent start codon, stop codon, signal peptide, signal peptide cleavage site, TNF receptor binding region, transmembrane region and death domain, respectively.

图2 小体鲟 *tnfrsf10* 基因的 cDNA 及其氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequence of *tnfrsf10* of *Acipenser ruthenus*

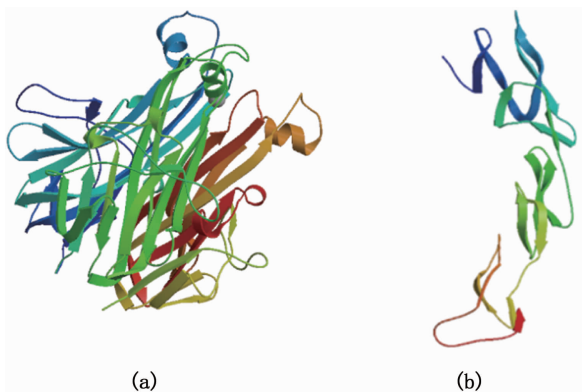


图3 小体鲟 Tnfsf10 (a) 和 Tnfrsf10 (b) 蛋白质三级结构

Fig. 3 Tertiary structure of Tnfsf10 (a) and Tnfrsf10 (b) of *Acipenser ruthenus*

2.4 Bioymifi 处理导致神经丘毛细胞增多

为了研究 Ar-Tnfsf10 和 Ar-Tnfrsf10 在小体鲟仔鱼发育中的作用,利用人 Tnfrsf10 激活剂 Bioymifi 从 35 期到 44 期(侧线感受器扩增阶段)对仔鱼进行持续处理,然后分析仔鱼的形态改变。结果显示:Bioymifi 处理后,仔鱼的整体形态没有明显的改变。

由于 Ar-*tnfsf10* 和 Ar-*tnfrsf10* 主要表达在小体鲟仔鱼的腹面吻端侧线感受器周围,用小清蛋白抗体标记 44 期小体鲟的侧线机械感受器和电感受器的感觉细胞,分析 Bioymifi 处理是否影响小体鲟腹面吻端侧线机械感受器和电感受器的发育。结果显示:经过 Bioymifi 处理后,小体鲟腹面吻端眶下侧线管神经丘内的感觉细胞毛细胞

数量显著增多 ($P < 0.01$); 而眶下管外侧的壶腹器官感觉细胞数量没有显著变化(图 5)。该结果提示, *Tnfsf10* 信号可能特异性参与小体鲟侧线神经丘的发育。

3 讨论

本研究在小体鲟中克隆了 *Ar-tnfsf10* 和 *Ar-tnfrsf10* 基因, 并对它们的氨基酸序列特征和系统进化进行了分析, 发现 *Ar-Tnfsf10* 和 *Ar-Tnfrsf10* 位于辐鳍亚纲分支的基部, 代表了辐鳍亚纲的原始形式。另外, *Ar-tnfrsf10* 与 *Ar-tnfsf10* 的表达模式基本相同, 均在侧线感觉上皮中表达。且 *Tnfrsf10* 的小分子激活剂 Bioymifi 可特异性地促进侧线神经丘毛细胞的发育。这些结果表明: 小体鲟 *Tnfsf10-Tnfrsf10* 代表了辐鳍亚纲的原始形式, 且可能参与侧线机械感受器的发育。

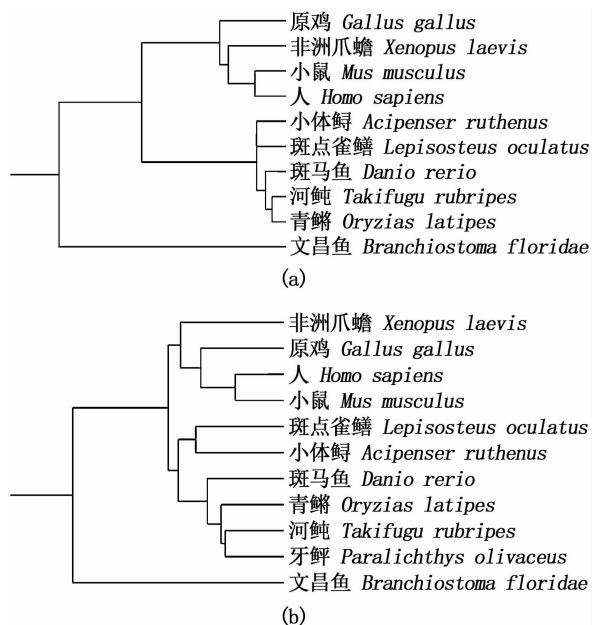
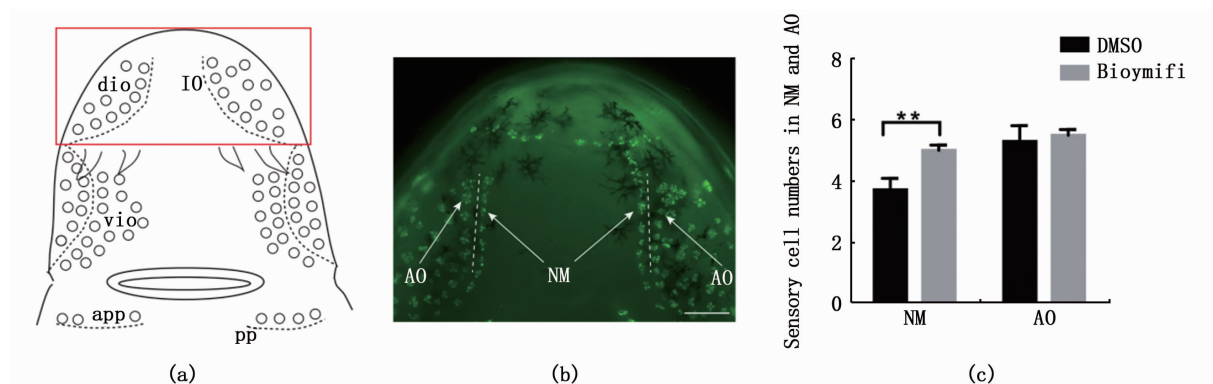


图 4 小体鲟与其他代表性脊椎动物 *Tnfsf10* (a) 和 *Tnfrsf10* (b) 的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic trees of *Tnfsf10* (a) and *Tnfrsf10* (b) in sterlet and other representative vertebrates



(a) 小体鲟腹侧吻端神经丘和壶腹器官的分布; (b) 利用小清蛋白标记 A 图中方框处的神经丘和壶腹电感受器的感觉细胞, 两虚线间是神经丘(NM), 外侧是壶腹电感受器(AO); (c) Bioymifi 处理后, 机械和壶腹感受器的感觉细胞定量分析。IO. 眶下侧线管道; dio. 背侧眶下壶腹区域; vio. 腹侧眶下壶腹区域; app. 前鳃盖骨壶腹区域; pp. 前鳃盖骨侧线管道。标尺: 200 μm 。
(a) The schematic diagram of distribution of neuromasts and ampullary organ in ventral side of head; (b) The sensory cell of ventral neuromast (NM) (between the two dotted lines) and ampullary organs (AO) (outside of the dotted lines) in the box of A labeled with parvalbumin; (c) The sensory cell number in neuromast and ampullary organ after treated with Bioymifi. IO. Infraorbital lateral line canal; dio. Dorsal infraorbital ampullary field; vio. Ventral infraorbital ampullary field; app. Anterior preopercular ampullary field; pp. Preopercular lateral line canal. Scale bar: 200 μm .

图 5 Bioymifi 促进小体鲟侧线机械感觉细胞的形成

Fig. 5 Bioymifi promotes the formation of sensory cell in mechanoreceptor in *Acipenser ruthenus*

3.1 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 的进化分析

TNFSF 和 TNFRSF 对多细胞动物的免疫和发育非常重要, 原始多细胞动物的 *tnfsf* 和 *tnfrsf* 祖先基因经过多轮复制产生了多个家族成员。目

前在人类中发现了 19 个 *tnfsf* 和 29 个 *tnfrsf* 基因, 但在低等脊椎动物中鉴定的 *tnfsf* 和 *tnfrsf* 基因家族成员较少。在小体鲟胚胎 cDNA 中克隆的 *tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 与 GenBank 数据库中转录组拼

接的小体鲟 *tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 序列比对后发现,小体鲟胚胎 cDNA 中克隆的 *tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 仅存在少量碱基变异,这证明小体鲟 *tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 拼接正确。小体鲟 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 与人同源基因的相似性分别为 29.09% 和 34.23%,但关键氨基酸和功能性结构域都很保守,且三维建模结构与人的 TRAIL 和 DR5 基本一致。这暗示 Ar-*tnfsf10* 和 Ar-*tnfrsf10* 虽发生了一定程度的变异,但结构具有保守性。另外,人 DR5 (*Tnfrsf10B*) 的激活剂 Bioymifi 处理后,小体鲟侧线机械感受器毛细胞数量的改变也从侧面说明了小体鲟 *Tnfrsf10* 与人 *Tnfrsf10B* 结构高度相似。基于辐鳍亚纲和肉鳍亚纲物种 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 构建的进化树显示,小体鲟 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 位于硬骨鱼分支的基部,平行于四足动物的分支。Ar-*Tnfsf10* 和 Ar-*Tnfrsf10* 代表了辐鳍亚纲 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 原始的形式,这为研究 Tnf 及其受体超家族在脊椎动物中的进化奠定了基础。

3.2 *tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 基因的表达模式

人类 *tnfsf10* 在成体多种免疫细胞中表达,如:自然杀伤(NK)细胞、T 细胞和树突状细胞(DC)等;而 *tnfrsf10* 的表达更为广泛,在肝、小肠、脾、胸腺、外周血中的白细胞和活化 T 细胞等正常细胞和癌细胞中均有表达^[12-13]。虹鳟的 *tnfsf10* 在前肾、后肾、表皮、鳃和肠等多个免疫器官表达^[14]。斑马鱼的 *tnfrsf10* 在卵巢中最为丰富,鳃、心脏、肌肉和肾等组织也都有表达^[15]。相对于成体免疫细胞中的表达,*tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 在胚胎中的表达更为特异。斑马鱼的 *tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 主要在脊索、耳囊、侧线系统和中间细胞群中表达^[5]。小体鲟 Ar-*tnfsf10* 和 Ar-*tnfrsf10* 基因在躯干的水平肌隔和头部的腹侧表皮表达,这些位置为侧线机械感受器所在部位。成体和胚胎的表达模式差异暗示:*tnfsf10* 和 *tnfrsf10* 在成体和胚胎阶段发挥不同的功能,在成体免疫细胞中更多地参与免疫反应,而在早期发育阶段则参与特定组织器官的发育。

3.3 *Tnfsf-Tnfrsf* 信号特异参与侧线神经丘的发育

Tnfsf-Tnfrsf 信号早期被作为癌症治疗的重要靶标,通过激活癌细胞中的 *Tnfsf-Tnfrsf* 信号诱导癌细胞凋亡^[1]。近些年发现,*Tnfsf-Tnfrsf* 信号还广泛参与造血系统、视网膜和神经系统的发育、

再生^[6-7,16]。敲低 *Tnfr2* 和 *Tnf α* 导致斑马鱼血管内皮细胞转化形成造血干细胞被抑制,这个过程是通过 NF- κ B 介导的^[6]。敲低 *Tnf α* 会抑制斑马鱼缪勒氏细胞增殖及视网膜的再生^[7]。在小鼠中敲除 CD95 也导致脑中神经干细胞的减少^[16]。研究发现:Bioymifi 处理促进小体鲟神经丘毛细胞的发育,但对壶腹电感受器感觉细胞影响不显著,这暗示 *Tnfsf10* 信号特异性促进侧线神经丘毛细胞的形成。该结果与在斑马鱼中观察到的现象相一致。这说明 *Tnfsf10-Tnfrsf10* 信号除了参与免疫外,在原始的硬骨鱼中还表现出参与器官发育的作用。

综上,小体鲟 *Tnfsf10* 和 *Tnfrsf10* 代表了硬骨鱼同源蛋白的原始形式,可能特异性参与侧线神经丘的发育。

参考文献:

- [1] DOSTERT C, GRUSDAT M, LETELLIER E, et al. The TNF family of ligands and receptors: communication modules in the immune system and beyond [J]. *Physiological Reviews*, 2019, 99(1): 115-160.
- [2] WIENS G D, GLENNEY G W. Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1324-1335.
- [3] QUISTAD S D, STOTLAND A, BAROTT K L, et al. Evolution of TNF-induced apoptosis reveals 550 My of functional conservation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(26): 9567-9572.
- [4] LI Y G, XIAO T Y, ZOU J. Fish TNF and TNF receptors [J]. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(2): 196-220.
- [5] EIMON P M, KRATZ E, VARFOLOMEEV E, et al. Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2006, 13(10): 1619-1630.
- [6] ESPÍN-PALAZÓN R, STACHURA D L, CAMPBELL C A, et al. Proinflammatory signaling regulates hematopoietic stem cell emergence [J]. *Cell*, 2014, 159(5): 1070-1085.
- [7] NELSON C M, ACKERMAN K M, O' HAYER P, et al. Tumor necrosis factor- α is produced by dying retinal neurons and is required for Müller glia proliferation during zebrafish retinal regeneration [J]. *Journal of Neuroscience*, 2013, 33(15): 6524-6539.
- [8] 宋炜, 宋佳坤, 范纯新, 等. 全人工繁殖西伯利亚鲟的早期胚胎发育 [J]. *水产学报*, 2010, 34(5): 777-785.
SONG W, SONG J K, FAN C X, et al. Studies on the early embryonic development of artificially-bred Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010,

- 34(5): 777-785.
- [9] 张昊, 范纯新, 宋佳坤. 西伯利亚鲟 *Tbx3* 基因的克隆和表达分析[J]. 动物学研究, 2012, 33(2): 158-164.
ZHANG H, FAN C X, SONG J K. Cloning and expression of *Tbx3* gene in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* [J]. Zoological Research, 2012, 33(2): 158-164.
- [10] WANG G L, WANG X M, YU H, et al. Small-molecule activation of the TRAIL receptor DR5 in human cancer cells [J]. Nature Chemical Biology, 2013, 9(2): 84-89.
- [11] MODRELL M S, BEMIS W E, NORTHCUIT R G, et al. Electroreceptive ampullary organs are derived from lateral line placodes in bony fishes[J]. Nature Communications, 2011, 2: 496.
- [12] MACFARLANE M, AHMAD M, SRINIVASULA S M, et al. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(41): 25417-25420.
- [13] KOGA Y, MATSUZAKI A, SUMINOE A, et al. Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils [J]. Cancer Research, 2004, 64(3): 1037-1043.
- [14] GLENNEY G W, WIENS G D. Early diversification of the TNF superfamily in teleosts: genomic characterization and expression analysis[J]. The Journal of Immunology, 2007, 178(12): 7955-7973.
- [15] BOBE J, GOETZ F W. Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 129(2/3): 475-481.
- [16] CORSINI N S, SANCHO-MARTINEZ I, LAUDENKLOS S, et al. The death receptor CD95 activates adult neural stem cells for working memory formation and brain repair[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(2): 178-190.

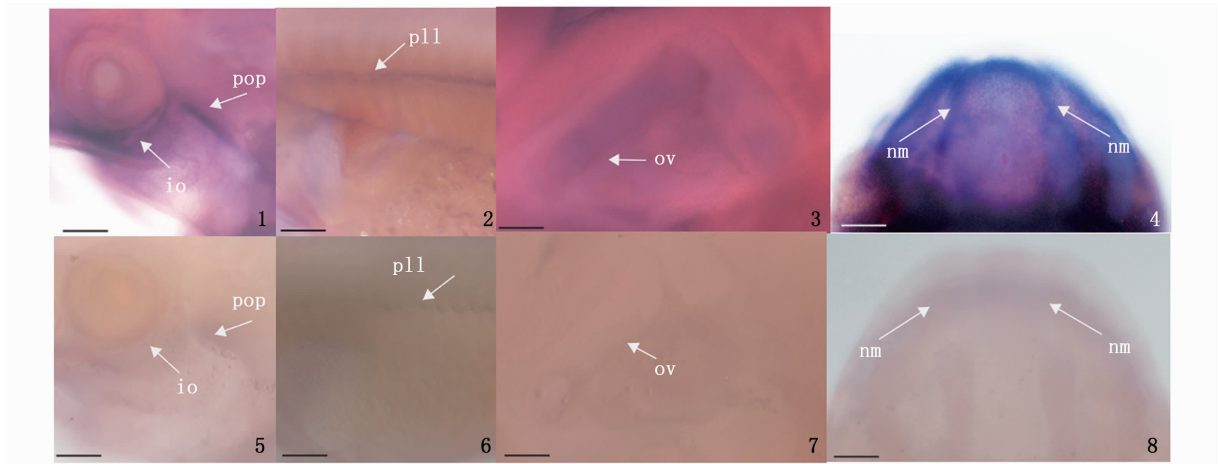
Cloning, expression and preliminary function analysis of *Ar-tnfsf10* and *Ar-tnfrsf10* genes in sterlet, *Acipenser ruthenus*

ZHAN Minyue^{1,2,3}, WANG Jian^{2,3}, FAN Chunxin^{1,2,3}

(1. Institute for Marine Biosystem and Neurosciences, International Center of Marine Study, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Tumor Necrosis Factor Superfamily (TNFSF) and Tumor Factor Receptor Superfamily (TNFRSF) regulate cell apoptosis, metabolism and development. To explore the expression and function of TNFSF and TNFRSF in teleosts, we cloned *tnfsf10* and *tnfrsf10* of the sterlet, *Acipenser ruthenus*, and analyzed their structure and evolution. Results showed that, *Tnfsf10* and *Tnfrsf10* of the sterlet were located at the base of actinopterygii branch in phylogenetic tree and have low homology with *Tnfsf10* and *Tnfrsf10* of the tetrapod, however, their tertiary structure is similar to *Tnfsf10* and *Tnfrsf10* of the human. Whole-mount in situ hybridization analysis showed that *tnfsf10* and *tnfrsf10* were mainly expressed in the horizontal muscle septum of the trunk, infraorbital canal of the head, preopercular lateral line, and neuromast of the ventral rostral. After being treated with *Tnfrsf10* specific activator Bioymifi, the morphology of sterlet larvae did not change significantly, but the number of hair cells in neuromast increased significantly. The findings suggest that the *Tnfsf10* and *Tnfrsf10* of the sterlet represent the original form of the teleost homologous protein, which may be specifically involved in the development of hair cells in the lateral line neuromast.

Key words: sterlet; *Tnfsf10*; *Tnfrsf10*; expression; lateral line; mechanoreceptor sensory cell; electroreceptor sensory cell

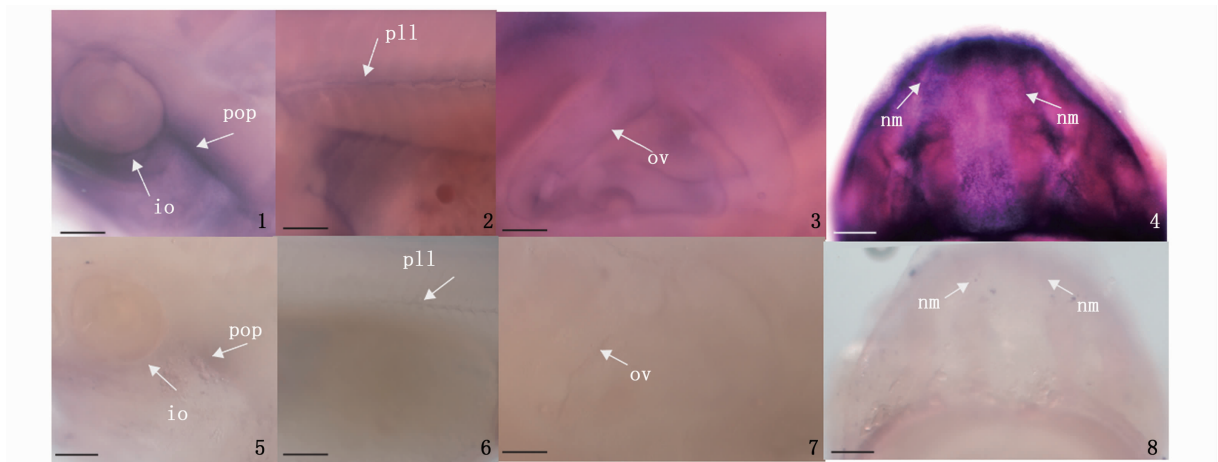


1-4 分别为实验组的眼、躯干、耳和吻端区域；5-8 为空白对照的相应区域。io. 眶下管；pop. 前鳃盖管；pll. 后侧线；ov. 耳囊；nm. 腹侧神经丘。标尺：100 μm 。

1-4 is the structure of eye, trunk, otic vesicle and rostrum in experimental group, respectively. 5-8 is the corresponding structure of blank control group. io. infraorbital lateral line canal; pop. preopercular lateral line; pll. posterior line; ov. otic vesicle; nm. neuromast. Scale bar: 100 μm .

图版 I *Ar-tnfsf10* 在小体鲟 44 期仔鱼中的表达

Plate I The expression of *Ar-tnfsf10* in the 44th stage larvae of *Acipenser ruthenus*



1-4 分别为实验组的眼、躯干、耳和吻端区域；5-8 为空白对照的相应区域。io. 眶下管；pop. 前鳃盖管；pll. 后侧线；ov. 耳囊；nm. 腹侧神经丘。标尺：100 μm 。

1-4 is the structure of eye, trunk, otic vesicle and rostrum in experimental group, respectively. 5-8 is the corresponding structure in blank control group. io. infraorbital lateral line canal; pop. preopercular lateral line; pll. posterior line; ov. otic vesicle; nm. neuromast. Scale bar: 100 μm .

图版 II *Ar-tnfrsf10* 在小体鲟 44 期仔鱼中的表达

Plate II The expression of *Ar-tnfrsf10* in the 44th stage larvae of *Acipenser ruthenus*