

东北林蛙瘦素受体叠加转录蛋白基因的克隆及组织表达分析

吴彤, 刘婷婷, 刘依铭, 赵雪滢, 刘玉芬, 刘鹏, 赵文阁

哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025

吴彤, 刘婷婷, 刘依铭, 赵雪滢, 刘玉芬, 刘鹏, 赵文阁. 东北林蛙瘦素受体叠加转录蛋白基因的克隆及组织表达分析. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1859-1873.

WU T, LIU TT, LIU YM, ZHAO XY, LIU YF, LIU P, ZHAO WG. Cloning and tissue expression analysis of the *LepROT* gene of *Rana dybowskii*. Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1859-1873.

摘要: 瘦素受体叠加转录蛋白 (leptin receptor overlapping transcript, LepROT) 在免疫调节中发挥多种作用。为了获得两栖类 LepROT 在抗感染中的作用及其机制的信息, 首先采用 RT-PCR 技术克隆东北林蛙的 *LepROT* 基因并进行生物信息学分析; 再分别构建嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, Ah) 与细菌脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 东北林蛙的感染模型, 获得组织病理解剖变化特征, 并应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 *LepROT* 基因的变化规律及其对核转录因子 NF- κ B 信号通路的影响。结果表明, *LepROT* 基因长度为 396 bp, 编码 131 个氨基酸残基, 与两栖类同源性在 93.74% 以上, 与哺乳类同源性在 86.39% 以上, 在各个物种中相对保守; 感染 Ah、LPS 后, 基因 *LepROT*、NF- κ B、*IKK α* 和 *IKK β* 的相对表达量均显著上调 ($P < 0.01$), 并且不同组织的表达量上调的时间规律不同, 推测东北林蛙可能通过 LepROT 启动 NF- κ B 信号通路发挥抗感染作用, 为进一步扩展两栖类 LepROT 的生物学功能的研究提供了证据。

关键词: *LepROT* 基因; NF- κ B 信号通路; 嗜水气单胞菌; 细菌脂多糖; 东北林蛙

Received: August 13, 2021; **Accepted:** December 2, 2021; **Published online:** December 22, 2021

Supported by: Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, China (LH2021C053); the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Heilongjiang Province, China (202010231020).

Corresponding authors: LIU Yufen. Tel: +86-451-88060784; E-mail: liuyufen0825@126.com

ZHAO Wenge. Tel: +86-451-88060784; E-mail: zhaowenge311@126.com

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (LH2021C053); 黑龙江省大学生创新创业训练计划 (202010231020)

Cloning and tissue expression analysis of the *LepROT* gene of *Rana dybowskii*

WU Tong, LIU Tingting, LIU Yiming, ZHAO Xueying, LIU Yufen, LIU Peng, ZHAO Wenge

College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, Heilongjiang, China

Abstract: Leptin receptor overlapping transcript (*LepROT*) plays multiple roles in the regulation of immune systems. However, very little information is available about the anti-infectious mechanisms of amphibians *LepROT*. In this study, the cDNA sequence of the *Rana dybowskii LepROT* gene was determined by using RT-PCR and bioinformatics analysis. Then, the *Aeromonas hydrophila* (*Ah*) and lipopolysaccharides (LPS) infected models of *R. dybowskii* was constructed to obtain histopathological characteristics. Constitutive expression of *LepROT* mRNA and NF- κ B signaling pathway were detected by real-time quantitative PCR. The full-length cDNA of *LepROT* gene was 396 bp and encoded 131 amino acids. Amino acid sequence analysis revealed *LepROT* shares 93.74% and 86.39% identity with homologues from other amphibians and mammals respectively, and the *LepROT* gene was quite conserved among different species. After infection, the relative expression levels of *LepROT*, NF- κ B, *IKK α* and *IKK β* mRNA were all significantly upregulated ($P < 0.01$), but showed a diverse temporal pattern of up-regulation in different tissues. Therefore, it was proposed that the *LepROT* gene of *R. dybowskii* might activate the NF- κ B signaling pathway to exert anti-infectious effects, thus providing evidence for further extending the biological function of *LepROT*.

Keywords: *LepROT*; NF- κ B signaling pathway; *Aeromonas hydrophila*; lipopolysaccharides; *Rana dybowskii*

瘦素 (leptin, LEP) 是由脂肪组织产生的一种因子^[1], 可以调节机体能量稳态、食物摄入平衡和新陈代谢^[2], 还具有参与身体生长发育^[3-4]、繁殖^[5]和抵抗病原体入侵的免疫反应^[6]。研究证实, 瘦素的生物学功能需要瘦素受体 (leptin receptor, LEPR) 的参与。在免疫细胞表面可检测到 LEPR 的表达, 揭示了 LEPR 与免疫系统的密切关系^[5]。LEPR 在没有瘦素的情况下以二聚体形式存在, 并与配体结合时被激活。研究表明^[7-8], LEPR 的选择性剪接可形成不同种的剪接产物, 其中有一种独特的蛋白被称为瘦素受体叠加转录蛋白 (leptin receptor overlapping transcript, *LepROT*), 其与 *LEPR* 使用相同的启动子和外显子, 但氨基酸结构并不相似^[8]。研

究发现, *LepROT* 和 *LEPR* 基因可以在大鼠下丘脑中表达^[9], 如果使 *LepROT* 基因沉默, 将会增加瘦素信号通路的表达^[10]。目前, *LepROT* 的同源基因的克隆已经在人^[8]、小家鼠^[11]、斑马鱼^[12]、南美白对虾^[13]等物种中实现, 然而其生化机制的相关信息依然有限。

东北林蛙 (*Rana dybowskii*) 隶属蛙科 (Ranidae)、林蛙属 (*Rana*), 是可以抵御寒冷条件的东北地区优势两栖物种^[14-15]。其生存过程中容易受到嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, *Ah*) 的感染, 导致其出现红腿病, 进而引发败血症等变化^[16]。而 LPS 是一种特异性的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 该分子可被 TLR4 分

子所识别,并通过髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)和 I κ B 激酶(inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, IKK)等接头蛋白将信号传递入细胞核,进而激活效应分子的表达以及核转录因子(nuclear factor- κ -gene binding, NF- κ B)信号通路的启动,完成免疫应答^[17-18]。

本研究拟对感染 *Ah* 与 LPS 的东北林蛙不同组织、不同时间点基因 *LepROT*、*NF- κ B*、*IKK α* 和 *IKK β* 的相对表达量进行检测,分析 *LepROT* 基因与机体抗感染特性之间的关系,为 *LepROT* 基因的免疫功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及菌株

成体雄性东北林蛙(20 \pm 5)g。嗜水气单胞菌株 DW1701-1909 (*Ah*) 由本实验室分离鉴定。在 LB 固体培养基上,呈灰白色圆形小菌落。传代培养后通过平板计数法测定菌液浓度,并分别制备 1.0 \times 10⁷、1.5 \times 10⁷、1.0 \times 10⁸ 和 1.0 \times 10¹⁰ CFU/mL 共 4 个浓度梯度的菌悬液。采用腹腔注射法,暂养一周,每天观察,确定东北林蛙的半数致死剂量(median lethal dose, LD₅₀) 为 1.5 \times 10⁷ CFU/mL。

1.1.2 试剂来源

克隆载体 pMD18-T、感受态细胞大肠杆菌 *Eshcherichia coli* DH5 α 、DL2000 marker、Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTPs、琼脂糖、胶回收及 TRIzol 试剂盒、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 购于南京诺唯赞生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌种复苏、动物攻毒和样本采集

将本实验室保存的嗜水气单胞菌种复苏、

平板划线培养,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中,180 r/min、28 $^{\circ}$ C 条件下摇床培养^[19], OD₆₀₀ 检测菌液浓度范围为 0.4–0.6 时,通过预试验确定菌悬液浓度。将细菌悬液稀释为 1.5 \times 10⁷ CFU/mL, 4 $^{\circ}$ C 备用。将东北林蛙随机分为 3 组,每组 27 只。本实验设 *Ah* 组、LPS 组和 LB 组(对照),嗜水气单胞菌悬液(1.5 \times 10⁷ CFU/mL)、LPS 溶液(1 mg/mL,溶于灭菌的 LB 培养基中)和 LB 培养液各 1 mL,以上 3 组模型均使用腹腔注射法。分别取注射后 8、16、24、36、48、72、96、120、168 h 的 3 组东北林蛙心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、皮肤、肌肉和胃组织样品。以上 9 个时间点每组取 3 只,用于后续相关实验。东北林蛙按照美国国立卫生研究院(National Institutes of Health) 实验室动物护理和使用指南的建议实施计划。本研究方案已由哈尔滨师范大学生命科学与技术学院动物实验伦理委员会(编号:hFRI2020) 审核通过。

1.2.2 引物设计

根据与东北林蛙同源性较近的物种——中国林蛙,其 *LepROT* 基因的序列(GenBank 登录号:XM_040360761.1),使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,*LepROT-B* 片段长度为 329 bp 左右,*LepROT-q-A* (用于 qRT-PCR 试验) 长度为 249 bp,将以上产物进行拼接,得到 *LepROT* 扩增片段跨度为 396 bp,引物 β -actin、*NF- κ B*、*IKK α* 和 *IKK β* 参考文献[20-22],用于 qRT-PCR,引物序列见表 1。

1.2.3 *LepROT* 基因的克隆及生物信息学分析

使用 TRIzol 试剂盒从脾脏细胞中提取组织样品的总 RNA,采用 1%的水平式琼脂糖凝胶电泳检测其完整性并用紫外分光光度计(Beckman, Brea, CA, USA) 检测确定浓度。根据反转录试剂盒合成 cDNA 第一链,按照 Taq plus DNA 聚合酶说明书进行 PCR 反应体系的配置(54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 30 个循环)。得到 PCR 产

物后进行胶回收纯化,与 pMD18-T 载体进行连接,并转入到大肠杆菌 DH5 α 中,经 PCR 检测,获得的菌株命名为 pMD18-T-LepROT-B,将该菌株进行序列测定。使用 SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)、DNAMAN 6.0、MEGA7.0 和 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 等软件对 *LepROT* 的核苷酸和氨基酸序列进行生物信

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Purpose/Length (bp)
LepROT-q-FA	AACGCTGAGACGACAATTCC	249
LepROT-q-RA	TAACATGGCGGGGATTAAG	
LepROT-FB	TGCTTGGATGTGCCTTAG	329
LepROT-RB	CCACTGCTCCCAACTAAA	
β -actin-F	AAGAATGAGGGCTGGAACA	qRT-PCR analysis
β -actin-R	GTGCGTGACATCAAGGAGAAGC	
NF- κ B-A	AGGAGGTTCTGGAGGTTT	qRT-PCR analysis
NF- κ B-B	GAGGAGTCGGCTTTCATT	
IKK α -A	CAAGCTGTAACCACGTCTC	qRT-PCR analysis
IKK α -B	GGCCATTTCTACATAACATGC	
IKK β -A	TTTTGAGGATCTGTGCCCTT	qRT-PCR analysis
IKK β -B	CAATGGCACGCAAAGTACGA	

表 2 参考物种信息

Table 2 List of reference species

Species	Accession No. of nucleotide	Accession No. of amino acid
<i>Rana temporaria</i>	XM_040360761	XP_040216695
<i>Xenopus laevis</i>	NM_001093878	NP_001087347.1
<i>Xenopus tropicalis</i>	NM_001017102	NP_001017102.1
<i>Bufo bufo</i>	XM_040407057	XP_040262991.1
<i>Nothobranchius furzeri</i>	HADY01019498	SBP57983.1
<i>Takifugu rubripes</i>	NM_001136149	NP_001129621.1
<i>Alligator sinensis</i>	XM_025212552	XP_025068337.1
<i>Gallus gallus</i>	NM_001007958	NP_001007959.1
<i>Homo sapiens</i>	BC011027	AAH56250.1
<i>Pan troglodytes</i>	XM_016920167	XP_016775656.1
<i>Rattus norvegicus</i>	NM_020099	NP_064484.1
<i>Mus musculus</i>	NM_175036.4	NP_778201.1
<i>Ochotona curzoniae</i>	XM_040978417	XP_040834351.1
<i>Ursus maritimus</i>	XM_040627188	XP_040483122.1
<i>Bos taurus</i>	NM_001034741	NP_001029913.1
<i>Sus scrofa</i>	NM_001145388	NP_001138860.1
<i>Oryx dammah</i>	XM_040232662	XP_040088596.1
<i>Monodon monoceros</i>	XM_029228450	XP_029084283.1

息学分析^[15]。参考物种信息见表 2。

1.2.4 不同组织的 qRT-PCR 检测

以 β -actin 的 mRNA 相对表达量作为内参,采用 SYBR Green I 嵌合荧光法检测 *LepROT*、*NF- κ B*、*IKK α* 和 *IKK β* 基因在东北林蛙组织(心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、皮肤、肌肉和胃)中 mRNA 的表达情况。反应体系 20 μ L,包含 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix

10 μL , *LepROT-q-FA* (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , *LepROT-q-RA* (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , ddH₂O 7.8 μL , cDNA 模板 1 μL 。反应程序按照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 的说明书, 设置 3 次技术重复。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算相对表达量, 利用 SPSS25 软件采用单因素方差分析法分析其相对表达量, 统计学意义为 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$, 利用 GraphPad Prism 8 软件进行作图。

1.2.5 苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 分析

分别采集东北林蛙感染前与感染后 168 h 的肝脏、皮肤和肌肉组织, 置于中性甲醛缓冲液中固定。然后, 在乙醇中脱水, 用于常规石蜡包埋。切片 (6 μm) 放置在涂有聚 L-赖氨酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 的载玻片上, 用 HE 染色进行组织学观察。脱蜡复水二甲苯 I 5 min, 二甲苯 II 5 min, 1/2 二甲苯 5 min, 无水乙醇 I

3 min, 无水乙醇 II 3 min, 95%乙醇 I 3 min, 95%乙醇 II 3 min, 90%乙醇 3 min, 80%乙醇 3 min, 70%乙醇 3 min, ddH₂O 5 min, 然后用苏木精染色 10 min^[23]。接下来, 用 ddH₂O 冲洗去除残留的颜色, 在 1% 的盐酸乙醇中停留片刻进行分化, 1% 的氨水停留片刻进行蓝化, 用水冲洗 3 min, 0.5% 伊红染液染色 3 min 后, 对载玻片进行梯度脱水和透明试验, 使用中性树胶封片^[15]。

2 结果与分析

2.1 感染鉴定

剖检发现, 与未感染组相比, 其他 2 组的东北林蛙发病现象基本一致。东北林蛙在感染后 8–16 h 无明显变化; 在 24 h 后肝脏肿大变白出现充血 (图 1A2), 腿部肌肉有出血点 (图 1B2); 48–168 h 腹腔可见腹水; 96–168 h 东北林蛙头部和背部出现溃烂 (图 1C2) 且行动迟缓等现象, 表明人工感染成功。

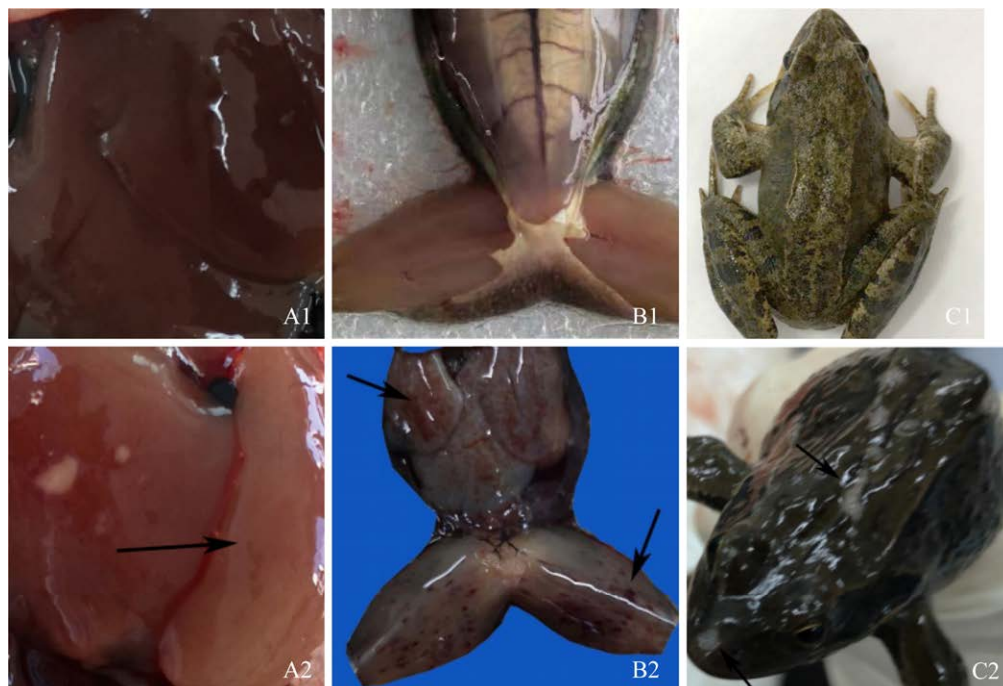


图 1 感染 *Ah* 前后的东北林蛙的病理解剖变化

Figure 1 Pathological and anatomical changes of *Rana dybowskii* before and after infection with *Ah*. (A1), (B1) and (C1) were liver, skin and muscle of the uninfected control group, respectively. (A2) Hepatomegaly of *R. dybowskii*. (B2) There are hemorrhagic spots in leg muscles of *R. dybowskii*. (C2) Ulceration on the head and back of *R. dybowskii*, the arrow points to the above symptoms.

2.2 组织病理学变化

将 HE 染色后的结果进行分析发现, 对照组和感染 *Ah* 168 h 后的东北林蛙组织发生明显变化。阴性对照组的肝脏组织紧密, 细胞间隙小; 皮肤结构完整, 组织致密; 肌肉组织结构致密。而感染后的肝脏组织中肝细胞壁消失, 空泡变性, 细胞间隙增大, 肝细胞核缩小, 炎症细胞浸润; 而皮肤细胞之间的界限变得不清晰, 整体结构变得松散, 另外, 表皮脱落, 皮肤结构不完整,

腺泡腔内充满大量红细胞; 在肌肉组织中发现, 肌纤维变化明显, 发生扭曲、断裂和崩解 (图 2)。

2.3 *LepROT* 基因的克隆与鉴定

紫外分光光度计检测所提取样品总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 均在 1.8–2.0 之间, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量, 其 28S、18S 和 5S RNA 条带清晰, 质量符合要求, 可进行后续试验。以脾脏的 cDNA 为模板, 扩增 *LepROT-q-A*、*LepROT-B*, 依据琼脂糖凝胶电泳图 (图 3A, 3C)

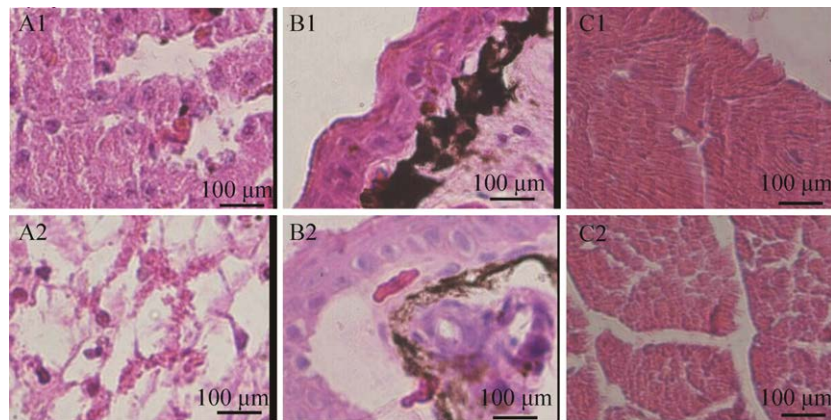


图 2 感染前后东北林蛙的病理组织变化

Figure 2 Pathological changes of *Rana dybowskii* after infection. (A1), (B1) and (C1) respectively show the liver, skin and muscle tissues of *R. dybowskii* in the negative control group; (A2), (B2) and (C2) showed the changes of liver, skin and muscle tissues of *R. dybowskii* after *Ah* infection for 168 h.

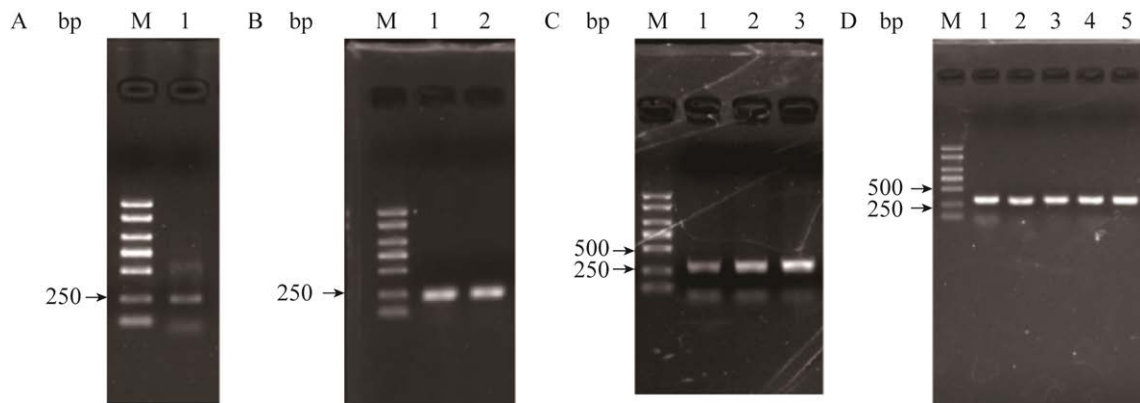


图 3 *LepROT* 基因的克隆及鉴定

Figure 3 Cloning and identification of *LepROT* in *Rana dybowskii*. (A) PCR amplification of *LepROT-q-A* fragment of *R. dybowskii*. M: DL2000 marker; lane 1: PCR product of *LepROT-q-A* gene. (B) PCR identification of *LepROT-q-A* fragment colony of *R. dybowskii*. M: DL2000 marker; lanes 1–2: the products of colony PCR. (C) PCR amplification of *LepROT-q-B* fragment of *R. dybowskii*. M: DL2000 marker; lanes 1–3: PCR products of *LepROT-B* gene. (D) PCR identification of *LepROT-q-A* fragment colony of *R. dybowskii*. M: DL2000 marker; lanes 1–5: the products of colony PCR.

的检测结果,条带大小分别为 249 bp 和 329 bp 左右,进行胶回收后将纯化的 *LepROT-q-A*、*LepROT-B* 片段和 pMD18-T 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,再进行菌落 PCR 鉴定,电泳结果可见菌落 PCR 条带清晰单一(图 3B, 3D)。

2.4 *LepROT* 基因的生物信息学分析

经序列拼接获得东北林蛙 *LepROT* 基因的全编码区(NCBI 登录号为 MZ089743),序列长为 396 bp,与已知的中国林蛙 *LepROT* 核苷酸序列的同源性达 97.22%;在蛋白质一级结构上,该基因编码了 131 个氨基酸残基;在二级结构上,运用 SOPMA 软件分析表明,*LepROT* 基因的蛋白包含 α 螺旋占 35.11% (46 个氨基酸),延伸链占 29.77% (39 个氨基酸), β 转角占 8.40% (11 个氨基酸)和无规卷曲占 26.72% (35 个氨基酸)等几种结构形式;在三级结构上,采用 SWISS-MODEL 软件模拟预测该蛋白结构(图 4A),与模式生物非洲爪蟾的 *LepROT* 的三级结构(图 4B)类似。运用 DNAMAN6.0 软件将东北林蛙的 *LepROT* 与表 2 中 18 个物种的 *LepROT* 进行氨基酸序列比较,发现该蛋白与两栖类同源性在 93.74% 以上,其中与中国林蛙同源性最高(96.18%),并且与哺乳类相比同源性在 86.39% 以上。使用 MEGA7.0 构建 *LepROT* 氨基酸的系统进化树,进化树显示其与两栖类处在同一分支,亲缘关系最近(图 5)。

2.5 *LepROT* 与 NF- κ B 信号通路中相关因子 mRNA 转录水平变化

2.5.1 不同组织 *LepROT* mRNA 转录水平

通过数据分析得知,*Ah* 组与 LPS 组东北林蛙的 *LepROT* 基因在所有组织中不同时间点均有不同水平的表达。在心脏组织中,*Ah* 和 LPS 处理后 *LepROT* mRNA 表达量变化大致相同,均呈现先下调后上调再下调的状态,但 *Ah* 组的 *LepROT* 相对表达量上调时间更长,且上调时间有一定的延滞性;*Ah* 组在 8–48 h 显著下调,72–120 h 显著上调;LPS 组在 48 h 达到峰值,为阴性对照组的 1.49 倍 ($P < 0.01$)。*Ah* 组肝脏中 *LepROT* mRNA 的相对表达量均显著上调(除 120 h 外),在 16 h 时达到峰值,为对照组的 19.65 倍 ($P < 0.01$);而 LPS 组的肝脏组织则先上调后下调,在 48 h 达到峰值,为对照组的 5.59 倍 ($P < 0.01$)。在脾脏组织中,*Ah* 组和 LPS 组的 *LepROT* mRNA 表达量变化大致一致,均呈现先上升后下降,均在 24 h 出现峰值,分别为对照组的 8.10 倍和 7.68 倍 ($P < 0.01$)。在肺脏组织中 2 个试验组的 *LepROT* mRNA 表达量变化明显不同,*Ah* 组在 16 h 时达到峰值,为对照组的 3.21 倍;而 LPS 组在 168 h 时达到峰值,为对照组的 3.16 倍。在肾脏组织中两试验组的 *LepROT* mRNA 相对表达量显著上升,*Ah* 组在 48 h 时达到峰值,为对照组的 6.64 倍 ($P < 0.01$);而 LPS 组

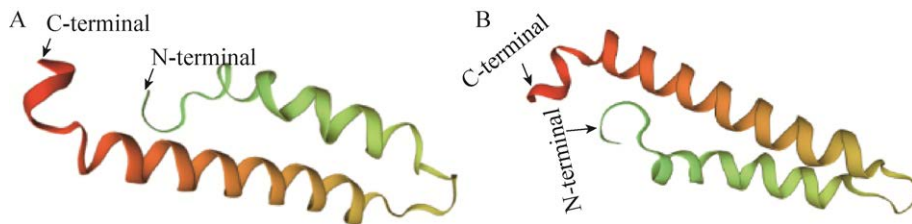


图 4 *LepROT* 的三级结构模型

Figure 4 The *LepROT* tertiary structure model. Using the Swiss Model to predict the tertiary structure of *LepROT* of *Rana dybowskii* (A) and *Xenopus laevis* (B).

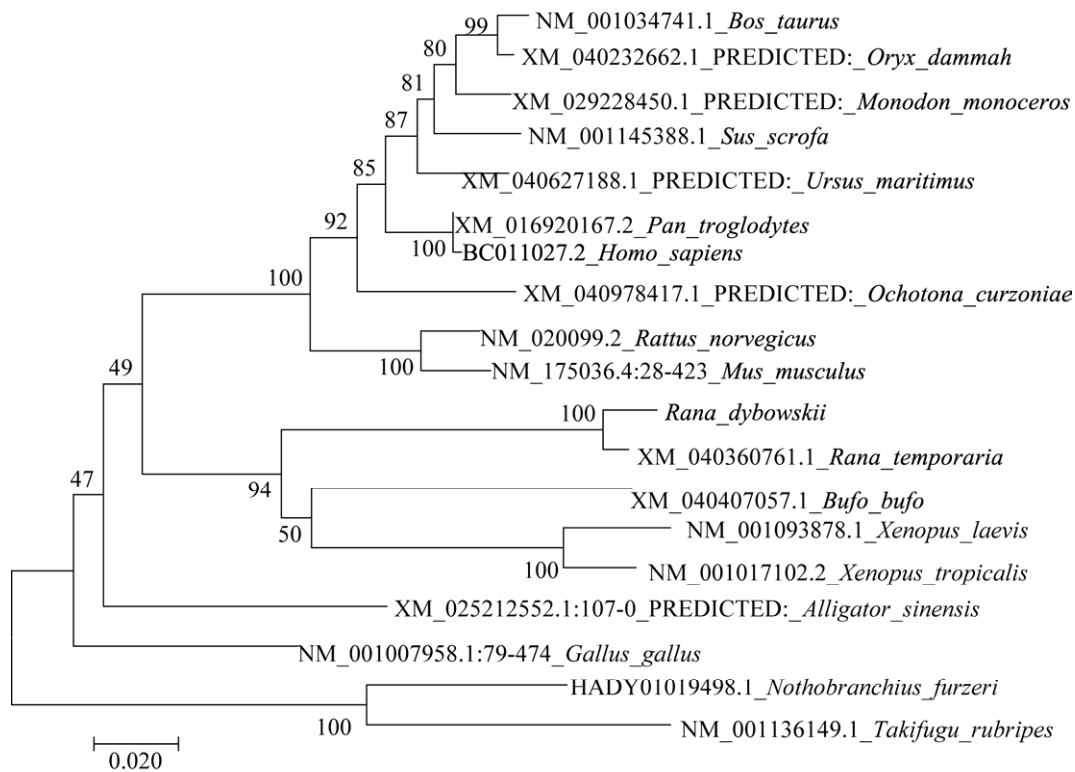


图5 LepROT 系统进化树分析

Figure 5 Phylogenetic tree of LepROT. Evolutionary analysis of LepROT amino acid sequences. The MEGA software was used for analysis, and the neighbor-joining (NJ) method was used to construct a phylogenetic tree (bootstrap=500) in MEGA7.0.

则在 24 h 时达到峰值，为对照组的 6.88 倍 ($P<0.01$)。皮肤组织中的 *LepROT* mRNA 相对表达量显著上调，且前者比后者上调明显，*Ah* 组在 8 h 时就达到了峰值，为对照组的 9.25 倍 ($P<0.01$)；而 LPS 组在 24 h 时达到峰值，为对照组的 5.57 倍 ($P<0.01$)。肌肉组织与其他组织不同的是，*Ah* 组和 LPS 组的 *LepROT* mRNA 相对表达量呈现相反的变化，*Ah* 组在 8–72 h 显著上调，而 LPS 组显著下降。胃的 *LepROT* mRNA 相对表达量 *Ah* 组在 24 h 时达到峰值，为对照组的 2.37 倍；而 LPS 组 *LepROT* mRNA 相对表达量在 16 h 时达到峰值，为对照组的 1.54 倍，较其他组织变化不明显。上述结果表明，感染 *Ah* 与 LPS 胁迫的 *LepROT* 基因在不同组织的应答时间和水平存在差异 (图 6A–H)。

2.5.2 不同组织 *IKKα* mRNA 转录水平

与 *LepROT* mRNA 相似，感染 *Ah* 与 LPS 的东北林蛙的 *IKKα* 基因在所有研究组织中不同时间点均有不同水平的表达。在心脏组织中，*Ah* 组和 LPS 组无显著提升，只有 LPS 组在 16 h 时心脏组织的 *IKKα* mRNA 显著上调，为对照组的 7.32 倍 ($P<0.01$)。在肝脏组织中，*Ah* 组显著上调，在 24 h 达到峰值，为对照组的 3.47 倍 ($P<0.01$)；而 LPS 组 *IKKα* mRNA 相对表达量也有上调，但上调没有前者明显。在脾脏组织中，*Ah* 组与 LPS 组表达量均显著上调，且 *Ah* 组较 LPS 组表达量显著上调，*IKKα* mRNA 相对表达量变化显著，*Ah* 组在 16 h 达到峰值，为对照组的 9.37 倍 ($P<0.01$)；而 LPS 组的峰值在 48 h 才出现，为对照组的 7.51 倍 ($P<0.01$)。*Ah* 组与

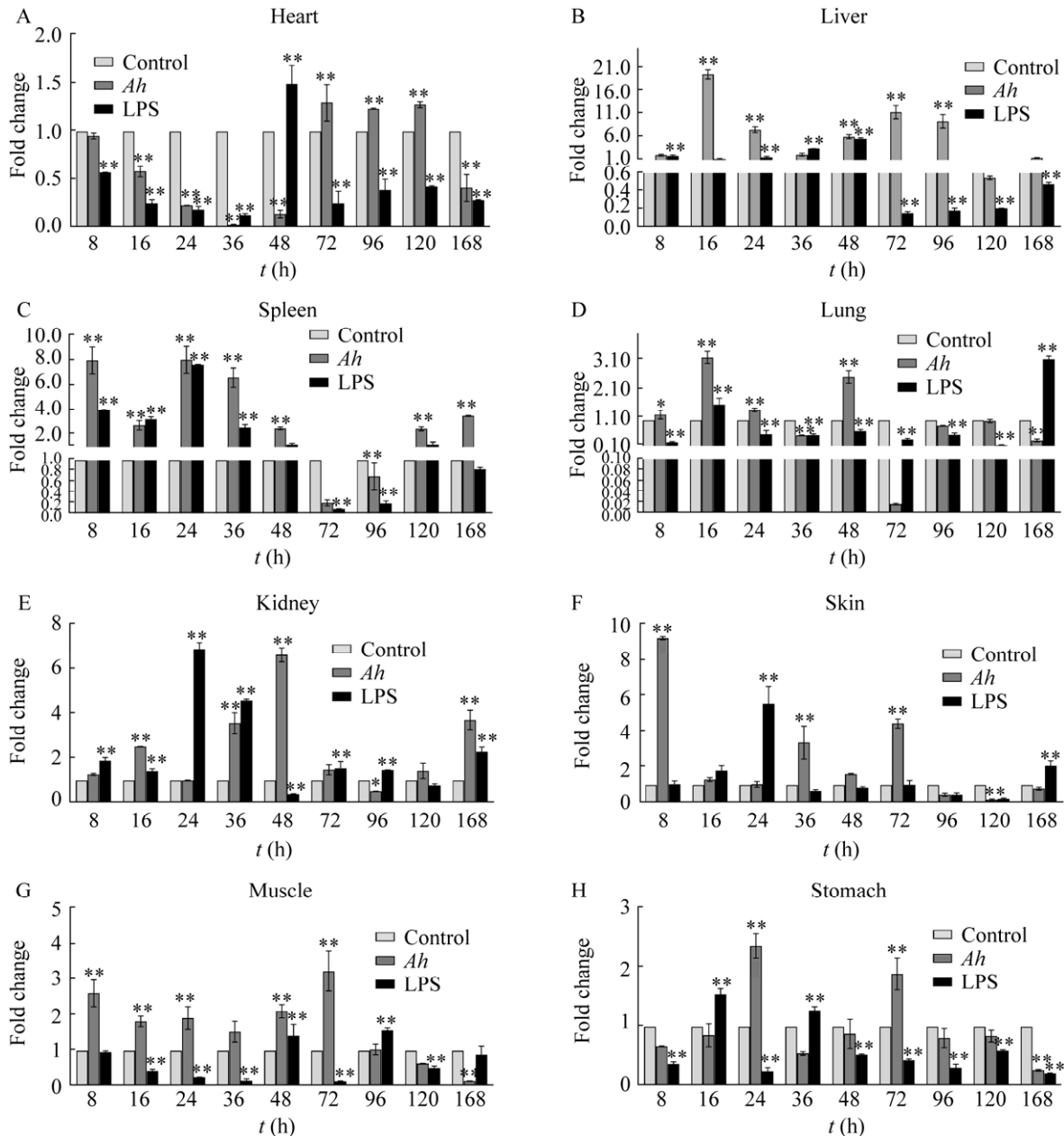


图 6 嗜水气单胞菌和 LPS 处理后东北林蛙 *LepROT* mRNA 表达量的变化

Figure 6 The relative expression of *LepROT* mRNA in different tissues in *Rana dybowskii* after infection with *Ah* and LPS injection. (A) Heart. (B) Liver. (C) Spleen. (D) Lung. (E) Kidney. (F) Skin. (G) Muscle. (H) Stomach, the samples were collected at different time points after *Ah* or LPS (x-axis). β -actin as an internal control. The results were expressed as the $\bar{x} \pm s$ error (bars) of three replicates. *: $P < 0.05$ vs. *LepROT* expression on uninfected control group; **: $P < 0.01$ vs. *LepROT* expression on uninfected control group.

LPS 组在肺脏组织中, 表现出相反的变化规律, *Ah* 组在 16 h 和 24 h 显著上调, 而 LPS 组在 72 h 和 96 h 显著上调。在肾脏组织中, 二者差异明显,

Ah 组在 24 h 达到峰值, 为对照组的 3.41 倍 ($P < 0.01$); 而 LPS 组在 96 h 达到峰值, 为对照组的 2.65 倍 ($P < 0.01$)。皮肤组织则与肾脏组织相反,

LPS 组显著上调,尤其在 96 h 出现峰值,为对照组的 7.41 倍 ($P<0.01$)。在肌肉组织中,2 试验组都没有明显变化,只有在 96 h 时,LPS 组为对照

组的 9.47 倍 ($P<0.01$)。在胃组织中,*Ah* 组无明显变化,而 LPS 组在 120 h 达到峰值,为对照组的 7.55 倍 ($P<0.01$) (图 7A-H)。

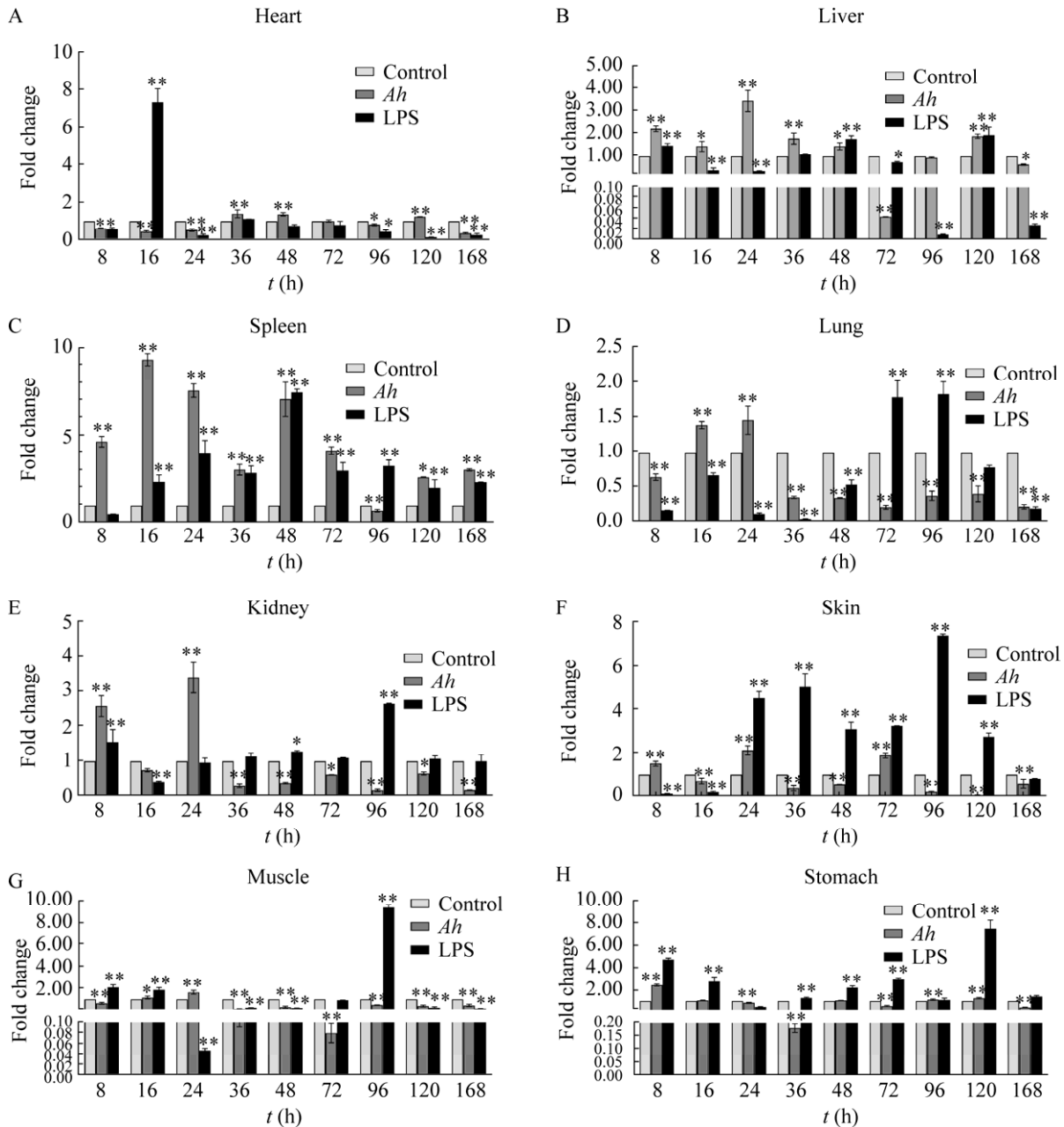


图 7 嗜水气单胞菌和 LPS 处理后东北林蛙 *IKKα* mRNA 表达量的变化

Figure 7 The relative expression of *IKKα* mRNA in different tissues in *Rana dybowskii* after infection with *Ah* and LPS injection. (A) Heart. (B) Liver. (C) Spleen. (D) Lung. (E) Kidney. (F) Skin. (G) Muscle. (H) Stomach, the samples were collected at different time points after *Ah* or LPS (*x*-axis). β -actin as an internal control. The results were expressed as the $\bar{x} \pm s$ error (bars) of three replicates. *: $P<0.05$ vs. *LepROT* expression on uninfected control group; **: $P<0.01$ vs. *LepROT* expression on uninfected control group.

2.5.3 不同组织 *IKK β* mRNA 转录水平

IKK β mRNA 表达量变化与 *IKK α* 的 mRNA 表达量变化基本一致。只有 LPS 组的心脏组织, *IKK β* 与 *IKK α* 在 16 h 达到峰值, 为对照组的 4.03 倍 ($P<0.01$)。肝脏、脾脏、肾脏、皮肤、肌肉和胃

组织中 *IKK β* 也与 *IKK α* 的表达变化情况基本一致。仅在感染后的脾脏组织中, 东北林蛙的 LPS 组 *IKK β* mRNA 相对表达量比 *Ah* 组高, LPS 组在 48 h 达到峰值, 为对照组的 7.34 倍 ($P<0.01$), 表明 *IKK α* 与 *IKK β* 具有同步性 (图 8A-H)。

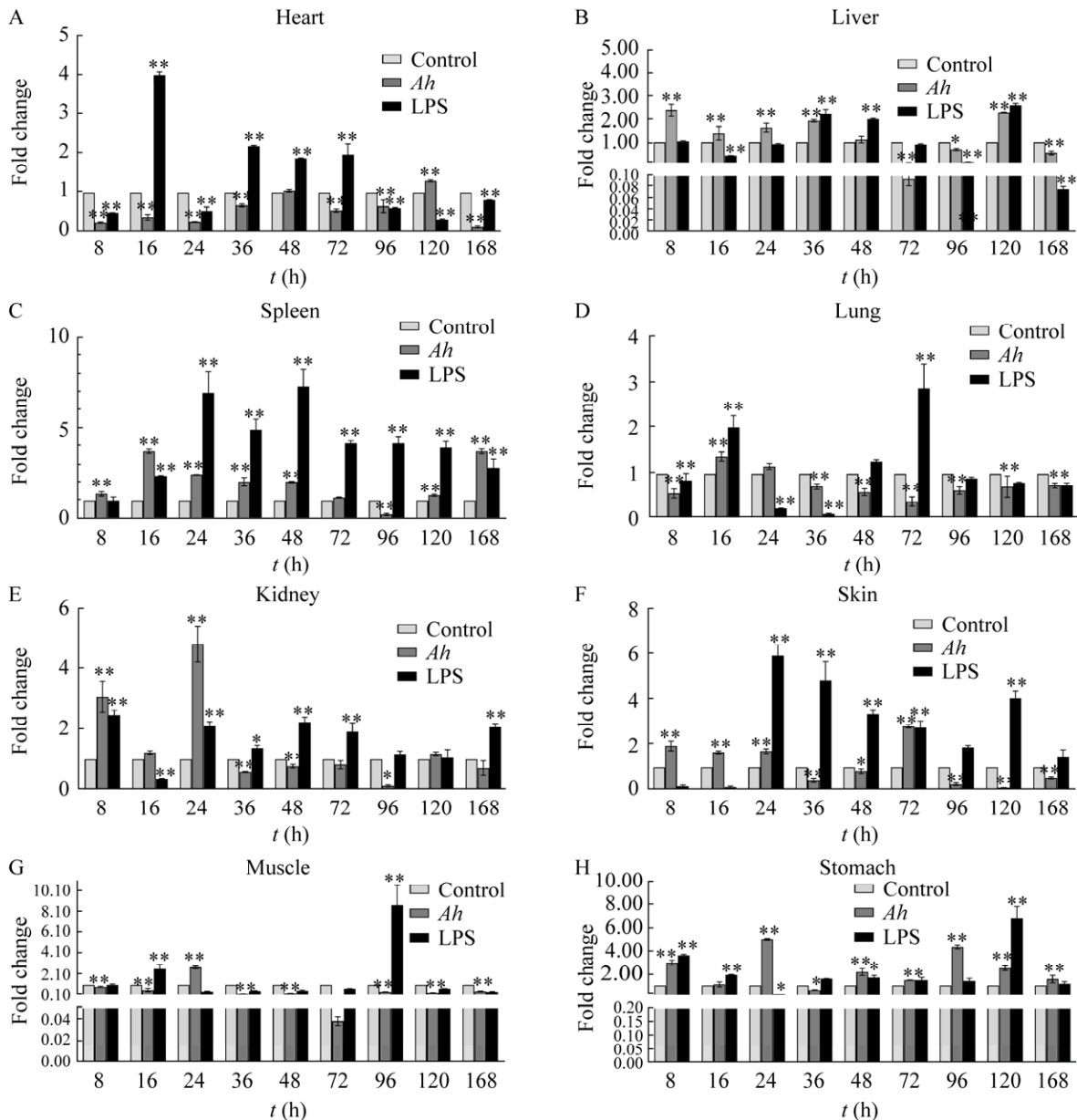


图 8 嗜水气单胞菌和 LPS 处理后东北林蛙 *IKK β* mRNA 表达量的变化

Figure 8 The relative expression of *IKK β* mRNA in different tissues in *Rana dybowskii* after infection with *Ah* and LPS injection. (A) Heart. (B) Liver. (C) Spleen. (D) Lung. (E) Kidney. (F) Skin. (G) Muscle. (H) Stomach, the samples were collected at different time points after *Ah* or LPS (x -axis). β -actin as an internal control. The results were expressed as the $\bar{x} \pm s$ error (bars) of three replicates. *: $P<0.05$ vs. *LepROT* expression on uninfected control group; **: $P<0.01$ vs. *LepROT* expression on uninfected control group.

2.5.4 不同组织 *NF- κ B* mRNA 转录水平

NF- κ B mRNA 的相对表达量也与 I κ B 激酶相对表达量变化基本一致。东北林蛙的心脏组织在 LPS 刺激下, *NF- κ B* mRNA 转录水平在 16 h 达到峰值, 为对照组的 1.84 倍 ($P < 0.01$); 而在 *Ah* 的刺激下, 在 96 h 达到峰值, 为对照组的 1.75 倍 ($P < 0.01$)。在肝脏组织中, *Ah* 组与 LPS 组的 *NF- κ B* mRNA 表达量基本一致, 但前者表达量相对显著。在脾脏组织中, *Ah* 组在 24 h 达到峰值, 为对照组的 2.85 倍 ($P < 0.01$); LPS 组在 96 h 达到峰值, 为对照组的 3.71 倍 ($P < 0.01$)。 *Ah* 组与 LPS 组肺脏组织的 *NF- κ B* mRNA 相对表达量在 16 h 显著上调, 分别为对照组的 1.78 倍和 1.25 倍 ($P < 0.01$)。在肾脏组织中, *Ah* 组在 8–24 h 显著上调, 在 24 h 达到峰值, 为对照组的 9.29 倍 ($P < 0.01$); LPS 组在 8 h 达到峰值, 为对照组的 3.52 倍 ($P < 0.01$)。在皮肤组织中, *Ah* 组在 8–24 h 显著上调, 在 24 h 达到峰值, 为对照组的 5.24 倍 ($P < 0.01$); LPS 组在 24–72 h 上调, 在 24 h 达到峰值, 为对照组的 2.64 倍 ($P < 0.01$)。在肌肉组织中, *NF- κ B* mRNA 相对表达量与 *IKK α* 、*IKK β* 不同, *Ah* 组较 LPS 组 *NF- κ B* mRNA 表达量显著上调。*Ah* 组的胃在 8–24 h 显著上调, 且在 24 h 达到峰值, 为对照组的 6.59 倍 ($P < 0.01$); LPS 组在 120 h 显著上调, 为对照组的 8.27 倍 ($P < 0.01$) (图 9A–H)。

3 讨论

东北林蛙是我国二级保护动物, 不仅能大量捕食森林、牧草和农作物的害虫, 而且其整体或雌蛙输卵管的干制品, 亦称哈士蟆和哈士蟆油, 均可入药, 是我国名贵中药材之一, 具有重要的科研价值和药用价值。研究表明, 两栖类易受嗜水气单胞菌感染, 是导致种群数目

减少的重要原因之一^[15]。本研究对东北林蛙 *LepROT* 基因的编码区进行了克隆和序列分析, 系统进化树分析表明东北林蛙的 *LepROT* 与中国林蛙、中华大蟾蜍、非洲爪蟾等具有较高的氨基酸序列同源性, 表明 *LepROT* 在两栖类分子进化中相对保守。东北林蛙与非洲爪蟾 *LepROT* 的三级结构极为相似, 推测 *LepROT* 在二者体内发挥相同的作用, 但前者比后者结构略有松散。本研究还首次分析感染 *Ah* 与 LPS 的东北林蛙各组织中 *LepROT* 蛋白表达及 *NF- κ B* 信号通路中相关因子的表达。结果表明, 感染 *Ah* 与 LPS 会导致东北林蛙各组织出现严重病变, *LepROT* 可能通过调节瘦素与瘦素受体结合从而激活 *NF- κ B* 信号通路。

LepROT 是由瘦素受体相关基因编码的跨膜蛋白受体, 主要在不同组织间转运瘦素, 具有结合游离瘦素和缓冲其血循环浓度水平的功能^[11]。在 *Ah* 与 LPS 的刺激下, *LepROT* 基因在东北林蛙大多数组织中明显上调, 特别是在脾脏、皮肤和肝脏, 这与以往在河豚鱼和黄颡鱼的研究结果一致, 表明皮肤是两栖动物抗原呈递的主要部位之一^[24-25]。*LepROT* 基因不仅在东北林蛙的不同组织中广泛表达, 也在其他物种组织中广泛表达, 例如哺乳动物和斑马鱼^[10-12]。*LepROT* 信号调控与 *NF- κ B* 信号通路有关, *NF- κ B* 参与调节和诱导多种促炎性细胞因子, 包括 p65/RelA、p52、c-Rel、RelB、p50 以及 p52 亚单位^[26]。*NF- κ B* 的激活依赖于其抑制剂 I κ B α 的磷酸化和 3 个密切相关的激酶 (*IKK α* 、*IKK β* 和 *IKK γ*), 通过与磷酸化相关的丝氨酸残基在 I κ B α 降解中发挥关键作用^[27]。在东北林蛙的各个组织中, *NF- κ B*、*IKK α* 和 *IKK β* 基因的表达趋势相似, 表明它们之间存在相关性, 证实了胁迫后 *NF- κ B* 信号通路被激活。

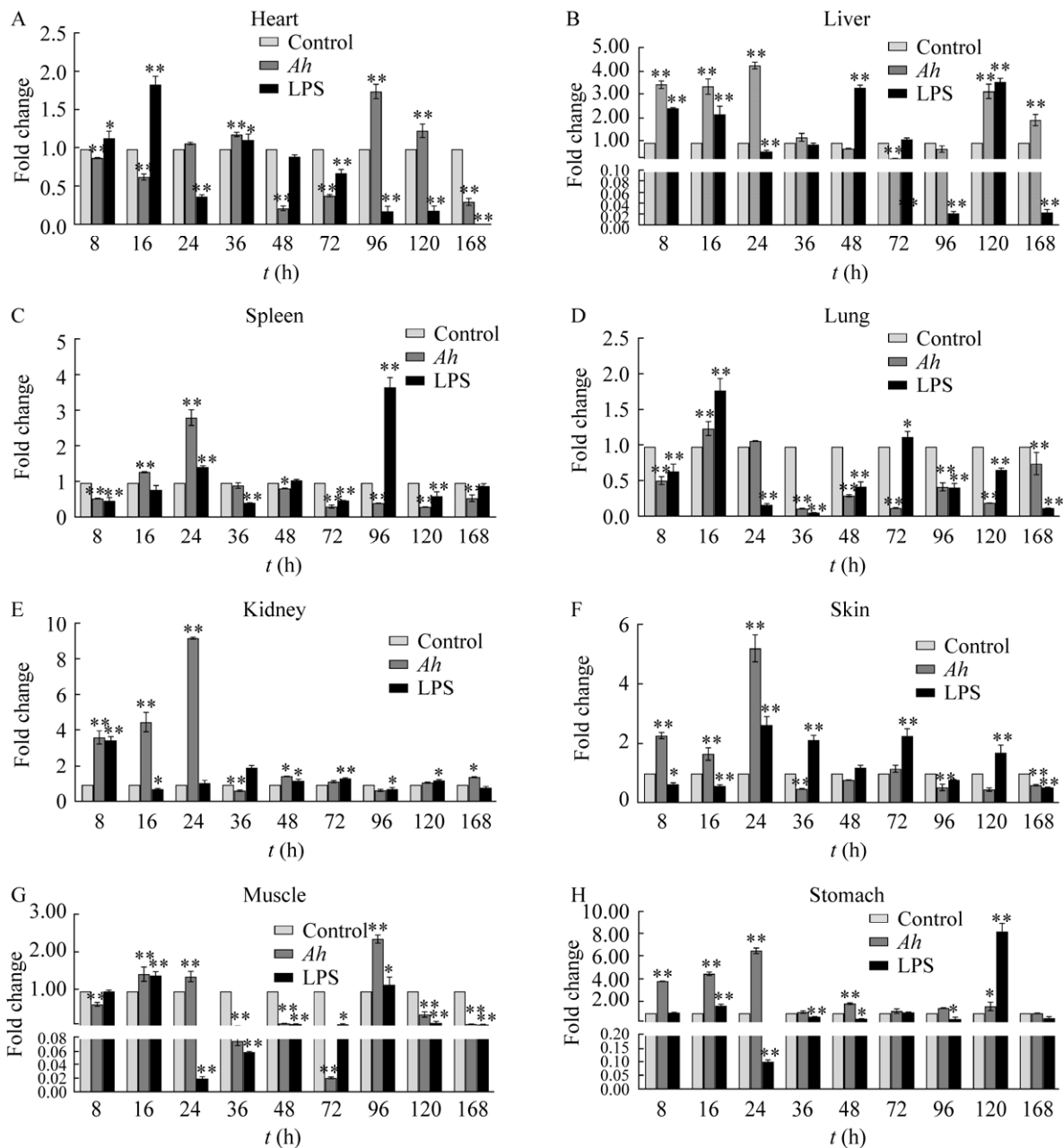


图9 嗜水气单胞菌和LPS处理后东北林蛙 *NF-κB* mRNA 表达量的变化

Figure 9 The relative expression of *NF-κB* mRNA in different tissues in *Rana dybowskii* after infection with *Ah* and LPS injection. (A) Heart. (B) Liver. (C) Spleen. (D) Lung. (E) Kidney. (F) Skin. (G) Muscle. (H) Stomach, the samples were collected at different time points after *Ah* or LPS (x-axis). β -actin as an internal control. The results were expressed as the $\bar{x} \pm s$ error (bars) of three replicates. *: $P < 0.05$ vs. *LepROT* expression on uninfected control group; **: $P < 0.01$ vs. *LepROT* expression on uninfected control group.

瘦素是一种脂肪生成激素，与瘦素受体结合后具有多种生物学功能（如可促进细胞增殖、抗凋亡、促进癌细胞侵袭等）^[28]。而在肥胖

人群中，瘦素的分泌随着脂肪的增多而浓度增大，但大量的瘦素无法与细胞膜上的受体结合，从而导致瘦素信号通路及其相关生理功能受到

抑制,就会出现瘦素抵抗^[29]。有报道称, LepROT 能抑制细胞膜上 LEPR 在下丘脑弓状核中的表达,抑制 LepROT 表达后,可以增强瘦素信号通路表达及相关生理功能的作用,从而缓解瘦素抵抗^[30]。在本研究中,我们发现 LepROT mRNA 的相对表达量在各个组织各个时间点的样品均出现显著上调的现象,这与王传旭^[31]的研究结果一致。研究还发现, LepROT 与 NF- κ B、IKK α 和 IKK β mRNA 的相对表达量均出现上调现象,一些组织出现时间的滞后性,表明 LepROT 不具有抑制 NF- κ B、IKK α 和 IKK β mRNA 的相对表达量上调的作用,其 mRNA 的表达趋势与 NF- κ B、IKK α 和 IKK β 相似。LepROT、NF- κ B、IKK α 和 IKK β 这些基因在东北林蛙中的广泛分布有力地支持了该蛋白可能在两栖类中具有许多不同的生理作用,拓宽了该蛋白在脊椎动物中的功能前景。

4 结论

本研究获得了东北林蛙 LepROT 的核苷酸序列 396 bp, 编码 131 个氨基酸残基, 其三级结构模型与非洲爪蟾基本相似。东北林蛙 LepROT 与两栖类、哺乳类等亲缘关系均较近, 在不同物种间具有高度保守性。在感染 Ah 与注射 LPS 后, 其组织中的 LepROT、NF- κ B、IKK α 和 IKK β mRNA 均呈现显著上调, 推测 LepROT 可能激活 NF- κ B 信号通路, 进一步提高抗感染能力。

REFERENCES

- [1] Cicekdal MB, Kazan BT, Tuna BG, et al. Effects of two types of calorie restriction on methylation levels of adiponectin receptor 1 (AdipoR1) and leptin receptor overlapping transcript (leprot) in a MMTV-TGF- α breast cancer mouse model. *Br J Nutr*, 2020, 123(9): 1079.
- [2] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, 372(6505): 425-432.
- [3] Crespi EJ, Denver RJ. Leptin (ob gene) of the South African clawed frog *Xenopus laevis*. *PNAS*, 2006, 103(26): 10092-10097.
- [4] Yuan L, Wang Y, Hu Y, et al. *In ovo* leptin administration modulates glucocorticoid receptor mRNA expression specifically in the hypothalamus of broiler chickens. *Neurosci Lett*, 2017, 638: 181-188.
- [5] Swain JE, Dunn RL, McConnell D, et al. Direct effects of leptin on mouse reproductive function: regulation of follicular, oocyte, and embryo development. *Biol Reprod*, 2004, 71(5): 1446-1452.
- [6] Zhao Y, Sun R, You L, et al. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300(2): 247-252.
- [7] Baumann H, Morella KK, White DW, et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *PNAS*, 1996, 93(16): 8374-8378.
- [8] Bailleul B, Akerblom I, Strosberg AD. The leptin receptor promoter controls expression of a second distinct protein. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(14): 2752-2758.
- [9] Mercer JG, Moar KM, Hoggard N, et al. B219/OB-R 5'-UTR and leptin receptor gene-related protein gene expression in mouse brain and placenta: tissue-specific leptin receptor promoter activity. *J Neuroendocrinol*, 2000, 12(7): 649-655.
- [10] Couturier C, Sarkis C, Séron K, et al. Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. *PNAS*, 2007, 104(49): 19476-19481.
- [11] Touvier T, Conte-Auriol F, Briand O, et al. LEPROT and LEPROTL1 cooperatively decrease hepatic growth hormone action in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119(12): 3830-3838.
- [12] Pasquier J, Cabau C, Nguyen T, et al. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 368.
- [13] Deng SP, Chen HP, Zhu CH, et al. Leptin receptor overlapping transcript: characterization, tissue distribution and changes in gene expression in response to eyestalk ablation in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Sci*, 2017, 83(1): 57-64.

- [14] 赵文阁, 刘鹏, 陈辉. 黑龙江省两栖爬行动物志. 北京: 科学出版社, 2008.
Zhao WG, Liu P, Chen H. Amphibians and Reptiles in Heilongjiang Province. Beijing: Science Press, 2008 (in Chinese).
- [15] 边若菲. 嗜水气单胞菌胁迫下东北林蛙 *MHCI* 基因表达的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2021.
Bian RF. Expression of *MHCI* gene in *Rana dybowskii* under stress of *Aeromonas hydrophila*[D]. Harbin: Harbin Normal University, 2021 (in Chinese).
- [16] 刘学龙, 梁晚枫. 中国林蛙“红腿病”病原研究. 中国兽医杂志, 2005, 41(10): 62.
Liu XL, Liang WF. Etiology of red leg disease of *Rana chensinensis*. Chin J Vet Med, 2005, 41(10): 62 (in Chinese).
- [17] Tang D, Gao Y, Wang R, et al. Characterization, genomic organization, and expression profiles of MyD88, a key adaptor molecule in the TLR signaling pathways in miuiy croaker (*Miichthys miuiy*). Fish Physiol Biochem, 2012, 38(6): 1667-1677.
- [18] Dong W, Gao W, Cui J, et al. microRNA-148 is involved in NF- κ B signaling pathway regulation after LPS stimulation by targeting IL-1 β in miuiy croaker. Fish Shellfish Immunol, 2021, 118: 66-71.
- [19] 许腾腾, 赵慧娟, 刘尊英. 连翘提取物对嗜水气单胞菌群体感应系统的影响. 微生物学通报, 2021, 11: 1-35.
Xu TT, Zhao HJ, Liu ZY. Effect of forsythia suspensa extract on quorum sensing system of *Aeromonas hydrophila*. Microbiol China, 2021, 11: 1-35.
- [20] 史雪灿, 柴龙会, 牛曙东, 等. 嗜水气单胞菌胁迫下东北林蛙皮肤 MyD88 和 TRAF6 基因表达的动态变化. 动物医学进展, 2015, 36(6): 59-63.
Shi XC, Chai LH, Niu SD, et al. Expression dynamics of *MyD88* and *TRAF6* genes in *Rana dybowskii* infected with *Aeromonas hydrophila*. Prog Vet Med, 2015, 36(6): 59-63 (in Chinese).
- [21] 史雪灿. 嗜水气单胞菌胁迫下东北林蛙 TLR4 信号通路相关分子的表达研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.
Shi XC. Expression studies of TLR4 signaling pathway related molecules in *Rana dybowskii* under the stress of *Aeromonas hydrophila*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2015 (in Chinese).
- [22] 曲俐俐. 嗜水气单胞菌胁迫下东北林蛙 TLRs/MyD88 信号通路中关键分子 IKKs 的动态变化[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
Qu LL. Dynamic change of key molecules IKKs in the TLRs/MyD88 signaling pathway of *Rana dybowskii* under the stress of *Aeromonas hydrophila*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019 (in Chinese).
- [23] 王昌河, 谢振丽, 吕建伟. 动物组织石蜡切片 H-E 染色的快速方法. 生物学通报, 2012, 47(07):50-51.
Wang CH, Xie ZL, Lv JW. Rapid method for H-E staining of paraffin sections of animal tissues. Bull Biol, 2012, 47(07):50-51.
- [24] Gong Y, Luo Z, Zhu QL, et al. Characterization and tissue distribution of leptin, leptin receptor and leptin receptor overlapping transcript genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Gen Comp Endocrinol, 2013, 182: 1-6.
- [25] Kurokawa T, Murashita K, Suzuki T, et al. Genomic characterization and tissue distribution of leptin receptor and leptin receptor overlapping transcript genes in the pufferfish, *Takifugu rubripes*. Gen Comp Endocrinol, 2008, 158(1): 108-114.
- [26] 胡卫华. 钩藤碱对 OGD/R 诱导的 BV-2 小胶质细胞中 Notch1/NF- κ B 通路蛋白及炎症因子 mRNA 的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
Hu WH. Effects of uncarine on Notch1/NF- κ B pathway protein and inflammatory factor mRNA in OGD/R induced BV-2 microglia[D]. Nanchang: Nanchang University, 2021 (in Chinese).
- [27] Ai M, Lin S, Zhang M, et al. Cirsiolineol attenuates LPS-induced inflammation in both *in vivo* and *in vitro* models via inhibiting TLR-4/NF- κ B/IKK signaling pathway. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(8): e22799.
- [28] La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity. Cytokine, 2017, 98: 51-58.
- [29] Zhang Y, Chua S. Leptin function and regulation. Compr Physiol, 2017, 8(1): 351-369.
- [30] Xi LQ, Liu YN, Tang ZQ, et al. Expression of leptin receptor in the oviduct of Chinese brown frog (*Rana dybowskii*). Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol, 2017, 312(6): R912-R918.
- [31] 王传旭. 蛋白磷酸酶 6(PP6)和瘦素受体叠加转录蛋白(LepROT)在棉铃虫变态和发育中的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.
Wang CX. The function of protein phosphatases 6(PP6) and leptin receptor overlapping transcript (LepROT) in metamorphosis and development in *Helicoverpa armigera*[D]. Jinan: Shandong University, 2012 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)