

# 瓶鼻海豚(*Tursiops truncatus*)及其近缘物种 牛(*Bos taurus*) *TLR8* 基因免疫应答功能的探究

谷 龙, 章纬菁, 于芳芳, 任文华

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 鲸类是陆生哺乳动物的后代, 大约在 5 600 万年前从陆地过渡到海洋, 鲸类自身免疫机能为了应对海洋病原体的挑战发生了适应进化。 *TLR8* 基因属于病毒型 Toll 样受体家族成员, 被病原体诱导后激活下游信号通路, 在调节机体抵抗病原体感染的免疫方面发挥着重要作用。 本研究分析了瓶鼻海豚(*Tursiops truncatus*)及其近缘陆生物种牛(*Bos taurus*)的 *TLR8* 基因的结构, 克隆了 *TLR8* 基因并构建重组质粒转染人胚肾细胞系 HEK293 细胞, 再用 *TLR8* 人工合成激动剂 R848 刺激该细胞, 检测 *TLR8* 信号通路下游基因 *NF-κB* 和 *IL-8* 的表达差异。 实验结果表明, 两个物种的 *NF-κB* 和 *IL-8* 表达量均显著高于空载体转染组, 而瓶鼻海豚的表达量又均低于牛。 由此推测, 在应对异源刺激时 *TLR8* 基因发挥了免疫功能, 为了适应不同于陆地环境的海洋环境, 鲸类采取了和陆生哺乳动物不同的应对策略和模式。

[关键词] 瓶鼻海豚, 牛, *TLR8* 基因, *NF-κB*, *IL-8*

[中图分类号] Q594 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2021)04-0043-10

## Research on *TLR8* Gene Immune Response Function of Bottlenose Dolphins(*Tursiops truncatus*) and Cattle(*Bos taurus*)

Gu Long, Zhang Weijing, Yu Fangfang, Ren Wenhua

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Cetaceans are the descendants of terrestrial mammals. They transitioned from land to ocean about 56 million years ago. The autoimmune function of cetaceans evolved to meet the challenges of marine pathogens. *TLR8* gene is a member of the viral Toll-like receptor family. It activates downstream signal pathways after being induced by pathogens, and plays an important role in regulating the body's immunity against pathogen infection. In this study, we analyzed the structure of the *TLR8* gene of the bottlenose dolphin(*Tursiops truncatus*) and cattle(*Bos taurus*), cloned the *TLR8* gene and constructed a recombinant plasmid to transfect the human embryonic kidney cell line HEK293 cells, and then stimulated the *TLR8* synthetic agonist R848 Cells, to detect the differences in the expression of *NF-κB* and *IL-8* downstream of the *TLR8* signaling pathway. The experimental results showed that the expression levels of *NF-κB* and *IL-8* of the two species were significantly higher than those of the empty vector transfection group, while the expression levels of bottlenose dolphins were lower than those of cattle. It is speculated that the *TLR8* gene exerts an immune function in response to heterologous stimuli. In order to adapt to the marine environment different from the terrestrial environment, cetaceans have adopted different coping strategies and models from terrestrial animals.

**Key words:** *Tursiops truncatus*, *Bos taurus*, *TLR8*, *NF-κB*, *IL-8*

鲸类的陆地祖先在大约 5 600 万年前从陆地进入海洋<sup>[1]</sup>, 面对和陆地不同的生态环境, 鲸类从形态、生理到分子水平发生了一系列进化适应, 例如为了应对海洋中多样且随着洋流迅速传播的病原体<sup>[2]</sup>, 鲸类的免疫功能发生了相应的变化。鲸类既有和陆生哺乳动物同源的免疫器官, 又有其独特的解剖结构如淋巴上皮喉部腺体等<sup>[3]</sup>。在分子水平上, 有研究发现主要组织相容性复合物(MHC)基因变异与鲸类对病

收稿日期: 2020-11-23.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31872219, 31370401, 31772448, 31630071).

通讯作者: 任文华, 博士, 教授, 研究方向: 生物化学与分子生物学. E-mail: 08162@njnu.edu.cn

原体侵袭的免疫能力有关<sup>[4]</sup>;对印度太平洋驼背海豚(*Sousa chinensis*)的白细胞转录组的分析也发现了大量可能在免疫耐受中起作用的相关基因<sup>[5]</sup>。此外,一些关于 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLRs)分子进化的研究证明,TLRs 在鲸类中发生了正选择<sup>[6-9]</sup>。

哺乳动物的免疫类型分为先天免疫和获得免疫两种系统,TLRs 作为先天免疫系统的核心成分,处于抵御病原体的第一线。TLRs 位于细胞膜表面或细胞内膜系统上,作为中间介导分子,识别病原体相关的分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),并启动细胞内信号转导的级联反应,最终形成适应性免疫<sup>[10]</sup>。哺乳动物有 10~15 种 TLRs,每种都适应特定病原体的不同配体<sup>[11-12]</sup>。*TLR1*、*TLR2*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR6*、*TLR10* 和 *TLR11* 位于细胞膜上,参与识别杆菌、鞭毛蛋白、真菌和衣原体等病原微生物,被称为非病毒性 TLRs。*TLR3*、*TLR7*、*TLR8* 和 *TLR9* 位于细胞内的细胞器膜上,比如内质网膜上,参与识别病原微生物的核酸物质,如单链或双链病毒 RNA,属于病毒型 TLRs<sup>[13]</sup>。其中,*TLR8* 的天然配体主要是单链病毒 RNA(ssRNA)<sup>[12,14]</sup>,也能被某些人工合成的激动剂如瑞奎莫特(Resiquimod, R848)、咪喹莫特(Imiquimod)等激活。配体被 TLR8 识别后,通过髓样分化因子 88(MyD88)信号通路激活下游转录因子(如 NF- $\kappa$ B 和 c-Jun)<sup>[15-16]</sup>,产生一系列的细胞免疫因子如 *IL-8*、*IL-12* 等<sup>[17]</sup>,从而对病毒产生天然免疫。

TLRs 作为 I 型跨膜蛋白,均具有相似的结构,通常由胞外域、跨膜域和胞内域组成。其中,胞外域主要包含数个富含亮氨酸重复序列(Leucine rich repeats, LRRs)结构域;胞内域为 Toll-IL-1 结构域(TIR 结构域),参与信号转导;胞外域和胞内域之间通过单个跨膜螺旋结构域相连<sup>[18]</sup>。徐等对鲸类包括 TLR8 在内的 10 种 TLRs 进行生物信息学分析,发现其胞外域具有大量正选择位点,并且绝大多数正选择位点发生了激进的氨基酸替代<sup>[19]</sup>。

鲸类和陆生哺乳动物 *TLR8* 基因结构和功能的差异目前尚未见报道,本研究通过克隆测序鉴定了瓶鼻海豚和牛两个物种的 *TLR8* 基因序列,并对其氨基酸序列和蛋白质结构进行了生物信息学分析;此外通过克隆瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 基因,转染人源肾细胞系 HEK293 细胞(该细胞自身不表达 *TLR8*,通过人工激活剂 R848 刺激可以产生 *TLR8*),检测其下游基因的表达差异,探讨鲸类适应海洋环境发生的免疫适应分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品和主要试剂

瓶鼻海豚肌肉样本取自本课题组积累的中国沿海搁浅或意外捕获/杀死的死亡个体,牛肝脏样本采购自南京市栖霞区附近屠宰场。动物材料处理的所有程序均经南京师范大学机构评审委员会批准。用 DNA/RNA 样品保护剂(Takara)处理样品,液氮保存。本实验使用 HEK293 细胞系购自美国 ATCC 公司。

RNA 保护试剂 RNAliso、Plus、PrimeScript<sup>TM</sup> RT 试剂盒、DNA Marker、限制性内切酶、T4 连接酶购自 Takara 公司;R848(Resiquimod)购自 InvivoGen 公司;Luciferase 报告系统试剂盒、NF- $\kappa$ B-Luc 质粒、pRL-TK 质粒购自 Promega 公司;Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司;切胶纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司;胎牛血清、Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司;SYBR Green Master(ROX)购自 Roche 公司;pcDNA3.1+质粒购自 Thermo 公司;NF- $\kappa$ B(P65)、 $\beta$ -actin、IL-8 兔抗鼠一抗和羊抗兔二抗购自美国 Immuno-Way 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 瓶鼻海豚基因组 DNA 提取

瓶鼻海豚 *TLR8* CDS 处于一个外显子内,使用酚氯仿抽提法提取了瓶鼻海豚基因组 DNA 用于目的基因的扩增。

#### 1.2.2 牛肝脏组织总 RNA 提取和 RT-PCR 获得 cDNA

按照 RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent(Invitrogen 公司)说明书进行牛新鲜肝脏样品总 RNA 提取,加入 50  $\mu$ L Rnase-free water 溶解沉淀,产物浓度检测后 -80  $^{\circ}$ C 保存。

根据 PrimeScript<sup>TM</sup> RT 试剂盒(Takara 公司)说明书逆转录 RNA 成 cDNA,4  $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.2.3 瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 基因克隆

GenBank 中瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 基因的收录号分别为 XM\_004317714、EF583902.1,据此序列使用引物

设计软件 Primer Premier 5 和 DNASTAR 设计其开放阅读框的引物,在上下游引物的 5'端分别添加限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点和保护碱基. 引物序列见表 1 Primers for PCR 部分.

分别以瓶鼻海豚基因组 DNA 和牛 cDNA 为模板扩增 *TLR8* 基因,简称为 *dTLR8* 和 *cTLR8*. PCR 产物测序.

1.2.4 TLR8 蛋白结构预测分析

使用 MEGA 软件对瓶鼻海豚和牛的 TLR8 蛋白进行序列比对;使用 SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽;使用 TMHMM Sever, v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测跨膜区;使用 SMART 网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测 TLR8 功能域;使用 EZMOL (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/ezmol/>) 预测蛋白质的三维结构;使用 Pymol 软件对瓶鼻海豚和牛两种蛋白质的三维结构进行比对.

1.2.5 TLR8 重组质粒的构建和 HEK293 细胞转染

*dTLR8* 和 *cTLR8* 基因全长片段分别与 pcDNA3.1+质粒连接,转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,使用 Axygen 试剂盒进行质粒抽提.

培养细胞密度至合适时使用试剂 Lipofectamine 2000 进行转染,将 Opti-MEM 与 Lipofectamine 2000 或质粒等比例混合.

1.2.6 双荧光素酶报告系统检测 NF- $\kappa$ B 表达

将 *dTLR8*-pcDNA3.1+质粒或 *cTLR8*-pcDNA3.1+质粒与 NF- $\kappa$ B 启动子驱动的萤火虫荧光素酶报告质粒(NF- $\kappa$ B-Luc)及海肾荧光素酶报告质粒(pRL-TK)共转染至 HEK293 细胞,24 h 后加入 R848 进行刺激(每孔 1  $\mu$ g/mL),培养一段时间后通过 Dual-luciferase 报告系统试剂盒(Promega 公司)进行荧光强度的测定,从而获得 NF- $\kappa$ B 表达情况.

1.2.7 qRT-PCR 检测 IL-8 表达情况

将 *dTLR8*-pcDNA3.1+质粒与 *cTLR8*-pcDNA3.1+质粒分别转染至 HEK293 细胞,24 h 后加入 R848 进行刺激(每孔 1  $\mu$ g/mL),处理 8 h 后提取 RNA 并进行反转录,通过 qRT-PCR 检测 TLR8 及其下游免疫因子 *IL-8* 的 mRNA 表达水平. 引物序列见表 1 Primers for qRT-PCR 部分.

实验进行 3 次生物学重复,且每次重复使用 3 个复孔.

1.2.8 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 和 IL-8

离心收集被 R848 刺激的转染 *TLR8*-pcDNA3.1+的 HEK293 细胞,充分裂解,检测细胞上清总蛋白浓度,并调整为一致的终浓度. 12%分离胶 SDS-PAGE 电泳. 转移蛋白至 PVDF 膜上分别进行一抗二抗反应. 使用凝胶成像仪进行曝光显色.

1.2.9 数据处理

重复实验 3 次,*t* 检验检测统计数值差异,显著差异用 \* 表示( $P<0.05$ ),极显著差异用 \*\* 来表示( $P<0.01$ ).

表 1 引物序列  
Table 1 Primers sequences

Primers for PCR		
	引物名称	序列(5'→3')
<i>Bos taurus</i>	<i>TLR8-F</i>	CGCGGATCCATGACCCCTTCACCTTTTGCTTCTGAC
<i>Bos taurus</i>	<i>TLR8-R</i>	CCGCTCGAGTTAGTATGCTTAATGGAATTGAC
<i>Tursiops truncatus</i>	<i>TLR8-F</i>	CGCGGATCCATGACTCTTCACCTTTTGCTTCTGACC
<i>Tursiops truncatus</i>	<i>TLR8-R</i>	CCGCTCGAGACTGCTGTGCATTCTTAGTATGTTG
Primers for qRT-PCR		
	引物名称	序列(5'→3')
	$\beta$ -actin-q-F	GAGCTACGAGCTGCCTGACG
	$\beta$ -actin-q-R	CCTAGAAGCATTTGCGGTGG
	<i>TLR8-q-F</i>	TGGTTTACTGGGATGCTTGTT
	<i>TLR8-q-R</i>	TGTCCTCACTCTCTCCAGGTGG
	<i>IL-8-q-F</i>	CATACTCCAAACCTTCCACC
	<i>IL-8-q-R</i>	AAACTTCTCCACAACCCTCTG

2 结果与讨论

2.1 瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 基因克隆

根据 GenBank 中瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 基因的收录号分别设计引物,以瓶鼻海豚基因组 DNA 和牛 RNA 逆转录成的 cDNA 为模板扩增 *TLR8* 基因,PCR 产物检测如图 1A、B 第 2 泳道所示,产物序列长度约 3 000 bp,经测序分别证实获得克隆目的片段分别为 3 198 bp 和 3 102 bp,各含有完整的开放阅读框 3 105 bp 和 3 072 bp,测序结果通过 NCBI 网站 BLAST 比对证实分别为瓶鼻海豚和牛的 *TLR8* 基因。

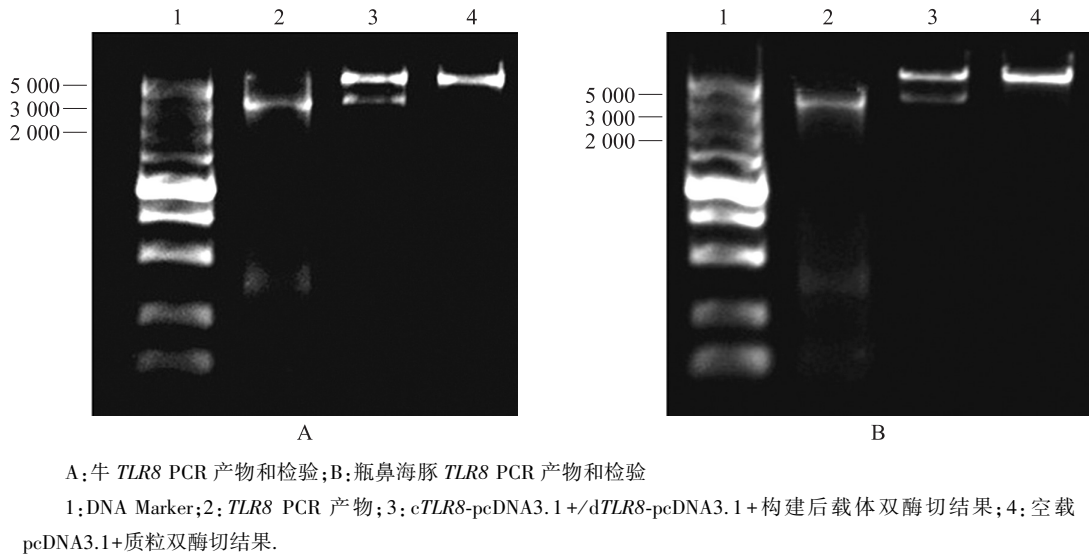


图 1 *TLR8* PCR 产物和表达载体双酶切检验

Fig. 1 The test of PCR products and expression vectors of *TLR8*

2.2 瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 蛋白结构预测

2.2.1 瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 蛋白质序列比对

使用 MEGA 软件对瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 的氨基酸序列进行比对,两个物种分别含有 1 035 和 1 024 个氨基酸残基(图 2),且牛和瓶鼻海豚相比,氨基酸位点存在多处不同:牛 *TLR8* 蛋白质在第 97~98 位点检测到 2 个氨基酸的缺失,在第 322~330 位点检测到 9 个氨基酸的缺失。同时,一级结构检测到 3 个与信号转导功能相关的高度保守的基序:Box1、Box2 和 Box3。

2.2.2 瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 蛋白质的信号肽、跨膜区和结构域预测

信号肽(SP)是引导新合成蛋白质到膜中或跨膜转移的短肽链。本研究使用信号肽预测工具 SignalP-5.0 sever 在线对瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 蛋白质的信号肽进行预测,结果发现两个物种的信号肽均为第 1~17 个氨基酸(图 2)。

使用蛋白质跨膜预测网站 TMHMM Sever v.2.0 对瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 蛋白质的分析发现,瓶鼻海豚的跨膜区为第 820~843 个氨基酸,牛的跨膜区为第 809~831 个氨基酸。瓶鼻海豚膜外区共 820 个氨基酸残基,牛与之相比有 159 个差异,占 19.4%。瓶鼻海豚膜内区共 192 个氨基酸残基,牛与之相比有 7 个差异,占 3.6%(图 2)。

使用 SMART 在线服务预测瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 蛋白质的结构域,结果显示瓶鼻海豚膜外区包括 18 个 LRR(leucine-rich repeats)序列(图 3A),其中瓶鼻海豚在 120~143,632~655 位点有 2 个 LRR\_TYR 结构域(LRR\_typical subfamily),在 766~817 有 1 个 LRRCT(LRR C-terminal domain);牛有 17 个 LRR 序列(图 3B),其中有 2 个分别位于 118~141,193~216 位点的 LRR\_TYR 结构域,1 个位于 755~806 位点的 LRRCT 结构域。本研究发现,牛不仅比瓶鼻海豚缺少 1 个 LRR 序列(即瓶鼻海豚 LRR3 序列),并且两者后续 LRR 的位置和数量也有一定区别。膜内区负责引导下游信号通路,较膜外域保守,且两个蛋白均预测到与白介素-1 型受体同源的 TIR(Toll/IL-1 receptor domain,TIR)结构域。





2.2.3 瓶鼻海豚和牛 TLR8 蛋白质的二级结构分析

利用在线分析软件 SOPMA 预测分析瓶鼻海豚和牛 TLR8 蛋白质所形成的二级结构,所得结果如图所示(图 4). 瓶鼻海豚 TLR8 蛋白中分别有 486 个  $\alpha$  螺旋(46.96%), 142 个  $\beta$  折叠(13.72%), 47 个  $\beta$  转角(4.54%)和 360 个无规则卷曲(34.78%);牛 TLR8 蛋白中分别有 440 个  $\alpha$  螺旋(42.97%), 150 个  $\beta$  折叠(14.65%), 54 个  $\beta$  转角(5.27%)和 380 个无规则卷曲(37.11%). 在瓶鼻海豚和牛 TLR8 蛋白二级结构中,  $\alpha$  螺旋数量差异达到了 46 个(占 10.4%),  $\beta$  折叠、 $\beta$  转角和无规则卷曲数量没有显著差别,但是它们的  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、 $\beta$  转角和无规则卷曲位置存在差别.



图中彩色字母表示二级结构,蓝色 h 代表  $\alpha$  螺旋,红色 e 代表  $\beta$  折叠,绿色 t 代表  $\beta$  转角,黄色 c 代表无规则卷曲.

A:瓶鼻海豚 TLR8 蛋白质的二级结构;B:牛 TLR8 蛋白质的二级结构

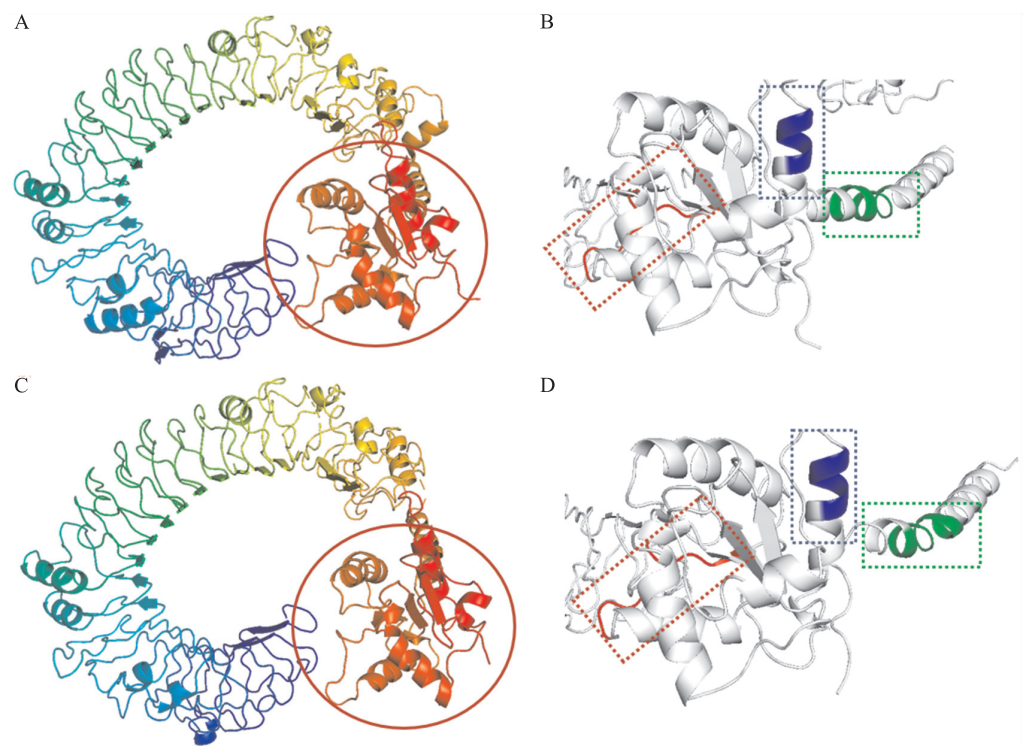
图 4 瓶鼻海豚和牛 TLR8 蛋白质的二级结构预测

Fig. 4 Prediction of the secondary structure of *Tursiops truncatus* and *Bos taurus* TLR8 protein

2.2.4 瓶鼻海豚和牛 TLR8 蛋白质的三级结构分析

瓶鼻海豚和牛 TLR8 的 3D 结构预测显示(图 5),瓶鼻海豚的  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠的数量为 18 个和 22 个,牛的为 18 个和 21 个. 同时,两个物种的膜外域均为马蹄形结构, $\alpha$  螺旋凸向环形外侧, $\beta$  折叠在内侧,瓶鼻海豚 TLR8 蛋白有 8 个大小不等的  $\alpha$  螺旋和 18 个  $\beta$  折叠,牛有 9 个  $\alpha$  螺旋和 17 个  $\beta$  折叠,两者存在 1 个  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠的差异;膜内域均为类球形结构, $\alpha$  螺旋包裹在球形外侧, $\beta$  折叠在内侧,瓶鼻海豚由 10 个  $\alpha$  螺旋和 4 个  $\beta$  折叠通过 loop 连接而成,牛有 9 个  $\alpha$  螺旋和 4 个  $\beta$  折叠,两者存在 1 个  $\alpha$  螺旋的差异.





A:瓶鼻海豚 TLR8 的三维结构;B:瓶鼻海豚 TLR8 膜内区放大图;C:牛 TLR8 的三维结构;D:牛 TLR8 膜内区放大图  
图中红色圈代表 TLR8 膜内区,绿色框代表 Box1,红色框代表 Box2,蓝色框代表 Box3.

图 5 瓶鼻海豚和牛 TLR8 蛋白质的三维结构预测

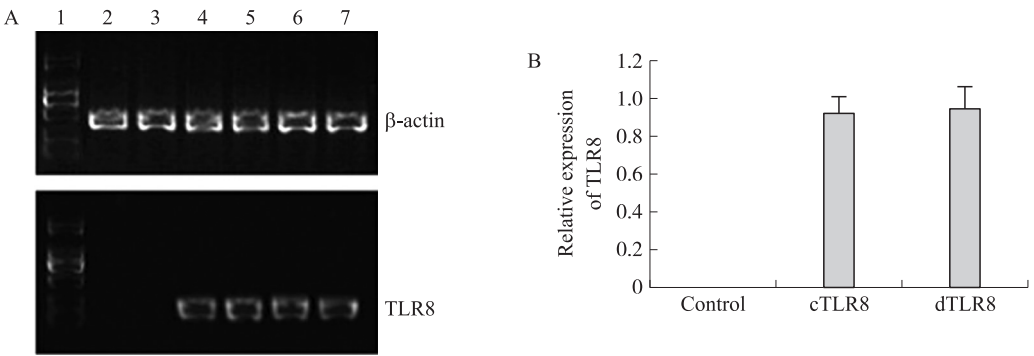
Fig. 5 Three-dimensional structure prediction of *Tursiops truncatus* and *Bos taurus* TLR8 protein

2.3 瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 重组质粒载体构建

双酶切扩增得到的瓶鼻海豚和牛 *TLR8* 基因,将其连接至双酶切后的 pcDNA3.1+质粒,从而构建表达载体. 构建后的 c*TLR8*-pcDNA3.1+/d*TLR8*-pcDNA3.1+载体双酶切验证结果见图 1,A、B 3 泳道均出现了两条带,一条带在 3 000 bp 附近,和 *TLR8* PCR 产物长度相当,另一条带在 5 000 bp 附近,长度与 4 泳道的空载质粒一致,表明质粒构建成功.

2.4 *TLR8* 的初始表达和转染效率的探究

本研究使用半定量 PCR 对细胞中 *TLR8* 表达情况进行了检测,结果如图 6A 所示,2、3 泳道无条带说明野生型细胞不表达 *TLR8*;4、5 和 6、7 两条泳道的条带明暗程度无差异. 因此可以认为,R848 刺激与否基本不影响 *TLR8* 的表达.



A:1;DNA Marker;2:不使用 R848 刺激的空载 pcDNA3.1+;3:使用 R848 刺激的空载 pcDNA3.1+;4:不使用 R848 刺激的 c*TLR8*-pcDNA3.1+;5:使用 R848 刺激的 c*TLR8*-pcDNA3.1+;6:不使用 R848 刺激的 d*TLR8*-pcDNA3.1+;7:使用 R848 刺激的 d*TLR8*-pcDNA3.1+;B:Control:空载 pcDNA3.1+;c*TLR8*:转染了 c*TLR8*-pcDNA3.1+表达载体的细胞;d*TLR8*:转染了 d*TLR8*-pcDNA3.1+表达载体的细胞.

图 6 *TLR8* 的初始表达和转染效率

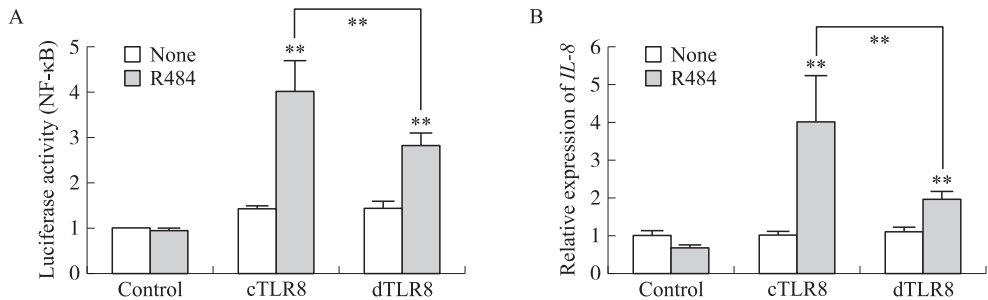
Fig. 6 The expression and transfection efficiency of *TLR8*

同时本研究使用 qRT-PCR 检测了转染 pcDNA3.1+、cTLR8-pcDNA3.1+和 dTLR8-pcDNA3.1+的细胞中 TLR8 mRNA 的表达量. 结果如图 6B 所示,除空载质粒外,两种转染细胞 TLR8 的表达量大致相当. 因此可以认为,当其他条件相同时,cTLR8-pcDNA3.1+和 dTLR8-pcDNA3.1+可以被视为具有相似的转染效率.

2.5 R848 刺激 HEK293 细胞对 TLR8 下游基因 NF-κB 和 IL-8 表达水平的影响

为了探究 R848 刺激对 TLR8 激活下游通路的影响,本研究通过双荧光素酶报告实验检测了下游基因 NF-κB 的表达水平,结果如图 7A 所示:在未使用 R848 刺激时,转染 cTLR8-pcDNA3.1+质粒、dTLR8-pcDNA3.1+质粒组和对照组相比,荧光值小幅度提升;在使用 R848 刺激后,对照组荧光值略有下降,而转染重组质粒组荧光值分别较空载质粒组提升至 4 倍和 2.8 倍左右,且较非刺激组也提升约至 2.5 倍和 2 倍左右.

此外,本研究通过 qRT-PCR 检测了下游基因 IL-8 的表达水平,结果如图 7B 所示:在未使用 R848 刺激时,三种转染组 IL-8 的表达量大致相当;在使用 R848 刺激后,对照组 IL-8 的表达量略有下降,转染重组质粒组较未刺激 IL-8 的表达量显著提升:转染 cTLR8-pcDNA3.1+质粒组刺激后表达量较未刺激提升至约 4 倍左右,转染 dTLR8-pcDNA3.1+质粒组刺激后表达量较未刺激提升至约 1.6 倍左右,且数据差异极显著 (\*\*,  $P<0.01$ ). 由此可见,两组转染组细胞均能有效提升 R848 刺激后 IL-8 的表达量,且转染了牛 TLR8 细胞的表达量提升更为显著.



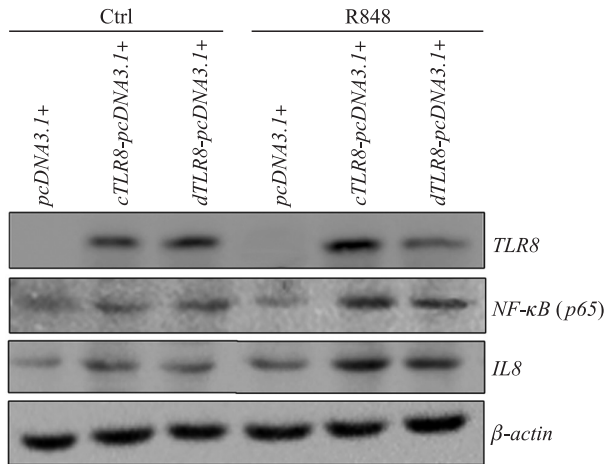
Control:空载 pcDNA3.1+;cTLR8;cTLR8-pcDNA3.1+载体的转染细胞;dTLR8;dTLR8-pcDNA3.1+载体的转染细胞;白色为未加 R848 组,黑色为加 R848 组.

图 7 R848 刺激对 TLR8 下游基因 NF-κB 和 IL-8 表达水平的影响

Fig. 7 The effect of R848 stimulation on the expression of NF-κB and IL-8 downstream of TLR8

2.6 Western blot 检测 R848 刺激对 TLR8 下游通路 NF-κB 和 IL-8 蛋白的影响

本研究使用 R848 对转染细胞进行刺激,提取细胞内蛋白后使用 Western blot 检测对照组和实验组中 TLR8、NF-κB 和 IL-8 的含量变化. 结果如图 8 所示,在受到 R848 刺激后,转染了牛或瓶鼻海豚 TLR8 基因的一组较对照组相比,其下游基因 NF-κB 和 IL-8 的表达量有了较为明显的上升. 同时,与瓶鼻海豚 TLR8



Ctrl:未加 R848 组;R848:加 R848 组;cTLR8-pcDNA3.1+:转染了 cTLR8-pcDNA3.1+表达载体的细胞;dTLR8-pcDNA3.1+:转染了 dTLR8-pcDNA3.1+表达载体的细胞.

图 8 转染牛/瓶鼻海豚 TLR8 的 HEK293 细胞刺激后下游蛋白的相对表达量

Fig. 8 The relative expression of downstream proteins of the HEK293 transfected with *Bos taurus/Tursiops truncatus* TLR8 after stimulation



转染组相比,牛 *TLR8* 转染组刺激后表达量的增加更为显著.由此可见,R848 对于 HEK293 细胞的刺激能在一定程度上增加 *TLR8* 及其下游基因 *NF-κB* 和 *IL-8* 的表达量.

### 3 结论

一般研究认为,TLRs 基因家族高度保守,基因中任一氨基酸位点的替代、缺失都可能影响其功能,从而失去对某些病原微生物的免疫应答<sup>[20]</sup>. Mukherjee 等<sup>[21]</sup>和 Barreiro 等<sup>[22]</sup>的研究均表明 *TLRs* 在进化中发生了纯化选择,然而最近的一些生物信息学分析发现鲸类 *TLR4* 在由陆地向海洋迁移的过程中发生了适应性进化<sup>[23]</sup>,也在鲸类 *TLR8* 中检测到了位于胞外结构域的正选择信号<sup>[19]</sup>.本研究对瓶鼻海豚与牛 *TLR8* 基因的蛋白结构分析发现,两个物种胞内域的 TIR 结构域高度相似,因为其主要负责细胞内的信号传递,相对保守<sup>[24]</sup>;相比之下,胞外域表现出更明显的分化,存在一系列的氨基酸替换、插入和缺失位点.这可能是由于胞外域参与识别不同病原微生物的 PAMP<sup>[25]</sup>,而鲸类在二次入水过程中面临的病原体差异相应的介导了胞外域 LRRs 的进化<sup>[18]</sup>.在本实验中,发现牛和瓶鼻海豚相比,第三个 LRR 序列的位置有一定差异. LRR3 能够帮助 *TLR8* 识别富含 AU 的特异性配体 ORN<sup>[26]</sup>,其在灵长目中高度保守,在牛和啮齿目等物种中检测到相似的氨基酸插入和缺失.和啮齿目相反,牛 LRR3 的变异不影响 ORN 直接识别、活化 *TLR8* 通路<sup>[26]</sup>.然而,瓶鼻海豚与牛 *TLR8* 的氨基酸和 LRR3 的差异对免疫功能的影响有待进一步实验验证.

*TLR8* 基因作为 Toll 样受体家族成员,参与先天免疫的应答. Zhou 和 Hackstein 等关于人 *TLR8* 基因的研究发现,R848 的刺激能够活化 *TLR7/8* 的 MyD88 信号通路,促进合成下游细胞因子,引起免疫应答<sup>[27-28]</sup>.此外,有研究发现 R848 的刺激也能够激活猪、牛等哺乳动物的 *TLR8* 基因<sup>[29]</sup>.但是,R848 的单独刺激却无法激活大鼠等啮齿目的 *TLR8* 基因<sup>[29-31]</sup>.对于鲸类这种二次入水的哺乳动物,*TLR8* 基因的免疫应答功能尚未见报道.本研究选用瓶鼻海豚代表鲸类,选用牛代表鲸类的陆生近缘哺乳动物,在细胞和蛋白水平上检测 *TLR8* 下游通路 *NF-κB* 和 *IL-8* 的表达情况.结果显示,转染了牛和瓶鼻海豚 *TLR8* 基因的两组细胞较对照组相比,其下游蛋白 *NF-κB* 和 *IL-8* 的表达量有了较为明显的上升.因此,本研究认为瓶鼻海豚 *TLR8* 基因能够通过激活下游信号通路,促进合成 *NF-κB* 和 *IL-8* 等细胞因子,进而引起细胞免疫应答.此外,牛 R848 刺激组表达量的提升比瓶鼻海豚组的提升更为显著. Liu 等<sup>[29]</sup>使用 R848 分别刺激转染了数种陆生哺乳动物 *TLR8* 基因的细胞,结果显示和牛相比,刺激后人、猪和绵羊 *TLR8* 的下游蛋白 *NF-κB* 的表达量均显著提升,而猫、马的表达量则和牛相似.因此,本研究认为瓶鼻海豚 *TLR8* 基因对 R848 的敏感性可能低于包括牛在内的大部分陆生哺乳动物.

鲸类从陆地重返海洋后,面临着截然不同的生活环境,如温度、盐碱度、病原体和渗透压等,给鲸类带来了巨大的挑战<sup>[32-33]</sup>.海洋中的病毒数量达到了数十亿每升,病毒种类也极其多样,但其中大部分为噬菌体或植物病毒等较难引起鲸类免疫应答反应的病原体<sup>[34-38]</sup>.此外,海洋哺乳动物的种类和数量相较于陆生哺乳动物而言要少的多,这在一定程度上限制了部分病原微生物的传播范围和传播速度.以上各种原因,导致鲸类 *TLR8* 基因在海洋环境中发生了适应性进化,从而影响了其蛋白结构和免疫应答功能. Tian<sup>[9]</sup>等的研究发现,瓶鼻海豚和牛的 *TLR4* 对陆地细菌的反应存在物种特异性,且牛的 *TLR4* 反应更强烈,这和本研究的结论相似.综上所述,和牛或其他陆生哺乳动物相比,瓶鼻海豚 *TLR8* 基因对 R848 的敏感性较低,推测可能是海洋和陆地生态系统之间连通和传播方式的差异导致了海洋和陆生哺乳动物 *TLR8* 基因的差异进化,这也符合 Nakajima<sup>[24]</sup>等提出的宿主-病原体共进化的“军备竞赛”理论.

### [参考文献]

- [1] THEWISSEN J G M, COOPER L N, CLEMENTZ M T, et al. Whales originated from aquatic artiodactyls in the Eocene epoch of India[J]. Nature, 2007, 450(7173): 1190-1194.
- [2] MCCALLUM H, HARVELL D, DOBSON A. Rates of spread of marine pathogens[J]. Ecology letters, 2003, 6(12): 1062-1067.
- [3] BEINEKE A, SIEBERT U, WOHLSEIN P, et al. Immunology of whales and dolphins[J]. Veterinary immunology & immunopathology, 2010, 133(2-4): 81-94.
- [4] XU S, REN W, ZHOU X, et al. Sequence polymorphism and geographical variation at a positively selected MHC-DRB gene in

- the finless porpoise(*Neophocaena phocaenoides*): implication for recent differentiation of the Yangtze Finless porpoise? [J]. *Journal of molecular evolution*, 2010, 71(1): 6–22.
- [5] GUI D, JIA K, XIA J, et al. De novo assembly of the Indo-Pacific humpback dolphin leucocyte transcriptome to identify putative genes involved in the aquatic adaptation and immune response[J]. *PLoS one*, 2013, 8(8): e72417.
  - [6] SHEN T, XU S, WANG X, et al. Adaptive evolution and functional constraint at TLR4 during the secondary aquatic adaptation and diversification of cetaceans[J]. *BMC evolutionary biology*, 2012, 12(1): 39.
  - [7] TIAN R, CHEN M, CHAI S, et al. Divergent selection of pattern recognition receptors in mammals with different ecological characteristics[J]. *Journal of molecular evolution*, 2018, 86(2): 138–149.
  - [8] XU S, TIAN R, LIN Y, et al. Widespread positive selection on cetacean TLR extracellular domain[J]. *Molecular immunology*, 2019, 106: 135–142.
  - [9] TIAN R, SEIM I, ZHANG Z, et al. Distinct evolution of toll-like receptor signaling pathway genes in cetaceans[J]. *Genes & genomics*, 2019, 41(12): 1417–1430.
  - [10] TAKEDA K, AKIRA S. TLR signaling pathways.[J]. *Seminars in immunology*, 2004, 16(1): 3–9.
  - [11] ROACH J C, GLUSMAN G, ROWEN L, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2005, 102(27): 9577–9582.
  - [12] TEMPERLEY N D, BERLIN S, PATON I R, et al. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss[J]. *BMC genomics*, 2008, 9(1): 62.
  - [13] 冯悦, 夏雪山. 病毒相关 Toll 样受体研究进展[J]. *现代免疫学*, 2007, 27(5): 434–438.
  - [14] ROACH J C, GLUSMAN G, ROWEN L, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2005, 102(27): 9577–9582.
  - [15] IWASAKI A, MEDZHITOV R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses[J]. *Nature immunology*, 2004, 5(10): 987–995.
  - [16] O' NEILL L A J, BOWIE A G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling[J]. *Nature reviews immunology*, 2007, 7(5): 353–364.
  - [17] HERBERHOLD S, COCH C, ZILLINGER T, et al. Delivery with polycations extends the immunostimulant Ribomunyl® into a potent antiviral Toll-like receptor 7/8 agonist[J]. *Antiviral therapy*, 2011, 16(5): 751.
  - [18] GAY N J, GANGLOFF M. Structure and function of Toll receptors and their ligands[J]. *Annual review of biochemistry*, 2007, 76: 141–165.
  - [19] XU S, TIAN R, LIN Y, et al. Widespread positive selection on cetacean TLR extracellular domain[J]. *Molecular immunology*, 2019, 106: 135–142.
  - [20] TAKEUCHI O, AKIRA S. Recognition of viruses by innate immunity[J]. *Immunological reviews*, 2007, 220(1): 214–224.
  - [21] MUKHERJEE S, SARKAR R N, WAGENER D K, et al. Signatures of natural selection are not uniform across genes of innate immune system, but purifying selection is the dominant signature[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2009, 106(17): 7073–7078.
  - [22] BARREIRO L B, BEN-ALI M, QUACH H, et al. Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense[J]. *PLoS genetics*, 2009, 5(7): e1000562.
  - [23] SHEN T, XU S, WANG X, et al. Adaptive evolution and functional constraint at TLR4 during the secondary aquatic adaptation and diversification of cetaceans[J]. *BMC evolutionary biology*, 2012, 12(1): 39.
  - [24] NAKAJIMA T, OHTANI H, SATTA Y, et al. Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution[J]. *Immunogenetics*, 2008, 60(12): 727–735.
  - [25] BELL J K, MULLEN G E, LEIFER C A, et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors[J]. *Trends in immunology*, 2003, 24(10): 528–533.
  - [26] FORSBACH A, NEMORIN J G, MONTINO C, et al. Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses[J]. *The journal of immunology*, 2008, 180(6): 3729–3738.
  - [27] ZHOU Z, SUN L. Immune effects of R848: evidences that suggest an essential role of TLR7/8-induced, Myd88- and NF- $\kappa$ B-dependent signaling in the antiviral immunity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Developmental & comparative immunology*, 2015, 49(1): 113–120.
  - [28] HACKSTEIN H, KNOCH A, NOCKHER A, et al. The TLR7/8 ligand resiquimod targets monocyte-derived dendritic cell differentiation via TLR8 and augments functional dendritic cell generation[J]. *Cellular immunology*, 2011, 271(2): 401–412.
  - [29] LIU J, XU C, HSU L C, et al. A five-amino-acid motif in the undefined region of the TLR8 ectodomain is required for species-specific ligand recognition[J]. *Molecular immunology*, 2010, 47(5): 1083–1090.

(下转第68页)

- [11] SUN X, DING Q, HYDE K D, et al. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest[J]. Fungal ecology, 2012, 5(5): 624–6321.
- [12] PHOOKAMSAK R, NORPHANPHOUN C, TANAKA K, et al. Towards a natural classification of *Astrosphaeriella*-like species; introducing *Astrosphaeriellaceae* and *Pseudoastrosphaeriellaceae* fam. nov. and *Astrosphaeriellopsis*, gen. nov[J]. Fungal diversity, 2015, 74(1): 143–197.
- [13] BAI Q, ZHAI L, CHEN X, et al. Biological and molecular characterization of five *Phomopsis* species associated with pear shoot canker in China[J]. Plant disease, 2015, 99(12): 1704–1712.
- [14] CHANG C Q, XI P G, XIANG M M, et al. New species of *Phomopsis* on woody plants in Hunan Province[J]. Mycosystema, 2005, 2: 145–154.
- [15] UDAYANGA D, CASTLEBURY L A, ROSSMAN A Y, et al. The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops[J]. Fungal biology, 2015, 119(5): 383–407.
- [16] HUANG F, UDAYANGA D, WANG X, et al. Endophytic *Diaporthe* associated with *Citrus*, A phylogenetic reassessment with seven new species from China[J]. Fungal biology, 2015, 119: 331–347.
- [17] ZHANG A W, HARTMAN G L, RICCIONI L, et al. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues[J]. Plant disease, 1997, 81: 1143–1149.
- [18] SANTOS J M, VRANDEIC K, COSIC J, et al. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia[J]. Persoonia, 2011, 27: 9–19.
- [19] SOGONOV M V, CASTLEBURY L A, ROSSMAN A Y, et al. Leaf inhabiting genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales[J]. Studies in mycology, 2008, 62: 1–79.
- [20] VRANDEIC K, COSIC J, RICCIONI L, et al. *Phomopsis longicolla* a new pathogen on *Abutilon theophrasti* in Croatia[J]. Plant pathology, 2004, 53: 251.
- [21] NAWAZ M A, YANG S H, REHMAN H M, et al. Genetic diversity and population structure of Korean wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) inferred from microsatellite markers[J]. Biochemical systematics and ecology, 2017, 71: 87–96.
- [22] PETRINI O. Fungal endophytes of tree leaves[C]//ANDREWS J H, HIRANO S S. Microbial ecology of leaves. New York: Springer, 1991.
- [23] LEHMAN S G. Pod and stem blight of soybean[J]. Annals of missouri botanical gardens, 1923, 10: 111–178.

[责任编辑:黄敏]

(上接第52页)

- [30] GORDEN K K B, QIU X X, BINSFELD C C A, et al. Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazo-quinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides[J]. The journal of immunology, 2006, 177(10): 6584–6587.
- [31] HEMMI H, KAISHO T, TAKEUCHI O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway[J]. Nature immunology, 2002, 3(2): 196–200.
- [32] WANG Z, CHEN Z, XU S, et al. ‘Obesity’ is healthy for cetaceans? Evidence from pervasive positive selection in genes related to triacylglycerol metabolism[J]. Scientific reports, 2015, 5: 14187.
- [33] FUHRMAN J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. Nature, 1999, 399(6736): 541–548.
- [34] JIANG S, STEWARD G, JELLISON R, et al. Abundance, distribution, and diversity of viruses in alkaline, hypersaline Mono Lake, California[J]. Microbial ecology, 2004, 47(1): 9–17.
- [35] WOMMACK K E, COLWELL R R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2000, 64(1): 69–114.
- [36] MANTOVANI M, RUSCHEL A R, PUCHALSKI A, et al. Diversity of species and successional structure of a secondary formation in an Atlantic rain forest[J]. Scientia forestalis (Brazil), 2005, (67): 141–142.
- [37] SUTTLE C A. Marine viruses—major players in the global ecosystem[J]. Nature reviews microbiology, 2007, 5(10): 801–812.
- [38] WEITZ J S, WILHELM S W. Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles[J]. F1000 biology reports, 2012, 4: 17.

[责任编辑:黄敏]