

孙慧妙, 沈伟良, 陈彩芳, 等. 硫化物胁迫对缢蛏血液 SO_4^{2-} 浓度及 *SULT1B1-12* 基因表达的影响[J]. 海洋学报, 2023, 45(1): 62–70, doi:10.12284/hyxb2023004

Sun Huimiao, Shen Weiliang, Chen Caifang, et al. Effects of sulfide stress on blood SO_4^{2-} concentration and *SULT1B1-12* gene expression in *Sinonovacula constricta*[J]. Haiyang Xuebao, 2023, 45(1): 62–70, doi:10.12284/hyxb2023004

硫化物胁迫对缢蛏血液 SO_4^{2-} 浓度及 *SULT1B1-12* 基因表达的影响

孙慧妙^{1,2}, 沈伟良³, 陈彩芳^{1*}, 林志华^{1,4}, 韩庆喜²

(1. 浙江万里学院 生物与环境学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100; 2. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315823; 3. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315012; 4. 浙江万里学院 宁海海洋生物种业研究院, 浙江 宁海 315604)

摘要: 作为典型的埋栖型滩涂贝类, 缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 常暴露在富含硫化物的环境中, 并表现出较强的硫化物耐受能力。胞质磺基转移酶 1B1 (*SULT1B1*) 位于硫代谢途径下游, 是催化磺化反应的关键酶, 在甲状腺激素 (THs) 等内源性物质的生物转化过程中发挥重要作用。为研究 *ScSULT1B1-12* 基因在缢蛏耐硫中的作用, 本研究采用生物信息学方法分析了其序列特征, 并结合血液中 SO_4^{2-} 浓度变化, 开展其组织表达及不同浓度 (50 $\mu\text{mol/L}$ 、150 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$) 硫化物胁迫 72 h 后的表达特征研究。结果表明, *ScSULT1B1-12* 基因全长 cDNA 为 1 100 bp, 含有 897 bp 的开放阅读框, 编码 298 个氨基酸。序列分析表明, *ScSULT1B1-12* 含有 4 个催化活性位点 (₅₆K、₁₀₄N、₁₀₆H 和 ₁₃₄A)、1 个 N 端的 PAPS 结合域 (YPKSGTXW)、1 个 C 端的 PAPS 结合和二聚化域 (RKGXXGDWKNXFTVXXE), 表明其在结构上具有催化磺化反应的能力。组织分布表明, *ScSULT1B1-12* 基因在鳃中高表达, 其次为闭壳肌和肝胰腺。硫化物胁迫后缢蛏血液中 SO_4^{2-} 浓度呈下降趋势, *ScSULT1B1-12* 基因的表达模式也在波动中呈下降趋势, 表明硫酸盐可进一步被活化生成磺化反应的供体, 而 *ScSULT1B1-12* 介导的磺化反应受抑制后可使缢蛏体内 THs 保持在一定水平, 以加强其代谢机能和免疫功能, 使机体适应高硫化物的不良环境。

关键词: 缢蛏; *ScSULT1B1-12*; 硫化物胁迫; 时间表达; 硫酸根

中图分类号: Q955; Q786

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2023)01-0062-09

1 引言

水生穴居动物由于生存空间有限, 其摄食、排泄均在洞穴中进行, 导致残饵、排泄物等有机物在洞穴中积累。尤其是退潮时, 洞穴内氧气含量迅速下降, 在缺氧条件下, 底部沉积物中的硫酸盐、亚硫酸盐和含硫有机物会被还原为硫化物 H_2S ^[1], 使得穴居动物

长时间暴露于高浓度的硫化物环境中, 对硫化物产生了一定的耐受性。目前对耐硫生物的研究主要集中在单环刺螠 (*Urechis unicinctus*)^[2]、美洲刺螠 (*Urechis caupo*)^[3]、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[4] 和日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)^[5] 等水生无脊椎动物中。

硫化物 (H_2S 、 HS^- 和 S^{2-}) 是底栖环境常见的不良

收稿日期: 2022-03-25; 修订日期: 2022-06-24。

基金项目: 浙江省公益技术应用研究项目 (LGN22C190025); 国家重点研发计划“蓝色粮仓”科技创新课题 (2018YFD0901405, 2020YFD0900802); 财政部和农业农村部; 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-49); 浙江省科技重点研发计划 (2019C02054, 2021C02069-7)。

作者简介: 孙慧妙 (1996—), 女, 浙江省衢州市人, 研究方向为滩涂贝类环境适应机制。E-mail: 2075243655@qq.com

* 通信作者: 陈彩芳, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事海洋生物环境适应性研究。E-mail: chencaifang@zvu.edu.cn

环境因子,具有呼吸毒性和免疫毒性^[6-7],会抑制需氧生物的有氧呼吸,使新陈代谢减慢,甚至导致生物体的死亡。为了抵御硫化物的毒性,耐硫生物会对其进行氧化代谢解毒^[2]。此硫化物氧化代谢途径在硫醌氧化还原酶(Sulfide Quinine Oxidoreductase, SQR)、硫双加氧酶(Sulfur Dioxidegenase, SDO)、硫转移酶(Sulfur Transferases, ST)等一系列酶的作用下,将有毒硫化物转化为无毒硫酸盐^[8]。硫酸盐在机体内会被进一步活化为3'-磷酸腺苷5'-磷酸硫酸(3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS);而胞质磺基转移酶(Cytosolic Sulfotransferase, SULF)以PAPS作为其磺化反应的通用供体,促进甲状腺激素、类固醇和儿茶酚胺类等有效内源性物质的失活和消除^[9]。胞质磺基转移酶1B1(Cytosolic Sulfotransferase 1B1, SULT1B1)通过磺化反应调节甲状腺激素(Thyroid Hormones, THs)水平^[10],以调控机体生理代谢水平。

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)是我国重要的经济养殖贝类之一,常栖居于潮间带的泥砂质滩涂中。作为典型的穴居双壳贝类,其埋栖深度可达体长的5~8倍,远远深于泥蚶(*Tegillarca granosa*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)等其他滩涂贝类^[11-12]。由于潮汐作用和洞穴内有限的海水交换,缢蛏常暴露于高浓度的硫化物环境中,且其耐受硫化物的能力要强于单环刺螠、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、罗氏沼虾等水生动物^[12-13]。本课题组已有研究表明,缢蛏线粒体硫化物氧化途径是其对硫化物解毒的重要策略^[11-12];在对其基因组的进一步分析中发现,缢蛏 *SULT1B1*(*ScSULT1B1*)基因家族存在基因扩张现象,且在对已有的硫化物胁迫后缢蛏转录组数据的比较分析中亦筛选到了该家族成员 *SULT1B1-12* 基因的全长 cDNA 序列。因此,本研究拟以硫代谢途径中间产物——硫酸盐水平为连接点,对 *ScSULT1B1-12* 基因的序列特征、组织表达和硫化物胁迫后的表达特征进行分析,探讨其在缢蛏耐硫性状中的作用机制,旨在为缢蛏耐硫化物分子机制研究及后续开展分子标记辅助育种提供理论依据。

2 材料和方法

2.1 实验材料

实验用缢蛏采集自宁波市海洋与渔业研究院科技创新基地。选取健康、活力好、壳体完整、规格均匀的成年缢蛏,体质量为(10.72±1.64)g,壳长为(5.8±0.5)cm。实验开始前暂养7d,海水盐度为21.2±0.5,温度为(18.1±1.5)℃,连续充气,每日换水1次,并定时投喂适量的小球藻。随机选取4颗缢蛏,设为4个

生物学平行,分别解剖取其鳃、闭壳肌、肝胰腺、斧足、外套膜、水管等组织,组织经液氮速冻后保存于-80℃,用于 *ScSULT1B1-12* 基因的组织表达研究。

2.2 硫化物胁迫实验

选取384颗健康缢蛏成贝进行硫化物攻毒实验。在实验开始前2d停止投喂和充氧。鉴于硫化物对缢蛏的96h安全浓度为158 μmol/L^[11],故本研究设置3个浓度组,分别为50 μmol/L、150 μmol/L和300 μmol/L,每组均设4个平行。实验用九水硫化钠($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$)配置100 mmol/L硫化物母液,成倍稀释母液使水体浓度分别达到相应实验设定浓度。每3h补充1次母液,以维持暴毒水体硫化物浓度的稳定。于硫化物攻毒后0h、3h、6h、12h、24h、48h、72h,从各平行组随机选取4颗缢蛏,抽取血液后解剖取其鳃和肝胰腺。各样品均于液氮速冻后储存于-80℃,用于 *ScSULT1B1-12* 基因的时间表达研究。

2.3 缢蛏血液 SO_4^{2-} 离子浓度检测

用珠磨法破碎缢蛏血细胞,3000 r/min离心5min;取上清液1mL,加入1mL乙腈沉淀蛋白质后加入8mL去离子水,振荡混匀后静置5min;随后10000 r/min离心10min,取上清液,经过孔径为0.22 μm滤膜过滤。经离子色谱法检测滤液中 SO_4^{2-} 浓度。

2.4 *ScSULT1B1-12* 基因的生物信息学分析

从硫化物胁迫后缢蛏转录组数据库中筛选得到 *ScSULT1B1-12* 基因全长序列。利用 ORF Finder 查找其开放阅读框(Open Reading Box, ORF)。使用 NCBI(National Center for Biotechnology Information)的 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)分析序列的完整性并进行同源性比较分析。使用 ProtParam 预测其等电点(Isoelectric point, pI)和分子量(Molecular weight, Mw)(<https://web.expasy.org/protparam/>)。利用 PROSITE(<https://prosite.expasy.org/>)进行功能域的分析。通过 SWISS-MODEL(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>)进行其蛋白质高级结构预测。用 Clustal W 软件进行多序列比对分析。利用 MEGA-7 软件构建系统发育树,并利用 iTOL(<https://itol.embl.de/>)进行在线美化。

2.5 *ScSULT1B1-12* 基因在缢蛏不同组织及硫化物胁迫下的表达

Trizol 法提取缢蛏组织总 RNA,使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa,日本)反转录成 cDNA 模板。根据 *ScSULT1B1-12* 基因全长序列设计 RT-qPCR 引物(表1)。利用 LightCycler® 480II 实时 PCR 系统进行荧光定量 PCR 反应,每组样品设

4 个生物学平行, 4 个技术重复。以 RS9 基因为内参基因^[14], 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[15] 计算 *ScSULT1B1-12* 的相对表达量。

表 1 实验所用引物及其序列

Table 1 Primers and their sequences used in the experiment

引物名称	序列(5'-3')
<i>SULT1B1-12</i> -F	CAAATCCGAATGGAAAGGCGG
<i>SULT1B1-12</i> -R	CAACAGAATCTGTATGTGAAG
RS9-F	TGAAGTCTGGCGTGTCAAGT
RS9-R	CGTCTCAAAGGGCATTACC

2.6 数据处理

所有数据以平均值±标准差来表示, 均使用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), $p < 0.05$ 表示差异显著。

3 结果

3.1 硫化物胁迫下缢蛏血液 SO_4^{2-} 浓度的变化

随着胁迫时间的延长, 除 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组外, 其余较高浓度组 (150 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$) 缢蛏血液 SO_4^{2-} 浓度波动较大, 总体均呈下降趋势; 且浓度越高, 波动越剧烈 (图 1)。50 $\mu\text{mol/L}$ 硫化物胁迫下, 其 SO_4^{2-} 浓度波动不大, 在 3 h 时小幅上升, 6 h 时略微下降, 随后 12 h、24 h、48 h 时保持上升趋势, 但差异不显著 ($p > 0.05$), 72 h 时小幅下降。150 $\mu\text{mol/L}$ 硫化物胁迫下, 其 SO_4^{2-} 浓度 3 h 时显著下降 ($p < 0.05$), 6 h、12 h 时持续小幅上升, 之后 24 h 时有所下降, 到 48 h、72 h 时保持在同一水平内波动。300 $\mu\text{mol/L}$ 硫化物胁迫

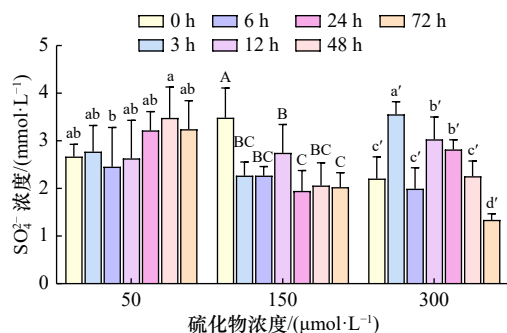


图 1 硫化物胁迫下缢蛏血液 SO_4^{2-} 浓度的变化

Fig. 1 Changes in SO_4^{2-} concentration of *Sinonovacula constricta* under sulfide stress

同类型字母中不同字母表示同一胁迫浓度下不同时间点间的数据差异显著 ($p < 0.05$)

Different letters of the same type represented significant changes among different time at the same exposure concentration ($p < 0.05$)

下, 其 SO_4^{2-} 浓度 3 h 时显著上升 ($p < 0.05$), 6 h 时大幅下降 ($p < 0.05$), 12 h 时再次显著升高 ($p < 0.05$), 24 h 时小幅波动, 48 h、72 h 持续大幅下降 ($p < 0.05$)。

3.2 *ScSULT1B1-12* 基因序列的生物信息学分析

ScSULT1B1-12 基因的 cDNA 序列全长为 1 100 bp, 包含 897 bp 的 ORF, 编码 298 个氨基酸 (图 2)。其预测的蛋白分子量为 35.03 kDa, 理论等电点为 6.37, 其中极性氨基酸所占比例较高, 为亲水性蛋白, 无信号肽。功能域预测发现其有 1 个功能域 (Pfam: Sulfotransfer_1, 46~291 aa)。该蛋白的二级结构由 117 个 H 键、137 个螺旋数和 44 个转角组成。三级结构预测显示其为同源二聚体。

氨基酸序列同源性分析显示, *ScSULT1B1-12* 与其他软体动物 *ScSULT1B1* 的同源性最高, 其中与长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 和美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 的同源性分别为 52.36% 和 48.48%。与其他动物 *SULT1B1* 进行多重序列比对表明, 该基因保守性较高, 含有 4 个催化活性位点 (₅₆K、₁₀₄N、₁₀₆H 和 ₁₃₄A)、N 端的 PAPS 结合域 (YPKSGTXW)、C 端的 PAPS 结合和二聚化域 (RKGXXGDWKNXFTVXXE) (图 3)。

用 MEGA7.0 软件以邻接法构建了各物种 *SULT1B1* 的系统进化树, 在线美化后如图 4 所示。该进化树由 3 个分支组成, *ScSULT1B1-12* 首先与贝类聚为一支, 随后与节肢动物聚为一支, 最后再与脊椎动物聚为一支。

3.3 *ScSULT1B1-12* 基因组织表达分析

利用 RT-qPCR 技术检测了 *ScSULT1B1-12* 在缢蛏鳃、闭壳肌、肝胰腺、斧足、外套膜、水管中的表达情况 (图 5)。结果表明 *ScSULT1B1-12* 基因在 6 种组织中均有表达, 且其在鳃中表达量最高, 其次为闭壳肌和肝胰腺。

3.4 *ScSULT1B1-12* 基因在硫化物胁迫下的表达特征分析

硫化物胁迫下, 缢蛏鳃中 *ScSULT1B1-12* 基因表达水平随着时间的延长总体呈下降-升高-下降的波动模式 (图 6M)。50 $\mu\text{mol/L}$ 硫化物胁迫下, 鳃 *ScSULT1B1-12* 基因的表达量在 3 h 时略微下降, 6 h、12 h 时小幅波动上升后于 24 h 时显著升高 ($p < 0.05$), 随后 48 h 时显著下降 ($p < 0.05$), 并在 72 h 时略有上升。150 $\mu\text{mol/L}$ 硫化物胁迫下, 鳃 *ScSULT1B1-12* 基因的表达量在 3 h 时显著下降 ($p < 0.05$), 6 h、12 h 时小幅波动后于 24 h 时显著升高 ($p < 0.05$), 随后 48 h 时显著下降 ($p < 0.05$), 并在 72 h 时保持在同一表达水平。300 $\mu\text{mol/L}$ 硫化物胁迫下, 鳃 *ScSULT1B1-12* 基因的表达水平较前两组波动剧烈, 在 3 h 时略微下降后于 6 h

```

1      CCGTTAGTGGAAGAAGATCCCAGACGTTTTAGCGCTTACTTGTAGCCAGCAATGCCGCTG
1      M P L
61     CGGACGTTTACAGACCGTGGGGGCGCCACGATCACCCCTAATAGAGGTGGCTGGTATGTTA
4      R T F T D R G G A T I T L I E V A G M L
121    TACCCGTATGTAGAGGTGCTCAACAGGAGAACTGTGTCCAGCAGATCAAACCTGCACCG
24     Y P Y V E G A Q Q E N C V Q Q I K L A P
181    GCACGAGACGACGATGTGTTGCTGGTAACTATCCAAAGTCAGGCACTCACTGGATGTGG
44     A R D D D V L L V N Y P K S G T H W M W
241    GAGATTATGTCAATGTTACACAACGGTAAGGCGGAAACCATTCCAAAAATCAAACAAACC
64     E I M S M L H N G K A E T I P K I K Q T
301    AGTTTCATGGAGGCTTTGACAACCTGATCAGCTAGCGTCACTTCCATCGCCTCGGATCTTG
84     S F M E A L T T D Q L A S L P S P R I L
361    AACACACATATGCGCTTCAAAGATCTCCGGAGGACATGCTTGCCAGAAAAACGAAGATT
104    N T H M R F K D L P E D M L A R K T K I
421    GTTCTCATCTATCGGAACCCTAAAGACATCGCAGTGTCACTGTACAACCATGAGTATAAA
124    V L I Y R N P K D I A V S L Y N H E Y K
481    CTGGAGGGCTCTACCATTACAATGGCACCTGGTCCGATTGGCTGCAGTCACTCTTTCTC
144    L E G L Y H Y N G T W S D W L Q S L F L
541    GCTGGAACAGTGTCCGGCGGCGACTGGTTCAGTACGTGCAGGACTGGGAGGCGGTGACC
164    A G T V S G G D W F Q Y V Q D W E A V T
601    AGGGGGCGTCCCGACTACCCCATACACGTCGTCTACTATGAGGACCTCAAACAGCACCCC
184    R G R P D Y P I H V V Y Y E D L K Q H P
661    CACATGGAAGTAGAAAAGTTGGCAAAGTTCTGGAGCTGCCGGTAACATCCGAGTTGTGT
204    H M E V E K L A K F L E L P V T S E L C
721    CGTCAGATCGCGGACAAGTGCTCGTTCTCAACATGAAGGTGGACAAGAGAGGACTAGAA
224    R Q I A D K C S F S N M K V D K R G L E
781    AACGAGTCTGACCAGGTGTGGCGAGACCATAACCCAAGCTACTACAGGAAAGGGGAG
244    N E F W T R V W R D H N P S Y Y R K G E
841    GTGGGGGATTGGAAAAACTGGTTCACGGTGGCACAGAATGAGCACTTCGATCGGATATAC
264    V G D W K N W F I V A Q N E H F D R I Y
901    CGGGACAGAATGATCGGCAGTCAACTCAACATCCGGTTTGTAGCTATAATACCTACCACC
284    R D R M I G S Q L N I R F E L *
961    GACCTCTACCGAATTCTTGTGGTATGTCCGCCATCATTACCCATCATTGGCCCTCGGGTG
1 021  TTTCCGCCATTGACACCAGGACCGACATGTTATTGTGTTCTATTATTCAATGTGCTCAT
1 081  GGCGTAAATTTGACATTAACATTTCTCATATAAAACATTTTATTCTAGAAAAGAAAGA
1 141  TTAGTTTCGCTGTACGAATAAGTAATTTCTACAATTATAAGATATTGTCAAACAAATGTA
1 201  AACAGGATTGACATTTGAATAAGAACATGTTTACAGGCACGTTTGTGTTTCAATTATAT
1 261  ATTAATTATTCATTTTAAACAATTATTAAGTGATTTTAAAAGGGATATATTAAGCT
1 321  TCAAACCCACATCCACCAGCTTTAAAGCAGTGGACAAGATAGTTTTGGACACTCTTCTAT
1 381  AGGAAGTATGTAACCATTGAATTATTTAGAATGATGTTTCATTATGCTGTTCAAAAATG
1 441  TACGTTAACTTGACTTTACCAGAAAAACCGACTGTTGAACAAAACAGTTACTTTACTG
1 501  CGGCACTATCACACTACTACATTTACCATTTAAAAAGGGTATGCATGAAAAAATGATG
1 561  CAGAGCATCAAAGTCGCCG

```

图 2 *ScSULT1B1-12* 基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列Fig. 2 Full-length cDNA sequence of the *ScSULT1B1-12* gene and its deduced amino acid sequences

红色加粗字体为起始密码子、终止密码子; 阴影部分为蛋白的保守结构域, 加粗字体和下划线标注表示 PAPS 结合域; 黄色加粗字体和下划线标注表示 PAPS 结合和二聚化域; 蓝色加粗字体为氨基酸活性位点; 左侧数字为核苷酸和氨基酸的位置

Red bold font indicated the initiation codon and stop codon, the shaded part indicated the conserved domain of the protein, the bold font and underlined mark indicated the PAPS binding domains; the yellow bold font and underlined mark indicated PAPS binding and dimerization domains; the blue bold font showed the catalytic active sites; the numbers on the left indicate the positions of nucleotide and amino acid

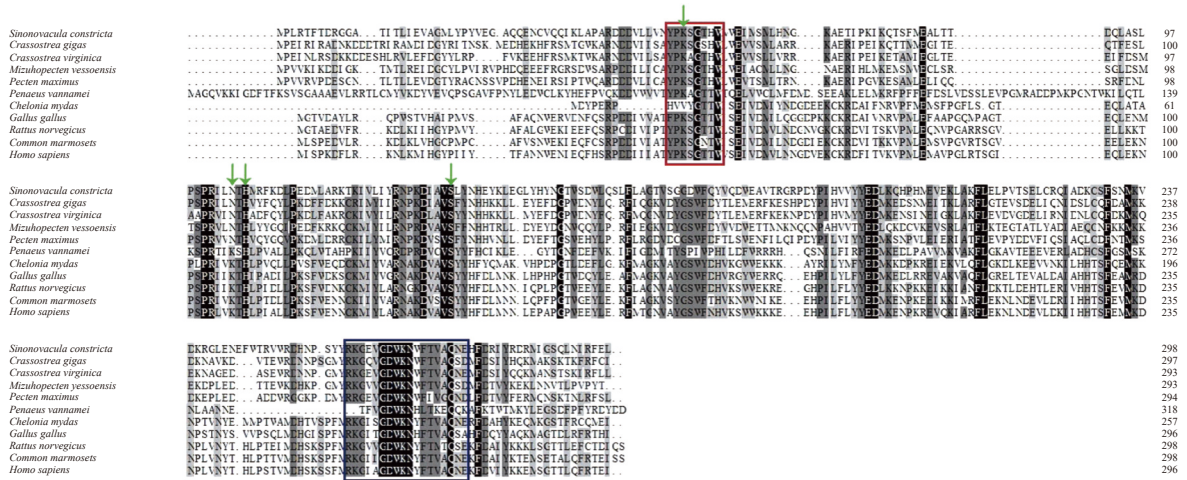


图 3 11 种动物 SULT1B1 氨基酸序列的多重比较

Fig. 3 Multiple alignments of the amino acid sequences of SULT1B1 in eleven animals

绿色箭头表示催化活性位点; 红框表示 PAPS 结合域; 蓝框表示 PAPS 结合和二聚化域; 所使用序列的物种名及基因登录号见附表 S1

The green arrows indicated the catalytic active site; the red box indicated the PAPS binding domain; the blue box indicated the PAPS binding and dimerization domain; the species name and the corresponding accession numbers of the sequences used are shown in appendix Table S1

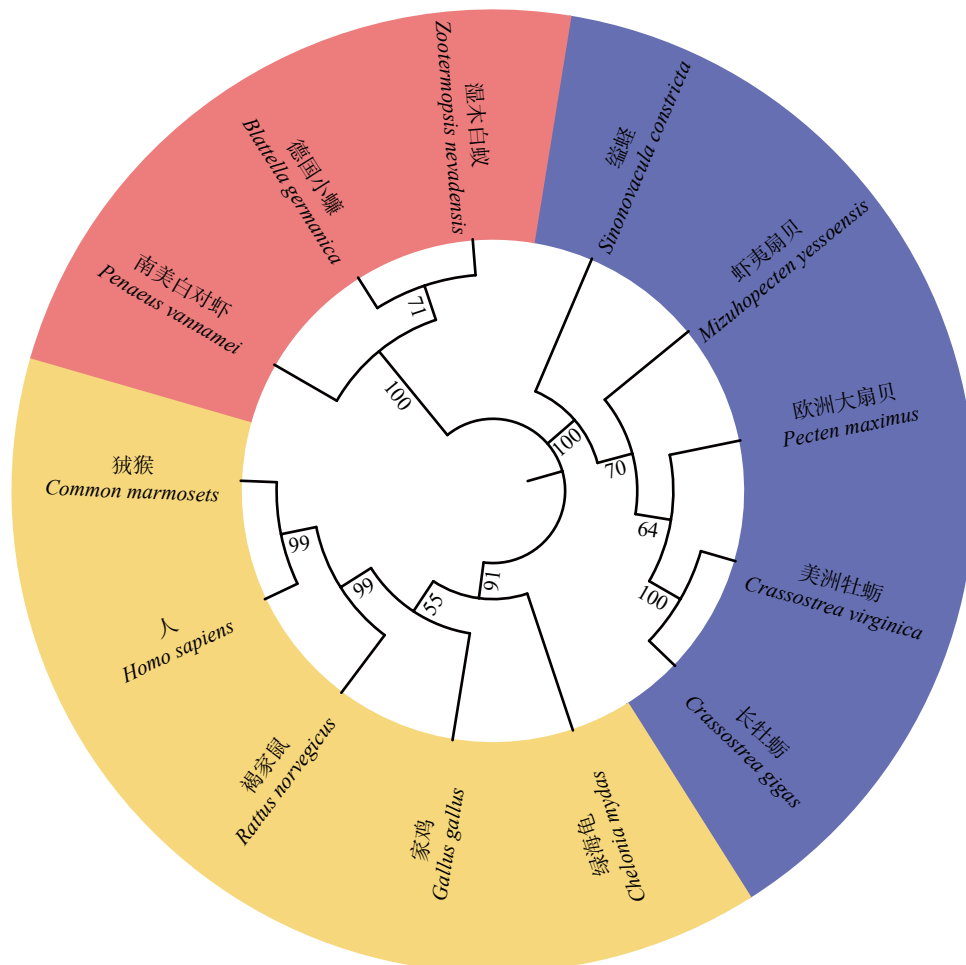


图 4 邻接法构建的 ScSULT1B1-12 系统进化树

Fig. 4 The ScSULT1B1-12 phylogenetic tree constructed by neighbor-joining method

所使用序列的基因登录号见附表 S1

Accession numbers of the sequences used in construction of tree are shown in appendix Table S1

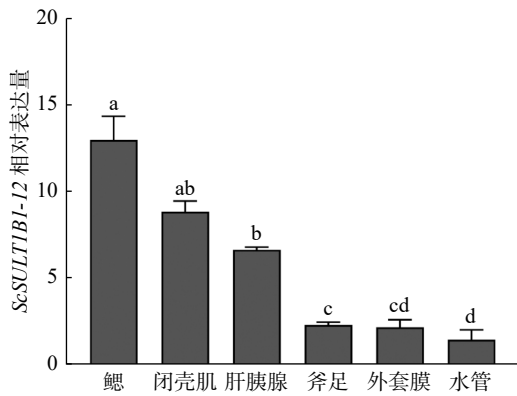
图5 *ScSULT1B1-12* 基因在缢蛏不同组织中的表达

Fig. 5 The expression of *ScSULT1B1-12* gene in different tissues of *Sinonovacula constricta*

不同字母表示组织间的数据差异显著 ($p < 0.05$)

Different letters represented significant changes among different tissues

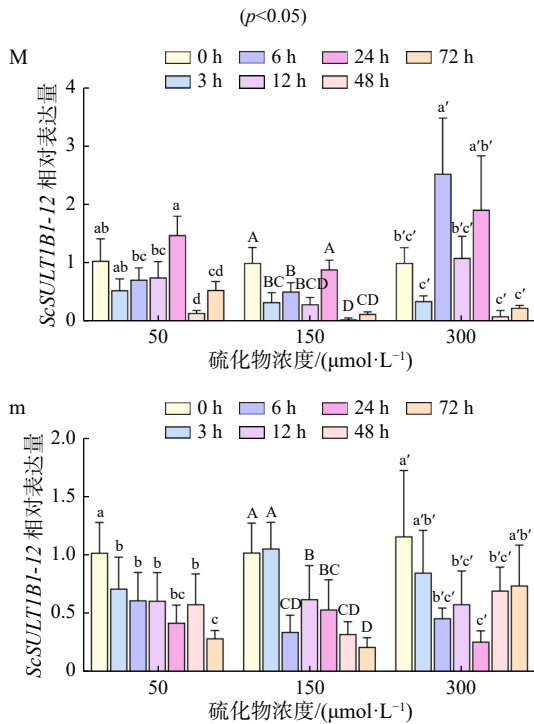


图6 硫化物胁迫下 *ScSULT1B1-12* 基因在缢蛏鳃 (M) 和肝胰腺 (m) 中的表达特征

Fig. 6 The expression characteristics of the *ScSULT1B1-12* gene in gill (M) and hepatopancreas (m) of *Sinonovacula constricta* under sulfide stress

同类型字母中不同字母表示同一胁迫浓度下不同时间点间的数据差异显著 ($p < 0.05$)

Different letters of the same type represented significant changes among different time at the same exposure concentration ($p < 0.05$)

时显著上升至峰值 ($p < 0.05$), 12 h 时显著下降 ($p < 0.05$), 随后 24 h 小幅升高, 在 48 h 时又剧烈下降 ($p < 0.05$), 最后于 72 h 时保持在同一表达水平。

硫化物胁迫下, 缢蛏肝胰腺中 *ScSULT1B1-12* 基因

表达水平亦呈波动模式(图 6m)。50 $\mu\text{mol/L}$ 、150 $\mu\text{mol/L}$ 硫化物胁迫下, 肝胰腺 *ScSULT1B1-12* 基因的表达模式类似, 总体呈下降趋势。50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组, 其基因表达量在 3 h 时显著下降 ($p < 0.05$), 随后在 6 h、12 h、24 h、48 h 时在同一范围内小幅波动, 最后于 72 h 时显著下降 ($p < 0.05$)。150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组, 肝胰腺 *ScSULT1B1-12* 基因表达量在前 3 h 维持同一水平, 6 h 时显著下降 ($p < 0.05$), 之后在 12 h 时显著上升 ($p < 0.05$), 随后 24 h、48 h、72 h 时保持下降趋势。300 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组, 肝胰腺 *ScSULT1B1-12* 基因的表达量在 3 h 时略微下降, 6 h 继续下降后于 12 h、24 h、48 h 时在同一范围内波动, 最后于 72 h 小幅上升。

4 讨论

硫是生命的基本元素, 硫代谢对细胞的生长和存活至关重要^[8]。在该代谢通路中, 首先硫化物相继在 SQR、SDO、ST 等酶的催化下氧化生成代谢中间产物硫酸盐^[8]。本研究发现, 硫化物胁迫后缢蛏血液 SO_4^{2-} 浓度与胁迫时间呈负相关关系。而硫酸盐必须经活化后才能参与 SULT 介导的磺化反应, 并在调节内源性化学物质的生物活性, 促进其消除中发挥关键作用^[9, 16]。故推测硫化物胁迫后缢蛏体内硫酸盐产物被活化为 PAPS, 为磺化反应提供通用供体^[9], 在激素、儿茶酚胺神经递质等的稳态中起着重要作用^[17]。

SULT1B1 属于 SULT 超家族成员之一^[18]。该超家族基因包含 4 个保守的催化活性位点、PAPS 结合域、PAPS 结合和二聚化域^[19]。本研究中 *ScSULT1B1-12* 基因也具有上述的催化活性位点及保守功能域。其中位于其 C 端的 KTVE 基序 (KXXXTVXXE) 是 SULTs 中同源和异源二聚体的常见蛋白质相互作用基序^[20]。大多数 SULTs 是以同源二聚体形式存在^[21]。这亦与本研究结果一致, *ScSULT1B1-12* 蛋白的三级结构预测显示其为同源二聚体。除了 SULTs 的催化残基和二聚化区域外, SULTs 最保守的区域是 PAPS 结合域^[22]。每个亚型都必须结合 PAPS 才能发挥其功能^[23]。这些活性位点与结构域为 *ScSULT1B1-12* 发挥其磺化功能提供了结构支撑。

从 *ScSULT1B1-12* 基因的组织表达结果发现其主要在鳃和肝胰腺中高表达, 其中鳃表达量最高。这可能是由于鳃是水生生物的呼吸器官, 直接暴露于硫化物中^[11], 其对胁迫的敏感性较高^[24]; 而肝胰腺作为经典的解毒代谢器官, 也是硫化物氧化的主要部位^[25-26]。*ScSULT1B1-12* 基因在缢蛏肝胰腺中高表达, 与在啮

齿动物和人类中的研究结果相一致^[27],推测可能与该器官的强代谢能力有关^[28-29]。

SULT1B1 催化以 THs 为底物的磺化反应^[10,30],该反应是 THs 代谢的重要途径^[10],以调节机体内 THs 的稳态。而 THs 是机体最重要的激素之一^[31],可调节所有组织的新陈代谢^[10,31-33],且能参与免疫调节^[34-37]。本研究结果表明,硫化物胁迫下 *ScSULT1B1-12* 基因的转录水平呈波动模式,总体呈下降趋势。这可能是由于磺化反应是导致 THs 失活的重要一步^[10],在胁迫初期 *ScSULT1B1-12* 基因的表达量显著升高,使 THs 大量失活以抑制机体的生理代谢水平,降低其能量消耗;但随着胁迫时间的延长,其表达量受抑制,可使 THs 活性保持在一定水平,以加强机体代谢机能来维持基本生命活动所需,同时提高机体的免疫功能,以应对高硫化物浓度的不良环境。此外,缢蛭体内

SO_4^{2-} 浓度的变化,从一定程度上也反应了被活化的硫酸盐通用供体,还可能参与除 SULT1B1 外的其他 SULT 超家族成员介导的磺化反应。

5 结论

本研究对 *ScSULT1B1-12* 基因的序列结构进行生物信息学分析,表明其在结构上具备催化磺化反应的能力。组织分布表明,其在鳃和肝胰腺中表达量较高。硫化物胁迫后缢蛭血液 SO_4^{2-} 浓度呈下降趋势,同时 *ScSULT1B1-12* 基因的转录水平呈抑制趋势,表明硫酸盐可被活化生成磺化反应的供体,而 *ScSULT1B1-12* 催化的磺化反应受抑制后可使缢蛭体内 THs 保持活性,以加强其代谢机能来维持机体的基本生命活动,同时提高机体的免疫功能,以适应高硫化物浓度的不良环境。

参考文献:

- [1] Jørgensen B B, Fenchel T. The sulfur cycle of a marine sediment model system[J]. *Marine Biology*, 1974, 24(3): 189–201.
- [2] Grieshaber M K, Völkel S. Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide[J]. *Annual Review of Physiology*, 1998, 60: 33–53.
- [3] Arp A J, Hansen B M, Julian D. Burrow environment and coelomic fluid characteristics of the echiuran worm *Urechis caupo* from populations at three sites in northern California[J]. *Marine Biology*, 1992, 113(4): 613–623.
- [4] Jayamanne S C. Toxicity of hydrogen sulphide to juveniles of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 1992, 20(2): 191–199.
- [5] 管越强,裴素蕊,李泽健.急性硫化物胁迫对日本沼虾免疫和抗氧化系统的影响[J].水生生态学杂志,2011,32(6):89–94.
Guan Yueqiang, Pei Surui, Li Zejian. Effects of acute sulfide stress on immune responses and antioxidant system of *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(6): 89–94.
- [6] Konishi M, Watsuji T O, Nakagawa S, et al. Effects of hydrogen sulfide on bacterial communities on the surface of galatheid crab, *Shinkaia crosnieri*, and in a bacterial mat cultured in rearing tanks[J]. *Microbes and Environments*, 2013, 28(1): 25–32.
- [7] Duan Yafei, Dong Hongbiao, Wang Yun, et al. Intestine oxidative stress and immune response to sulfide stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 63: 201–207.
- [8] Bora P, Chauhan P, Pardeshi K A, et al. Small molecule generators of biologically reactive sulfur species[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(48): 27359–27374.
- [9] Coughtrie M W H, Sharp S, Maxwell K, et al. Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 1998, 109(1/3): 3–27.
- [10] Cooper R L, Zorrilla L M. 4.12-The hypothalamic-pituitary-thyroid axis as a target for environmental chemicals[J]. *Comprehensive Toxicology*, 2018, 4: 230–275.
- [11] Shen Yaoyao, Chen Jiaqi, Shen Weiliang, et al. Molecular characterization of a novel sulfide: quinone oxidoreductase from the razor clam *Sinonovacula constricta* and its expression response to sulfide stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 239: 110367.
- [12] Chen Caifang, Shen Yaoyao, Shen Weiliang, et al. Defense responses of sulfur dioxygenase to sulfide stress in the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Genes & Genomics*, 2021, 43(5): 513–522.
- [13] 沈瑶瑶.硫化物胁迫下缢蛭2个关键硫代谢基因的响应研究[D].宁波:宁波大学,2019
Shen Yaoyao. Response of two key sulfur metabolism genes in *Sinonovacula constricta* under sulfide stress[D]. Ningbo: Ningbo University, 2019.
- [14] Zhao Xuelin, Fu Jianping, Jiang Liting, et al. Transcriptome-based identification of the optimal reference genes as internal controls for quantitative RT-PCR in razor clam (*Sinonovacula constricta*)[J]. *Genes & Genomics*, 2018, 40(6): 603–613.
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2002, 25(4): 402–408.
- [16] Kauffman F C. Sulfonation in pharmacology and toxicology[J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2004, 36(3/4): 823–843.
- [17] Liu T A, Liu M C, Yang Y S. Immunohistochemical analysis of a novel dehydroepiandrosterone sulfotransferase-like protein in *Drosophila* neural circuits[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 367(1): 14–20.

- [18] Glatt H, Engelke C E H, Pabel U, et al. Sulfotransferases: genetics and role in toxicology[J]. *Toxicology Letters*, 2000, 112–113: 341–348.
- [19] Uno Y, Uehara S, Inoue T, et al. Molecular characterization of functional UDP-glucuronosyltransferases 1A and 2B in common marmosets[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2020, 172: 113748.
- [20] Petrotchenko E V, Pedersen L C, Borchers C H, et al. The dimerization motif of cytosolic sulfotransferases[J]. *FEBS Letters*, 2001, 490(1/2): 39–43.
- [21] Kiehlbauch C C, Lam Y F, Ringer D P. Homodimeric and heterodimeric aryl sulfotransferases catalyze the sulfuric acid esterification of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(32): 18941–18947.
- [22] Weitzner B, Meehan T, Xu Qifang, et al. An unusually small dimer interface is observed in all available crystal structures of cytosolic sulfotransferases[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2009, 75(2): 289–295.
- [23] Tibbs Z E, Falany C N. An engineered heterodimeric model to investigate SULT1B1 dependence on intersubunit communication[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2016, 115: 123–133.
- [24] 陈修报, 郑浩然, 王洋, 等. 基于原代培养背角无齿蚌鳃细胞的镉毒性效应评价[J]. *环境科学学报*, 2020, 40(7): 2665–2670.
Chen Xiubao, Zheng Haoran, Wang Yang, et al. Cytotoxicity assessment of cadmium on primary gill cell culture from *Anodonta woodiana*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, 40(7): 2665–2670.
- [25] Bartholomew T C, Powell G M, Dodgson K S, et al. Oxidation of sodium sulphide by rat liver, lungs and kidney[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1980, 29(18): 2431–2437.
- [26] Furne J, Springfield J, Koenig T, et al. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2001, 62(2): 255–259.
- [27] Meerman J H N, Ringer D P, Coughtrie M W H, et al. Sulfation of carcinogenic aromatic hydroxylamines and hydroxamic acids by rat and human sulfotransferases: substrate specificity, developmental aspects and sex differences[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 1994, 92(1/3): 321–328.
- [28] 郑清梅, 刘兴隆, 郭江山, 等. 粤东海产经济贝类重金属含量与暴露风险评价[J]. *农业资源与环境学报*, 2019, 36(1): 105–114.
Zheng Qingmei, Liu Xinglong, Guo Jiangshan, et al. Analysis of heavy metal concentrations in marine economic shellfish from eastern Guangdong Province and its health risk[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2019, 36(1): 105–114.
- [29] 邵晓菲, 吴海燕, 王群, 等. 麻痹性贝类毒素在栉孔扇贝体内的代谢轮廓[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(3): 623–632.
Bing Xiaofei, Wu Haiyan, Wang Qun, et al. Metabolic profile of paralytic shellfish toxin in scallop *Chlamys farreri*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 623–632.
- [30] Kester M H A, Bulduk S, van Toor H, et al. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disrupters[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002, 87(3): 1142–1150.
- [31] 郭一帆, 陈佩杰, 肖卫华. 甲状腺激素对骨骼肌功能的调控及其机制[J]. *中国运动医学杂志*, 2020, 39(8): 649–652.
Guo Yifan, Chen Peijie, Xiao Weihua. Thyroid hormone regulation and mechanism of skeletal muscle function[J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*, 2020, 39(8): 649–652.
- [32] 王丹丹. 甲状腺激素受体相关蛋白3的分子生物学功能研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2021.
Wang Dandan. Molecular biology function of thyroid hormone receptor associated protein 3[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2021.
- [33] Yen P M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(3): 1097–1142.
- [34] Lam S H, Sin Y M, Gong Z, et al. Effects of thyroid hormone on the development of immune system in zebrafish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(3): 325–335.
- [35] Sahoo P K. Immunostimulating effect of triiodothyronine: dietary administration of triiodothyronine in rohu (*Labeo rohita*) enhances immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2003, 19(2): 118–122.
- [36] 陈勇, 华雪铭, 周洪琪, 等. 壳聚糖和益生菌对异育银鲫非特异免疫功能及血清甲状腺激素、皮质醇水平的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(5): 711–718.
Chen Yong, Hua Xueming, Zhou Hongqi, et al. Effects of chitosan and probiotics on non-specific immune function and the levels of serum thyroid hormone and cortisol in allogynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(5): 711–718.
- [37] 边原, 李刚, 杨勇, 等. 甲状腺激素在免疫应答方面的研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2015, 18(2): 219–222.
Bian Yuan, Li Gang, Yang Yong, et al. Research progress of thyroid hormone upon immune response[J]. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*, 2015, 18(2): 219–222.

补充材料

表 S1 物种拉丁文学名及其 NCBI 登录号对照表

补充材料可通过 <https://hyxbocean.cn/> 获取。补充材料未进行排版和编辑, 内容的准确性和科学性由作者承担。

Effects of sulfide stress on blood SO_4^{2-} concentration and *SULT1B1-12* gene expression in *Sinonovacula constricta*

Sun Huimiao^{1,2}, Shen Weiliang³, Chen Caifang¹, Lin Zhihua^{1,4}, Han Qingxi²

(1. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315823, China; 3. Ningbo Academy of Oceanology and Fishery, Ningbo 315012, China; 4. Ninghai Institute of Mariculture Breeding and Seed Industry, Zhejiang Wanli University, Ninghai 315604, China)

Abstract: As a typical dwelled tidal shellfish, *Sinonovacula constricta* is often exposed to sulfide-rich environment and shows strong sulfide tolerance. The cytosolic sulfotransferase 1B1 (SULT1B1) is located at downstream of the sulfur metabolism pathway, while it is a key enzyme catalyzing the sulfation reaction and plays an important role in the biotransformation of endogenous substances such as thyroid hormones (THs). In order to study the role of *ScSULT1B1-12* in sulfur resistance, the sequence characteristics were analyzed by bioinformatics method. Combined with the changes of blood SO_4^{2-} concentration, the spatial expression and temporal expression profiles during 72 h sulfide stress (50 $\mu\text{mol/L}$, 150 $\mu\text{mol/L}$, 300 $\mu\text{mol/L}$) were studied. The full-length cDNA of *ScSULT1B1-12* gene was 1 100 bp, containing an open reading frame of 897 bp, and encoding 298 amino acids. Sequence analysis showed that *ScSULT1B1-12* contains four catalytic active sites (₅₆K, ₁₀₄N, ₁₀₆H, and ₁₃₄A), one PAPS binding domain (YPKSGTXW) at N terminal, and one PAPS binding and dimerization domain (RKGXXGDWKNXFTVXXE) at C terminal, indicating that it was structurally able to catalyze the sulfation reaction. Spatial expression showed that *ScSULT1B1-12* was highly expressed in gills, followed by the adductor muscle and hepatopancreas. Blood SO_4^{2-} concentration decreased, and the expression patterns of *ScSULT1B1-12* also declined with fluctuation after sulfide stress, indicating that sulfate can be further transformed to sulfated donors, and *ScSULT1B1-12*-mediated sulfation may be inhibited to keep THs at a certain level in *S. constricta*, in order to strengthen the metabolic and immune functions, and make the organism adapt the adverse environment of high sulfide.

Key words: *Sinonovacula constricta*; *ScSULT1B1-12*; sulfide stress; temporal expression; sulfate ion