

日本海神蛤壳修复过程中外套膜组织的转录组特征解析

郭建宝, 肖嘉鑫, 吴思润, 梁誉腾, 向雪建, 高志鹰, 刘 洋*, 霍忠明

大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 辽宁 大连

收稿日期: 2025年2月10日; 录用日期: 2025年3月3日; 发布日期: 2025年3月12日

摘 要

为探究日本海神蛤壳体破损后外套膜修复组织与正常外套膜组织的差异, 本研究利用转录组测序技术(RNA-Seq)及生物信息学分析方法, 比较分析外套膜修复组织(A4Y1)、外套膜外部组织(A4Wa1)和外套膜内部组织(A4Wb1)转录组。结果显示, 在三种外套膜组织中共筛选出1864个差异表达基因(DEGs) (筛选条件: $p_{adj} < 0.05$ 且 $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1$)。其中, A4Wa1与A4Y1中上调表达基因807个, 下调表达基因598个; A4Wb1与A4Y1中上调表达基因678个, 下调表达基因563; A4Wa1与A4Wb1中上调表达基因44, 下调表达基因142。GO和KEGG富集分析显示, 这些差异基因显著富集于生物矿化和免疫相关的通路中。且相关基因在修复组织中表达水平较高。这些结果显示, 三种外套膜组织在生物矿化和免疫功能方面存在显著差异, 这可能与日本海神蛤壳体修复机制密切相关。本研究为深入探讨日本海神蛤外套膜功能提供了数据支持, 同时为其他软体生物外套膜的研究提供了参考。

关键词

日本海神蛤, 外套膜, RNA-Seq, 生物矿化

Transcriptomic Profiling of Mantle Tissue in *Panopea japonica* during Shell Repair

Jianbao Guo, Jiaxin Xiao, Sirun Wu, Yuteng Liang, Xuejian Xiang, Zhiying Gao, Yang Liu*, Zhongming Huo

Engineering and Technology Research Center of Shellfish Breeding in Liaoning Province, College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning

Received: Feb. 10th, 2025; accepted: Mar. 3rd, 2025; published: Mar. 12th, 2025

*通讯作者。

文章引用: 郭建宝, 肖嘉鑫, 吴思润, 梁誉腾, 向雪建, 高志鹰, 刘洋, 霍忠明. 日本海神蛤壳修复过程中外套膜组织的转录组特征解析[J]. 海洋科学前沿, 2025, 12(1): 50-61. DOI: 10.12677/ams.2025.121006

Abstract

To investigate the differences between mantle repair tissue and normal mantle tissue of *Panopea japonica* following shell damage, this study employed RNA-Seq and bioinformatics analysis to compare the transcriptomes of mantle repair tissue (A4Y1), external mantle tissue (A4Wa1), and internal mantle tissue (A4Wb1). A total of 1864 differentially expressed genes (DEGs) were identified across the three types of mantle tissues (selection criteria: $p_{\text{adj}} < 0.05$ and $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1$). Among these, 807 upregulated and 598 downregulated genes were found in A4Wa1 vs. A4Y1, 678 upregulated and 563 downregulated genes in A4Wb1 vs. A4Y1, and 44 upregulated and 142 downregulated genes in A4Wa1 vs. A4Wb1. GO and KEGG enrichment analyses revealed significant enrichment of these DEGs in pathways associated with biomineralization and immunity, with higher expression levels in repair tissues. These findings indicate that the three mantle tissue types exhibit significant differences in biomineralization and immune functions, which are likely linked to the shell repair mechanisms of *P. japonica*. This study provides data support for further exploration of mantle functions in *P. japonica* and serves as a reference for research on mantles in other mollusks.

Keywords

Panopea japonica, Mantle, RNA-Seq, Biomineralization

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

日本海神蛤(*Panopea japonica*), 属软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、海螂目(Myoidae)、缝栖蛤科(Hiatellidae)、海神蛤属(*Panopea*), 俗称“象拔蚌”, 是长约 8~15 厘米, 重约 500 g 的大型贝类。生活在潮下带 10~50 米水深的泥沙底, 为埋栖型贝类, 埋栖深度为 10~50 厘米[1]。日本海神蛤分布于中国黄海北部、朝鲜半岛和日本北海道等海域[2]。日本海神蛤的肉质鲜美, 口感上佳, 可与原产于美国及加拿大太平洋沿海的高雅海神蛤(*Panopea generosa*)不相上下。特别是日本海神蛤的牛磺酸含量显著较高, 每 100 g 水管干样品中牛磺酸含量为 2.97 g, 约是菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)等贝类的 5~9 倍[3], 因此备受消费者青睐, 市场潜力巨大。然而, 由于中国的日本海神蛤被过度捕捞, 资源几近枯竭, 主要依赖进口[4]。作为埋栖型贝类, 日本海神蛤通常埋栖于泥沙中, 仅露出虹吸管尖端。一旦遇到危险或者生活环境变化, 虹吸管会迅速收缩至泥沙中[1]。日本海神蛤为滤食性动物, 通过滤食、排泄和沉积耦合底栖和浮游系统。尽管双壳贝类大多是静止状态, 但它们的选择性过滤摄食和消化选择类似于移动动物的觅食, 具有重要的生态影响[5]。

软体动物的外套膜是一种包裹动物内脏并分泌外壳的器官。由内、外表皮和结缔组织以及少数肌肉纤维组成。贝类外套膜的形状随种类的不同而有差异[6]。双壳纲的外套膜通常位于左右两壳的内面, 是左右两侧包被软体部的二片薄膜, 其背缘与内脏团背面的上皮组织相连, 并由此向两侧伸长。外套膜在贝壳内的中央部分通常相当薄, 几乎半透明, 但边缘较厚, 具有内、外、中三个皱褶[7]。然而, 同属于双壳贝类, 日本海神蛤的外套膜却有些许不一样。由于日本海神蛤的壳无法完全收紧, 它的外套膜和水管一直暴露环境中, 因此具有独特的形态特征, 其外套膜完整包裹住内脏团, 仅留有一个足口。

双壳纲的外套膜的主要功能之一是通过蛋白质基质分泌和细胞外钙化过程参与壳的形成。Freer 等[8]研究证实蓝贻贝(*Mytilus edulis*)的外套膜转录组中, 有特征性生物矿物蛋白质表达。Marie 等[9]研究发现黑珠母贝和大珠母贝中, 鉴定出 80 种贝壳基质蛋白, 其中 66 种是完全独特的蛋白。外套膜另外一个主要功能是参与机体的免疫反应, 保护机体免受外界病原微生物干扰等。Yue Xin 等[10]研究发现文蛤在外套膜中合成内源性红霉素来抵御海洋中的微生物。Jingliang Huang 等[11]研究通过蛋白质组学分析, 合浦珠母贝的外套膜中的血细胞, 鉴定出了许多参与细胞和体液免疫的成分。此外, 双壳纲的外套膜还具有触觉等感官作用。Jiachen Yu 等[12]对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)的 SOX 基因家族(SRY-related HMG-box)进行了全基因组鉴定和表达谱分析。研究发现, 7 个 SOX 基因中有 5 个, 包括 SOXB1、SOXB2、SOXC、SOXD 和 SOXE, 在外套膜和鳃中的表达量较高。研究者推测, 这可能与扇贝外套膜和鳃中存在的多种神经感觉结构密切相关。

在规定海域捕捞后运输日本海神蛤时, 观察发现其贝壳破碎后, 外套膜会生成一种水泡状的修复组织。这种水泡状组织是否参与机体的损伤修复, 以及其基因表达上是否与正常的外套膜组织存在差异, 尚属未知。为此, 本研究采用 RNA-Seq 技术, 对日本海神蛤外套膜的水泡状修复组织以及无损伤的外套膜的外部组织和内部组织的转录组进行了比较分析。通过差异表达基因的解析, 初步探究了水泡状修复组织是否是日本海神蛤应对壳体破损的一种机制, 并进一步推测该机制可能涉及的基因调控过程。

2. 材料与方法

2.1. 样品处理

动物实验得到了大连海洋大学动物保护与利用委员会的批准。

日本海神蛤来自朝鲜元山市附近海域捕捞, 运输过程中, 有些日本海神蛤壳破碎形成了水泡状组织。组织采样前对它们分别进行了为期一周的驯化养殖, 并在采样前 24 小时停止喂食。观察其健康程度, 然后以修复外套膜的水泡状组织(A4Y1)为实验组, 外套膜的外层组织(A4Wa1)与外套膜的内部组织(A4Wb1)为对照组, 取完组织置于液氮中快速冷冻, -80°C 保存。

2.2. 文库制备与转录组测序

采用 TRIzol 试剂(Invitrogen, California, CA, USA)从每个样品中提取 RNA。使用紫外分光光度计(IM-PLEN, California, CA, USA)检测 RNA 纯度, 并使用 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)精确检测 RNA 完整性。RNA 样品检测合格后, 用带有 Oligo(dT)的磁珠富集真核生物 mRNA。随后加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段, 以 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物(random hexamers)合成一链 cDNA, 然后加入缓冲液、dNTPs 和 DNA polymerase I 和 RNase H 合成二链 cDNA, 随后利用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA。纯化的双链 cDNA 先进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 再用 AMPure XP beads 进行片段大小选择。最后进行 PCR 扩增, 并用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 得到最终的测序文库。合格的文库在 Illumina 平台上用 PE150 进行汇集和测序。

2.3. 转录组数据处理

采用 FastQC 对原始数据进行质控, Trimomatic v0.38 被用于过滤测序引物接头、poly-N 和低质量读数的读段(reads), 从而获得干净的读段(clean reads), 所有下游分析都是基于高质量的 clean reads 进行的。同时, 从实验室测序的基因组, 然后使用 Hisat2 v2.1.0 将获得的 clean reads 比对到参考基因组上, 再通过 SAMtools v1.7 进行排序去重, 使用 HTSeq v0.11.2 统计比对到每个基因上的 read counts。最后采用 R 语言包 edgeR v3.20 进行差异表达基因分析, 将 read counts 转换为 cmp 值, 并以 $p.\text{adj} < 0.05$ &

$|\log_2\text{foldchange}| \geq 1$ 作为筛选差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)的阈值。通过 R 语言包 pheatmap v1.0.12 绘制差异基因聚类热图。

2.4. DEGs 功能注释及富集分析

首先基于筛选出的 DEGs，通过 python 脚本从日本海神蛤的基因组(日本海神蛤基因组已由辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心测序完成)注释文件中获得了 DEGs 的序列及相关注释信息。然后使用 Blastp v2.2.26 软件将 DEGs 序列比对至公共数据库(如 NR、Swiss-Prot 和 eggNOG 等数据库)，获取基因的功能注释信息。最后使用 R 语言包 ClusterProfiler v3.18.1 进行基因本体论(Gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。

3. 结果与分析

3.1. 转录组测序及比对结果

本次实验共构建 3 个 cDNA 文库，并使用 Illuminat NovaSeq 6000 对上述文库进行测序。测序结果显示(表 1)，共获得 141,878,738 条 reads。对 raw reads 进行初步过滤去除低质量数据后，共获得 136,922,166 条 clean reads 和 20.45 Gb clean bases。每个样本中的 Q20 和 Q30 均超过了 97%和 92%，GC 含量在 35%到 40%。使用 Trimmomatic 将 clean reads 进行进一步处理，去除低质量的 reads，以确保测序数据的质量，建立索引后，将过滤后的 clean reads 与日本海神蛤的基因组进行比对。基于 SAMtool v1.7 对比对结果进行排序去重后的分析见表 2，去重后得到了 16.39M reads 供后续分析。这些结果均表明我们的测序结果质量良好，适合开展进一步研究。

Table 1. Quality statistics of sequencing data
表 1. 测序数据质量统计

Sample	Raw Reads	Clean Reads	Clean Base (G)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
A4Y1	48,189,758	46,285,362	6.94	97.27	92.62	39.49
A4Wa1	46,848,442	45,518,576	6.83	97.27	92.62	37.74
A4Wb1	46,840,538	45,118,228	6.77	97.21	92.46	37.21

Table 2. Sequencing alignment statistics
表 2. 测序数据比对率统计

Samples	clean_reads	Total_map	Unique_map	Multi_map
A4Y1	22,505,930	17,257,547 (76.68%)	16,030,934 (71.23%)	597,007 (2.65%)
A4Wa1	22,129,861	21,815,617 (98.58%)	20,227,329 (91.40%)	794,627 (3.59%)
A4Wb1	21,930,135	21,471,795 (97.51%)	19,608,829 (89.41%)	986,225 (4.50%)

3.2. 差异表达基因分析

我们利用 HTSeq v0.11.2 统计了各样本的 read counts，并使用 R 语言包 edgeR v3.20 对基因表达的差异性进行分析。以 A4Wa1 和 A4Wb1、A4Wa1 和 A4Y1、A4Wb1 和 A4Y1 为比较组(筛选标准： $p.\text{adj} < 0.05$ 且 $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1$)，共筛选得到 1864 个差异表达基因(DEGs)。如图 1 所示，A4Wa1 与 A4Y1 的比较中，上调表达基因 807 个，下调表达基因 598 个；A4Wb1 与 A4Y1 的比较中，上调表达基因 678 个，下调表达基因 563 个；A4Wa1 与 A4Wb1 的比较中，上调表达基因 44 个，下调表达基因 142 个。

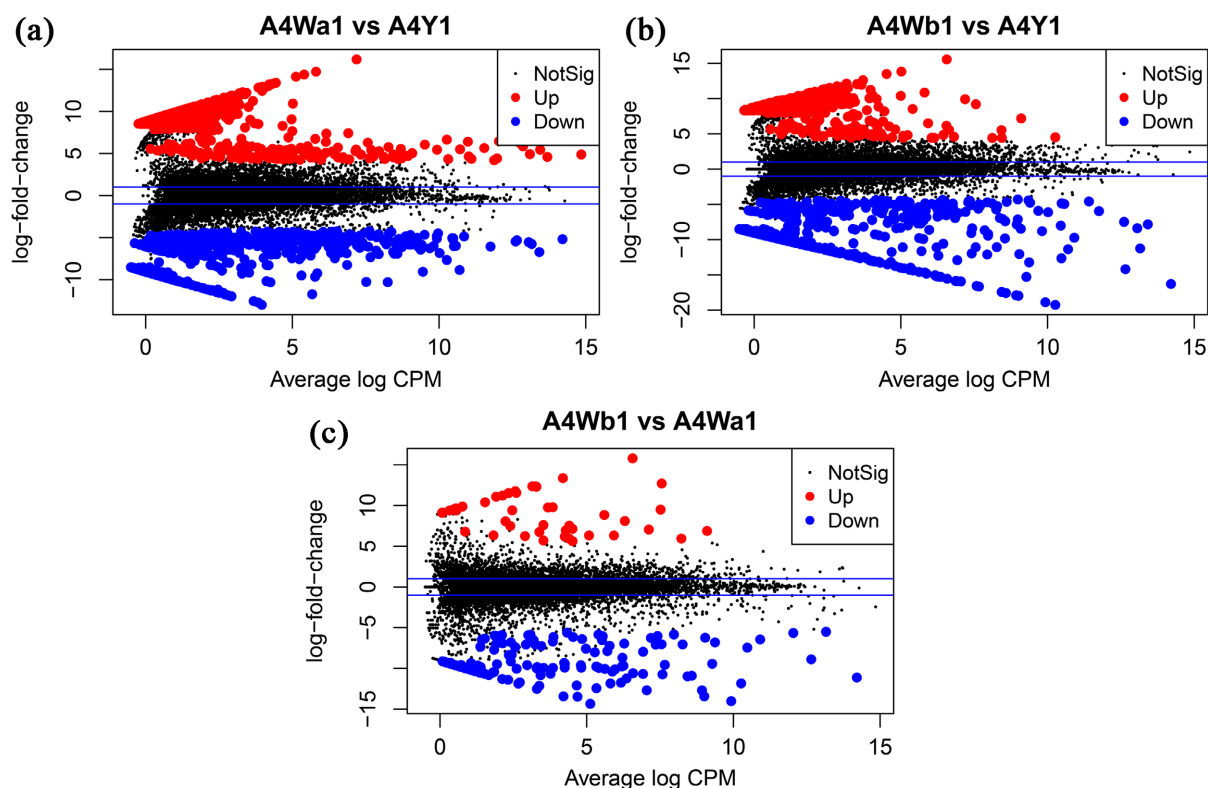


Figure 1. Differential gene volcano map between different samples. (a) The differential gene volcanic map of the outer tissue of the mantle (A4Wa1) and the damage repair tissue of the mantle (A4Y1); (b) The differential gene volcanic map of the inner tissue of the mantle (A4Wb1) and the damage repair tissue of the mantle (A4Y1); (c) Gene volcano map of the difference between the outer tissue of the mantle (A4Wa1) and the inner tissue of the mantle (A4Wb1). Blue dots represent down regulated genes, red dots represent up-regulated genes, and black dots represent genes with no significant differential expression

图 1. 不同样本之间的差异基因火山图。(a) 外套膜的外部组织(A4Wa1)与外套膜的修复组织(A4Y1)的差异基因火山图; (b) 外套膜的内部组织(A4Wb1)与外套膜的修复组织(A4Y1)的差异基因火山图; (c) 外套膜的外部组织(A4Wa1)与外套膜的内部组织(A4Wb1)差异基因火山图。蓝色点代表下调的基因, 红色点代表上调的基因, 黑色点代表没有明显差异表达的基因

为了更深入探索 DEGs 的表达模式, 我们对 HTSeq v0.11.2 输出的原始 read counts 进行了归一化处理, 后续分析均基于归一化后的 counts 数据。通过不同组别之间的 Venn 图分析(图 2(a)), 发现仅有 31 个差异基因在所有组别间共有。与 A4Wa1 和 A4Wb1 之间的差异相比, A4Wa1 和 A4Y1、A4Wb1 和 A4Y1 之间的差异基因数量显著更多, 表明修复组织(A4Y1)与正常组织(A4Wa1 和 A4Wb1)的差异尤为显著。基于 DEGs 的表达数据, 我们使用 R 包 pheatmap v1.0.12 对差异基因进行了聚类分析。如图 2(b)所示, 在差异基因聚类热图中, 红色表示表达上调的基因, 蓝色表示表达下调的基因。热图清晰地展示了不同样本间的差异表达基因模式, 进一步证明本实验中的数据可靠性及样本选择的合理性。

3.3. GO 功能富集分析

如图 3 和图 4 所示, 我们对 A4Wa1 vs A4Y1、A4Wb1 vs A4Y1 和 A4Wa1 vs A4Wb1 中筛选出的 DEGs 进行了 GO 富集分析。结果表明: 三个比较的组别都显著富集到了几丁质结合(Chitin binding), 胞外区(Extracellular region), 多糖结合(Polysaccharide binding), 肽酶抑制剂活性(Peptidase inhibitor activity)条目上。这些条目都与壳形成有着密切的关系, 表明这些条目注释到基因在外套膜组织中普遍表达。其中几丁质结合条目主要富集到了几丁质酶-1 (CHIT1)与 Pif 蛋白、MATN2 等多种基质蛋白。

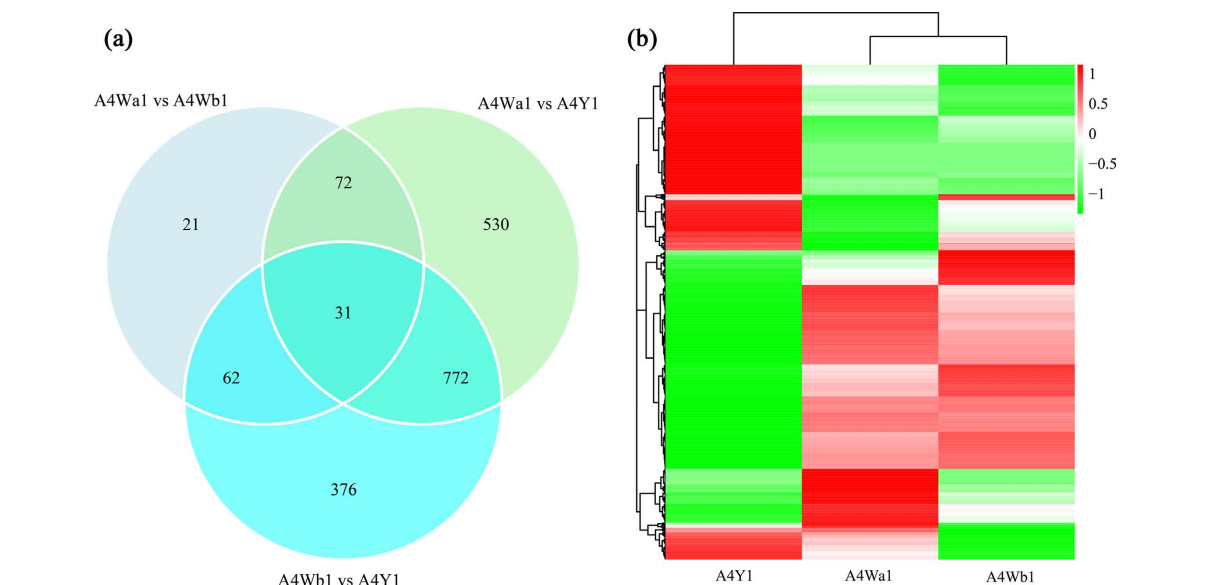


Figure 2. Venn diagram and clustering heatmap of differentially expressed genes (DEGs). (a) The Venn diagram shows the distribution of DEGs among different comparison groups; (b) The clustering heatmap illustrates the expression patterns of DEGs. A4Wa1 represents the outer tissue of the mantle, A4Wb1 represents the inner tissue of the mantle, and A4Y1 represents the injury-repair tissue of the mantle

图 2. 差异表达基因(DEGs)的 Venn 图和聚类热图。(a) Venn 图展示不同比较组间的 DEGs 分布; (b) 聚类热图显示 DEGs 的表达模式。A4Wa1 表示外套膜的外部组织, A4Wb1 表示外套膜的内部组织, A4Y1 表示外套膜的修复组织

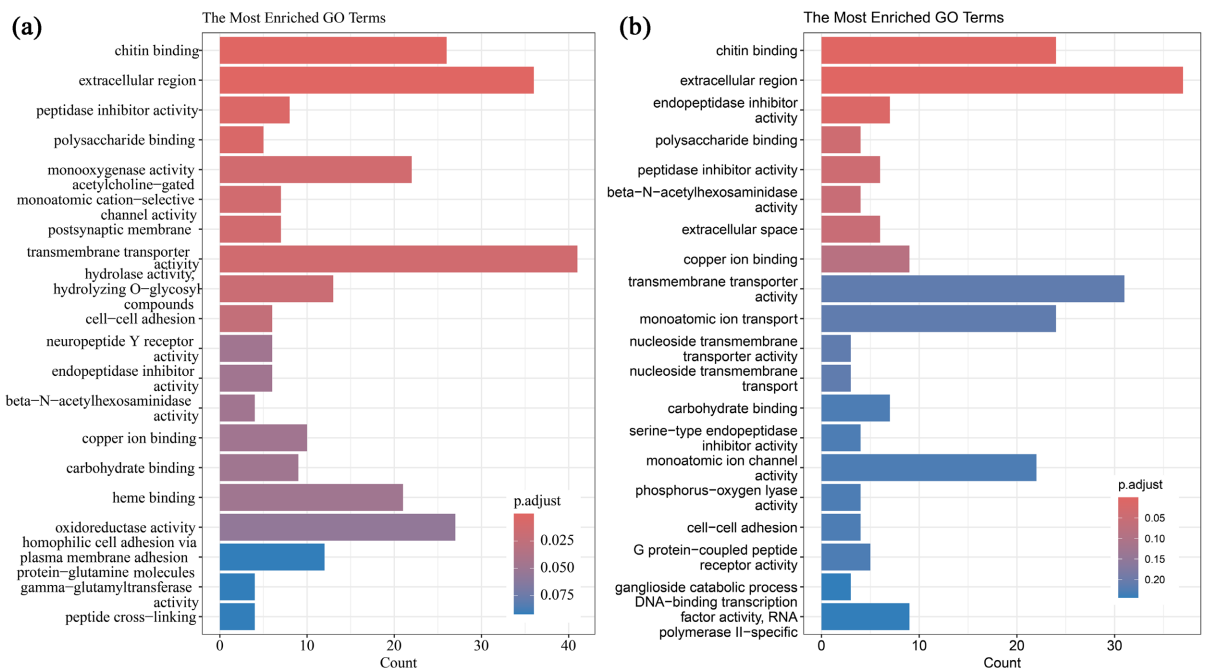


Figure 3. GO enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs). (a) GO enrichment analysis for the A4Wa1 vs A4Y1 comparison group; (b) GO enrichment analysis for the A4Wb1 vs A4Y1 comparison group. A4Wa1 represents the outer tissue of the mantle, A4Wb1 represents the inner tissue of the mantle, and A4Y1 represents the injury-repair tissue of the mantle. The bar plots display the significantly enriched GO terms and their associated gene counts, with colors indicating the level of statistical significance (p.adj)

图 3. 差异表达基因(DEGs)的 GO 富集分析结果。(a) A4Wa1 vs A4Y1 比较组的 GO 富集分析; (b) A4Wb1 vs A4Y1 比较组的 GO 富集分析。A4Wa1 表示外套膜的外部组织, A4Wb1 表示外套膜的内部组织, A4Y1 表示外套膜的修复组织。图中显示了显著富集的 GO 条目及其对应的基因数量, 颜色表示显著性水平(p.adj)

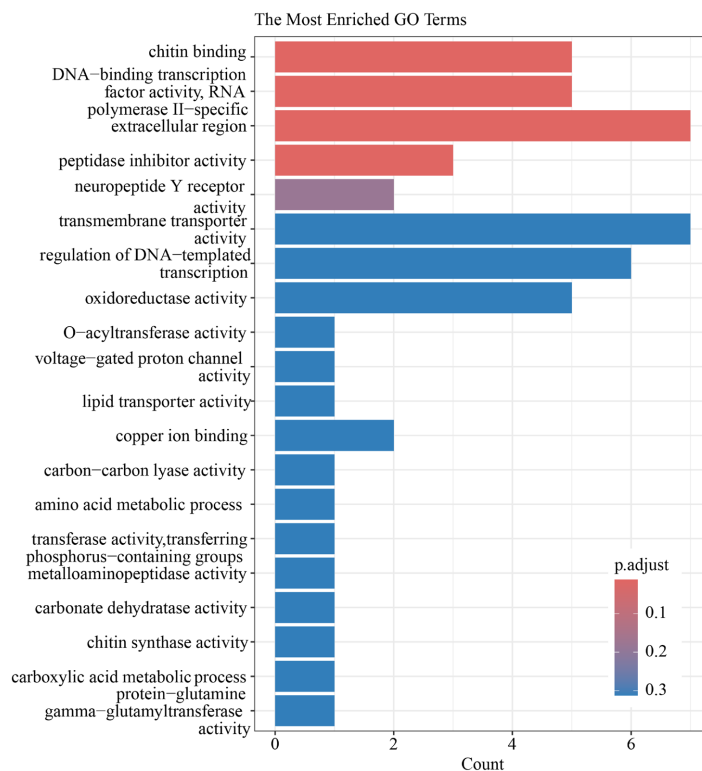


Figure 4. GO enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) between the outer mantle tissue and inner mantle tissue (A4Wa1 vs A4Wb1). The bar plot displays the significantly enriched GO terms and their associated gene counts, with colors indicating the level of statistical significance (p.adj)

图 4. 外套膜的外部组织与外套膜内部组织(A4Wa1 vs A4Wb1)差异基因 GO 注释富集图。图中显示了显著富集的 GO 条目及其对应的基因数量，颜色表示显著性水平(p.adj)

3.4. KEGG 通路富集分析

将 A4Wa1 vs A4Y1 与 A4Wb1 vs A4Y1 以及 A4Wa1 vs A4Wb1 中筛选出的 DEGs 注释到 KEGG 上，以便系统分析这些 DEGs 的关联性。如图 5 所示，KEGG 富集结果表明：两个比较组别分别筛选出的 1405 个、1240 个和 186 个 DEGs，分别富集到了 248 条、246 条和 104 条信号通路上，其中 A4Wa1 vs A4Y1 组有 48 条信号通路显著富集(p.adj < 0.05)，A4Wb1 vs A4Y1 有 20 条信号通路显著富集(p.adj < 0.05)，A4Wa1 vs A4Wb1 有 36 条信号通路显著富集(p.adj < 0.05)。

依据 p.adj 值由低到高选择了前 20 条信号通路进行绘图和分析，A4Wa1 vs A4Y1 的结果显示，前 5 条信号通路是钙信号转导途径(Calcium signaling pathway)、昼夜节律(Circadian entrainment)、Rap1 信号通路(Rap1 signaling pathway)、GnRH 信号通路(GnRH signaling pathway)和催产素信号通路(Oxytocin signaling pathway)是 DEGs 显著富集的前 5 条信号通路，分别注释到了 40、19、30、19 和 26 个基因。A4Wb1 vs A4Y1 的结果显示，前 5 条信号通路是异喹啉生物碱的生物合成(Isoquinoline alkaloid biosynthesis)、酪氨酸代谢(Tyrosine metabolism)、苯丙氨酸代谢(Phenylalanine metabolism)、胆汁分泌(Bile secretion)和蛋白质消化吸收(Protein digestion and absorption)，分别注释到了 13、16、9、12 和 22 个基因。此外，两个比较组之间显著富集的通路中有 10 个相同的，分别是酪氨酸代谢、胆汁分泌、钙信号转导途径、氨基酸与核苷酸代谢、昼夜节律、黑素生成、矿物质吸收、醛固酮的合成与分泌、鞘糖脂生物合成-球状和异球状系列和光转导。有趣的是，在 A4Wa1 vs A4Wb1 的富集结果中同样也有异喹啉生物碱的生物合成通路被显著富集(图 6)。

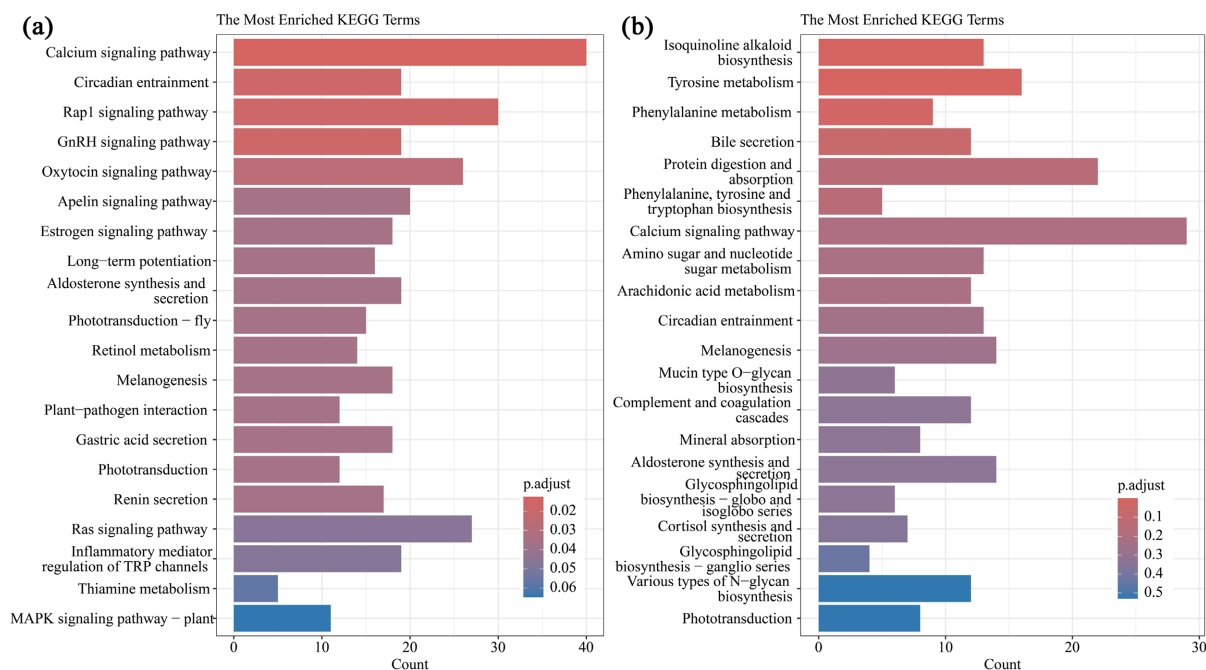


Figure 5. KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs). (a) KEGG enrichment analysis for the A4Wa1 vs A4Y1 comparison; (b) KEGG enrichment analysis for the A4Wb1 vs A4Y1 comparison. A4Wa1 represents the outer mantle tissue, A4Wb1 represents the inner mantle tissue, and A4Y1 represents the injury-repair tissue of the mantle. The figure shows the significantly enriched KEGG pathways and the corresponding number of genes, with colors indicating the level of significance (p.adjust)

图 5. 差异表达基因(DEGs)的 KEGG 富集分析结果。(a) A4Wa1 vs A4Y1 比较组的 KEGG 富集分析; (b) A4Wb1 vs A4Y1 比较组的 KEGG 富集分析。A4Wa1 表示外套膜的外部组织, A4Wb1 表示外套膜的内部组织, A4Y1 表示外套膜的修复组织。图中显示了显著富集的 KEGG 通路及其对应的基因数量, 颜色表示显著性水平(p.adjust)

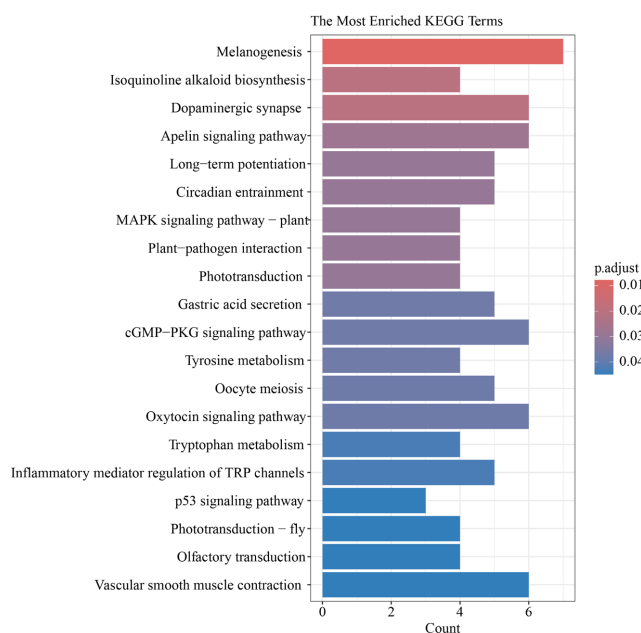


Figure 6. KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) between the outer mantle tissue and inner mantle tissue (A4Wa1 vs A4Wb1). The figure presents significantly enriched KEGG pathways and the corresponding number of genes, with colors indicating the level of significance (p.adjust)

图 6. 外套膜的外部组织与外套膜内部组织(A4Wa1 vs A4Wb1)差异表达基因 KEGG 注释富集图。图中显示了显著富集的 KEGG 通路及其对应的基因数量, 颜色表示显著性水平(p.adjust)

4. 讨论

外套膜是软体动物的重要组织,不仅在贝壳形成中发挥关键作用,还参与免疫反应、环境适应以及损伤修复等多种生物学功能。壳体的破损可能显著影响机体的生理平衡。本研究通过 RNA-Seq 技术结合生物信息学分析,对外套膜的不同组织(外部组织、内部组织及修复组织)进行了差异表达基因的鉴定。这些基因经功能富集分析(如 GO 和 KEGG)后,主要归属于免疫反应、信号传导及生理节律调控等相关通路。同时,外套膜的内部组织和外部组织与其修复组织之间鉴定的差异基因也表现出显著差异,表明外套膜不同组织在功能和分子机制上存在差异性。

4.1. 壳损伤修复过程中壳形成相关基因表达的变化

软体动物典型壳体(如贻贝、牡蛎、鲍鱼和鹦鹉螺)具有三层结构:最外层为一层薄的有机革质层,内部则为两层钙化层,即外部的棱柱层和内部的珍珠层[13]。生物矿化在贝壳的形成中起到了关键作用,生物矿化在贝壳形成中发挥了关键作用,这一过程受发育和环境因素的双重调控,并涉及精确的基因表达调控分析。在本研究中,与壳体形成相关的基因在外套膜的修复组织中普遍呈上调趋势,包括几丁质酶(*CHIT1*)和 *Pif* 蛋白等重要基因。几丁质酶是内切- β -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶,属于 18 糖基水解酶家族,通过催化 β -(1,4)糖苷键的水解来降解几丁质[14]。已有研究表明,*CHIT1* 参与调节肝成纤维细胞组织重塑过程[15]。此外,外套膜边缘主要负责棱柱层的形成,而几丁质是棱柱层中有机基质的主要成分[16]。在研究牡蛎的贝壳修复过程中,通过在壳边缘刻划发现,损伤刺激会启动修复机制,并激活或抑制与贝壳形成相关的基因表达,从而再生棱柱状层[17]。*Pif* 蛋白是一种酸性基质蛋白,它特异性地与霏石晶体结合。主要参与了珍珠层形成。*Pif* 互补 DNA (cDNA)编码了一种前体蛋白,该蛋白在翻译后被切割以产生 *Pif97* 和 *Pif80*。其中 *Pif97* 中存在几丁质结合域,能够与几丁质结合[18]。*MATN2* 是一种广泛分布于细胞外基质中的丝状形成蛋白,在各种组织的细胞外基质组装中发挥作用,形成胶原相关和胶原非依赖性丝状网络[19]。有趣的是,这些基因表达量在外套膜的修复组织中远高于外套膜的正常组织(图 7)。

综上所述,多种细胞外基质蛋白通过与几丁质等组分的相互作用,共同促进了日本海神蛤壳体的修复。我们的研究显示,相当数量的差异表达基因显著富集于这些相关通路,这表明外套膜的修复组织与正常外套膜组织在分子机制上存在显著差异。作为一种修复性组织,外套膜的修复组织的主要功能是迅速修复破损的壳体,以防止机体进一步受损并提高修复效率。

4.2. 壳损伤修复过程中免疫基因表达的变化

在外套膜壳体破损时,日本海神蛤会调动其免疫系统,以应对潜在的外来病原微生物威胁。在采样时,日本海神蛤表现出健康活跃的状态,壳体与外套膜的破损并未导致严重的全身感染或组织坏死。在 A4Wb1 vs A4Y1 和 A4Wa1 vs A4Wb1 的差异基因中 KEGG 富集过程中,富集到了异喹啉生物碱的生物合成的信号通路,其中注释到了 *HDC*、*AOC3*、*tyr-3*、*Aplysianin-A* (*APA*)等基因。但在 A4Wa1 vs A4Y1 的差异基因中并没富集到免疫相关的信号通路,这表明这些免疫基因在日本海神蛤外套膜直接接触外部环境的组织普遍表达。但是这些基因在外套膜的修复组织中表达量远高于外套膜的正常组织中(图 7)。

HDC 是组氨脱羧酶,组胺(*HA*)是在组氨酸脱羧酶催化下通过组氨酸脱羧合成的[20],这是一种脊椎动物和无脊椎动物中的重要神经递质,调节各种生理过程,包括炎症反应、免疫调节以及细胞分化、增殖和再生[21]-[24]。研究显示,缺乏 *HDC* 的小鼠对炎症的敏感性增加[25],进一步表明其在炎症和免疫调控中的关键作用。含铜胺氧化酶 3 (*AOC3*),也称为血管粘附蛋白 1 (*VAP-1*)是一种内皮粘附分子,可促进中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞外渗到炎症部位[26]。*AOC3* 已经被证实在小鼠中参与呼吸过敏性炎症反应中[27]。其在炎症调控中的功能可能是日本海神蛤在损伤修复过程中对潜在病原体防御的重要组

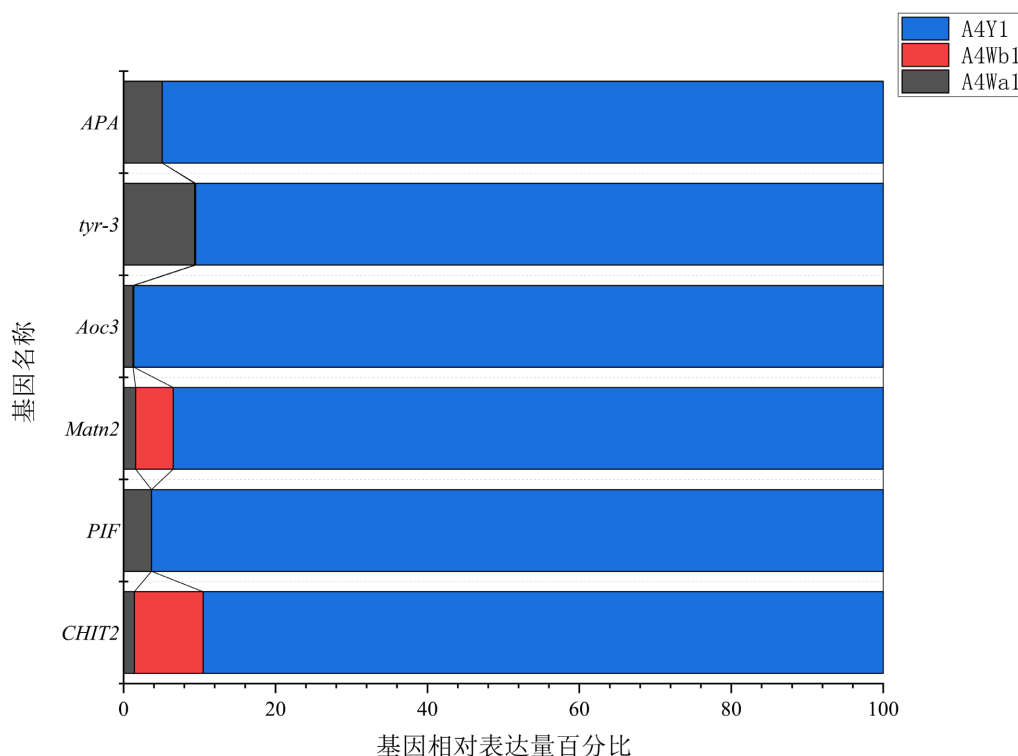


Figure 7. Percentage comparison of relative expression levels of six genes across different tissues. This figure shows the relative expression percentages of *CHIT1* (Chitotriosidase-1), *PIF* (Protein *PIF*), *Matn2* (Matrilin-2), *Aoc3* (Amine oxidase 3), *tyr-3* (Putative tyrosinase-like protein *tyr-3*), and *APA* (Aplysianin-A) in different tissues. Different colors indicate tissue types: blue represents A4Y1 (damage-repair tissue of the mantle), red represents A4Wb1 (inner tissue of the mantle), and black represents A4Wa1 (outer tissue of the mantle)

图 7. 不同组织中 6 个基因的相对表达量百分比比较图。该图展示了几丁质酶-1 (*Chitotriosidase-1*, *CHIT1*)、*PIF* 蛋白 (*Protein PIF*, *PIF*)、基质蛋白-2 (*Matrilin-2*, *Matn2*)、含铜胺氧化酶 3 (*Aoc3*, *Amine oxidase 3*)、酪氨酸酶样蛋白 (*Putative tyrosinase-like protein*, *tyr-3*) 和海兔素-A (*Aplysianin-A*, *APA*) 在不同组织中的相对表达量百分比。不同颜色分别代表不同组织类型：蓝色为 A4Y1 (外套膜修复组织)，红色为 A4Wb1 (外套膜内部组织)，黑色为 A4Wa1 (外套膜外部组织)

成部分。*Tyr* 是酪氨酸酶，存在大多数细菌、真菌、植物和动物的 3 型含铜酶之一[28]。研究表明，在虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 中，酪氨酸相关蛋白既参与生物矿化，又参与黑素生成，可能参与贝壳形成和色素沉着[29]。因此，*Tyr* 基因可能既参与壳体修复，又具备免疫功能。而在淡水蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 中，紫蚌外套膜酪氨酸酶活性高于白蚌，表明 *HcTyr* 和 *HcTyp-1* 可能参与了珍珠层颜色的形成[30]。海兔素 A (*APA*) 一种存在于海兔 (*Aplysia kurodai*) 蛋白腺中的抗菌和抗肿瘤糖蛋白[31]。在过氧化氢酶存在下，海兔素 A 的抗菌活性如预期一样受到抑制，表明海兔素 A 的抗菌作用源于与底物反应过程中产生的过氧化氢[32]。在日本海神蛤中，*APA* 的表达上调可能表明其在应对损伤修复区域潜在病原体感染中发挥了抗菌作用。

有趣的是，我们在日本海神蛤外套膜的修复组织中筛选出众多的免疫功能相关基因，并显著富集到多个通路中，日本海神蛤在壳破损之后形成的水泡状组织可能与免疫相关。通过释放免疫相关蛋白等物质，这些修复组织在损伤区域发挥免疫保护功能，以抵御潜在病原体的侵染。这些结果表明，外套膜的损伤修复组织不仅在壳体修复中起到关键作用，还通过免疫调控来维持机体的稳态。

5. 结论

本文通过对日本海神蛤外套膜的修复组织(A4Y1)与外套膜的外部组织(A4Wa1)和外套膜的内部组织

(A4Wb1)转录组进行比较分析,以 $p_{\text{adj}} < 0.05$ & $|\log_2\text{foldchange}| \geq 1$ 为阈值筛选得到了 1864 个 DEGs, A4Wa1 与 A4Y1 上调表达基因 807 个,下调表达基因 598 个; A4Wb1 与 A4Y1 上调表达基因 678 个,下调表达基因 563 个; A4Wa1 与 A4Wb1 上调表达基因 44 个,下调表达基因 142 个。通过 GO 和 KEGG 对 DEGs 进行了富集分析,富集结果显示外套膜修复组织与外套膜的正常组织中存在显著差异,外套膜确实存在壳形成或壳修复相关基因,通过以基质蛋白与几丁质共同修复壳破损的部位。除此之外,富集结果显示: A4Wb1 vs A4Y1 和 A4Wa1 vs AaWb1 中的差异基因富集到了免疫相关通路,而在 A4Wa1 vs A4Y1 中并未观察到类似富集现象。这表明免疫基因在直接接触外部环境的外套膜组织中具有普遍表达的特点,而在修复组织中,其表达水平显著上调,可能通过相关信号传导机制增强对损伤部位的免疫应答。

综上所述,外套膜的修复组织主要是日本海神蛤为修复破损的壳而形成的特化组织。这一组织不仅通过基质蛋白的合成促进壳体修复,还通过合成并释放免疫相关蛋白等物质,有效应对潜在病原体的侵袭。这表明日本海神蛤在壳修复过程中具备复杂的免疫调控和再生机制,进一步揭示了外套膜在机体适应和防御中的重要功能。

基金项目

大连市重点研发计划,日本海神蛤(象拔蚌)人工苗种繁育与高效养殖技术,2022YF16SN065; 国家贝类产业技术体系专项(国家级), CARS-49。

参考文献

- [1] Lee, C., Baik, K. and Hong, K. (1998) Ecological Studies on the Habitat of Geoduck Clam, *Panope Japonica*. *Journal of Aquaculture*, **11**, 105-111.
- [2] 齐钟彦, 马绣同. 黄渤海的软体动物[M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [3] 李春艳, 阎磊, 王品虹, 等. 日本海神蛤营养成分分析与评价[J]. *营养学报*, 2008(1): 113-114, 116.
- [4] 霍忠明, 赵雯, 肖友翔, 等. 日本海神蛤人工繁殖及早期生长发育[J]. *水产学报*, 2021, 45(2): 235-245.
- [5] Vaughn, C.C. and Hoellein, T.J. (2018) Bivalve Impacts in Freshwater and Marine Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **49**, 183-208. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062703>
- [6] 张玺, 齐钟彦. 贝类学纲要[M]. 北京: 科学出版社, 1961.
- [7] Audino, J.A. and Marian, J.E.A.R. (2016) On the Evolutionary Significance of the Mantle Margin in Pteriomorphian bivalves. *American Malacological Bulletin*, **34**, 148-159. <https://doi.org/10.4003/006.034.0212>
- [8] Freer, A., Bridgett, S., Jiang, J. and Cusack, M. (2013) Biomineral Proteins from *Mytilus edulis* Mantle Tissue Transcriptome. *Marine Biotechnology*, **16**, 34-45. <https://doi.org/10.1007/s10126-013-9516-1>
- [9] Marie, B., Joubert, C., Tayalé, A., Zanella-Cléon, I., Belliard, C., Piquemal, D., et al. (2012) Different Secretory Repertoires Control the Biomineralization Processes of Prism and Nacre Deposition of the Pearl Oyster Shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 20986-20991. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210552109>
- [10] Yue, X., Zhang, S., Wang, H., Yu, J., Peng, Q., McFall-Ngai, M., et al. (2022) The Mud-Dwelling Clam *Meretrix petechialis* Secretes Endogenously Synthesized Erythromycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119**, e2214150119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2214150119>
- [11] Huang, J., Li, S., Liu, Y., Liu, C., Xie, L. and Zhang, R. (2018) Hemocytes in the Extrapallial Space of *Pinctada fucata* Are Involved in Immunity and Biomineralization. *Scientific Reports*, **8**, Article No. 4657. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22961-y>
- [12] Yu, J., Zhang, L., Li, Y., Li, R., Zhang, M., Li, W., et al. (2017) Genome-Wide Identification and Expression Profiling of the SOX Gene Family in a Bivalve Mollusc *Patinopecten yessoensis*. *Gene*, **627**, 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.013>
- [13] Saruwatari, K., Matsui, T., Mukai, H., Nagasawa, H. and Kogure, T. (2009) Nucleation and Growth of Aragonite Crystals at the Growth Front of Nacres in Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. *Biomaterials*, **30**, 3028-3034. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.011>
- [14] Okada, Y., Yamaura, K., Suzuki, T., Itoh, N., Osada, M. and Takahashi, K.G. (2013) Molecular Characterization and

- Expression Analysis of Chitinase from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **165**, 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.03.008>
- [15] Malaguarnera, L., Rosa, M.D., Zambito, A.M., dell'Ombra, N., Marco, R.D. and Malaguarnera, M. (2006) Potential Role of Chitotriosidase Gene in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Evolution. *The American Journal of Gastroenterology*, **101**, 2060-2069. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00680.x>
- [16] Levi-Kalisman, Y., Falini, G., Addadi, L. and Weiner, S. (2001) Structure of the Nacreous Organic Matrix of a Bivalve Mollusk Shell Examined in the Hydrated State Using Cryo-TEM. *Journal of Structural Biology*, **135**, 8-17. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2001.4372>
- [17] Du, X., Fan, G., Jiao, Y., Zhang, H., Guo, X., Huang, R., *et al.* (2017) The Pearl Oyster *Pinctada fucata martensii* Genome and Multi-Omic Analyses Provide Insights into Biomineralization. *GigaScience*, **6**, gix059. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix059>
- [18] Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T., Kato, T., *et al.* (2009) An Acidic Matrix Protein, Pif, Is a Key Macromolecule for Nacre Formation. *Science*, **325**, 1388-1390. <https://doi.org/10.1126/science.1173793>
- [19] Mátés, L., Korpos, É., Deák, F., Liu, Z., R. Beier, D., Aszódi, A., *et al.* (2002) Comparative Analysis of the Mouse and Human Genes (Matn2 and MATN2) for Matrilin-2, a Filament-Forming Protein Widely Distributed in Extracellular Matrices. *Matrix Biology*, **21**, 163-174. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(01\)00194-9](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(01)00194-9)
- [20] Thurmond, R.L., Gelfand, E.W. and Dunford, P.J. (2008) The Role of Histamine H1 and H4 Receptors in Allergic Inflammation: The Search for New Antihistamines. *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**, 41-53. <https://doi.org/10.1038/nrd2465>
- [21] Castellán Baldan, L., Williams, K.A., Gallezot, J., Pogorelov, V., Rapanelli, M., Crowley, M., *et al.* (2014) Histidine Decarboxylase Deficiency Causes Tourette Syndrome: Parallel Findings in Humans and Mice. *Neuron*, **81**, 77-90. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.052>
- [22] Hill, S.J. (1990) Distribution, Properties, and Functional Characteristics of Three Classes of Histamine Receptor. *Pharmacological Reviews*, **42**, 45-83. [https://doi.org/10.1016/s0031-6997\(25\)00039-0](https://doi.org/10.1016/s0031-6997(25)00039-0)
- [23] Jones, B.L. and Kearns, G.L. (2010) Histamine: New Thoughts about a Familiar Mediator. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **89**, 189-197. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.256>
- [24] Kitakaze, M. (2016) Clinical Evidence of the Role of Histamine in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, **67**, 1553-1555. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.01.046>
- [25] Yang, X.D., Ai, W., Asfaha, S., Bhagat, G., Friedman, R.A., Jin, G., *et al.* (2010) Histamine Deficiency Promotes Inflammation-Associated Carcinogenesis through Reduced Myeloid Maturation and Accumulation of CD11b⁺Ly6G⁺ Immature Myeloid Cells. *Nature Medicine*, **17**, 87-95. <https://doi.org/10.1038/nm.2278>
- [26] Salmi, M. and Jalkanen, S. (1992) A 90-Kilodalton Endothelial Cell Molecule Mediating Lymphocyte Binding in Humans. *Science*, **257**, 1407-1409. <https://doi.org/10.1126/science.1529341>
- [27] Dunkel, J., Aguilar-Pimentel, J.A., Ollert, M., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., de Angelis, M.H., *et al.* (2014) Endothelial Amine Oxidase AOC3 Transiently Contributes to Adaptive Immune Responses in the Airways. *European Journal of Immunology*, **44**, 3232-3239. <https://doi.org/10.1002/eji.201444563>
- [28] Yao, H., Cui, B., Li, X., Lin, Z. and Dong, Y. (2020) Characteristics of a Novel Tyrosinase Gene Involved in the Formation of Shell Color in Hard Clam *Meretrix meretrix*. *Journal of Ocean University of China*, **19**, 183-190. <https://doi.org/10.1007/s11802-020-4202-1>
- [29] Sun, X., Yang, A., Wu, B., Zhou, L. and Liu, Z. (2015) Characterization of the Mantle Transcriptome of Yesso Scallop (*Patinopecten yessoensis*): Identification of Genes Potentially Involved in Biomineralization and Pigmentation. *PLOS ONE*, **10**, e0122967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122967>
- [30] Chen, X., Liu, X., Bai, Z., Zhao, L. and Li, J. (2017) *HcTyr* and *HcTyp-1* of *Hyriopsis cumingii*, Novel Tyrosinase and Tyrosinase-Related Protein Genes Involved in Nacre Color Formation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **204**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.11.005>
- [31] Kamiya, H., Muramoto, K. and Yamazaki, M. (1986) Aplysianin-A, an Antibacterial and Antineoplastic Glycoprotein in the Albumen Gland of a Sea Hare, *Aplysia kurodai*. *Experientia*, **42**, 1065-1067. <https://doi.org/10.1007/bf01940736>
- [32] Jimbo, M., Nakanishi, F., Sakai, R., Muramoto, K. and Kamiya, H. (2003) Characterization of L-Amino Acid Oxidase and Antimicrobial Activity of Aplysianin A, a Sea Hare-Derived Antitumor-Antimicrobial Protein. *Fisheries Science*, **69**, 1240-1246. <https://doi.org/10.1111/j.0919-9268.2003.00751.x>