

东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因克隆及其在感染中的表达分析

许冬梅, 刘依铭, 孙玉刚, 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

许冬梅, 刘依铭, 孙玉刚, 刘玉芬, 刘鹏, 赵文阁. 东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因克隆及其在感染中的表达分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1731-1746.

XU Dongmei, LIU Yiming, SUN Yugang, LIU Yufen, LIU Peng, ZHAO Wenge. Cloning of *adipor1* and *adipor2* genes in *Rana dybowskii* and its expression pattern upon infection[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1731-1746.

摘要: 脂联素受体 1 (adiponectin receptor 1, AdipoR1)和脂联素受体 2 (adiponectin receptor 2, AdipoR2)能够与脂肪组织分泌的脂联素(adiponectin, AdipoQ)相结合, 参与机体的多种生理功能。为探究 AdipoR1 和 AdipoR2 在嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)感染下两栖类炎症反应中的作用, 通过逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术克隆东北林蛙(*Rana dybowskii*)的 *adipor1* 和 *adipor2* 基因, 对 *adipor1* 和 *adipor2* 进行生物信息学分析; 利用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术分析 *adipor1* 和 *adipor2* 的组织表达差异, 构建 Ah 感染的东北林蛙炎症模型, 通过苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)观察组织病理变化; 再利用 qRT-PCR 和 Western blotting 对感染后不同时间点的 *adipor1* 和 *adipor2* 的表达进行动态检测。结果表明, AdipoR1 和 AdipoR2 均为具有 7 次跨膜结构域的膜蛋白; 系统进化树也显示与两栖类聚为同一分支; 基于 qRT-PCR 和 Western blotting 结果显示, Ah 感染下 *adipor1* 和 *adipor2* 在转录和翻译水平发生不同程度的上调表达, 但应答时间和水平有所差异。综上所述, 推测 AdipoR1 和 AdipoR2 参与了机体的细菌免疫应答过程, 为进一步探究脂联素受体在两栖类的生物学功能提供参考。

关键词: 东北林蛙; 嗜水气单胞菌; *adipor1* 基因; *adipor2* 基因; 细菌感染

资助项目: 黑龙江省自然科学基金(LH2021C053)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (LH2021C053).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Yufen, liuyufen@hrbnu.edu.cn; ZHAO Wenge, zhaowenge@hrbnu.edu.cn

Received: 2022-09-28; Accepted: 2022-12-31; Published online: 2023-01-17

Cloning of *adipor1* and *adipor2* genes in *Rana dybowskii* and its expression pattern upon infection

XU Dongmei, LIU Yiming, SUN Yugang, LIU Yufen*, LIU Peng, ZHAO Wenge*

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

Abstract: Adiponectin receptor 1 (AdipoR1) and Adiponectin receptor 2 (AdipoR2) can bind to adiponectin (AdipoQ) secreted by adipose tissue to participate in various physiological functions of the body. In order to explore the role of AdipoR1 and AdipoR2 in amphibians infected by *Aeromonas hydrophila* (*Ah*), the genes *adipor1* and *adipor2* of *Rana dybowskii* were cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and analyzed by bioinformatics. The tissue expression difference of *adipor1* and *adipor2* was analyzed by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), and an inflammatory model of *R. dybowskii* infected by *Ah* was constructed. The histopathological changes were observed by hematoxylin-eosin staining (HE staining); the expression profiles of *adipor1* and *adipor2* after infection were dynamically detected by qRT-PCR and Western blotting. The results show that AdipoR1 and AdipoR2 are cell membrane proteins with seven transmembrane domains. Phylogenetic tree also shows that AdipoR1 and AdipoR2 cluster with the amphibians in the same branch. qRT-PCR and Western blotting results show that *adipor1* and *adipor2* were up-regulated at different levels of transcription and translation upon *Ah* infection, but the response time and level were different. It is speculated that AdipoR1 and AdipoR2 participate in the process of bacterial immune response, providing a basis for further exploring the biological functions of AdipoR1 and AdipoR2 in amphibians.

Keywords: *Rana dybowskii*; *Aeromonas hydrophila*; *adipor1* gene; *adipor2* gene; bacterial infection

脂联素(adiponectin, AdipoQ)是一种由脂肪组织分泌的具有调节能量平衡^[1]、抗动脉粥样硬化^[2]、参与脂质代谢^[3]、繁殖^[4]以及免疫功能^[5]的细胞因子。AdipoQ 通过与脂联素受体(adiponectin receptor, AdipoR)结合介导生物学功能,其中 AdipoR 主要包括 AdipoR1、AdipoR2 和功能性受体 T-钙黏蛋白(T-cadherin, T-cad)。2003 年 Yamauchi 等^[6]首次在人体发现 AdipoR1 和 AdipoR2,其中 AdipoR1 对球状脂联素具高度亲和性,而对全长脂联素亲和力低;AdipoR2 对球状和全长脂联素都具有中度亲和性。以往研究^[6]证实 AdipoR1 和 AdipoR2 是具有 7 次跨膜结

构域的细胞膜蛋白质,二者拓扑结构与 G 蛋白偶联受体相反,其氨基端在细胞内,羧基端在细胞外。T-钙黏蛋白是近年来新发现是一种 Ca^{2+} 依赖的糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定蛋白,锚定在细胞表面,对全长脂联素形成的多聚合体具有结合功能^[7]。AdipoQ 与 AdipoR1、AdipoR2 和 T-cad 结合后,能够靶向定位多种免疫细胞,参与先天性免疫和获得性免疫。AdipoR1 主要激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinase, p38 MAPK)通路;而 AdipoR2 主要通过环

氧化物酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2)和过氧化物酶体增殖物活化受体 α/γ (peroxisome proliferator-activated receptor α/γ , PPAR α/γ)通路发挥生物学功能的多效性^[8-9]。

近年来, *adipor1* 和 *adipor2* 基因已经在人^[3]、鼠^[10]、鱼类^[11]和鸟类^[12]中得到鉴定, 发现二者在哺乳动物代谢旺盛的组织中广泛分布, 例如 *adipor1* 在骨骼肌中大量表达, 而 *adipor2* 在肝脏中大量表达。研究证明由于 AdipoR1 和 AdipoR2 在多种免疫细胞膜上表达, 如嗜酸性粒细胞^[13]、肥大细胞^[14]和巨噬细胞^[15], 导致 AdipoQ 与其受体结合后, 一方面刺激免疫细胞的增殖, 另一方面 AdipoR1 可以介导巨噬细胞中核转录因子(nuclear factor- κ -gene binding, NF- κ B)信号通路的激活和促炎细胞因子的表达, AdipoR2 通过介导抗炎 M2 巨噬细胞极化参与炎症反应^[16-17]。AdipoR1 和 AdipoR2 也能够参与自身免疫病如类风湿性关节炎中, 炎症促进 AdipoQ、AdipoR1 和 AdipoR2 的表达, 发挥抗炎作用的同时促进其他促炎介质的表达^[18-19]。研究发现, 在人类的 AdipoQ-AdipoR1 轴通过促进调节性 T 细胞释放白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10), 对炎症反应进行响应^[20]。上述研究表明 AdipoR1 和 AdipoR2 能够参与炎症反应过程, 而两栖类 AdipoR1 和 AdipoR2 是否具有相似的生物学功能还需要进一步研究。

东北林蛙(*Rana dybowskii*)是能够耐受高纬度、寒冷生存环境的无尾两栖动物, 在控制虫害、维护生态平衡方面起着积极的作用。其整体或雌蛙输卵管的干制品可入药, 故其也是重要的经济动物之一^[21-22]。近年来, 野生东北林蛙由于生存环境恶化、大量捕捉和微生物侵害等原因数量锐减。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)是一种常见人-兽-水产动物致病菌, 可导致蛙类出现“红腿病”, 该病的传染力强、病程短和死亡率

高, 对野生和养殖东北林蛙都造成严重威胁^[23-24]。本文拟对东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 进行克隆以及生物信息学分析, 人工建立东北林蛙 Ah 感染模型, 利用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)和 Western blotting 对不同感染时间的基因 *adipor1* 和 *adipor2* 表达水平进行检测, 为 AdipoR1 和 AdipoR2 的免疫功能研究提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物和菌株

东北林蛙(2-3 龄), 体质量(25±5) g, 实验室人工养殖。嗜水气单胞菌株(DW1701-1909)由本实验室分离鉴定。

1.1.2 主要试剂

Trizol 试剂盒、逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)与 qRT-PCR 所需试剂依据参考文献[25], 均购于南京诺唯赞(Vazyme)生物科技有限公司; 克隆载体 pMD18-T 购于宝生物工程(大连)有限公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞购于上海唯地生物技术有限公司; AdipoR1 和 AdipoR2 兔源多克隆抗体和 HRP 标记山羊抗兔抗体 IgG (H+L)购于博奥森(北京)生物技术有限公司; RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、PVDF 膜、脱脂奶粉、ECL 发光液均购于上海碧云天生物技术有限公司; 福尔马林溶液、苏木精和伊红染色液等均为常规国产化学试剂。

1.2 方 法

1.2.1 菌种活化及感染模型建立

依照文献[26]方法进行嗜水气单胞菌菌种活化, 在 180 r/min、28 °C 条件下振荡培养过夜

后再转接入大体积液体培养基中,当 OD_{600} 值为 0.9 时,收集菌液,平板计数测定菌液浓度为 1.5×10^7 CFU/mL。随机将东北林蛙分为 2 组: 试验组和对照组各 21 只,参考文献[25]向试验组腹腔注射 1 mL 嗜水气单胞菌悬浊液,对照组腹腔注射等量灭菌 LB 液体培养基。在 8、16、24、36、48、72 h 时分别取 2 组东北林蛙的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、皮肤、肌肉和胃组织,用液氮速冻后移至 -80°C 冰箱保存备用。东北林蛙的处理严格遵照相关试验动物福利规定,本研究方案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: HNUARIA2021002)审核通过。

1.2.2 引物设计

根据欧洲林蛙的 *adipor1* 基因序列(GenBank 登录号: XM_040337832.1)和 *adipor2* 基因序列(GenBank 登录号: XM_040345307.1),利用 Primer Premier 5.0 设计 *adipor1* 和 *adipor2* 两对引物,测序后得到完整开放阅读框(open reading frame, ORF)区,再设计荧光定量引物 *adipor1-q* 和 *adipor2-q*,内参引物选用 β -actin 基因^[27],引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物详情见表 1。

1.2.3 东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因的克隆

取东北林蛙脾脏组织约 0.1 g,加入液氮充分研磨后,依据 Trizol 试剂盒说明书提取总

RNA。再反转录合成 cDNA 第一链,依照 Taq DNA 聚合酶说明书进行 PCR 反应体系的配制,反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 53°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 32 个循环; 72°C 终延伸 10 min。RT-PCR 扩增得到 *adipor1* 和 *adipor2*,片段回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,再转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,经菌液 PCR 鉴定后送至哈尔滨睿博科兴公司进行测序。

1.2.4 东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因生物信息学分析

对获得的 *adipor1* 和 *adipor2* 基因序列,利用 DNAMAN 进行拼接,然后使用 MEGA 7、NCBI Conserved Domain SearchSMART (<http://smart.embl.de>)、SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpredsopma.pl>)、SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)、TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)等软件进行氨基酸和核苷酸序列分析;采用 PROSITE (<https://www.expasy.org/resources/prosite>)、ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)以及 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)等程序预测蛋白质的结构域及理化性质,用 Clustal Omega 软件对 AdipoR1 和 AdipoR2 氨基酸序列进行同源性比对,各物种 AdipoR1 和 AdipoR2 蛋白相关信息见表 2。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer sequences (5'→3')	T_m ($^\circ\text{C}$)	Product size (bp)	Purpose
<i>adipor1</i>	F: AATAAGTGACAACCCAGCAAA	49.7	1 269	RT-PCR
	R: CAGATGAGTAATAAACCCAGT			
<i>adipor2</i>	F: GTGGGACAATCCTCAATG	53.3	1 508	RT-PCR
	R: CAAATCGGAAAGGGTAAA			
<i>adipor1-q</i>	F: CAGTGTATTGCCATTCAGA	53.3	165	qRT-PCR
	R: TTCCTAGCACGCAGACGA			
<i>adipor2-q</i>	F: ATGTCGTTTCATCGCTCCG	52.4	117	qRT-PCR
	R: GCCCTCCGAATGGCAGTA			
β -actin	F: AAGAATGAGGGCTGGAACA	52.0	176	qRT-PCR
	R: GTGCGTGACATCAAGGAGAAGC			

表 2 参考物种信息

Table 2 List of reference species

Species	Accession No. of nucleotide (AdipoR1)	Accession No. of amino acid (AdipoR1)	Accession No. of nucleotide (AdipoR2)	Accession No. of amino acid (AdipoR2)
<i>Rana temporaria</i>	XM_040337833.1	XP_040193767.1	XM_040345309.1	XP_040201243.1
<i>Nanorana parkeri</i>	XM_018556911.1	XP_018412413.1	XM_018576458.1	XP_018431960.1
<i>Bufo gargarizans</i>	XM_044287284.1	XP_044143219.1	XM_044281378.1	XP_044137313.1
<i>Xenopus laevis</i>	XM_041581097.1	XP_041437031.1	NM_001094102.1	NP_001087571.1
<i>Xenopus tropicalis</i>	NM_001007927.1	NP_001007928.1	XM_031898612.1	XP_031754472.1
<i>Geotrypetes seraphini</i>	XM_033918017.1	XP_033773908.1	XM_033952467.1	XP_033808358.1
<i>Gallus gallus</i>	NM_001031027.2	NP_001026198.2	NM_001007854.2	NP_001007855.1
<i>Mus musculus</i>	NM_001306069.1	NP_001292998.1	NM_001355692.1	NP_001342621.1
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	XM_002717585.3	XP_002717631.1	XM_017343436.1	XP_017198925.1
<i>Bos taurus</i>	NM_001034055.1	NP_001029227.1	NM_001040499.2	NP_001035589.1
<i>Sus scrofa</i>	NM_001007193.1	NP_001007194.1	NM_001007192.1	NP_001007193.1
<i>Pan troglodytes</i>	XM_009440922.3	XP_009439197.1	XM_016922724.2	XP_016778213.1
<i>Homo sapiens</i>	NM_001290629.1	NP_001277558.1	NM_001375365.1	NP_001362294.1
<i>Danio rerio</i> (AdipoR1a)	NM_001327754.1	NP_001314683.1	BC164853.1	AAI64853.1
<i>Danio rerio</i> (AdipoR1b)	NM_213500.1	NP_998665.1		

1.2.5 东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因表达差异分析

采用 SYBR Green I 嵌合荧光法检测 *adipor1* 和 *adipor2* 在东北林蛙不同组织和器官中的转录水平, β -actin 作为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量^[28]。反应体系为(20 μ L): 2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, primer 1 (10 μ mol/L) 0.4 μ L, primer 2 (10 μ mol/L) 0.4 μ L, 50 \times ROX Reference Dye2 0.4 μ L, ddH₂O 7.8 μ L, cDNA 模板 1 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环数为 40 个; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 每次试验设置 3 次重复。

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

取东北林蛙对照组和试验组各时间点的组织, 经 10% 福尔马林溶液固定后采用石蜡包埋法, 制作病理组织切片(6 μ m)。HE 染色方法参考文献[28], 常规脱蜡复水后苏木精染色, 1% 的盐酸乙醇溶液进行分化, 1% 的氨水返蓝, 蒸馏水冲洗, 后进行 0.5% 伊红染液染色。染色完

成后进行不同浓度酒精脱水和二甲苯透明, 最后用中性树胶封片。

1.2.7 Western blotting 检测

配制 RIPA 裂解混合液(RIPA:PMSF=100:1) 在冰上提取总蛋白质。利用 BCA 法对蛋白进行定量, SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, TBST 漂洗 3 次; 二抗室温孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次; 配制 ECL 发光液化学发光仪曝光显影, 使用 Image J 软件分析条带灰度值。

2 结果与分析

2.1 东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 克隆及鉴定

提取东北林蛙脾脏 RNA 后经电泳检测, 有清晰的 28S rRNA 和 18S rRNA 的条带(图 1A); OD_{260}/OD_{280} 均在 1.8–2.0 之间, 总 RNA 具有完整性。RT-PCR 扩增后得到与预计相符条带。目的基因与 pMD18-T 分别连接转化入大肠杆菌 DH5 α , 通过菌液 PCR 鉴定后, 与预期相符合(图 1B、1C)。

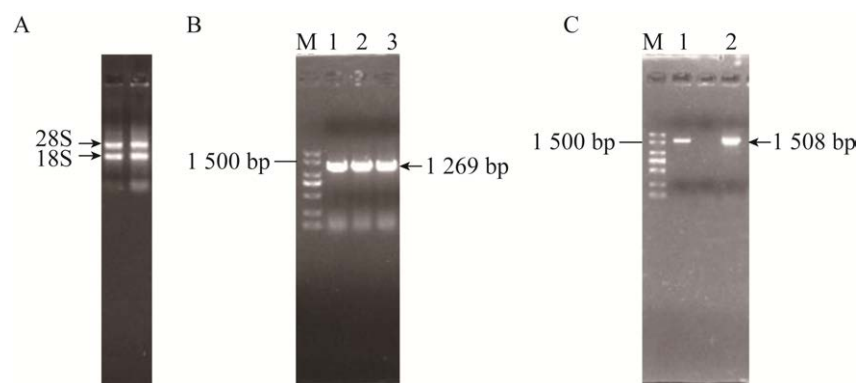


图1 东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因的克隆

Figure 1 Cloning of *adipor1* and *adipor2* genes of *Rana dybowskii*. A: RNA extraction from the spleen of *Rana dybowskii*. B: M: DL2000 DNA marker; Lane 1, 2, 3: *adipor1* gene. C: M: DL2000 DNA marker; Lane 2: *adipor2* gene.

2.2 东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 生物信息学分析

2.2.1 氨基酸序列同源性分析

经测序得到东北林蛙 *adipor1* 基因编码区 1 134 bp, 编码 377 个氨基酸; *adipor2* 基因编码区 1 164 bp, 编码 387 个氨基酸。将 *adipor1* 和 *adipor2* 基因上传至 GenBank, 获得基因登录号分别为 ON652851 和 ON652853。经序列比对, 东北林蛙 AdipoR1 和 AdipoR2 氨基酸与欧洲林蛙的同源性分别为 99.73% 和 98.19%, 与非洲爪蟾同源性分别 90.70% 和 88.37%, 与人类同源性分别为 87.40% 和 79.33%, 以上结果表明, AdipoR1 和 AdipoR2 在不同物种中保守程度较高。

2.2.2 东北林蛙 AdipoR1 和 AdipoR2 的理化性质及结构域预测

东北林蛙 AdipoR1 理论分子量为 42.84 kDa, 亲水性总平均值为 0.180, 蛋白质不稳定系数为 46.51; AdipoR2 理论分子量 43.49 kDa, 亲水性总平均值为 0.237, 蛋白质不稳定系数为 50.29, 说明 AdipoR1 和 AdipoR2 均为亲水不稳定蛋白质。

跨膜结构域预测显示, AdipoR1 和 AdipoR2 均为具有 7 次跨膜结构域的跨膜蛋白(图 2A、2B), 二者都存在 DNDYLL 和 FRACFGSIF 两段保守基序。结构域预测表明 AdipoR1 和 AdipoR2

分别在 131–354 aa、141–364 aa 处存在一个溶血素超家族(haemolysin-III superfamily, Hly III)结构域(图 2C、2D)。AdipoR1 蛋白在第 48 位点处有一个潜在糖基化位点, AdipoR2 分别在第 58 和 172 位点处各有一个潜在糖基化位点。AdipoR1 蛋白中存在 28 个磷酸化潜在位点, AdipoR2 蛋白中存在 27 个磷酸化潜在位点。

2.2.3 东北林蛙 AdipoR1 和 AdipoR2 三级结构及互作蛋白预测

经 SOPMA 软件分析, 东北林蛙 AdipoR1 蛋白中, 可能形成 α 螺旋占 51.19% (193 个氨基酸), 延伸链占 12.47% (47 个氨基酸), β 转角占 4.24% (16 个氨基酸) 和无规卷曲占 32.10% (121 个氨基酸) 等几种结构; AdipoR2 蛋白中, 可能形成 α 螺旋占 50.39% (195 个氨基酸), 延伸链占 15.25% (59 个氨基酸), β 转角占 3.62% (14 个氨基酸) 和无规卷曲占 30.75% (119 个氨基酸) 等几种结构。

利用 SWISS-MODEL 在线预测软件获得东北林蛙 AdipoR1 和 AdipoR2 蛋白质三级结构(图 3A、3B), 与二级结构预测结构分析相符。蛋白互作网络预测表明两种受体可能与脂联素(adiponectin)、瘦素(leptin)、胰岛素(insulin)、磷酸酪氨酸衔接蛋白(APPL1、蛋白激酶催化亚单位(PRKAA)等蛋白存在互作关系(图 3C、3D)。

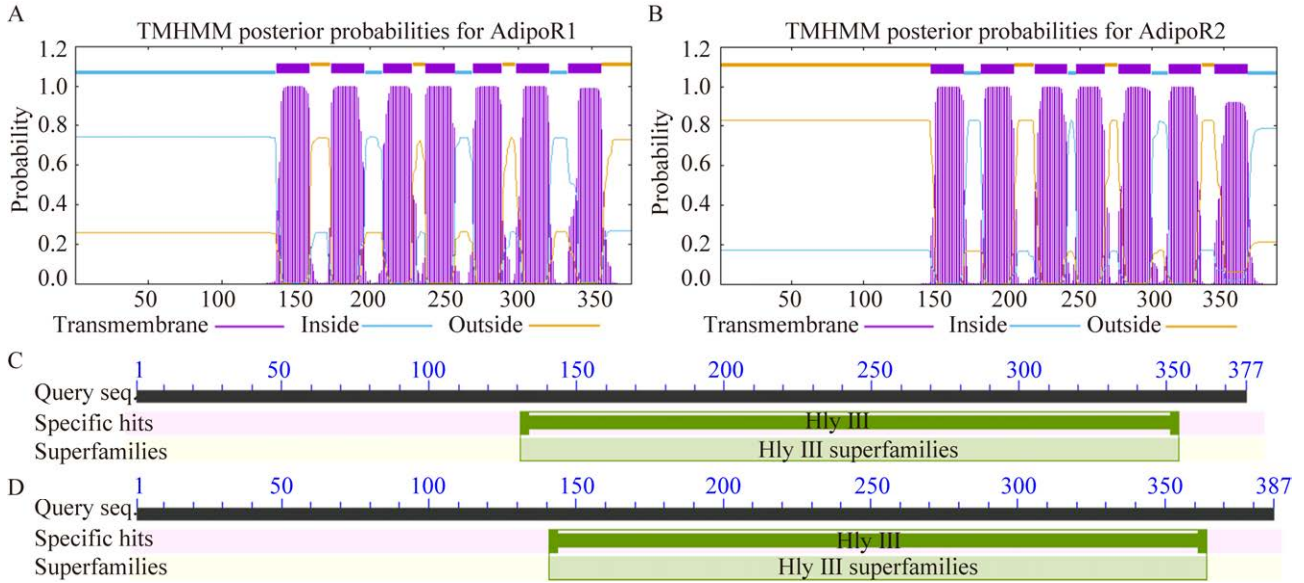


图 2 东北林蛙 AdipoR1 和 AdipoR2 的跨膜结构及结构域

Figure 2 The transmembrane structure and domain of AdipoR1 and AdipoR2 in *Rana dybowskii*. Prediction of transmembrane region of AdipoR1 (A) and AdipoR2 (B) proteins. Prediction of the functional domain of AdipoR1 (C) and AdipoR2 (D).

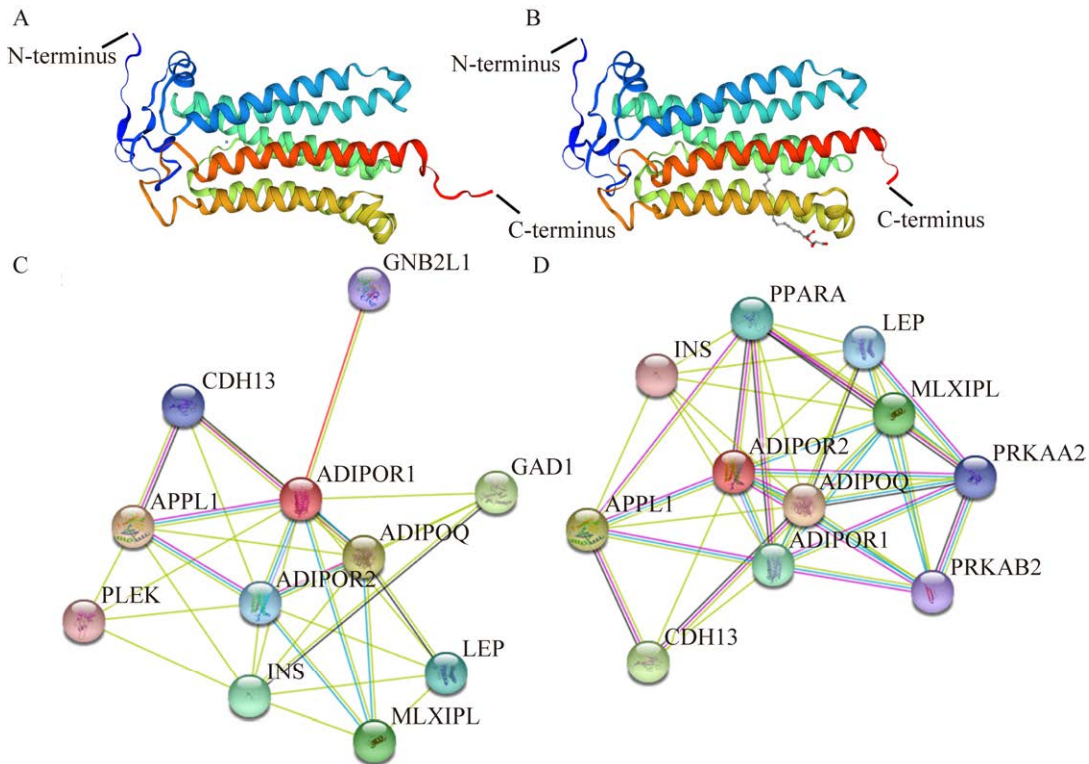


图 3 东北林蛙 AdipoR1 和 AdipoR2 蛋白质三级结构及互作蛋白预测

Figure 3 Prediction of the tertiary structure of AdipoR1 (A) and AdipoR2 (B) proteins of *Rana dybowskii* and prediction of proteins interactive with AdipoR1 (C) and AdipoR2 (D) of *Rana dybowskii*.

2.2.4 东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因同源性比对及进化树的构建

应用 MegAlign 分析软件将东北林蛙 *adipor1*、*adipor2* 核苷酸序列与参考物种(表 2 所示)进行多序列比对,结果显示东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 与欧洲林蛙的同源性最高,分别为 98.8%和 98.0%;东北林蛙 *adipor1* 与高山倭蛙、大蟾蜍和非洲爪蟾的同源性分别为 91.5%、

83.7%和 82.0%;东北林蛙 *adipor2* 与高山倭蛙、大蟾蜍和非洲爪蟾同源性为 90.8%、82.2%和 79.8%,表明与两栖动物同源性最高。依据氨基酸序列构建系统进化树,结果显示 AdipoR1 和 AdipoR2 与两栖动物之间聚为同一分支,与哺乳类、禽类等亲缘关系较远,与鱼类 AdipoR1 和 AdipoR2 亲缘关系更远(图 4),同源性和进化关系表明 *adipor1* 和 *adipor2* 基因的保守性很强。

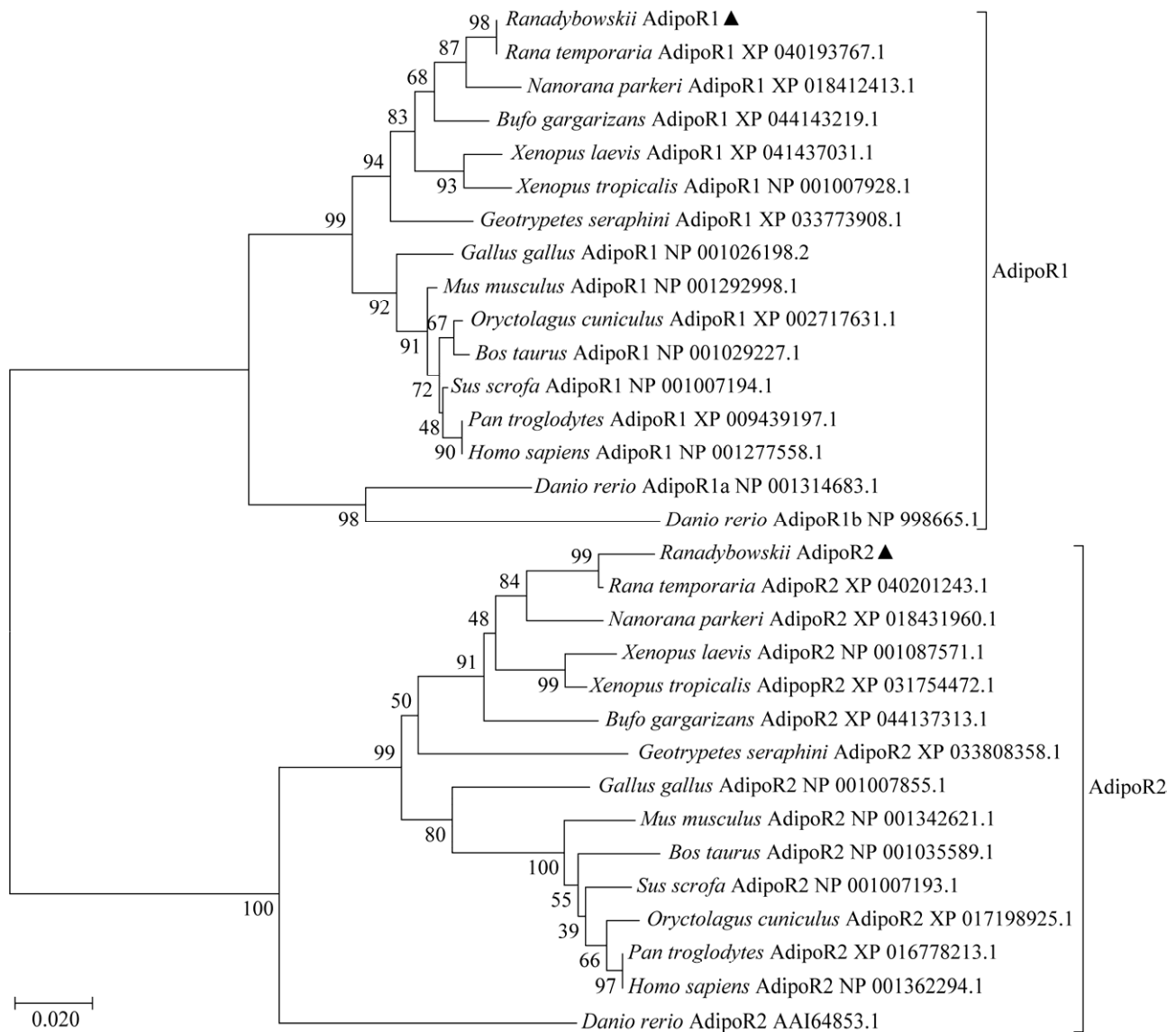


图 4 东北林蛙 AdipoR1 和 AdipoR2 氨基酸进化树构建

Figure 4 Phylogenetic tree based on amino acid residues of AdipoR1 and AdipoR2 in *Rana dybowskii*. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (N-J) method. Numbers on the branches represent bootstrap values for 500 replications.

2.3 *Ah* 感染东北林蛙病理组织学鉴定

将对照组和试验组东北林蛙的组织 and 脏器制作病理切片, 进行 HE 染色, 结果显示, 与对照组相比, 肝细胞产生空泡化病变随感染时间延长而加重, 肝脏血窦发生扩张并且细胞边界变模糊, 细胞核发生固缩和偏移并且细胞质变少(图

5A1–A4); 与对照组皮肤结构相比, 感染后皮肤表皮层与真皮层分离, 36–72 h 表皮层出现破损, 真皮层变薄, 黑色素细胞增多(图 5B1–B4); 感染后肌肉组织纤维纹理发生紊乱变化, 肌纤维间距明显变宽并且断裂、扭曲和变形(图 5C1–C4), 表明 *Ah* 感染东北林蛙的炎症模型成功建立。

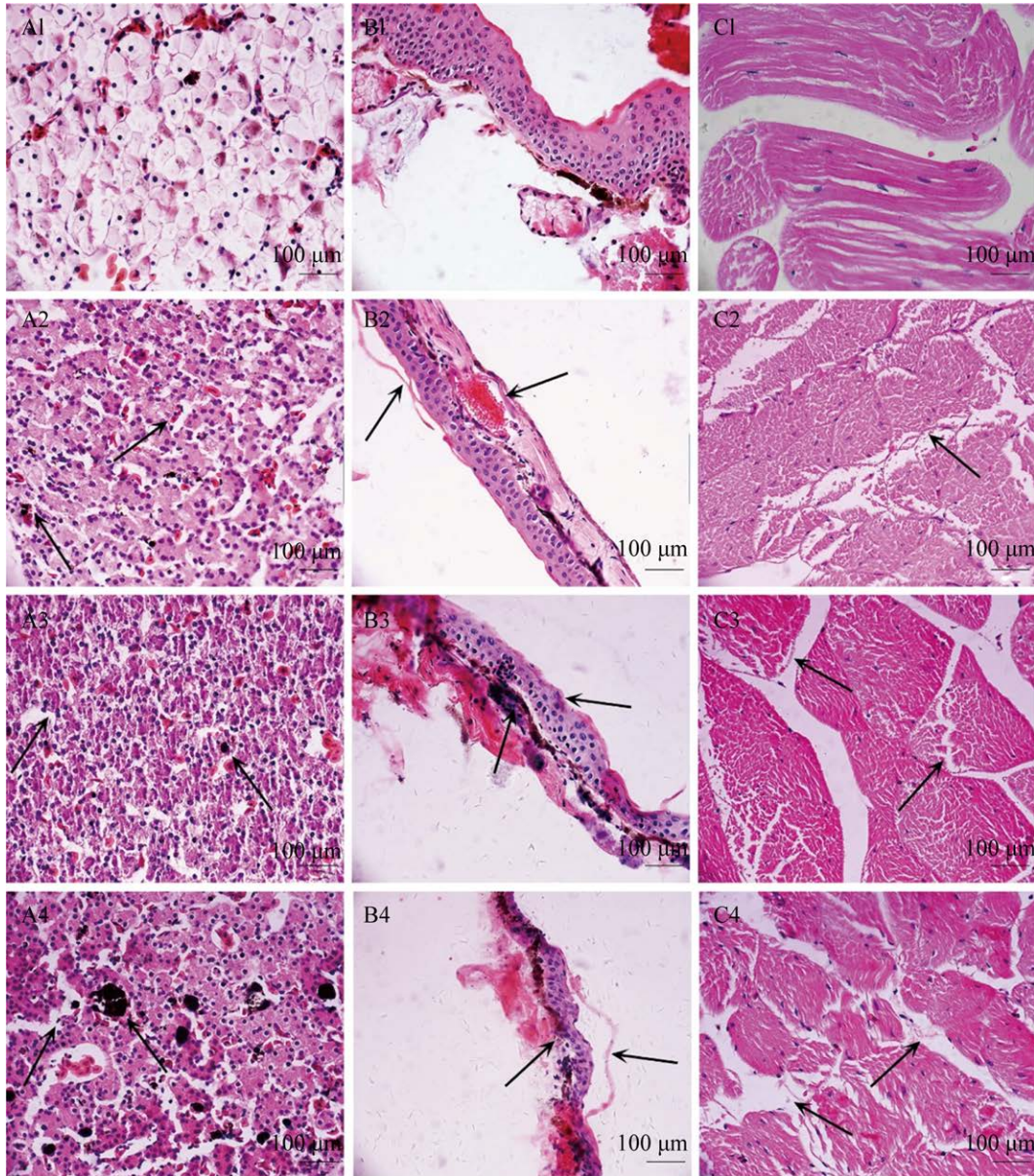


图 5 *Ah* 感染东北林蛙后病理组织变化

Figure 5 Pathological changes of *Rana dybowskii* after infection with *Ah*. A–C: Representative results of HE staining in the normal tissue of *R. dybowskii* and different time points after *Ah* infected. Scale bar=100 μ m. A: Liver. B: Skin. C: Muscle. 1: 0 h; 2: 16 h; 3: 36 h; 4: 72 h. Arrows indicate obvious pathological changes.

2.4 东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因的组织器官表达差异

采用 qRT-PCR 检测东北林蛙生理状态下不同组织和器官 *adipor1* 和 *adipor2* 的转录水平, 以心脏表达量作为对照, 结果表明, *adipor1* 和 *adipor2* 基因在 8 种组织和器官中均有表达, 其中 *adipor1* 在肾脏表达量最高($P<0.05$), 在皮肤、肝脏和肌肉表达量也显著高于心脏($P<0.05$)(图 6A); *adipor2* 在皮肤表达量最高($P<0.05$), 在肝脏、肾脏和肌肉表达量也显著高于心脏($P<0.05$)(图 6B), *adipor1* 和 *adipor2* 基因表达的组织特异性预示着它们在不同组织和器官中功能可能有差别。

2.5 *Ah* 感染后 *adipor1* 和 *adipor2* mRNA 转录水平变化

qRT-PCR 结果显示, 在 *Ah* 感染后, 肝脏 *adipor1* mRNA 表达量在 48 h 达到峰值, 是对照组的 1.21 倍($P>0.05$), 而脾脏在 72 h 时达到峰值, 是对照组 5.66 倍($P<0.01$), *adipor1* mRNA 在肌肉和胃中均在感染 8 h 达到峰值, 分别为对

照组的 1.41 倍($P<0.01$)和 6.50 倍($P<0.01$) (图 7A–7D)。肝脏 *adipor1* mRNA 表达量在感染 8–36 h 过程呈现波动变化, 48 h 达峰值后又出现下调; 脾脏 *adipor1* mRNA 表达量在 8–16 h 表达量显著上调, 24–48 h 出现下调与对照组差异不显著($P>0.05$), 之后重新上调; 肌肉 *adipor1* mRNA 表达量在 16–72 h 有所下降, 但与对照组表达量差异显著($P<0.01$); 胃中 *adipor1* mRNA 表达量除感染 24–36 h 与对照组差异不显著($P>0.05$), 其余时间点均显著高于对照组($P<0.01$)。

在 *Ah* 感染后, 肝脏、脾脏、肌肉和胃中 *adipor2* mRNA 表达量 8 h 开始上调表达并在 72 h 达到峰值, 分别为对照组的 0.68、1.80、0.87 和 5.69 倍($P<0.01$)(图 8A–8D)。肝脏和肌肉 *adipor2* mRNA 均低于对照组表达量; 而脾脏在 8–36 h 低于对照组($P<0.01$), 48–72 h 表达量上调表达高于对照组; 胃中仅在 72 h 与对照组相比显著增加, 其余时间点无显著变化($P>0.05$)。表明 *adipor1* 和 *adipor2* 基因在不同组织对炎症反应的应答时间和响应水平不同。

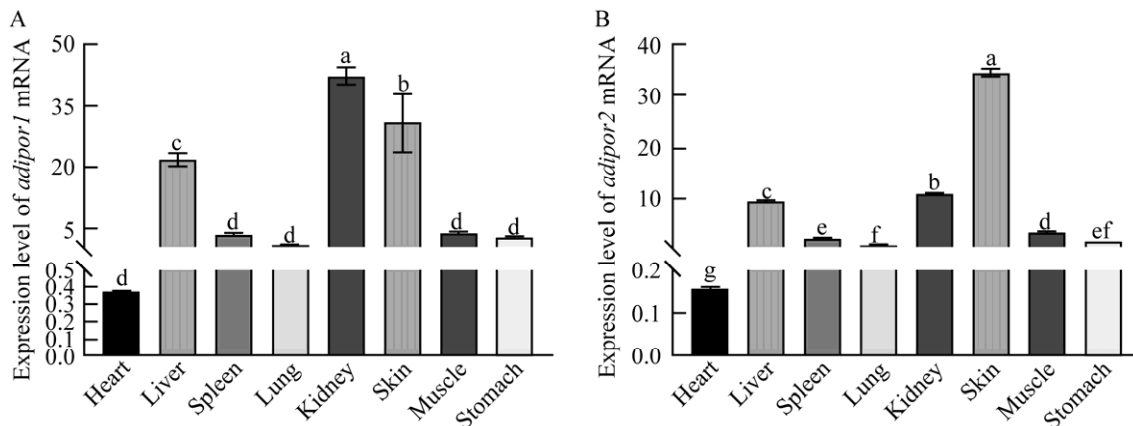


图 6 *adipor1* 和 *adipor2* 在东北林蛙不同组织和器官中的相对表达量

Figure 6 Relative expression of *adipor1* and *adipor2* in different tissues and organs of *Rana dybowskii*. Graphical presentation of qRT-PCR analysis shows changes in *adipor1* and *adipor2* genes expression in healthy *R. dybowskii*. Take the expression level of the heart as the control. The Duncan method was used to indicate the significance of the difference, and different letters indicate $P<0.05$.

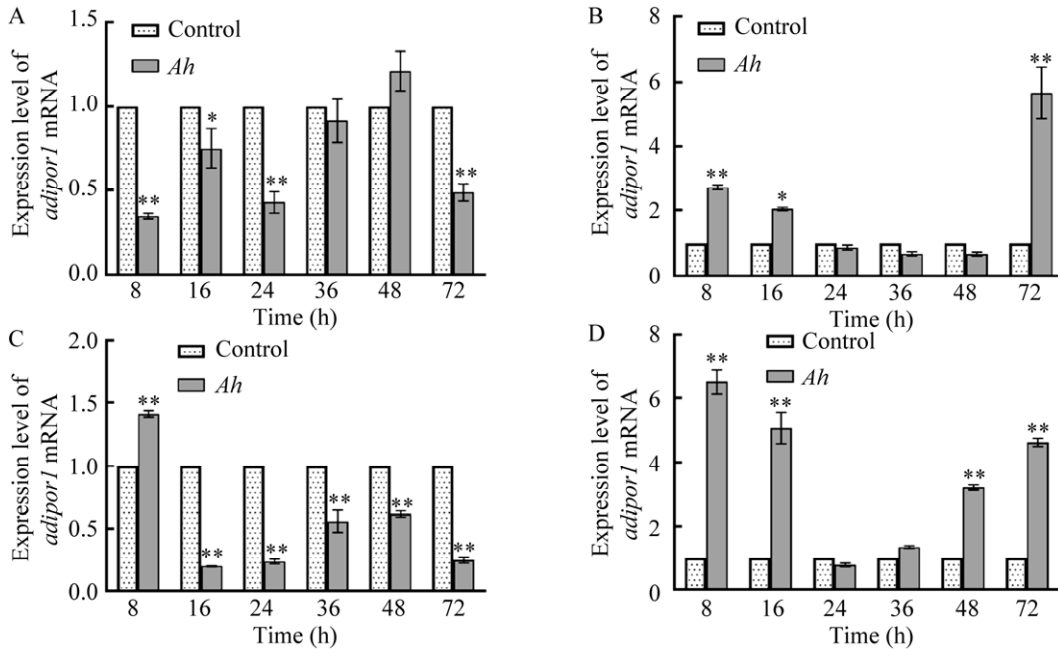


图 7 *Ah* 感染下东北林蛙不同组织和器官 *adipor1* 转录水平变化

Figure 7 Changes of *adipor1* expression in different tissues and organs of *Rana dybowskii* infected by *Ah*. A: Liver. B: Spleen. C: Muscle. D: Stomach. The samples were collected at different time points (8 h, 16 h, 24 h, 36 h, 48 h and 72 h) after *Ah* infection. The control group was injected with sterile trypsin liquid medium. β -actin was used as an internal control. Values are the $\bar{x} \pm s$ of three determinations from separate experiments. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

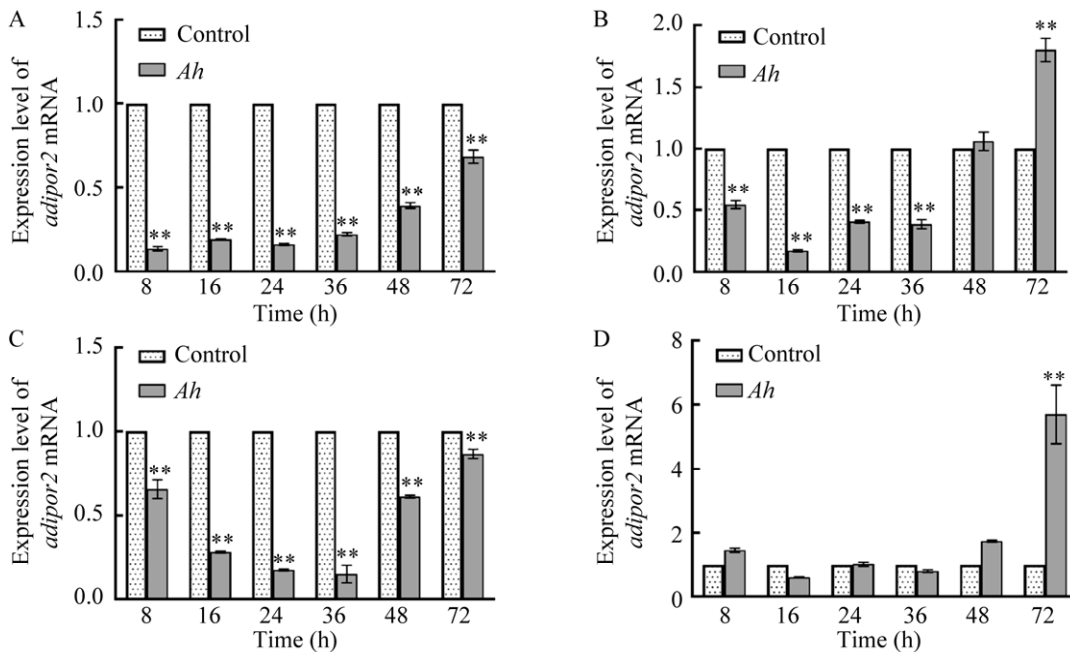


图 8 *Ah* 感染下东北林蛙不同组织和器官 *adipor2* 转录水平变化

Figure 8 Changes of *adipor2* expression in different tissues and organs of *Rana dybowskii* infected by *Ah*. A: Liver. B: Spleen. C: Muscle. D: Stomach. The samples were collected at different time points (8 h, 16 h, 24 h, 36 h, 48 h and 72 h) after *Ah* infection. The control group was injected with sterile trypsin liquid medium. β -actin was used as an internal control. Values are the $\bar{x} \pm s$ of three determinations from separate experiments. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.6 *Ah* 感染后 AdipoR1 和 AdipoR2 的 Western blotting 分析

对 *Ah* 感染后东北林蛙肝脏与脾脏中 AdipoR1 和 AdipoR2 进行 Western blotting 检测, 结果显示, 肝脏在感染 36 h 和 72 h 时 AdipoR1 表达量均与对照组相比显著下调, AdipoR2 表达量在感染 72 h 时显著上调, 为对照组的 1.23 倍

($P < 0.05$); 而脾脏中 AdipoR1 和 AdipoR2 均在 72 h 表达量达到峰值, 分别为对照组的 1.25 倍 ($P < 0.01$) 和 1.45 倍 ($P < 0.05$), 脾脏中 AdipoR1 和 AdipoR2 表达量在感染后变化趋势为先下调后上调(图 9A–9D)。这与 qRT-PCR 检测结果基本相符, 上述结果提示 AdipoR1 和 AdipoR2 可能参与了细菌感染引起的免疫应答。

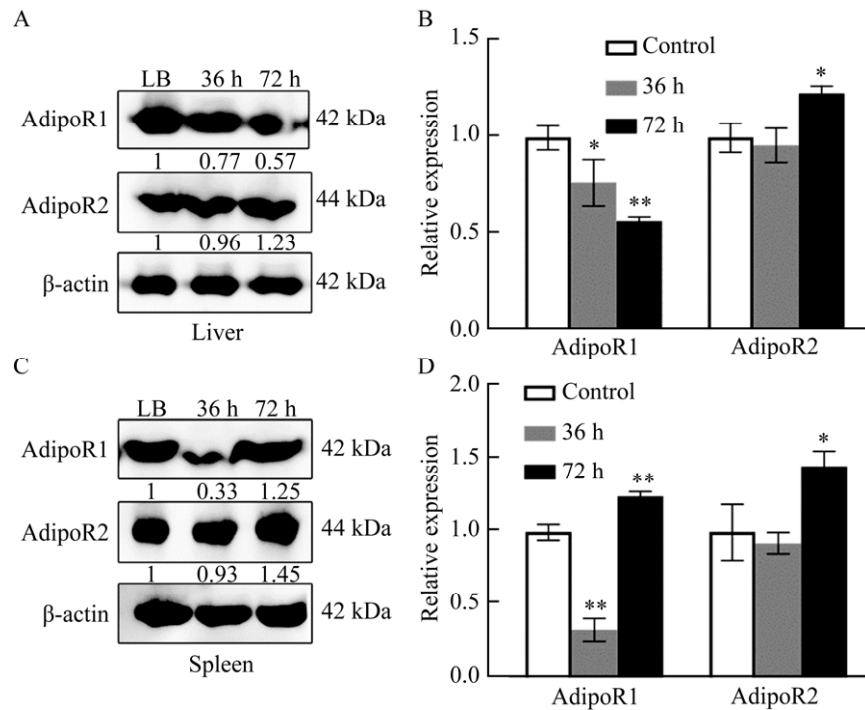


图 9 *Ah* 感染东北林蛙肝脏和脾脏中的 AdipoR1 和 AdipoR2 表达变化

Figure 9 Expression of AdipoR1 and AdipoR2 in liver and spleen of *Ah* infected *Rana dybowskii*. A: Western blotting for AdipoR1 and AdipoR2 in *R. dybowskii* in the liver of control group, 36 h and 72 h after *Ah* infection. B: Relative gray value of AdipoR1 and AdipoR2 at different infection times. C: Western blotting for AdipoR1 and AdipoR2 in *R. dybowskii* in the spleen of control group, 36 h and 72 h after *Ah* infection. β -actin was used as a loading control. D: Relative gray value of AdipoR1 and AdipoR2 at different infection times. LB: The control group of this study was injected with liquid LB medium. Data present $\bar{x} \pm s$ of three determinations from separate experiments. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; $n \geq 3$ biological replicates above two organs.

3 讨论与结论

本研究成功克隆东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因序列, 获得两种基因完整的 ORF 区。AdipoR1 和 AdipoR2 亚细胞定位显示二者均具

有 7 次跨膜结构域, 这与人^[6]、鼠^[7]、猪^[29]、鸡^[12]和鲤鱼^[30]的 AdipoRs 蛋白跨膜结构一致, 与 G 蛋白偶联受体不同的是 AdipoR1 和 AdipoR2 蛋白质的 C 端位于膜外而 N 端位于膜内。根据结构域分析, 在 AdipoR1 和 AdipoR2 中还发现了

一个 Hly III 结构域(编码 7 个跨膜螺旋束), 该结构可能通过形成特殊的拓扑结构对 AdipoRs 的生物学功能发挥关键作用^[31-32]。从同源性和系统发育树可看出, AdipoR1 和 AdipoR2 在进化上是保守的。

已知在哺乳动物中, *adipor1* 和 *adipor2* 几乎分布于所有组织中, *adipor1* 在骨骼肌中高表达, 而 *adipor2* 在肝脏中表达最丰富, 二者在不同组织的分布差异很大。本研究显示东北林蛙多个器官和组织中都能检测到 *adipor1* 和 *adipor2* mRNA 的存在, 但转录水平有差异。以往在小鼠中检测到 *adipor1* mRNA 在心脏、肾脏、肺、骨骼肌和脾中大量表达^[6]。禽类 *adipor1* mRNA 在骨骼肌、脂肪组织和间脑中的表达较高, 其次是肾、卵巢、肝脏、脑下垂体前叶和脾, 而 *adipor2* mRNA 在脂肪组织中的表达最高, 其次是骨骼肌、肝、卵巢、间脑、脑垂体腺前叶、肾和脾^[9]。青鱼 *adipor1* 在肝脏、眼、血、脑、脂肪组织和心脏中的表达水平较高, 在脾脏、皮肤和鳃中的表达水平较低; *adipor2* 在肝脏中的表达水平高于其他器官和组织, *adipor2* 在健康青鱼肾脏中的表达水平最低^[33]。上述物种的 *adipor1* 和 *adipor2* 不同组织转录水平特性与东北林蛙基本一致。*adipor1* 的高表达促进脂肪酸向这些组织线粒体的运输, 从而介导脂联素增加脂肪酸氧化的功能^[34]。此外研究还发现在草鱼体内, *adipor1* 存在 *adipor1a* 和 *adipor1b* 两种亚型, 这两种亚型在心脏表达量最高, 其次是脑和垂体; 而 *adipor2* 在脂肪组织和心脏中表达水平较高^[35]。与本研究中东林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 的组织表达特性有所差别, 表明 *adipor1* 和 *adipor2* 基因在不同物种间表达存在种属差异。斑马鱼^[36]、石斑鱼^[31]、罗非鱼^[37]的脑、肝脏、脂肪和肾脏中 *adipor1* 和 *adipor2* 表达水平较高, 在肌肉中的表达水平较低, 与东北林蛙的组织表达特性相

似。可以推测两栖类 *adipor1* 和 *adipor2* 的器官与组织表达具有物种特异性。

Holland 等^[38]通过实验证明, AdipoQ 通过与其两个受体结合, 有效地刺激神经酰胺酶的活性, 调节细胞神经酰胺水平, 并发现肝脏中 AdipoR1 和 AdipoR2 的过度表达会抑制饱和脂肪酸诱导的神经酰胺水平, 从而减轻炎症^[39]。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种由巨噬细胞和 T 细胞产生, 参与启动并调节炎症反应的重要促炎细胞因子, 通常被认为是炎症反应的标志^[40]。有研究把 TNF- α 、炎症、AdipoQ 及其受体进行了联系分析, 发现 AdipoQ 及其受体与 TNF- α 相似, 也可以参与调节炎症反应^[41-42]。Zelechowska 等研究也发现 AdipoR1 和 AdipoR2 和瘦素受体在肥大细胞内均有表达, 而 AdipoQ 可以通过增加抗炎细胞因子如转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β) 和 IL-10 的表达使肥大细胞发生迁移^[44]; 此外 AdipoR1-AdipoR2 轴信号通路可以抑制过敏反应, 也可能调节非 IgE 依赖型或假性过敏途径^[43]。

东北林蛙在感染 *Ah* 后, *adipor1* 和 *adipor2* 在所检测组织中存在显著不同程度上调的表达趋势, 这提示脂联素受体介导了生物学过程, 推测脂联素受体可通过调节代谢直接或间接参与免疫应答。在虹鳟鱼研究中, 注射细菌脂多糖后, 肌肉组织中 *adipor1* mRNA 的表达也略有下降, 但 *adipor2* mRNA 基本没有变化^[44], 这与本研究东北林蛙肌肉 *adipor1* 变化趋势相类似, 而 *adipor2* 变化趋势略有不同; 草鱼注射细菌脂多糖后, 肌肉在感染不同时间点 *adipor1a* 和 *adipor2* 表达量变化趋势与东北林蛙相类似^[35]。东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因在肝脏、脾脏、肾脏、皮肤中高度表达, 提示该分子可能参与蛙类免疫系统功能的实现。尤其是两栖动物的皮肤

暴露在外环境中，可以接触到大量的病原体，因此皮肤中 *adipor1* 和 *adipor2* 基因的高表达水平可以推测与感染相关。

本研究成功获得东北林蛙 *adipor1* 和 *adipor2* 基因，与其他动物之间有很高的同源性，AdipoR1 和 AdipoR2 属于亲水不稳定跨膜蛋白。经鉴定 *adipor1* 和 *adipor2* 基因在东北林蛙的多种器官和组织中存在。*Ah* 感染后，*adipor1* 和 *adipor2* 的表达存在不同程度地上调。这揭示了东北林蛙 AdipoR1 和 AdipoR2 可能参与了机体与细菌感染相关的免疫应答。

REFERENCES

- [1] ZHAO WS, ADJEI M, WANG HM, YANG LIU YL, ZHU JJ, WU HJ. ADIPOR1 regulates genes involved in milk fat metabolism in goat mammary epithelial cells[J]. *Research in Veterinary Science*, 2021, 137: 194-200.
- [2] 李响, 蒲连美, 阮杨, 李红, 金泽宁. 汉族人群 ADIPOR1 rs7539542 与冠状动脉粥样硬化性心脏病和 2 型糖尿病的关联分析[J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(6): 935-942.
LI X, PU LM, RUAN Y, LI H, JIN ZN. The relationship between ADIPOR1 rs7539542 and the susceptibility of coronary artery disease and type 2 diabetes in Han population[J]. *Journal of Capital Medical University*, 2020, 41(6): 935-942 (in Chinese).
- [3] RUIZ M, STÅHLMAN M, BORÉN J, PILON M. AdipoR1 and AdipoR2 maintain membrane fluidity in most human cell types and independently of adiponectin[J]. *Journal of Lipid Research*, 2019, 60(5): 995-1004.
- [4] 刘丹丹. AdipoQ 对蛋鸡下丘脑-垂体-卵巢轴生殖激素表达及卵泡生长发育的影响[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2021.
LIU DD. Effects of AdipoQ on reproductive hormone secretion and follicular growth and development of hypothalamic-pituitary-ovarian axis in laying hens[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [5] 徐嘉宝, 吴卫东. 有氧运动通过脂联素/p38MAPK 延缓高脂膳食大鼠肝脏炎症[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 50(1): 139-143.
XU JB, WU WD. Aerobic exercise retarded liver inflammation by adiponectin/p38MAPK in rats with high fat diet[J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2022, 50(1): 139-143 (in Chinese).
- [6] YAMAUCHI T, KAMON J, ITO Y, TSUCHIDA A, YOKOMIZO T, KITA S, SUGIYAMA T, MIYAGISHI M, HARA K, TSUNODA M, MURAKAMI K, OHTEKI T, UCHIDA S, TAKEKAWA S, WAKI H, TSUNO NH, SHIBATA Y, TERAUCHI Y, FROGUEL P, TOBE K, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects[J]. *Nature*, 2003, 423(6941): 762-769.
- [7] TSUGAWA-SHIMIZU Y, FUJISHIMA Y, KITA S, MINAMI S, SAKAUE TA, NAKAMURA Y, OKITA T, KAWACHI Y, FUKADA S, NAMBA-HAMANO T, TAKABATAKE Y, ISAKA Y, NISHIZAWA H, RANSCHT B, MAEDA N, SHIMOMURA I. Increased vascular permeability and severe renal tubular damage after ischemia-reperfusion injury in mice lacking adiponectin or T-cadherin[J]. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2021, 320(2): E179-E190.
- [8] XU NB, LI XF, WENG J, WEI CH, HE ZY, DOYCHEVA DM, LENAHAN C, TANG WH, ZHOU J, LIU YC, XU Q, LIU YH, HE XY, TANG JP, ZHANG JH, DUAN CZ. Adiponectin ameliorates GMH-induced brain injury by regulating microglia M1/M2 polarization via AdipoR1/APPL1/AMPK/PPAR γ signaling pathway in neonatal rats[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 873382.
- [9] TAN PH, TYRRELL HEJ, GAO LQ, XU DM, QUAN JC, GILL D, RAI L, DING YC, PLANT G, CHEN Y, XUE JZ, HANDA AI, GREENALL MJ, WALSH K, XUE SA. Adiponectin receptor signaling on dendritic cells blunts antitumor immunity[J]. *Cancer Research*, 2014, 74(20): 5711-5722.
- [10] IWABU M, OKADA-IWABU M, TANABE H, OHUCHI N, MIYATA K, KOBORI T, ODAWARA S, KADOWAKI Y, YOKOYAMA S, YAMAUCHI T, KADOWAKI T. AdipoR agonist increases insulin sensitivity and exercise endurance in AdipoR-humanized mice[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 45.
- [11] 韩冬冬, 苗淑彦, 聂琴, 苗惠君, 魏泽宏, 张文兵, 麦康森. 大菱鲆脂联素受体基因的克隆及饲料糖脂比对其表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(3): 565-572.
HAN DD, MIAO SY, NIE Q, MIAO HJ, WEI ZH, ZHANG WB, MAI KS. Molecular cloning of adiponectin receptors in turbot *Scophthalmus maximus* and its expression response to dietary ratios of carbohydrate to lipid[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(3): 565-572 (in Chinese).
- [12] RAMACHANDRAN R, OM OCÓN-GROVE, METZGER S L. Molecular cloning and tissue expression

- of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2007, 33(1): 19-31.
- [13] YAMAMOTO R, UEKI S, MORITOKI Y, KOBAYASHI Y, OYAMADA H, KONNO Y, TAMAKI M, ITOGA M, TAKEDA M, ITO W, CHIHARA J. Adiponectin attenuates human eosinophil adhesion and chemotaxis: implications in allergic inflammation[J]. Journal of Asthma, 2013, 50(8): 828-835.
- [14] ŹELECHOWSKA P, BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK E, WIKTORSKA M, RÓŻALSKA S, WAWROCKI S, KOZŁOWSKA E, AGIER J. Adipocytokines leptin and adiponectin function as mast cell activity modulators[J]. Immunology, 2019, 158(1): 3-18.
- [15] LUO NL, CHUNG BH, WANG XD, KLEIN RL, TANG CK, GARVEY WT, FU YC. Enhanced adiponectin actions by overexpression of adiponectin receptor 1 in macrophages[J]. Atherosclerosis, 2013, 228(1): 124-135.
- [16] MANDAL P, PRATT BT, BARNES M, MCMULLEN MR, NAGY LE. Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(15): 13460-13469.
- [17] OHASHI K, PARKER JL, OUCHI N, HIGUCHI A, VITA JA, GOKCE N, PEDERSEN AA, KALTHOFF C, TULLIN S, SAMS A, SUMMER R, WALSH K. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(9): 6153-6160.
- [18] ŁĄCZNA M, KOPYTKO P, TKACZ M, ZGUTKA K, CZEREWATY M, TARNOWSKI M, LARYSZ D, TKACZ R, KOTRYCH D, PIOTROWSKA K, SAFRANOW K, ŁUCZKOWSKA K, MACHALIŃSKI B, PAWLIK A. Adiponectin is a component of the inflammatory cascade in rheumatoid arthritis[J]. Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(10): 2740.
- [19] WANG YN, LIU R, ZHAO PF, ZHANG Q, HUANG YH, WANG L, LV CY, CHE N, TAN WF, ZHANG MJ. Blockade of adiponectin receptor 1 signaling inhibits synovial inflammation and alleviates joint damage in collagen-induced arthritis[J]. Clinical Rheumatology, 2022, 41(1): 255-264.
- [20] RAMOS-RAMÍREZ P, MALMHÄLL C, TLIBA O, RÄDINGER M, BOSSIOS A. Adiponectin/AdipoR1 axis promotes IL-10 release by human regulatory T cells[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 677550.
- [21] 赵文阁, 刘鹏, 陈辉. 黑龙江省两栖爬行动物志[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- ZHAO WG, LIU P, CHEN H. Amphibians and Reptiles in Heilongjiang Province[M]. Beijing: Science Press, 2008 (in Chinese).
- [22] 张傲. 东北林蛙油中糖和脂类及其代谢相关因子表达的研究[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2020.
- ZHANG A. Study on the expression of carbohydrate and lipid and their metabolic related factors in *Rana* oil[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [23] 孟欣, 孙大庆, 张冬星, 单晓枫, 钱爱东. 中草药提取物对东北林蛙源嗜水气单胞菌体内外抑菌试验及其抗炎免疫活性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(14): 112-118, 123.
- MENG X, SUN DQ, ZHANG DX, SHAN XF, QIAN AD. Antibacterial activity anti-inflammatory and immune activity of Chinese herbal extracts against *Aeromonas hydrophila* from northeastern forest frogs *in vivo* and *in vitro*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2022(14): 112-118, 123 (in Chinese).
- [24] 赵颖, 杜孟泽, 黄亚东, 张迪, 林德贵. 耐药性嗜水气单胞菌感染致四眼斑龟死亡的病例报告[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(3): 91-95.
- ZHAO Y, DU MZ, HUANG YD, ZHANG D, LIN DG. Case report of *Sacalia quadriocellata* died from an antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila* infection[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2022, 58(3): 91-95 (in Chinese).
- [25] 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[J]. 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*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(5): 1859-1873 (in Chinese).
- [26] 许晴. 嗜水气单胞菌胁迫对东北林蛙血细胞及白介素 IL-1 β 和 IL-10 表达的影响[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2021.
- XU Q. Effects of *Aeromonas hydrophila* on the hemocyte and the interleukin IL-1 β and IL-10 expression of *Rana dybowskii*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2021 (in Chinese).
- [27] 史雪灿, 柴龙会, 牛曙东, 肖向红. 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[J]. 动物医学进展, 2015, 36(6): 59-63.
- SHI XC, CHAI LH, NIU SD, XIAO XH. Expression dynamics of *MyD88* and *TRAF6* genes in *Rana dybowskii* infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(6): 59-63 (in Chinese).

- [28] 边若菲, 徐笑, 刘玉芬, 刘鹏, 赵文阁. 嗜水气单胞菌胁迫下东北林蛙 *MHC I* 基因在不同组织的表达[J]. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1323-1333.
BIAN RF, XU X, LIU YF, LIU P, ZHAO WG. Expression of *MHC I* genes in different tissues of *Rana dybowskii* under the stress of *Aeromonas hydrophila*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(7): 1323-1333 (in Chinese).
- [29] DING ST, LIU BH, KO YH. Cloning and expression of porcine adiponectin and adiponectin receptor 1 and 2 genes in pigs[J]. Journal of Animal Science, 2004, 82(11): 3162-3174.
- [30] YU MH, CHANG SH, XU J, ZHANG HY, JIANG YL. Genome-wide identification of endosialin family of C-type lectins in common carp (*Cyprinus carpio*) and their response following *Aeromonas hydrophila* infection[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2022, 129: 104338.
- [31] QIN CB, WANG B, SUN CY, JIA JR, LI WS. Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) adiponectin receptors: molecular characterization, mRNA expression, and subcellular location[J]. General and Comparative Endocrinology, 2014, 198: 47-58.
- [32] KIM AR, ALAM MJ, YOON TH, LEE SR, PARK H, KIM DN, AN DH, LEE JB, LEE CI, KIM HW. Molecular characterization of an adiponectin receptor homolog in the white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. PeerJ, 2016, 4: e2221.
- [33] WU CL, GAO JE, CHEN L, SHAO XP, YE JY. Identification, characterization, and expression analysis of adiponectin receptors in black carp *Mylopharyngodon piceus* in response to dietary carbohydrate[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2018, 44(4): 1127-1141.
- [34] YAMAUCHI T, KAMON J, MINOKOSHI Y, ITO Y, WAKI H, UCHIDA S, YAMASHITA S, NODA M, KITA S, UEKI K, ETO K, AKANUMA Y, FROGUEL P, FOUFELLE F, FERRE P, CARLING D, KIMURA S, NAGAI R, KAHN BB, KADOWAKI T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase[J]. Nature Medicine, 2002, 8(11): 1288-1295.
- [35] 赵文丽. 草鱼脂联素及其受体的克隆、表达及在肝脏糖代谢中的调控作用[D]. 新乡: 河南师范大学硕士学位论文, 2021.
ZHAO WL. Cloning, expression and regulation of adiponectin and its receptor in liver glucose metabolism of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[D]. Xinxiang: Master's Thesis of Henan Normal University, 2021 (in Chinese).
- [36] NISHIO SI, GIBERT Y, BERNARD L, BRUNET F, TRIQUENEAUX G, LAUDET V. Adiponectin and adiponectin receptor genes are coexpressed during zebrafish embryogenesis and regulated by food deprivation[J]. Developmental Dynamics: an Official Publication of the American Association of Anatomists, 2008, 237(6): 1682-1690.
- [37] YANG GK, SONG QQ, SUN CY, QIN JK, JIA JR, YUAN X, ZHANG YZ, LI WS. Ctrp9 and adiponectin receptors in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): molecular cloning, tissue distribution and effects on reproductive genes[J]. General and Comparative Endocrinology, 2018, 265: 160-173.
- [38] HOLLAND WL, MILLER RA, WANG ZV, SUN K, BARTH BM, BUI HH, DAVIS KE, BIKMAN BT, HALBERG N, RUTKOWSKI JM, WADE MR, TENORIO VM, KUO MS, BROZINICK JT, ZHANG BB, BIRNBAUM MJ, SUMMERS SA, SCHERER PE. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin[J]. Nature Medicine, 2011, 17(1): 55-63.
- [39] HOLLAND WL, SCHERER PE. PAQRs: a counteracting force to ceramides?[J]. Molecular Pharmacology, 2009, 75(4): 740-743.
- [40] AL-RASHED F, AHMAD Z, SNIDER AJ, THOMAS R, KOCHUMON S, MELHEM M, SINDHU S, OBEID LM, AL-MULLA F, HANNUN YA, AHMAD R. Ceramide kinase regulates TNF- α -induced immune responses in human monocytic cells[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 8259.
- [41] JORTAY J, SENOU M, ABOU-SAMRA M, NOEL L, ROBERT A, MANY MC, BRICHARD SM. Adiponectin and skeletal muscle: pathophysiological implications in metabolic stress[J]. The American Journal of Pathology, 2012, 181(1): 245-256.
- [42] WANG YJ, WANG XL, LAU WB, YUAN YX, BOOTH D, LI JJ, SCALIA R, PRESTON K, GAO EH, KOCH W, MA XL. Adiponectin inhibits tumor necrosis factor- α -induced vascular inflammatory response via caveolin-mediated ceramidase recruitment and activation[J]. Circulation Research, 2014, 114(5): 792-805.
- [43] PATHAK MP, PATOWARY P, das A, GOYARY D, KARMAKAR S, BHUTIA YD, ROY PK, das S, CHATTOPADHYAY P. Crosstalk between AdipoR1/AdipoR2 and Nrf2/HO-1 signal pathways activated by β -caryophyllene suppressed the compound 48/80 induced pseudo-allergic reactions[J]. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology, 2021, 48(11): 1523-1536.
- [44] SÁNCHEZ-GURMACHES J, CRUZ-GARCIA L, GUTIÉRREZ J, NAVARRO I. Adiponectin effects and gene expression in rainbow trout: an *in vivo* and *in vitro* approach[J]. The Journal of Experimental Biology, 2012, 215(Pt 8): 1373-1383.

(本文责编 陈宏宇)