

## 综述

## 硬骨鱼新型免疫球蛋白的研究进展

吕 翠 安利国 杨桂文\*

(山东师范大学生命科学学院, 山东省动物抗性生物学重点实验室, 济南 250014)

**摘要** 鱼类是最早出现免疫球蛋白的动物, 鱼类免疫球蛋白在鱼类的特异性体液免疫应答中发挥重要的作用。一直以来, 人们认为在硬骨鱼中仅存在IgM和IgD两种免疫球蛋白, 而2005年以来, 陆续在斑马鱼、虹鳟鱼及鲤鱼等硬骨鱼中发现了新型免疫球蛋白, 分别命名为IgZ、IgT及IgM-IgZ等。这些新型免疫球蛋白不仅在基因结构上很特别, 而且呈现出多样性, 在不同种的硬骨鱼中的功能也不完全相同, 同一种鱼中的IgT也呈现多样性。虽然目前对于鱼类新型免疫球蛋白的研究刚刚起步, 对其功能了解较少, 但有研究表明IgT在硬骨鱼的粘膜免疫中发挥重要的作用, 且认为它与IgA是同源的。该文拟对硬骨鱼中发现的新型免疫球蛋白的结构特点、基因组成和分布模式及功能差异作一简要综述。

**关键词** 硬骨鱼; 免疫球蛋白; IgT; 粘膜免疫

鱼类属于比较低等的脊椎动物, 从鱼类开始生物才出现以免疫球蛋白(Ig)为中心的特异性免疫机制<sup>[1]</sup>。在动物的种系进化过程中, 硬骨鱼类开始出现IgM和IgD, 到两栖类开始出现IgG, 哺乳动物又出现了IgA, 到人类已经有IgM、IgG、IgA、IgD和IgE五种不同的Ig。长时间以来, 人们一直认为在硬骨鱼中仅存在IgM<sup>[2-5]</sup>和IgD<sup>[6-9]</sup>两种免疫球蛋白, 但自2005年以来, 人们相继在斑马鱼、虹鳟鱼、红鳍东方鲀和鲤鱼中发现了一些新型的免疫球蛋白, 如: IgZ、IgT、IgM-Z等, 这些免疫球蛋白为硬骨鱼特有, 且呈现出多样性, 在不同种的硬骨鱼中其结构类似但功能不完全相同; 在同一种鱼中也呈现多样性, 如在斑马鱼中就发现了两种IgZ。这些新型免疫球蛋白的发现不仅改变了人们对鱼类免疫球蛋白的传统理念, 而且为免疫球蛋白的起源、进化及其多样性研究提供了新的线索, 同时有助于我们更深入地认识和了解鱼类的特异性免疫机制, 对指导鱼病的防治也具有重要的应用价值。

## 1 新型免疫球蛋白的命名

2005年, Danilova等<sup>[10]</sup>在斑马鱼(*Danio rerio*)中首次发现一种不同于IgM和IgD的新型免疫球蛋白, 命名为IgZ(以zebrafish首字母定义)。几乎同时, Hansen

等<sup>[11]</sup>在虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)中也发现了一种新型的免疫球蛋白重链基因, 命名为IgT(以teleost首字母定义)。因为时间上的巧合, 两个实验室分别命名了新发现的新型Ig, 也都没有阐述IgZ和IgT是否为同一类Ig, 但后来的研究发现, 两种Ig的基因结构类似, 都有4个重链恒定区(CH区)、有分泌型和膜结合型两种存在形式; 系统进化分析也表明两者属于同一类免疫球蛋白。2009年, Hu等<sup>[12]</sup>在斑马鱼中又发现了一种新的IgZ-like免疫球蛋白重链分子, 为了与2005年发现的IgZ相区别, 将其命名为IgZ2, 并将2005年发现的IgZ命名为IgZ1。2005年, 在鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)中发现了包含两个恒定区的嵌合体形式的Ig, 因其CH1区与鲤鱼的IgM的CH1区氨基酸序列同源性较高, CH2区与斑马鱼IgZ1的CH4区氨基酸序列同源性较高, 所以将其命名为IgM-IgZ<sup>[13]</sup>。2010年, 在鲤鱼中又发现了一种新的IgZ-like免疫球蛋白重链分子, 为了与IgM-IgZ相区别, 将其命名为IgZ1, 将IgM-IgZ命名为IgZ2<sup>[14]</sup>。在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)中发现了三种形式的新型免疫球蛋白,

收稿日期: 2011-03-30 接受日期: 2011-05-20

国家自然科学基金(No.30070586)和山东省自然科学基金(No.Y2007D37)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0531-86180143, E-mail: yanggw@sdu.edu.cn

其中一种包含4个CH区, 将其命名为IgZ<sup>[15]</sup>; 一种与鲤鱼的IgM-IgZ类似, 也是一种嵌合体形式, 称为草鱼Ig嵌合体; 最近又发现一种包含4个CH区的IgZ-like免疫球蛋白重链分子, 将其命名为IgZ2<sup>[16]</sup>。另外, 在三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)中报道了四种含有3个CH区的IgT存在, 分别命名为IgT1~IgT4<sup>[17]</sup>。在红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)中报道了一种新型的IgH, 它只含有2个CH区, 与斑马鱼的IgZ和虹鳟的IgT相比, 这种新型的IgH缺少了IgZ/IgT的CH2和CH3区<sup>[18]</sup>。在大西洋鲑(*Salmo salar*)中报道了8种IgT的存在, 因在大西洋鲑中存在IgHA和IgHB两种形式的重链, IgT根据其所在的重链类型分别命名为IgT-A1~IgT-A5、IgT-B1~IgT-B3<sup>[19]</sup>。

总之, 因为新型免疫球蛋白结构的多样性及发现时间的差异, 它们的命名因人而异, 目前还没有统一的命名形式。在本文中我们将这种新型的免疫球蛋白命名为IgT。

## 2 不同硬骨鱼中新型免疫球蛋白的研究

### 2.1 斑马鱼IgZ

目前在斑马鱼中发现了两种IgT, 二者重链都为 $\zeta$ 链, 同源率为53.5%, 分别命名为IgZ1和IgZ2。

2.1.1 IgZ1 Danilova等<sup>[10]</sup>于2005年在斑马鱼(*Danio rerio*)中首先发现一种新型的免疫球蛋白重链基因, 命名为IgZ重链基因, 作者称之为 $\zeta$ 链(此后统一称为 $\tau$ 链), 以后又命名为IgZ1。 $\zeta$ 链基因位于V区基因连锁群和 $\mu$ 链C区之间, 有独立的D区和J区, 即V区基因区段位于两个连锁的D-J-C簇的上游, 通过V区段与(DJC) $\mu$ 或者(DJC) $\zeta$ 基因重组而非类别转换来形成IgM或IgZ1。 $\zeta$ 链C区有4个结构域, 即C $\zeta$ 1-C $\zeta$ 4。经过生物信息学分析表明IgZ1是不同于IgM或IgD的一种新型免疫球蛋白, 且仅存在于硬骨鱼中。 $\zeta$ 链基因的发现得到了高度评价, 这个发现否定了之前人们所形成的传统结论, 即 $\mu$ 链恒定区是紧跟在可变区基因连锁群之后的<sup>[20]</sup>。

通过对斑马鱼IgM和IgZ1的时序表达研究和组织表达研究发现, IgZ1在成鱼中只定位在硬骨鱼类的主要淋巴组织, 如头肾和胸腺。且与V区基因距离较近的 $\zeta$ 链基因在发育过程中比IgM较早表达, 这意味着IgZ1在发育早期起着重要的作用。

2.1.2 IgZ2 2009年, Hu等<sup>[12]</sup>在斑马鱼中又发现了一种新的IgZ-like免疫球蛋白重链分子, 命名为IgZ2。

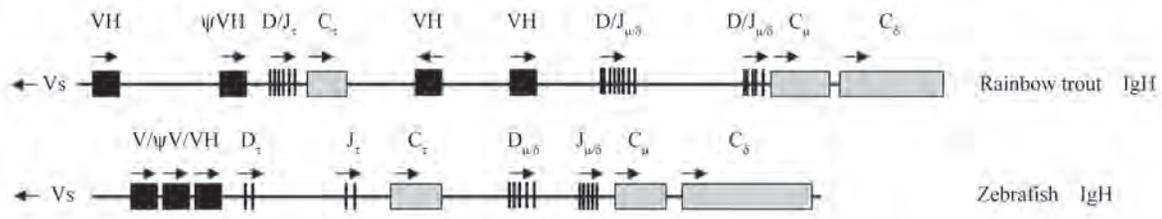
IgZ2是膜结合型分子, 它有4个恒定区, 1个跨膜区和1个短的胞内区。序列分析表明, IgZ2的CH1、CH2区与草鱼IgZ对应区域的同源性最高(54.1%、59.8%); CH3、CH4区与斑马鱼的IgZ1对应区域同源性最高(35.3%、80.4%)。

IgZ2在跨膜区和胞内区含有B细胞表面受体特有的残基, 包括形成CART(conserved antigen receptor transmembrane)结构域的氨基酸残基和与B细胞受体识别辅助分子CD79A/B相联系必需的氨基酸残基Thr、Ser和Tyr。通过荧光免疫染色也发现IgZ2与IgM一起共表达于B细胞表面, 通过流式细胞术分析表明, 用可促进B细胞分化的IL-4或LPS刺激后, IgZ2<sup>+</sup> B细胞的数目都上调, 这些证据都表明这种膜结合性的IgZ2很可能是一种B细胞受体(BCR)。IgZ2主要在免疫相关的组织中表达, 在LPS刺激之前可在肾脏、皮肤中检测到, LPS刺激后, 在肾、脾脏、鳃、肠和皮肤中都可以检测到。在硬骨鱼中, 肾脏类似于高等动物的骨髓, 为初级淋巴器官, 而脾脏、鳃、肠和皮肤可看作是次级淋巴器官。与之前报道的IgZ1只在初级淋巴组织中表达不同, IgZ2可在初级和次级淋巴器官中表达, 表明两者在功能上有区别。通过时序表达研究发现, IgZ2在斑马鱼的发育早期也起着重要的作用。

### 2.2 虹鳟鱼IgT

在斑马鱼中发现IgZ1的同时, 通过EST序列分析发现在虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)中同样存在类似斑马鱼IgZ1的重链类型, 命名为IgT<sup>[11]</sup>。 $\tau$ 链基因同样位于V区基因连锁群和C $\mu$ 区之间, 有独立的D区和J区,  $\tau$ 链基因的全长cDNA序列包含一个信号序列、重组的VDJ片段和有四个结构域即C $\tau$ 1-C $\tau$ 4的C区, C末端是跨膜区或分泌尾巴(图1), 存在分泌型和膜结合型两种存在形式。

最近, Zhang等<sup>[21]</sup>对虹鳟鱼的IgT的功能做了进一步的研究, 发现IgT在虹鳟鱼的粘膜免疫中发挥很重要的作用。虹鳟鱼的IgT在血清中以单体形式存在, 而在肠粘液中以类似于IgM的四聚体形式存在; 但与IgM不同, IgT的四聚体是由单体通过非共价键连接而成。与IgM相比, IgT主要存在于肠粘液中, IgT在肠粘液中的比重是IgM的63倍。免疫共沉淀的结果表明, 肠粘液中的IgT可以与多聚免疫球蛋白受体(pIgR)的分泌片(tSC)结合, 由此推测IgT很可能与哺乳动物的IgA类似, 也通过pIgR转运到肠腔中。



Rainbow trout IgH: 虹鳟鱼的IgH基因结构; Zebrafish IgH: 斑马鱼的IgH基因结构。

ψ: 假基因; →: 转录方向。

Rainbow trout IgH: genomic organization of the rainbow trout IgH loci; Zebrafish IgH: genomic organization of the rainbow trout and zebrafish IgH loci.

ψ: pseudogenes; →: transcriptional orientation.

图1 虹鳟鱼和斑马鱼IgH基因结构图

Fig.1 Genomic organization of the rainbow trout and zebrafish IgH loci

另外, 此实验发现了一种新型的B细胞, 即细胞表面仅表达IgT的IgT<sup>+</sup> B细胞。细菌刺激后, IgT<sup>+</sup> B细胞和IgM<sup>+</sup> B细胞的嗜菌能力和分泌抗体的能力都增强, 且肠组织IgT<sup>+</sup> B细胞数量增多, 大量聚集在肠的基层, 肠粘液中的IgT含量是对照组的51倍, 基因水平的检测结果与蛋白水平的结果一致。而与对照组相比, IgM在肠粘液中的含量及其基因的表达量都没有明显变化。而在血清中, 可以检测到特异的IgM, 但没有检测到特异的IgT。通过流式细胞和荧光免疫印记等技术发现, 大多数的肠道细菌上均结合有IgT, 表明鱼类IgT与哺乳类动物IgA相似, 可在肠腔中结合肠细菌从而阻止肠细菌的侵染。这些数据都表明IgT是粘膜免疫中重要的免疫球蛋白, 且比IgM发挥更重要的作用。

虹鳟鱼的IgT和斑马鱼的IgZ1、IgZ2的基因结构类似, IgT与IgZ2都表达于B细胞表面, 但不同的是, 斑马鱼的IgZ2和IgM一起共表达于B细胞表面, 而虹鳟鱼的IgT单独表达在B细胞表面形成IgT<sup>+</sup> B细胞。

### 2.3 鲤鱼IgT

目前在鲤鱼中报道了两种IgT, 分别命名为IgZ1和IgM-IgZ嵌合体。

**2.3.1 IgM-IgZ嵌合体** 2005年, 在鲤鱼中发现了一种IgM-IgZ嵌合体形式的新型免疫球蛋白, 此嵌合体有膜结合型和分泌型两种形式, 其重链包含两个恒定区。第一个恒定区外显子是由鲤鱼IgM的CH1组成, 而第二个外显子与斑马鱼IgZ1的CH4具有较高相似性(52.6%)。利用Real-time PCR检测IgM-IgZ嵌合体基因在各组织的表达模式, 发现经LPS刺激4 h

后IgM-IgZ嵌合体基因在鳃、头肾、肌肉和脑中有表达, 但在脾脏中的表达量却很低<sup>[13]</sup>。

**2.3.2 IgZ1** 2010年, 在鲤鱼中又发现了一种新的IgZ-like免疫球蛋白重链分子, 为与IgM-IgZ区别, 将其命名为IgZ1, 将IgM-IgZ命名为IgZ2。鲤鱼IgZ1的重链基因序列有4个恒定区和2个跨膜外显子, 这4个恒定区与虹鳟鱼的IgT和斑马鱼的IgZ恒定区的氨基酸序列同源性的12%~47.5%。基因序列分析表明IgZ1有独立的VH、D、J区。组织表达检测发现, 在各个器官中IgM的表达量都比IgZ1和IgZ2高。IgZ1与IgM相比, 表达量最高的是在外周血中, 其次是中肾和脾脏。而IgZ2在粘膜组织中的相对表达量比IgZ1高。用*T.borreli*刺激后, IgZ1在系统免疫和粘膜免疫器官中都有明显的上调(>4倍), 而只在脾脏和头肾等系统免疫器官中检测到IgM的表达量上调, 且其上调量低于IgZ1(头肾中IgZ1上调7倍, IgM上调5倍; 肠中IgZ1上调5倍, IgM上调2倍); IgZ2只在头肾中检测到有2倍的增长, 表明IgZ1主要对血液中的病原体引起免疫应答。而利用可侵染粘膜组织的病原体*Lernea*刺激后, IgM上调35倍, IgZ2上调8倍, IgZ1只上调4.5倍, 表明IgZ2可能参与鲤鱼的粘膜免疫从而保护机体免受上皮病原体的侵染。在鲤鱼的发育过程中检测到, IgZ1、IgZ2和IgM都持续表达, 但IgM一直占主导地位, 表明IgZ1、IgZ2在鲤鱼早期发育过程中有一定的保护作用<sup>[14]</sup>。

最近, 我们在鲤鱼中又克隆出另一种形式的IgT, 包含4个CH区, 系统进化分析表明它与其它硬骨鱼的IgT属于同一分支。它与IgM-IgZ和IgZ1的同源性分别为69.2%和47.5%, 其CH1区与鲤鱼IgM

的CH1区同源性很高,为78.4%,而CH2~CH4与IgZ1的相应区域同源性较高,分别为43.8%、51.0%、68.5%。目前其功能还在进一步研究中。

## 2.4 草鱼IgT

目前在草鱼(*Ctenopharyngoden idellus*)中报道了三种类型的IgT,即IgZ、IgZ2和IgM-IgZ嵌合体。

**2.4.1 IgZ** 在草鱼中,首先发现了包含典型的CH1、CH2、CH3和CH4四个恒定区的IgZ, IgZ存在分泌型和膜结合型两种形式,其中膜结合型是由膜外显子TM1与在最后一个恒定区外显子中的剪切位点剪接而成,与哺乳动物 $\mu$ 链的剪切方式类似。免疫印迹的结果显示草鱼IgZ在脾脏、头肾、鳃、肠和肝脏中都有表达<sup>[15]</sup>。

**2.4.2 IgM-IgZ嵌合体** Ig嵌合体只有两个恒定区,一个恒定区与IgM相应区域相似而另一个与IgZ相应区域相似,这一特征与已报道的鲤鱼IgM-IgZ相似,所以同样称为IgM-IgZ,具有分泌型和膜结合型两种形式。序列分析表明其全部恒定区氨基酸序列与鲤鱼IgM-IgZ的全部恒定区氨基酸序列的相似性最高,达74.0%。其中CH1区与草鱼IgM的CH1区相似性最高,达85.1%,CH2区与草鱼IgZ的CH4区相似性最高,为77.3%<sup>[16]</sup>。

**2.4.3 IgZ2** 草鱼IgZ2包含四个恒定区,与草鱼IgZ全部恒定区氨基酸序列相似率为59.8%,与斑马鱼IgZ、草鱼IgZ、虹鳟IgT、草鱼IgM的全部恒定区氨基酸序列的相似性较高,依次为66.7%、59.8%、52.6%、47.8%。草鱼IgZ2的CH1、CH2、CH3区的氨基酸序列与斑马鱼IgZ1对应的恒定区相似性最高,分别为60.9%、67.0%、68.8%,其CH4区与斑马鱼IgZ CH4区以及鲤鱼IgM-IgZ CH2区的氨基酸相似性都高达75.0%。RT-PCR分析IgM-IgZ和IgZ2表达,发现当表达量较高时,两者不仅在头肾、脾脏等淋巴器官中表达,也在鳃、肠等组织中有表达<sup>[16]</sup>。

## 2.5 红鳍东方鲀新型IgH

Savan等<sup>[18]</sup>在分析红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)基因组时发现一个仅仅编码两个恒定区的新型免疫球蛋白的重链基因,称为新型的IgH。新型的IgH的两个CH区与IgM和IgD分别只有9.8%~27.9%和9.0%~15.4%的同源性。与鲤鱼和草鱼中的嵌合体不同,新型的IgH的CH区中没有与IgM的CH区同源性很高的区域,其上游的恒定区与斑马鱼IgZ1的CH1区氨基酸序列有22%的相似性,下游的恒定区与斑

鱼IgZ1的CH4区氨基酸序列有24%的相似性,下游还有2个外显子与斑马鱼IgZ1的跨膜外显子氨基酸序列有54%的相似性,与斑马鱼的IgZ1相比,红鳍东方鲀的这种新型免疫球蛋白基因经历了CH2和CH3的缺失。蛋白结构分析表明在CH1和CH2区之间存在富含脯氨酸的铰链区,在IgH基因结构中,铰链区与第二个外显子(CH2)连接,类似于哺乳动物的IgA,但此铰链区结构的作用尚未研究。新型的IgH有分泌型和膜结合型两种存在形式。在红鳍东方鲀成鱼的脾脏、头肾、肝脏、鳃和肠道中都能检测到此新型的IgH重链基因的表达,尤其在肠和鳃的上皮细胞中能检测到其大量表达,推测其在粘膜免疫中发挥一定的作用;时序表达研究表明, IgH在红鳍东方鲀的发育早期也有一定的作用。对于红鳍东方鲀的新型的IgH功能还需要进一步分析。

## 2.6 三棘刺鱼IgT

2010年, Gambo'n-Deza等<sup>[17]</sup>在分析三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)的基因组时发现,其免疫球蛋白重链基因(IGH)的结构中包含由三个拷贝的IGHT-IGHM-IGHD组成的串联结构,另外还有一个单独的IGHT基因结构。每个IGHT上游存在一组DH-JH序列,位于IGHM-IGHD上游的重链恒定区基因之所以称为IGHT基因,除了因为其基因的位置和结构特点与IgT类似外,还因为其编码的氨基酸序列与虹鳟的IgT、斑马鱼的IgZ和草鱼的IgZ的氨基酸序列同源性较高。但与它们不同的是, IGHT基因编码的IgT只含有3个CH区,其中CH1区与其IgM的CH1区同源性较高,CH2、CH3区分别与虹鳟的IgT和斑马鱼IgZ的CH3、CH4区同源性较高。4个IGHT基因分别编码IgT,命名为IgT1-IgT4,它们之间的同源性高达90%,表明三棘刺鱼中编码免疫球蛋白重链的基因片段发生了复制现象。但目前对于三棘刺鱼中的IgT的功能研究尚未进行。

## 2.7 大西洋鲑IgT

由于染色体复制的原因,大西洋鲑(*Salmo salar*)中免疫球蛋白重链基因(IGH)有两个等位基因即IGH-A和IGH-B。Yasuike等<sup>[19]</sup>在分析其IGH基因结构时发现,在C $\mu$ 区域的上游存在多个串联排列的C $\tau$ 序列,如在IGH-A中有5个C $\tau$ 序列,在IGH-B中有3个C $\tau$ 序列,分别命名为C $\tau_A$ -1-C $\tau_A$ -5和C $\tau_B$ -1-C $\tau_B$ -3,但只有C $\tau_A$ -4、C $\tau_A$ -5和C $\tau_B$ -2的基因序列是完整的且是有功能的,编码的蛋白分别为IgT-A4、IgT-A5和IgT-B2,

完整的IgT包含4个CH区。序列分析表明,大西洋鲑的IgM-A和IgM-B之间、IgD-A和IgD-B之间的同源性高达96%以上,但这3种IgT之间的同源性很低,其中IgT-A和IgT-B的氨基酸序列的同源性为75%~76%,IgT-A4和IgT-A5之间的同源性为87%;表达分析表明三者的分布也有差异。结构的多样性和组织分布的差异表明三者可能分别具有不同的功能。因为大西洋鲑中有两个拷贝的IGH,使得其产生较多种类的免疫球蛋白,这有利于我们更好地了解Ig进化及多样性产生的机制。

已有证据表明,在大西洋鲑的肠粘液中不含有IgM且其中含有能够水解血清IgM的蛋白水解酶,而RT-PCR发现,IgT尤其是IgT-A5在粘膜组织包括肠和鳃中的表达量很高,所以可猜测IgT很有可能在大西洋鲑的粘膜免疫中发挥主导作用。在大西洋鲑发育早期(鱼体大小为0.2 g/2.05 cm)可以检测到IgT的表达,但是表达量很低;而在成鱼的头肾和脾脏中IgT有较高水平的表达,表明在大西洋鲑中IgT主要在成熟的鱼中发挥免疫保护作用<sup>[22]</sup>。

### 3 新型免疫球蛋白的进化分析

为了阐述硬骨鱼类各种Ig的关系,以及脊椎动物中Ig的进化关系,本文采用P-distance距离法为脊椎动物的Ig恒定区氨基酸序列构建了NJ系统进化树(图2)。结果显示,斑马鱼IgZ1与IgZ2先聚为一枝,这一枝与草鱼IgZ2和鲤鱼IgZ1分枝聚为一枝,而后与鲤鱼IgM-IgZ、草鱼IgM-IgZ和草鱼IgZ聚在一起;这一枝又与大西洋鲑IgT、红鳍东方鲀的新型IgH、虹鳟鱼IgT和三棘刺鱼IgT1-IgT4聚在一起。这进一步表明,硬骨鱼类中报道的IgZ、IgT以及红鳍东方鲀中的新型IgH应该为同一类型的免疫球蛋白。此外,所有硬骨鱼类的IgM和IgD分别以较高的支持率各聚为一枝。

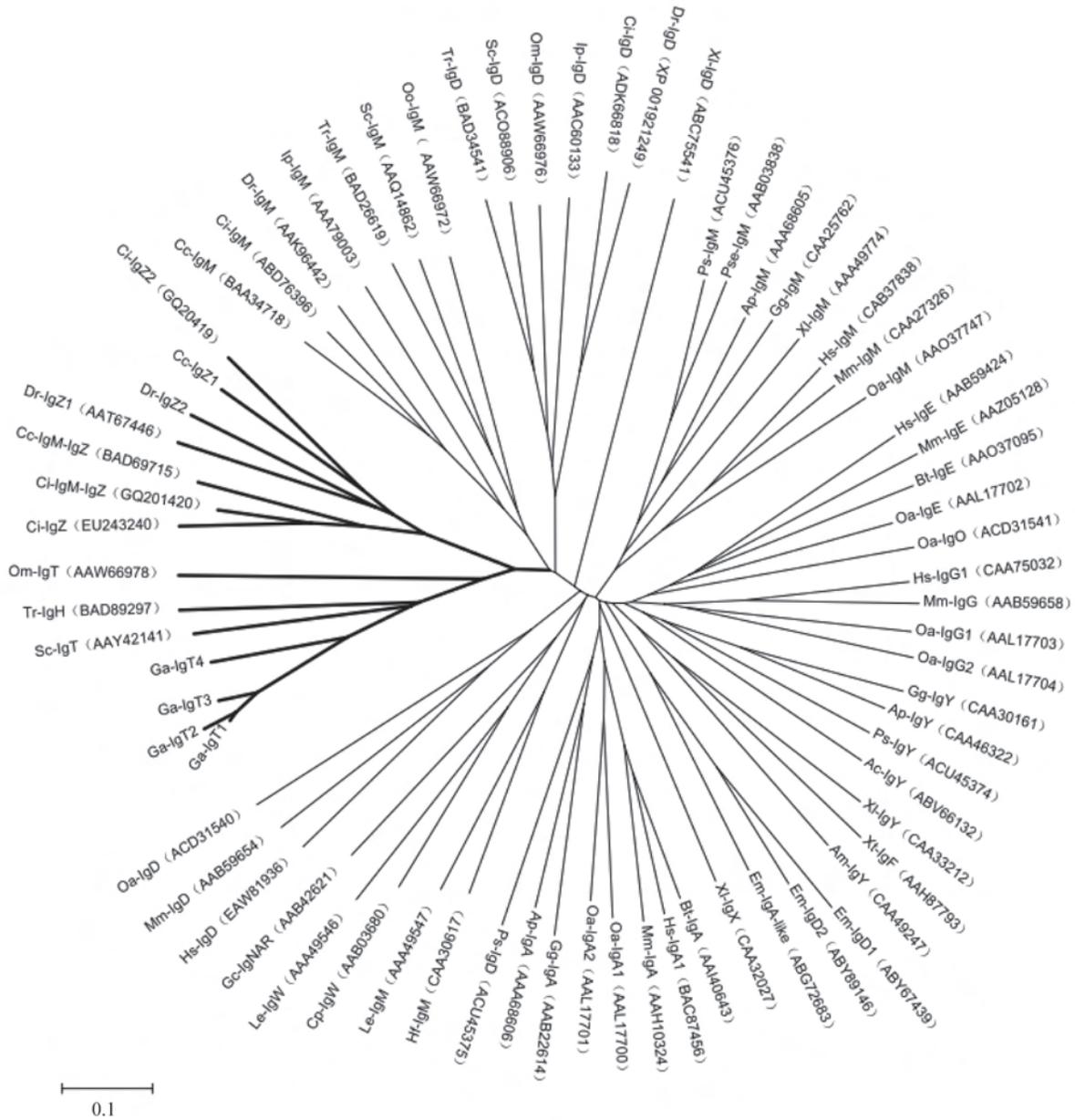
### 4 小结与展望

综上所述发现,在硬骨鱼中上述新型免疫球蛋白重链基因基本结构是保守的,有独立的D区和J区,且都是位于可变区基因连锁群和 $\mu$ 链恒定区(C $\mu$ )之间。而哺乳动物C $\mu$ 区是紧跟在V-D-J区之后的(图3)。目前倾向于将上述新型免疫球蛋白统称为IgT,IgT重链恒定区(CH)的数目大多数为4个,而三棘刺鱼的IgT只有3个CH区,红鳍东方鲀的新型IgH只有2个恒

定区(图4);IgT具有多样性,在不同种的硬骨鱼中,其结构类似但功能不完全相同;在同一种鱼中存在两种或两种以上的IgT。另外,在草鱼和鲤鱼还发现了IgM-IgZ嵌合体结构。这种结构的发现无疑提出了这样一个问题:在硬骨鱼的免疫球蛋白重链基因组上,既然 $\zeta$ 外显子位于 $\mu$ 外显子的上游,那么发生怎样的基因重组事件从而产生了C $\mu$ -C $\zeta$ 结构呢?一种可能的原因是存在两个串联的免疫球蛋白重链基因组座位,这样的情况在斑点叉尾鲴中有报道<sup>[23]</sup>;另一种可能的原因是发生两种独立的基因座位重排事件,但是具体的细节还有待于进一步研究。

通过对IgT的时序表达和组织表达研究发现,在硬骨鱼发育过程中IgT的表达时间比较早,表明在硬骨鱼发育早期,IgT对机体有一定的保护作用。不同鱼中的IgT表达分布不同,其中斑马鱼的IgZ2,虹鳟鱼的IgT,鲤鱼、草鱼的IgM-IgZ嵌合体以及大西洋鲑的IgT在鳃和肠中有大量表达。鱼类生活在水环境中,其大面积的粘膜包括皮肤、鳃、肠等是病原感染鱼类时最先接触的部位。许多证据表明粘膜并不仅仅是物理屏障,其局部的免疫应答对病原体的抵御更加重要。已有证据表明,IgT在粘膜免疫中起着重要的作用,虹鳟鱼粘液中IgT/IgM的比值是血清中的63倍,且经过寄生虫刺激后,粘液中IgT的变化比IgM的变化大,但在血清中IgM的变化大。在肠腔中可以观察到,IgT大量参与到识别、结合外来病原体的免疫应答中;并且IgT与多聚免疫球蛋白受体(pIgR)结合的实验也表明,与哺乳动物中IgA类似,IgT可通过多聚免疫球蛋白受体转运到肠腔中,从而阻止肠腔中的细菌侵染。这些证据都表明,IgT在虹鳟鱼的粘膜免疫中起着重要的作用。但是,IgT在其他硬骨鱼中的粘膜免疫中是否也起着重要的作用仍需要进一步的研究。

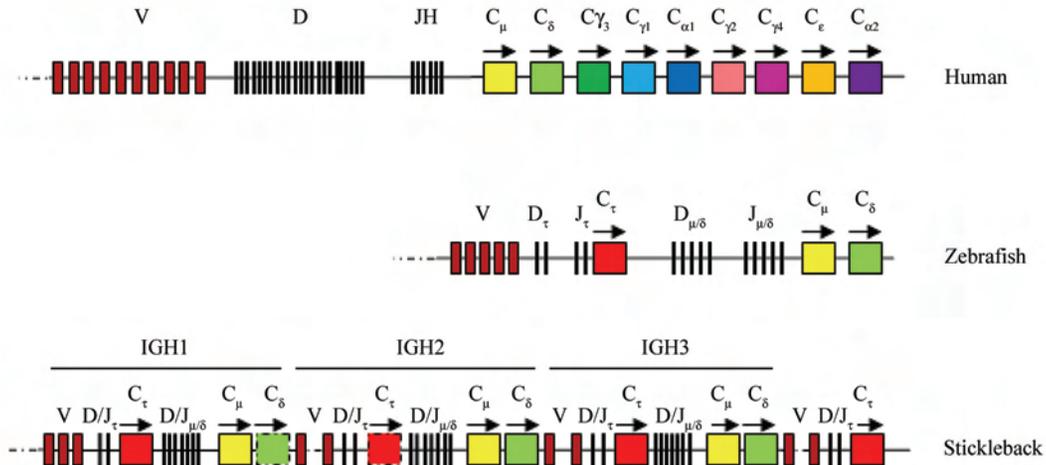
研究发现,斑马鱼的IgZ2和虹鳟鱼的IgT都是B细胞表面受体(BCR),通过进一步实验也证明了新型B细胞的存在。但不同的是,斑马鱼的IgZ2和IgM一起共表达于B细胞表面,而虹鳟鱼的IgT单独表达在B细胞表面形成IgT<sup>+</sup>B细胞。在哺乳动物中,BCR是B淋巴细胞的表面标记,参与抗原的递呈。B细胞表面不同BCR的表达情况表明B细胞处于不同的发育或分化阶段。例如:IgM<sup>+</sup>细胞代表未成熟的B细胞,而IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>细胞代表已经分化成熟的B细胞。所以,IgZ2是否作为B细胞处于不同发育或分化阶段的细



采用P-distance距离法构建的NJ树, 枝上数字为1 000次bootstrap的置信度值。建树所用序列为重链基因的全部恒定区氨基酸序列, 除三棘刺鱼的IgT1-IgT4、斑马鱼IgZ2和鲤鱼IgZ1的序列来自所发表论文的正文外, 其余序列均来自GenBank, 序列的登录号见系统发育树。Hs: 人; Mm: 小鼠; Bt: 牛; Oa: 鸭嘴兽; Gg: 鸡; Ap: 绿头鸭; Ps: 中华鳖; Ac: 安乐蜥; XI: 非洲爪蟾; Xt: 热带爪蟾; Am: 美西螈; Pw: 欧非肋突螈; Em: 豹纹壁虎; Psc: 红耳龟; Hf: 角鲨; Le: 鳐; Ga: 三棘刺鱼; Sc: 鳐; Tr: 红鳍东方鲀; Om: 虹鳟鱼; Cc: 鲤鱼; Dr: 斑马鱼; Ci: 草鱼; Ip: 斑点叉尾; Pa: 肺鱼; Gc: 护士鲨; Cp: 沙洲鲨。

The NJ tree was inferred by P-distance approach. Bootstrap values were calculated from 1 000 repetitions. The tree was constructed by using complete constant region amino acid sequences. Except for the three-spined stickleback fish IgT1-IgT4, zebrafish IgZ2 and common carp IgZ1 which were obtained directly from the publication, all other sequences used in the phylogenetic analysis were taken from the GenBank database, with their accession numbers shown in parentheses. Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Bt: *Bos taurus*; Oa: *Ornithorhynchus anatinus*; Gg: *Gallus gallus*; Ap: *Anas platyrhynchos*; Ps: *Pelodiscus sinensis*; Ac: *Anolis carolinensis*; XI: *Xenopus laevis*; Xt: *Xenopus tropicalis*; Am: *Ambystoma mexicanum*; Pw: *Pleurodeles waltli*; Em: *Eublepharis macularius*; Psc: *Pseudemys scripta*; Hf: *Heterodontus francisci*; Le: *Leucoraja erinacea*; Ga: *Gasterosteus aculeatus*; Sc: *Siniperca chuatsi*; Tr: *Takifugu rubripes*; Om: *Oncorhynchus mykiss*; Cc: *Cyprinus carpio*; Dr: *Danio rerio*; Ci: *Ctenopharyngodon idellus*; Ip: *Ictalurus punctatus*; Pa: *Protopterus aethiopicus*; Gc: *Ginglymstoma cirratum*; Cp: *Carcharhinus plumbeus*.

图2 基于脊椎动物免疫球蛋白重链恒定区基因构建的系统发育树  
Fig.2 Phylogenetic relationship of immunoglobulin heavy chain genes in vertebrates

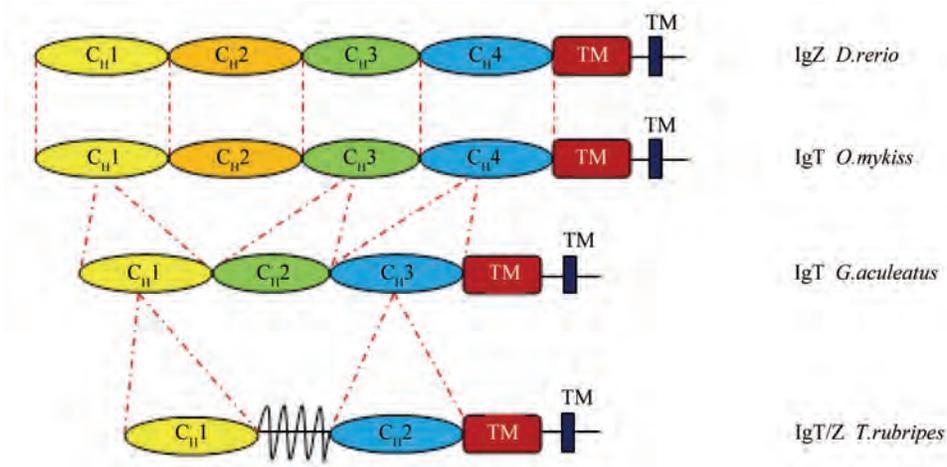


“→”表示基因转录的方向, 虚线框表示假基因, “---”表示连续的区域。

Transcription directions are shown by arrowhead, dashed-line boxes indicate the CH pseudogenes ( $\psi$ ), the continuous regions are indicated by dotted lines.

图3 人和几种硬骨鱼的IgH基因结构示意图

Fig.3 Schematic structures of IgH loci of human and vertebrates



C<sub>II</sub>: 恒定区; TM: 跨膜区。

C<sub>II</sub>: different constant domains; TM: transmembrane regions.

图4 由氨基酸序列推导的多种IgT的结构图

Fig.4 Scheme of isotypes IgT and IgZ derived after amino acid sequences

胞表面标记需要进一步证实。而虹鳟鱼中的IgT<sup>+</sup> B细胞是一种特异地产生IgT的B细胞, 这进一步证实了由基因结构进行的推测——IgT是通过V区段与(DJC) $\tau$ 基因重组而非类别转换形成的。

在免疫球蛋白进化的过程中, 鱼类是最早开始出现Ig的生物, 它的免疫系统比较原始, 这种硬骨鱼中特有的免疫球蛋白有可能是Ig最早的形式, 随着进化, 这种Ig逐渐退化或者演变。近年来, 在两栖类中发现了IgX并表明它是哺乳动物中IgA的同源体,

两者都在机体的粘膜免疫中发挥重要作用, 而现在已有证据表明IgT在硬骨鱼的粘膜免疫中发挥重要的作用, 这让人们大胆推测IgT应该是哺乳动物IgA的同源体。而且通过比较发现, 两者有许多共同点: 首先, IgT和IgA在血清中都以单体的形式存在, 而在粘液中以多聚体的形式存在; 其次, 两者都可以与pIgR结合且在粘膜免疫中都发挥重要的作用; 而且, 红鳍东方鲀的新型IgH的两个恒定区之间存在类似于哺乳动物IgA的铰链区。但两者又有差异: 哺乳

动物的IgA是通过IgM的类型转换而来,但虹鳟鱼中IgT是由IgT<sup>+</sup> B细胞直接产生,且在粘液中以四聚体的形式存在。当然对于其他硬骨鱼中的IgT是否由IgT<sup>+</sup> B细胞直接产生,还需要进一步证实。鱼类与哺乳动物的生活环境及进化水平不同,两者中粘膜免疫系统发挥作用的机制可能有较大的不同,作为粘膜免疫中的重要作用因子——IgT,其产生过程、结构特点和发挥作用的途径与IgA应该是有区别的。但对于这个大胆的猜测,还需要足够的证据去证实。

硬骨鱼新型免疫球蛋白IgT的发现表明了鱼类免疫球蛋白多样性和粘膜免疫系统复杂性的存在,激发了人们进一步研究鱼类免疫系统的兴趣。而且为鱼类免疫球蛋白的形成过程,基因重排的模式,多样性的形成以及免疫球蛋白系统进化的研究提供了一定的线索,并带来了更多的疑问,对于这些方面以及IgT的功能尚需要更多的研究。

### 参考文献 (References)

- Lobb CJ, Clem LW. The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus, and bile. *J Immunol* 1981; 127(4): 1525-9.
- Bengten E, Leanderson T, Pilstrom L. Immunoglobulin heavy chain cDNA from the teleost Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Nucleotide sequences of secretory and membrane form show an unusual splicing pattern. *Eur J Immunol* 1991; 21(12): 3027-33.
- Hordvik I, Voie AM, Glette J, Male R, Endresen C. Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Eur J Immunol* 1992; 22(11): 2957-62.
- Warr GW. The immunoglobulin genes of fish. *Dev Comp Immunol* 1995; 19(1): 1-12.
- Nakao MT, Tomana M, Fujiki K, Yano T. Isolation of cDNA encoding the constant region of the immunoglobulin heavy-chain from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol* 1998; 8(6): 425-34.
- Wilson M, Bengten E, Miller NW, Clem LW, Du Pasquier L, Warr GW. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(9): 4593-7.
- Hordvik I, Thevarajan J, Samdal I, Bastani N, Krossoy B. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand J Immunol* 1999; 50(2): 202-10.
- Stenvik J, Jorgensen TO. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. *Immunogenetics* 2000; 51(6): 452-61.
- Hirono I, Nam BH, Enomoto J, Uchino K, Aoki T. Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. *Fish Shellfish Immunol* 2003; 15(1): 63-70.
- Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Steiner LA. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: Identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol* 2005; 6(3): 295-302.
- Hansen JD, Landis ED, Phillips RB. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(19): 6919-24.
- Hu YL, Xiang LX, Shao JZ. Identification and characterization of a novel immunoglobulin Z isotype in zebrafish: implications for a distinct B cell receptor in lower vertebrates. *Mol Immunol* 2009; 47(4): 738-46.
- Savan R, Aman A, Nakao M, Watanuki H, Sakai M. Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Immunogenetics* 2005; 57(6): 458-63.
- Ryo S, Wijdeven RH, Tyagi A, Hermsen T, Kono T, Karunasagar I, et al. Common carp have two subclasses of bonyfish specific antibody IgZ showing differential expression in response to infection. *Dev Comp Immunol* 2010; 34(11): 1183-90.
- Xiao FS, Wang YP, Yan W, Chang MX, Yao WJ, Xu QQ, et al. Ig heavy chain genes and their locus in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Fish Shellfish Immunol* 2010; 29(4): 594-9.
- Xiao FS, Wang XX, Nie P. Novel immunoglobulin heavy chain genes, IgZ-2 and IgM-IgZ in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *J Fisheries China* 2010; 34(12): 1891-900.
- Gambon-Deza F, Sanchez-Espinel C, Magadan-Mompo S. Presence of an unique IgT on the IGH locus in three-spined stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) and the very recent generation of a repertoire of VH genes. *Dev Comp Immunol* 2010; 34(2): 114-22.
- Savan R, Aman A, Sato K, Yamaguchi R, Sakai M. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur J Immunol* 2005; 35(11): 3320-31.
- Yasuie M, de Boer J, von Schalburg KR, Cooper GA, McKinnel L, Messmer A, et al. Evolution of duplicated IgH loci in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *BMC Genomics* 2010; 11: 486.
- Flajnik MF. The last flag unfurled? A new immunoglobulin isotype in fish expressed in early development. *Nat Immunol* 2005; 6(3): 229-30.
- Zhang YA, Salinas I, Li J, Parra D, Bjork S, Xu Z, et al. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunol* 2010; 11(9): 827-35.
- Hatten F, Fredriksen A, Hordvik I, Endresen C. Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus. *Fish Shellfish Immunol* 2001; 11(3): 257-68.
- Bengten E, Clem LW, Miller NW, Warr GW, Wilson M. Channel catfish immunoglobulins: Repertoire and expression. *Dev Comp Immunol* 2006; 30(1/2): 77-92.

## Progress in the Study of Novel Immunoglobulin in Teleost Fish

Lü Cui, An Liguó, Yang Guiwen\*

(Shandong Provincial Key laboratory of Animal Resistance Biology, College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

**Abstract** Immunoglobulin has been discovered for the first time in fish, and it is the major player in a humoral immune system in fish. It was generally believed that teleost fish possess only few immunoglobulin isotypes such as IgM and IgD. Since 2005, the new Ig isotypes IgZ, IgT and a chimera of IgM-IgZ have been discovered from zebrafish, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio* L.), respectively. These findings broadened our knowledge in the immunoglobulin family of early vertebrates. As a novel immunoglobulin isotype, it exhibits specific gene organization and class diversity. So far, its function has not been known enough, but some studies have indicated that it acts as a mucosal intestinal immunoglobulin and may be an IgA equivalent. Here, the specific structural features, gene organization, distribution patterns and functional differences of the novel immunoglobulin are reviewed.

**Key words** teleost fish; immunoglobulin; IgT; mucosal immunity

---

Received: March 30, 2011 Accepted: May 20, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30070586) and Shandong Provincial Natural Foundation (No. Y2007D37)

\*Corresponding author. Tel: 86-531-86180143, E-mail: yanggw@sdsu.edu.cn