

香鱼 *CCL4-like* 基因的克隆、序列分析及免疫相关性表达变化分析

杨旦阳 陈炯* 陆新江 史雨红 李星云
(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211)

摘要 CC型趋化因子是一种多功能的趋化因子, 是鱼类先天免疫系统的重要组成部分。该研究通过文库测序方法获得香鱼(*Plecoglossus altivelis*, ayu) *CCL4-like*(*aCCL4-like*)基因cDNA序列。它编码一个由123个氨基酸组成的前肽, N-端22个氨基酸为信号肽序列。成熟肽包含4个半胱氨酸残基, 可形成2个二硫键。系统进化树分析揭示, *aCCL4-like*与大西洋鲑(*Salmo salar*, atlantic salmon) *CCL4*亲缘关系最近。实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)分析揭示, *aCCL4-like*基因mRNA在检测的健康香鱼7个组织中均有表达, 其中肝的表达量最高; 在鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)感染后, 各组织中*aCCL4-like*基因mRNA表达均显著变化, 但各时间点变化不一, 其中肠组织的变化最为明显。随后原核表达了*aCCL4-like*并制备相关抗血清, Western blot分析揭示, 鳃利斯顿氏菌注射后4 h的血清中*CCL4-like*含量无显著变化, 8 h时显著增加, 此后表现为持续增加。综上, *aCCL4-like*基因的表达变化与鳃利斯顿氏菌的感染过程密切相关, 推测*aCCL4-like*可能在香鱼抗病原菌感染的免疫反应过程中有重要作用。

关键词 CC型趋化因子; 香鱼; 鳃利斯顿氏菌; 实时荧光定量PCR;

Molecular Cloning, Sequences Analysis and Immune-related Expression Changes of *aCCL4-like* Gene from Ayu (*Plecoglossus altivelis*)

Yang Danyang, Chen Jiong*, Lu Xinjiang, Shi Yuhong, Li Mingyun

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract CC chemokines are a kind of multi-functional cytokines and play vital roles in innate immune system of teleost fish. In this study, we obtained a cDNA sequence encoding *CCL4-like* from ayu. The predicted ayu *CCL4-like* (*aCCL4-like*) propeptide was 123 amino acids (aa) long with a 22 aa signal peptide in the N-terminus. The mature peptide contained four conserved cysteine residues and they could form two disulfide bonds. Phylogenetic tree analysis showed that *Plecoglossus altivelis* *CCL4-like* was closely to *Salmo salar* *CCL4*. The Real-time quantitative PCR(RT-qPCR) analysis displayed that *aCCL4-like* mRNAs were widely existed in kinds of tissues of healthy ayu, and that the highest expression was in the liver. After *Listonella anguillarum* (*L.anguillarum*) infection, *aCCL4-like* mRNAs were dramatically up-regulated in all detected ayu tissues, especially in the intestine. Followed by *aCCL4-like* prokaryotic expression and its preparation of antiserum. Western blot analysis revealed

收稿日期: 2012-11-26 接受日期: 2013-01-17

国家自然科学基金(批准号: 31201970)和教育部新世纪优秀人才支持计划(批准号: NCET-08-0928)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0574-87609571, E-mail: jchen1975@163.com

Received: November 26, 2012 Accepted: January 17, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31201970) and the Program for New Century Excellent Talents in University (Grant No.NCET-08-0928)

*Corresponding author. Tel: +86-574-87609571, E-mail: jchen1975@163.com

网络出版时间: 2013-04-02 15:25

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130402.1525.001.html>

that the ayu serum aCCL4-like was no significant change after bacterial infection after 4 h, but increased suddenly at 8 h and since then continued to raise. In summary, our results suggested that aCCL4-like gene expression level was closely related to the progress of *L. anguillarum* infection, which predicts aCCL4-like's role in the immune response against microbial infections of ayu.

Key words CC chemokine ; ayu(*Listonella anguillarum*); RT-qPCR;

趋化因子(chemokines)是一类能使细胞发生定向迁移作用的细胞因子的总称,分子量一般在8.0~12.0 kDa,其一级结构的N-端包含4个保守的半胱氨酸残基,根据前两个半胱氨酸残基相对位置的不同,可将趋化因子分为4个家族:CXC(α)、CC(β)、C和CX3C^[1]。趋化因子能通过激活跨膜黏附分子G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)诱使细胞内信号转导,促进细胞迁移^[2]。CC趋化因子是趋化因子家族中最大的基因家族之一,因其N-端序列的第1个、第2个半胱氨酸残基紧密相连得名。哺乳动物CC趋化因子按功能可以划分为炎性趋化因子和自我平衡趋化因子两大类,炎性趋化因子主要由MCP簇和MIP簇构成^[3-4], Borza等^[5]和Nomiyama等^[6]研究表明,目前鱼类CC趋化因子无法区分成这两大类。CC趋化因子主要作用于单核细胞和淋巴细胞,其次还能促进其他类型细胞的游走趋化,如DC、NK细胞、嗜酸性粒细胞等^[7]。鱼类CC趋化因子是参与鱼类非特异性免疫应答反应的重要组成部分之一。近年来,通过同源克隆及EST等技术鉴定了大量哺乳类动物^[8-10]以及鱼类^[5,11-14]的CC趋化因子。

香鱼(*Plecoglossus altivelis*, ayu)是东亚地区如中国、日本和朝鲜等国特有的一种中小型名贵鱼类,在国际市场上素有“淡水鱼之王”的美誉。近年来,浙江、福建和山东等地区香鱼养殖已经形成一定规模,其经济效益十分显著。然而,高密度的人工养殖容易引起香鱼病害的发生,而抗生素的滥用更是产生了抗生素残留和细菌耐药性等诸多问题。例如,日本对从我国进口的香鱼规定了112种兽药、饲料添加剂和重金属限量指标。因此,有必要从鱼类自身免疫调控角度入手,对其抗细菌感染的分子机制进行深入研究,为后续相关病害的防治及抗病品种选育奠定理论基础。

本文通过文库测序法获得香鱼CCL4-like (aCCL4-like)基因的cDNA序列,对序列进行了比较和系统进化树分析,并明确了其mRNA的组织表达

特征,随后原核表达并制备了aCCL4-like抗血清,Western blot检测了鳃利斯顿氏菌感染后香鱼血清CCL4-like蛋白的表达变化。这一研究为后续深入探讨CCL4-like基因在鱼类抗细菌免疫中的作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 健康香鱼27尾,体重约20~25 g,购自宁海鳊溪香鱼养殖场。大肠杆菌TG1菌株、载体pET-28a、BL21 pLys E、鳃利斯顿氏菌香鱼分离株(ayu-H080701)^[15]由本实验室保存。ICR小鼠购自浙江医学科学院实验动物中心。

1.1.2 试剂 SDS-PAGE低分子量蛋白标准购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所;RNAiso Reagent、pMD19-T Simple Vector、AMV逆转录酶、Ex Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、*Nde* I、*Xho* I和SYBR Premix Ex Taq试剂盒购自TaKaRa公司;Gel Extraction Kit购自Omega公司;引物合成及序列测定由上海英俊生物工程公司完成;二抗(辣根酶标记山羊抗小鼠IgG)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL化学发光试剂盒、显影定影试剂盒、柯达X-OMAT BT胶片和压片暗盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 购买的香鱼在实验室条件下进行适应性养殖,养殖用水经消毒过滤,水温控制在20~22 °C,每天投喂饵料一次。一周后随机选取3尾,15 mg/L丁香酚麻醉后进行尾静脉采血,置于冰上4 h,冷冻离心取上清,分装并于-70 °C超低温冰箱保存。再分别取香鱼的肝、脾、肾、肠、鳃、心、肌肉组织并立即投入液氮保存。各组织随后于-70 °C超低温冰箱保存,收集的组织和血清作为健康香鱼样品。将鳃利斯顿氏菌接种于普通营养肉汤培养基中,28 °C恒温摇床培养过夜,第二天按1:100稀释继续培养直至菌处于生长对数期,离心收集菌体,用无菌

生理盐水洗涤一次,再用无菌生理盐水重悬浮并计数稀释至终浓度 1.0×10^5 CFU/mL。剩余香鱼分感染组、注射无菌生理盐水组,各12尾。感染组按 1.0×10^4 CFU/尾的浓度腹腔注射鳃利斯顿氏菌分离株ayu-H080701悬液100 μ L,另一组同样腹腔注射等剂量的无菌生理盐水。注射后在4, 8, 12, 24 h时间段进行取样,取样方法同上,各时间段每组每次取3尾。

1.2.2 *aCCL4-like*基因cDNA序列的克隆及分析 用RNAiso试剂提取健康香鱼肝脏组织总RNA,经琼脂糖电泳完整性检测以及Thermo Scientific NanoDrop 2000紫外分光光度计纯度分析。用Oligotex-dT³⁰纯化mRNA并以其作为模板,采用SMART RACE cDNA amplification kit合成肝cDNA,具体方法参照厂家说明书。根据已知的*aCCL4-like*基因3'端部分序列设计特异引物*aCCL4-like*-1t(-): 5'-GCT TTA CAA GGC CTT GTG TTG G-3',试剂盒自带引物Nested Universal Primer A(5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3')为上游引物,经PCR扩增送测序获得5'端部分序列,拼接后得到*aCCL4-like*基因cDNA序列。信号肽序列预测采用SignalP 3.0程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),多重序列比对采用ClustalW程序(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>),系统进化树构建采用MEGA 4.0^[16],实验结果采用SPSS单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计, $P < 0.05$ 为显著差异。

1.2.3 实时荧光定量PCR(RT-qPCR) 抽提香鱼各组织总RNA,用DNase I(RNase-free)处理基因组DNA,电泳检测处理前后RNA的质量。取1 μ g处理后的RNA作为模板, Oligo(dT) 30为引物,采用RNA PCR kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa)合成第一链cDNA,用作后续RT-qPCR模板。根据已获得的*aCCL4-like*基因cDNA序列设计检测引物, *aCCL4-like*(+): 5'-ACT GCC ATG GAT TAC CTG GA-3'和*aCCL4-like*(-): 5'-AAG GCC TTG TGT TGG TCT TG-3',预期扩增产物大小为105 bp;参照Lu等^[17]的方法,内参为 β -actin基因,扩增引物为pActin2(+): 5'-TCG TGC GTG ACA TCA AGG AG-3'和pActin2(-): 5'-CGC ACT TCA TGA TGC TGT TG-3',预期扩增产物大小为231 bp。RT-qPCR检测香鱼组织*aCCL4-like*基因mRNA表达的变化,每一样品重复分析3次,采用Stratagene Mx3000P荧光定量PCR仪,25 μ L反应体系包括SYBR Premix Ex Taq (2 \times)缓冲液12.5 μ L,上

下游扩增引物(10 μ mol/L)各1 μ L,模板0.5 μ L,灭菌水10 μ L;反应程序为:重复40个循环,每一程序包括94 $^{\circ}$ C变性30 s,58 $^{\circ}$ C复性30 s和72 $^{\circ}$ C合成30 s。扩增结束后对产物进行熔解曲线分析以确保特异性扩增,反应程序为94 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s和95 $^{\circ}$ C 30 s。荧光定量结果从仪器自带程序MxPro 3.2读取。采用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法^[18]对定量结果进行分析,获得*aCCL4-like*基因mRNA的相对表达量。

1.2.4 *aCCL4-like*基因的原核表达和抗血清制备 根据1.2.2得到的*aCCL4-like*基因序列设计原核表达引物pET-28a-*aCCL4-like*F: 5'-CCG CAT ATG CAA GTT AAT AAG GTG GCC AG-3'和下游引物pET-28a-*aCCL4-like*R: 5'-CCG CTC GAG TCA TGA GGA TTT TGA GTG TTG C-3'(下划线分别为添加的限制性内切酶Nde I和Xho I的识别序列),以香鱼头肾组织cDNA为模板扩增*aCCL4-like*基因ORF全序列,PCR产物切胶纯化后经双酶切插入pET-28a(+)载体,构建重组质粒pET-28a-*aCCL4-like*,转化大肠杆菌BL21 pLys E, IPTG诱导后,12% SDS-PAGE电泳检测。将符合预期大小的目的条带切胶纯化后免疫ICR小鼠,制备抗血清,具体方法参照文献[19]。

1.2.5 Western blot分析 感染鳃利斯顿氏菌的香鱼在0, 4, 8, 12, 24 h时采血清,SDS-PAGE电泳分离蛋白,转PVDF膜,转膜结束后用含10%脱脂奶粉的PBST缓冲液(含1% Tween-20的PBS溶液)37 $^{\circ}$ C封闭2 h。接着用上述缓冲液稀释的一抗(即制备的*aCCL4-like*小鼠抗血清)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,随后将PVDF膜用PBST缓冲液清洗15, 10, 5 min各一次,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(用PBST缓冲液1:5 000稀释),37 $^{\circ}$ C温浴100 min。再用PBST 15, 10, 5 min各洗一次,加上ECL于暗室显影。条带用Quantity One软件进行灰度值计算。

2 结果

2.1 *aCCL4-like*基因cDNA序列分析

测定的*aCCL4-like*基因cDNA序列长405 bp,包含一个完整的大开放阅读框架(ORF),起始于第14-16位的一个ATG起始密码子,终止于第383-385位的一个TGA终止密码子,预测编码一个含123个氨基酸的前肽,分子量约为13.9 kDa,等电点为9.77,前肽的N-末端22个氨基酸为信号肽序列,产生的成熟肽分子量约为11.5 kDa。计算机分析揭示,除斑马鱼序

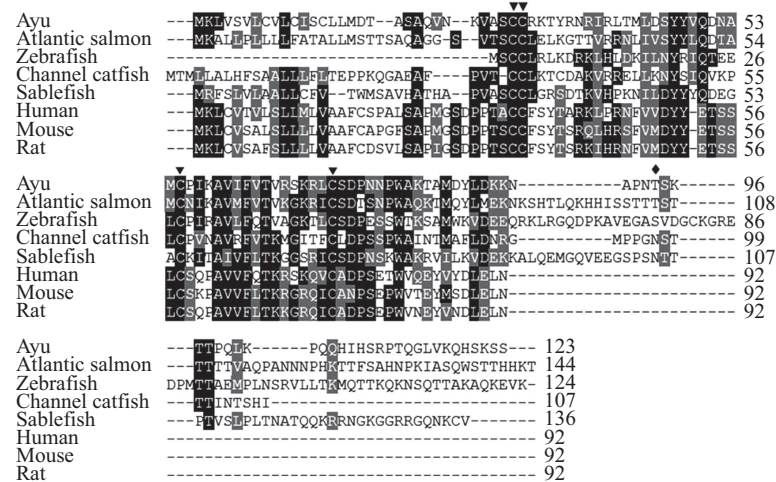
列不全外, 其他序列的N-端均具有信号肽, 成熟肽除C-末端变异明显外, 其余部分高度保守, 趋化因子特征性的4个保守半胱氨酸残基(Cys)位于aCCL4-like第30、31、55和71位, aCCL4-like氨基酸序列第94位的Thr可能是潜在的糖基化位点(图1)。

将香鱼CCL4-like氨基酸序列输入NCBI网站的Blast进行分析, 结果发现aCCL4-like与大西洋鲑

CCL4同源性最高, 为52%; 其次为斑马鱼, 40%; 和斑点叉尾鲷、银鲳以及人、小鼠、大鼠的同源性均低于40%。系统进化树分析也揭示, 香鱼和大西洋鲑的亲缘关系最近, 和哺乳动物远缘相关(图2)。

2.2 aCCL4-like基因mRNA的组织表达与病原感染的相关性

注射鳃利斯顿氏菌8 h内香鱼体表及游动无明显

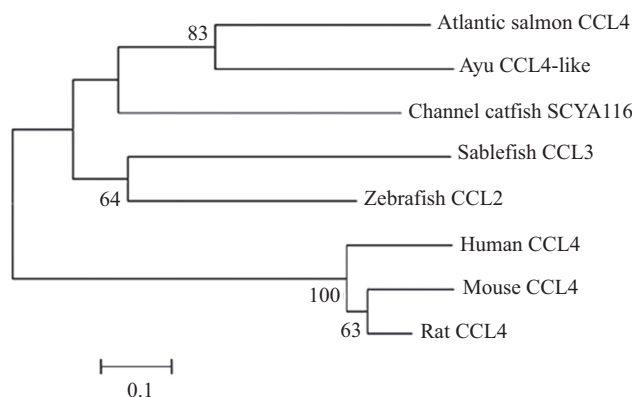


下划线代表各信号肽序列, “▼”所示为保守的半胱氨酸残基, “◆”所示为潜在的苏氨酸糖基化位点, 阴影阈值>70%, 灰色阴影代表相似氨基酸, 黑色阴影代表相同氨基酸。各物种登录号分别为: 香鱼(JP763502)、大西洋鲑(AC167426)、斑马鱼(XP_002667365)、斑点叉尾鲷(ABA54963)、银鲳(ACQ58878)、人(AAI04227)、小鼠(P14097)、大鼠(NP_446310)。

The signal peptide sequences were underlined, the conserved cysteine residues were marked by “▼” and the potential glycosylation site was marked as “◆”, threshold for shading is >70%, similar residues were marked as gray shadow and identical residues were black shadow. Accession numbers of sequences used are: *Plecoglossus altivelis*, JP763502; *Salmo salar*, atlantic salmon: AC167426; *Danio rerio*, zebrafish: XP_002667365; *Ictalurus punctatus*, channel catfish: ABA54936; *Anoplopoma fimbria*, sablefish: ACQ58878; *Homo sapiens*, human: AAI04227; *Mus musculus*, mouse: P14097; *Rattus norvegicus*, rat: NP_446310.

图1 香鱼CCL4-like与其他动物氨基酸序列的多重比对

Fig.1 Multiple alignment of the amino acid sequences of ayu CCL4-like and other animals



分叉处数值表示1 000次重复抽样所得到的置信度百分比, 只显示置信度60%以上的数值; 标尺长度表明每个位点发生0.1次置换。各物种的序列登录号详见图1描述。

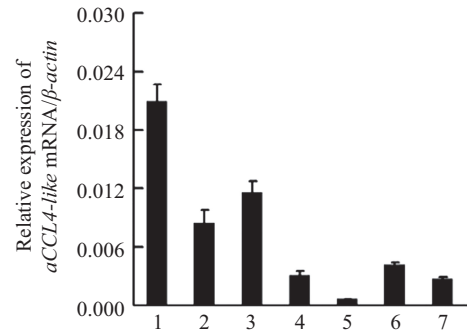
The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data(1 000 replicates; shown only when >60%). The scale bar shows the number of substitutions per site. GenBank accession numbers of sequences used are listed in Fig.1.

图2 基于NJ法构建的香鱼和其他物种CCL4-like系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of ayu and other animal CCL4-like using neighbor-joining method

显异常, 而注射鳃利斯顿氏菌12 h的香鱼游动变缓、反应迟钝, 到感染鳃利斯顿氏菌24 h时, 香鱼体表出现部分溃疡。解剖发现注射鳃利斯顿氏菌8 h的香鱼脾、肾、肝比对照组的明显肿大, 注射鳃利斯顿氏菌12 h和24 h的香鱼腹腔出现大量腹水, 并且肠道充血。注射无菌生理盐水的香鱼没有出现任何异常并且全部存活。

各组样品总RNA抽提后经检测, 其质量符合后续实验要求。RT-qPCR结果表明, *aCCL4-like*基因的mRNA在健康香鱼组织中均有表达, 其中在肝中表达量最高, 其次是脾、头肾组织(图3)。鳃利斯顿氏菌感染后, 香鱼各组织*aCCL4-like*基因mRNA的表

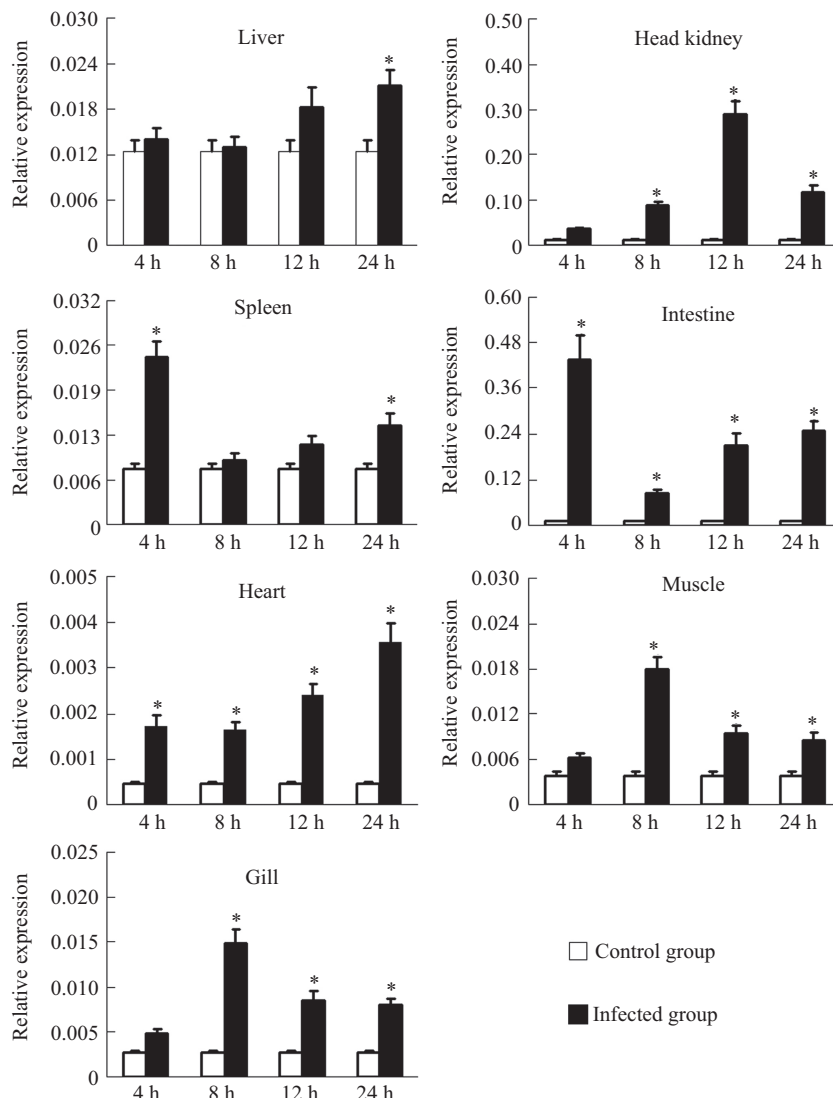


1: 肝; 2: 头肾; 3: 脾; 4: 肠; 5: 心; 6: 肌; 7: 鳃。

1: liver; 2: head kidney; 3: spleen; 4: intestine; 5: heart; 6: muscle; 7: gill.

图3 健康香鱼中*aCCL4-like*基因mRNA的组织表达特征

Fig.3 *aCCL4-like* mRNA expression patterns in healthy ayu



“□”为注射生理盐水的香鱼组织, “■”为注射鳃利斯顿氏菌的香鱼组织; * $P < 0.05$, 与对照组比较($n=3$)。

Normal saline groups were marked as “□”, and tissues infected with *L. anguillarum* groups were marked as “■”; * $P < 0.05$ vs control group($n=3$).

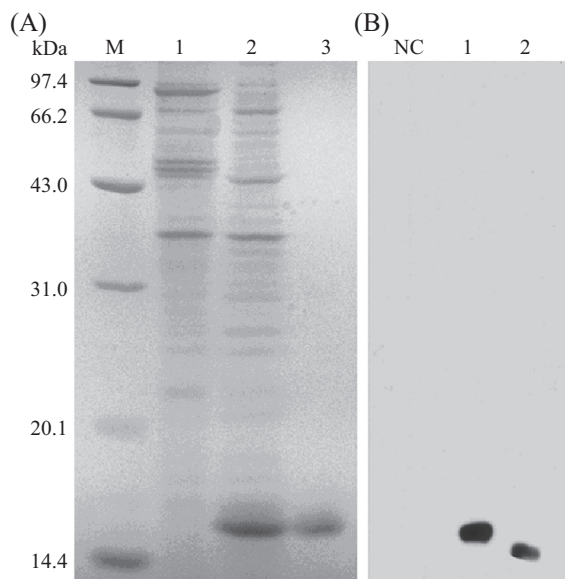
图4 实时荧光定量PCR分析鳃利斯顿氏菌感染前后香鱼的组织*aCCL4-like*基因mRNA表达变化

Fig.4 Real-time quantitative PCR analysis of *aCCL4-like* transcripts in various ayu tissues upon *L. anguillarum* infection

达均显著增加, 但各时间点变化不一。4 h时, 肠道aCCL4-like基因mRNA表达增加最为明显, 约为注射生理盐水组的43倍, 脾脏和心脏aCCL4-like基因mRNA表达增加分别为注射生理盐水组的3.03和3.66倍, 其余组织无显著性变化; 头肾、鳃、肌肉中到8 h时aCCL4-like基因mRNA才有显著性表达上调; 而肝中直到24 h时aCCL4-like基因mRNA才显著性上调。总体上, 病原感染后, 香鱼肠aCCL4-like基因mRNA表达上调倍数最为显著, 表达量也最高(图4)。

2.3 aCCL4-like的原核表达和抗血清制备

重组质粒pET-28a-aCCL4-like转化大肠杆菌BL21 pLys E后, 经IPTG诱导后, SDS-PAGE分离发现有特异的蛋白条带被诱导表达, 计算分子量约为16 kDa(图5A), 比目标融合蛋白的预期大小(11.5 kDa



A: SDS-PAGE检测aCCL4-like基因的原核表达, 考马斯亮蓝G-250染色。M: 低相对分子质量标准蛋白质(kDa); 1: 转化有pET-28a(+)-质粒的BL21 pLys E, IPTG诱导; 2: 转化有pET-28a-aCCL4-like重组质粒的BL21 pLys E, IPTG诱导; 3: 诱导蛋白条带的切胶纯化产物; B: Western blot检测aCCL4-like抗血清特异性, ECL显影。NC: 空白阴性对照; 1: 原核表达产物; 2: 香鱼血清。

A: SDS-PAGE analysis of prokaryotic expressed aCCL4-like, stained by Coomassie brilliant blue G-250. M: protein molecular weight standards (kDa); 1: pET-28a(+)-transformed BL21 pLys E, induced by IPTG; 2: pET-28a-aCCL4-like-transformed BL21 pLys E, induced by IPTG; 3: purified recombinant aCCL4-like; B: the test of prepared aCCL4-like antiserum by Western blot through ECL developing. NC: negative control, 1: the production of prokaryotic expression; 2: ayu serum.

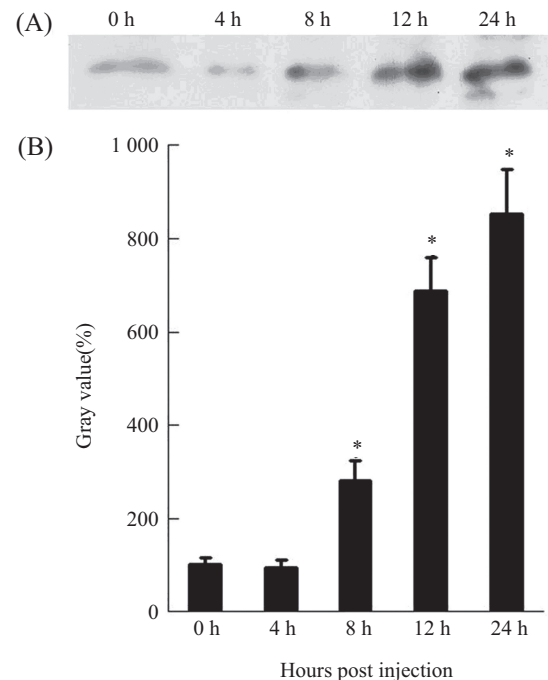
图5 aCCL4-like基因的原核表达和抗血清验证

Fig.5 Prokaryotic expression of aCCL4-like and the test of prepared antiserum

aCCL4-like成熟肽+2.2 kDa His-tag)大2.3 kDa左右, 这是由于His-tag中的碱性氨基酸作用造成蛋白在SDS-PAGE中迁移变慢, 导致测得的分子量偏大^[20]。随后特异诱导条带切胶纯化, 用于免疫小鼠制备抗血清。所制备的抗血清能与预期大小的原核表达产物及香鱼血清中分子量约为15 kDa的蛋白条带发生特异性结合(图5B), 后者分子量比计算值明显偏大, 可能是由于糖基化引起的^[21-22]。

2.4 Western blot检测病原感染相关的香鱼血清中aCCL4-like含量变化

分别采集鳃利斯顿氏菌腹腔注射感染0, 4, 8, 12, 24 h的血清, 用Western blot检测血清中aCCL4-like含量的变化并分析。结果表明, 与0 h相比, 感染4 h时香鱼血清aCCL4-like含量未发生显著变化; 8 h时含量显著增加($P < 0.05$), 并随着感染时间延长持续增加, 24 h时已增至注射生理盐水组的5.57倍(图6)。



A: 各时间点香鱼血清aCCL4-like蛋白的Western blot反应条带; B: Western blot条带相对量图示。* $P < 0.05$ 。

A: Western blot analysis of ayu serum aCCL4-like in different time points post *L.anguillarum* infection; B: relative quantification of serum aCCL4-like based on the Western blot results shown in A. * $P < 0.05$.

图6 Western blot检测香鱼血清aCCL4-like蛋白表达变化与鳃利斯顿氏菌侵染的相关性

Fig.6 Expression changes analysis of ayu serum aCCL4-like during *L.anguillarum* infection by Western blot

3 讨论

CC趋化因子是具有多种功能的分泌型小分子细胞因子,在哺乳动物及某些鱼类中被广泛克隆并报道。本文首次测定了*aCCL4-like*基因的cDNA序列。序列分析揭示,*aCCL4-like*具有趋化因子特征性的4个保守半胱氨酸残基,与大西洋鲑同源性最高,为52%;系统进化树分析表明,香鱼和大西洋鲑CCL4紧密成簇。

组织表达特征分析揭示,*aCCL4-like*基因mRNA在未注射鳃利斯顿氏菌的香鱼脾、肝、头肾、鳃、心脏、肌肉和肠等7个检测组织中均有不同程度的表达,并且在与免疫相关的肝、脾组织中表达量最为明显。已知鱼类大部分CC趋化因子为广谱性表达^[14],如鲤CC趋化因子(CCL-C5a样)在脑、皮肤、肝脏、肌肉、脾、头肾、体肾、肠、腮和心脏10个组织中均表达^[23];草鱼CC趋化因子CCL4在脾、心、肌、鳃、肝、肾、肠、脑中均有表达^[14];斑点叉尾鲷CC趋化因子(SCYA101-126)在肝、脾、头肾、胃、肠、肾、鳃、皮肤、卵巢9种组织中表达^[13];大西洋鲑CC趋化因子GmSCYA101、GmSCYA102、GmSCYA106a,b、GmSCYA108等在免疫相关的头肾、肝、脾、血中均表达^[5]。

鳃利斯顿氏菌是养殖香鱼弧菌病的主要病原之一^[15],本文通过香鱼人工感染鳃利斯顿氏菌发现,*aCCL4-like*基因的mRNA表达及血清中*aCCL4-like*的蛋白含量变化均与此菌感染香鱼过程紧密相关,暗示*aCCL4-like*可能参与到鱼类抗细菌感染的免疫反应中。有研究表明,CC趋化因子在抵抗外界病原菌入侵引发的组织损伤即所谓的炎症反应中发挥着重要作用。例如,鲩鱼的CC趋化因子MimiCC2能对鳃利斯顿氏菌感染产生应答,其免疫相关组织的MimiCC2 mRNA表达水平呈现上升趋势^[24]。炎症、缺氧再灌注以及LPS刺激等可以激活CC趋化因子招募单核/巨噬细胞和T淋巴细胞等定向迁移至损伤或感染部位,发挥吞噬作用消除病原体^[25-27]。Borza等^[5]分别用杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)以及pI:C的PBS悬液腹腔注射大西洋鲑,结果表明所检测的12个CC趋化因子在肝、脾、头肾、血中的表达几乎都显著上调,暗示这些大西洋鲑CC趋化因子可能作为炎症因子参与由外界刺激引起的白细胞应答过程。本文数据显示,鳃利斯顿氏菌感染香鱼后,各组织*aCCL4-like*基因mRNA的表达均有显著变化(图

4)。特别是肠,与对照组相比,病原感染后其表达量显著增加,感染4 h时即达到43倍,24 h时仍显著高于对照组,揭示*aCCL4-like*可能在鱼类抗细菌感染反应中对肠的保护起到重要作用。肠道是黏膜免疫系统的主要器官,早期研究表明,人的肠道黏膜在健康状态下就存在大量的巨噬细胞,当发生组织损伤炎症反应时,肠道黏膜内的部分CC和CXC趋化因子就被激活用以募集更多的白细胞与原有的免疫细胞一起抵抗炎症^[28-29]。肠道*aCCL4-like*基因mRNA的表达变化很可能是由于腹腔注射细菌导致邻近的肠道组织最先被感染,其黏膜免疫迅速被激活的原因。鳃利斯顿氏菌感染后的香鱼血清CCL4-like蛋白含量在炎症初期变化不大,感染8 h后显著增加,24 h已达到对照的5.57倍,揭示随着全身性炎症反应的加剧,机体需要更多的*aCCL4-like*或用以招募大量巨噬细胞吞噬病原菌,缓解炎症。

综上所述,本文通过对*aCCL4-like*序列测定、组织表达变化分析和对感染鳃利斯顿氏菌后的*aCCL4-like*表达变化分析,为进一步研究鱼类趋化因子的结构、功能和作用机理奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, *et al.* Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* 2003; 21(1): 48-9.
- 2 Hyduk SJ, Chan JR, Duffy ST, Chen M, Peterson MD, Waddell TK, *et al.* Phospholipase C, calcium, and calmodulin are critical for $\alpha 4\beta 1$ integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. *Blood* 2007; 109(1): 176-84.
- 3 Peatman E, Liu ZJ. Evolution of CC chemokines in teleost fish: A case study in gene duplication and implications for immune diversity. *Immunogenetics* 2007; 59(8): 613-23.
- 4 Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 2006; 7(12): 243.
- 5 Borza T, Stone C, Rise ML, Bowman S, Johnson SC. Atlantic cod (*Gadus morhua*) CC chemokines: Diversity and expression analysis. *Dev Comp Immunol* 2010; 34(8): 904-13.
- 6 Nomiya H, Hieshima K, Osada N, Kato-Unoki Y, Otsuka-Ono K, Takegawa S, *et al.* Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: Identification of a novel chemokine subfamily CX. *BMC Genomics* 2008; 9: 222.
- 7 Kuroda N, Uinuk-ool TS, Sato A, Samonte IE, Figueroa F, Mayer WE, *et al.* Identification of chemokines and a chemokine receptor in cichlid fish, shark, and lamprey. *Immunogenetics* 2003; 54(12): 884-95.
- 8 Yoshimura T, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood

- mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. FEBS Lett 1989; 244(2): 487-93.
- 9 Zach OR, Bauer HC, Richter K, Webersinke G, Bauer H. Sequence of the porcine full-length cDNA encoding ribosomal protein rpS12. Gene 1995; 159(2): 277-8.
- 10 Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, *et al.* Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(26): 16899-903.
- 11 Laing KJ, Secombes CJ. Trout CC chemokines: Comparison of their sequences and expression patterns. Mol Immunol 2004; 41(8): 793-808.
- 12 Peatman E, Liu ZJ. CC chemokines in zebrafish: Evidence for extensive intrachromosomal gene duplications. Genomics 2006; 3(88): 381-5.
- 13 Bao BL, Peatman E, Peng X, Baoprasertkul P, Wang GL, Liu ZJ. Characterization of 23 CC chemokine genes and analysis of their expression in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Dev Comp Immunol 2006; 9(30): 783-96.
- 14 王丽坤, 王娜, 马梅生, 胡成钰. 草鱼CCL4基因的克隆及表达. 南昌大学学报(理科版)[Wang Likun, Wang Na, Ma Meisheng, Hu Chengyu. Cloning and Expression of CCL4 in Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idellus*). J Nanchang Univ(Natl Sci)] 2009; 33(2): 181-4.
- 15 李长红, 陈炯, 史雨红, 李明云. 宁海地区香鱼弧菌病原菌鉴定. 微生物学报(Li Changhong, Chen Jiong, Shi Yuhong, Li Mingyun. Characterization of *Listonella anguillarum* as the aetiological agent vibriosis occurred in cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Ninghai country, China. Acta Microbiol Sin) 2009; 49(7): 931-37.
- 16 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24(8): 1596-99.
- 17 Lu XJ, Chen J, Huang ZA, Shi YH, Lv JN. Identification and characterization of a novel cathelicidin from ayu, *Plecoglossus altivelis*. Fish Shellfish Immunol 2011; 31(1): 52-7.
- 18 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 2008; 3(6): 1101-8.
- 19 黄左安, 陈炯, 陆新江, 史雨红, 李明云. 香鱼凝血因子X基因表达与鳃利斯顿氏菌感染的相关性研究. 动物学研究(Huang Zuohan, Chen Jiong, Lu Xinjiang, Shi Yuhong, Li Mingyun. Alteration on the expression of ayu coagulation factor X gene upon *Listonella anguillarum* infection. Zool Res) 2011; 32(5): 492-8.
- 20 唐威华, 张景六, 王宗阳, 洪孟民. SDS-PAGE法测定His-tag融合蛋白分子量产生偏差的原因. 植物生理学报(Tang Weihua, Zhang Jingliu, Wang Zongyang, Hong Mengmin. The cause of deviation made in determining the molecular weight of His-tag fusion proteins by SDS-PAGE. Acta Phytophysiol Sin) 2000; 26(1): 64-9.
- 21 Menten P, Wuyts A, Damme JV. Macrophage inflammatory protein-1. Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13(6): 455-81.
- 22 Henry OY, Cullen DC, Piletsky SA. Optional interrogation of molecularly imprinted polymers and development of MIP sensors: A review. Anal Bioanal Chem 2005; 382(4): 947-56.
- 23 汪金兔, 李炯棠, 万玉美, 冀培丰, 崔润滋, 张研, 等. 鲤CC型趋化因子CCL_C5a样基因的克隆组织表达与进化分析. 农业生物技术学报(Wang Jintu, Li Jiongtang, Wan Yumei, Ji Peifeng, Cui Runzi, Zhang Yan, *et al.* Cloning, tissue expressions and evolutionary analysis of *Cyprinus carpio* CC chemokine CCL-C5a-like Gene. J Agric Biotech) 2012; 20(4): 426-35.
- 24 Xu TJ, Cheng YZ, Shi G, Wang RX. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a disease-resistance related CC chemokine gene in miuiy croaker (*Miichthys miuiy*). Aquaculture 2011; 318(1): 25-32.
- 25 Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. Nat Immunol 2001; 2(2): 108-15.
- 26 Watts M, Munday BL, Burke CM. Immune responses of teleost fish. Aus Vet J 2008; 79(8): 570-74.
- 27 Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WH, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. J Immunol 1997; 158(9): 4129-36.
- 28 Heinsbroek SE, Gordon S. The role of macrophages in inflammatory bowel diseases. Expert Rev Mol Med 2009; 11: e14.
- 29 Kolios G, Lira-Current SA. Chemokines and their receptors in gut homeostasis and disease. Immunol Rev 2011; 7(3): 271-9.